

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

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

NOTICE

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

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

c-Myc dans le développement rénal et la polykystose rénale autosomique dominante

présentée par :
Martin Couillard

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Timothy L. Reudelhuber, président-rapporteur
Marie Trudel, directeur de recherche
Jerry Pelletier, membre du jury
Ying-Zhen Chen, examinateur externe
Véronique Phan, représentant du doyen de la FES



Résumé

La polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD) est principalement caractérisée par la formation bilatérale de kystes rénaux. Elle est causée par des mutations dans le gène *Pkd1* dans 85% des cas. Une majorité de kystes démontre une surexpression de *Pkd1*, β -caténine et *c-myc* qui sont associés à des taux anormalement élevés de prolifération et d'apoptose. Ces cellules épithéliales kystiques semblent dédifférenciées, suggérant une persistance d'expression de gènes fœtaux comme *c-myc* au stade adulte. En effet, l'expression rénale de *c-myc* est normalement élevée au cours de l'embryogenèse pour ensuite diminuer chez l'adulte. Cependant, la fonction de *c-myc* dans le développement du rein et de l'ADPKD demeure inconnue. Nous avons premièrement analysé son rôle dans le rein murin embryonnaire et adulte. Nos résultats démontrent que *c-Myc* est essentiel au développement rénal. Son inactivation conditionnelle dans le mésenchyme métanéphrique provoque la formation de reins embryonnaires hypoplasiques due à une réduction du taux de prolifération des cellules progénitrices, alors que sa perte dans l'épithélium mature n'affecte pas l'homéostasie rénale. Deuxièmement, nous avons évalué le rôle de *c-myc* dans l'ADPKD à l'aide des modèles murins SBM et SBPkd1_{TAG} qui surexpriment respectivement *c-myc* et *Pkd1* aux reins. Nous avons déterminé que *c-myc* active une nouvelle voie apoptotique indépendante de *FasL/Fas* dans l'épithélium rénal kystique des souris SBM. Ensuite, nous avons démontré que l'expression de *c-myc* et β -caténine est élevée dans les reins SBPkd1_{TAG}. Nos données supportent un modèle par lequel une surexpression de *Pkd1* stabilise la β -caténine cytoplasmique, permettant sa translocation au noyau pour activer l'expression de *c-myc*. De plus, l'inactivation de *c-myc* dans les reins SBPkd1_{TAG} améliore le phénotype kystique en diminuant les taux de prolifération cellulaire et d'apoptose. En conclusion, nous avons démontré que *c-myc* est essentiel au développement du rein et que son expression est stimulée dans la kystogenèse induite par une surexpression de *Pkd1*. Notre étude propose que *c-myc* pourrait être la cible d'une stratégie thérapeutique afin de contrer la progression de cette maladie.

Mots-clés : prolifération, apoptose, mésenchyme métanéphrique, épithélium, β -caténine

Abstract

The autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is characterized by bilateral kidney cysts formation. Mutations in *Pkd1* gene occur in 85% cases. In a majority of cysts, an overexpression of *Pkd1*, β -catenin and *c-myc* was observed and associated with high levels of cellular proliferation and apoptosis. These cystic epithelial cells seem dedifferentiated, suggesting that ADPKD may result from a failure of epithelial cells to fully differentiate and/or switch out of the renal developmental program. Normally, *c-myc* expression is elevated during renal development and reduced in adult kidney. However, the role of *c-myc* in kidney development and ADPKD is still unclear. We first analyzed *c-myc* function during renal organogenesis and adulthood. Our results suggest that *c-myc* is essential for kidney development. Its conditional deletion in metanephric mesenchyme resulted in renal hypoplasia due to reduced cellular proliferation, whereas its loss in mature epithelium was dispensable to renal homeostasis. Next, the role of *c-myc* in ADPKD was examined using the murine models SBM and SBPkd1_{TAG} that overexpress respectively *c-myc* and *Pkd1* in the kidney. We have determined that *c-myc* induced a new apoptotic pathway independent of *FasL/Fas* in cystic epithelium of SBM mice. In parallel, we showed that *c-myc* and β -catenin were highly expressed in SBPkd1_{TAG} kidneys. Our data proposed a mechanism in which *Pkd1* overexpression stimulates nuclear translocation of β -catenin where it can activate *c-myc* expression. Furthermore, inactivation of *c-myc* in SBPkd1_{TAG} mice leads to a partial rescue of the cystic phenotype due to a reduction of cellular proliferation and apoptosis. In conclusion, *c-myc* and β -catenin are both essential for renal development and are part of a common signaling pathway induced by *Pkd1* in ADPKD. This pathway could constitute a potential target for therapies aiming to counteract the progression of this disease.

Keywords : proliferation, apoptosis, metanephric mesenchyme, epithelium, β -catenin

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvi
I INTRODUCTION.....	1
I.1 Le développement rénal des mammifères.....	2
I.1.1 Développement du pro- et mésonéphros.....	2
I.1.2 Développement du métanéphros.....	3
I.1.3 Les gènes régulateurs du développement rénal.....	5
I.1.4 Les malformations du rein.....	12
I.2 Les maladies génétiques rénales polykystiques.....	15
I.2.1 La polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD).....	17
I.2.2 La polykystose rénale autosomique récessive (ARPKD).....	18
I.2.3 Les néphronophties et les maladies kystiques de la médulla rénale.....	19
I.2.4 Les syndromes Bardet-Biedl et de Joubert.....	20
I.2.5 Le syndrome de Meckel.....	21
I.2.6 Le syndrome orofaciodigital.....	21
I.2.7 Kystes rénaux et syndrome diabétique.....	21
I.2.8 La sclérose tubéreuse.....	22
I.2.9 Le syndrome tumoral von Hippel-Lindau.....	22
I.3 Pathogenèse de la formation des kystes rénaux.....	23
I.3.1 Prolifération et apoptose.....	23
I.3.2 La matrice extracellulaire.....	25

I.3.3	Polarité épithéliale	25
I.3.4	Mécanosensation par le cil primaire	26
I.4	Gènes mutés dans l'ADPKD	27
I.4.1	Structure des gènes <i>PKD1</i> et <i>PKD2</i>	27
I.4.2	Mutations dans les gènes <i>PKD1</i> et <i>PKD2</i>	29
I.4.3	Mécanismes pathogénétiques de l'ADPKD.....	31
I.5	Analyses moléculaires des polycystines dans l'ADPKD.....	33
I.5.1	La famille des polycystines.....	33
I.5.2	Structure et interactions protéiques des polycystines	35
I.5.3	L'expression endogène des polycystines	42
I.5.4	L'expression des polycystines dans l'ADPKD.....	45
I.6	Voies de signalisation de la polycystine-1	45
I.6.1	Régulation de l'influx de calcium.....	46
I.6.2	Activation des petites protéines G hétérotrimériques	47
I.6.3	La voie des Wnt	48
I.6.4	La voie mTOR	52
I.6.5	La voie JAK/STAT	52
I.6.6	Translocation nucléaire de la région carboxy-terminale de la PC1	53
I.7	Modèles murins de polykystose rénale	53
I.7.1	Mutants spontanés, insertionnels et chimiquement induits.....	54
I.7.2	Ablations géniques et transgéniques	57
I.7.3	Analyses fonctionnelles de <i>Pkd1</i> et <i>Pkd2</i>	59
I.7.4	Essai de traitements précliniques sur les modèles murins	65
I.8	Le facteur de transcription <i>c-myc</i> et les membres de la famille <i>Myc</i>	70
I.8.1	Historique des membres de la famille <i>Myc</i>	70
I.8.2	Structure génomique et protéique de <i>Myc</i>	70
I.8.3	Partenaires de <i>Myc</i> dans la régulation transcriptionnelle	71
I.8.4	Fonctions cellulaires de <i>Myc</i>	73

I.8.5	Rôle de <i>Myc</i> dans le développement.....	78
I.9	Hypothèses et mise en situation.....	86
I.9.1	Hypothèse 1 : L'apoptose induite par <i>c-myc</i> est dépendante de l'interaction FasL/Fas <i>in vivo</i>	86
I.9.2	Hypothèse 2 : <i>c-myc</i> joue un rôle dans l'organogenèse rénale	87
I.9.3	Hypothèse 3 : <i>c-myc</i> est un joueur important dans la polykystose rénale induite par une surexpression de <i>Pkd1</i>	87
I.9.4	Hypothèse 4 : β -caténine est essentielle au développement rénal	88
II	RÉSULTATS.....	89
	Avant propos et contribution des auteurs.....	90
II.1	C-MYC-INDUCED APOPTOSIS IN POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE IS INDEPENDENT OF FASL/FAS INTERACTION.....	91
II.2	C-MYC AS A KIDNEY DEVELOPMENTAL REGULATOR.....	114
II.3	CYSTOGENESIS INDUCED BY PKD1 OVEXPRESSION STIMULATES β - CATENIN/C-MYC PATHWAY	137
II.4	β -CATENIN REGULATES DEVELOPMENT AND HOMEOSTASIS OF THE KIDNEY	169
III	DISCUSSION.....	191
III.1	Rôle de <i>c-myc</i> dans le développement rénal	192
III.1.1	La perte de <i>c-myc</i> cause une réduction de la taille des reins associée à l'hypoplasie rénale	193
III.2	Rôle de la β -caténine dans le développement rénal.....	196
III.3	Rôle de la voie β -caténine/ <i>c-myc</i> dans le développement rénal	198
III.3.1	Coopération de la voie β -caténine/ <i>c-myc</i> dans la prolifération et le maintien des cellules souches rénales	199
III.3.2	Différents rôles de la β -caténine et de <i>c-myc</i> dans l'épithélium rénal mature	201
III.4	Rôle de <i>c-myc</i> et de la β -caténine dans l'ADPKD	203

III.4.1	La voie β -caténine/ <i>c-myc</i> est impliquée dans le déclenchement de la kystogenèse	203
III.4.2	Rôle de <i>c-myc</i> et de la β -caténine dans le mécanisme pathogénétique de gain et perte de fonction de <i>Pkd1</i>	208
III.4.3	Perspectives à court terme	209
III.4.4	Perspectives à long terme.....	210
CONCLUSION.....		214
BIBLIOGRAPHIE		216
IV	ANNEXES	I
IV.1	ANNEXE 1 Délétion conditionnelle rénale.....	II
IV.2	ANNEXE 2 Mécanisme de l'hypoplasie rénale	V
IV.3	ANNEXE 3 Activation de la voie canonique des Wnt dans les reins embryonnaires et adultes.....	IX
IV.4	ANNEXE 4 Expression de <i>c-myc</i> et β -caténine dans un modèle de perte de fonction de <i>Pkd1</i>	X
IV.5	ANNEXE 5 La souris transgénique <i>SBC</i>	XI

Liste des tableaux

Tableau I-I : Phénotypes ou syndromes associés à des mutations dans des gènes régulateurs du développement rénal.....	14
Tableau I-II : Les maladies kystiques humaines du rein	16
Tableau I-III : La répartition des mutations dans les gènes <i>PKD1</i> et <i>PKD2</i>.....	29
Tableau I-IV : La famille des polycystines	34
Tableau I-V : Partenaires protéiques de la polycystine-1	39
Tableau I-VI : Partenaires protéiques de la polycystine-2.....	41
Tableau I-VII : Modèles murins de la polykystose rénale par mutations spontanées, insertionelles et chimiquement induites.....	56
Tableau I-VIII : Modèles murins de la polykystose rénale par ablations géniques	58
Tableau I-IX : Modèles murins de la polykystose rénale par transgénèse.....	59
Tableau I-X : Mutagenèse murine de <i>Pkd1</i>	63
Tableau I-XI : Mutagenèse murine de <i>Pkd2</i>.....	65
Tableau I-XII : Interventions thérapeutiques dans les modèles de PKD	66
Tableau I-XIII : Exemples des gènes cibles de <i>Myc</i> et leurs fonctions	74
Tableau I-XIV : Dérégulation de l'expression de <i>Myc</i> chez la souris	81
Tableau IV-I : Promoteurs <i>Cre</i> rénaux-spécifiques.....	III
Tableau IV-II : Hypoplasie rénale chez la souris.....	VI
Tableau IV-III :Hypodysplasie rénale chez la souris	VII

Liste des figures

Figure I-1 : Développement rénal précoce chez la souris.....	3
Figure I-2 : Étapes séquentielles de la néphrogenèse	4
Figure I-3 : Gènes régulateurs de l'induction du bourgeon urétéral.....	7
Figure I-4 : Gènes régulateurs du branchement du bourgeon urétéral et de l'induction du mésenchyme et du stroma.....	10
Figure I-5 : Aspect macroscopique d'un rein polykystique	18
Figure I-6 : Structure protéique proposée pour la polycystine 1 et 2 (PC1 et PC2)....	35
Figure I-7 : Voies de signalisation induites par les polycystines.....	46
Figure I-8 : Modèle de la régulation de la voie des Wnt par le cil primaire rénal.....	51
Figure I-9 : La protéine c-Myc	71
Figure I-10 : Régulation transcriptionnelle par Myc	72
Figure I-11 : Voies de signalisation apoptotique de <i>c-myc</i>	77
Figure I-12 : Expression rénale de <i>c-myc</i> et <i>N-myc</i>.....	84
Figure III-1 : Modulation de la voie β-caténine/<i>c-myc</i> en fonction des niveaux d'expression de la polycystine-1	206
Figure IV-1 : Détection de la signalisation β-caténine dans les reins embryonnaires et adultes des souris rapporteuses Tcf-LacZ.	IX
Figure IV-2 : Surexpression de <i>c-myc</i> et β-caténine dans les reins des embryons <i>Pkd1</i>^{-/-}	X
Figure IV-3 : Schématisation du transgène <i>SBC</i>	XI

Liste des abréviations

A, C, G, T :	adénine, cytosine, guanine, thymine
AC :	domaine acide
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADPKD :	polykystose rénale autosomique dominante
AEBSF :	<i>4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride</i>
Alk3 :	<i>activin-like kinase-3</i>
AMPc :	adénosine monophosphate cyclique
AP-1 :	<i>activator protein-1</i>
Apaf1 :	<i>apoptotic protease-activating factor 1</i>
APC :	<i>adenomatous polyposis coli</i>
ARN :	acide ribonucléique
ARN pol II :	acide ribonucléique polymérase II
ARPKD :	polykystose rénale autosomique récessive
Bmp :	bone morphogenetic proteins
Bpk :	<i>BAL/C polycystic kidneys</i>
BR/HLH/LZ	<i>basic region/helix-loop-helix/leucine-zipper</i>
BU :	bourgeon urétéral
CAKUT :	<i>congenital anomalies of the kidney and urinar tract</i>
Cdk :	kinases cycline-dépendante
CLD :	domaine lectine de type C
Cpk :	<i>congenital polycystic kidneys</i>
CRR :	domaine riche en cystéines
Csf :	<i>colony-stimulating factor</i>
CTT :	queue carboxy-terminale de la PC1
DPA :	diphénylamine
DR4-5 :	<i>death receptor 4 or 5</i>
Dvl :	<i>dishevelled</i>
Egf :	<i>epidermal growth factor</i>
Egfr :	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ERK :	<i>extracellular signal-regulated protein kinase</i>
<i>et al.</i>	et collaborateurs
Eya1 :	<i>eyes absent homolog 1</i>
Fadd :	<i>Fas-associated death domain</i>
FAK :	<i>focal adhesion kinase</i>
Fgf :	<i>fibroblast growth factor</i>
GFR α 1 :	glycophosphatidylinositol
Gndf :	<i>glial-derived neurotrophic factor</i>
Gpc3 :	glypican-3
GPCR :	récepteurs couplés aux protéines G

GSK-3 β :	<i>Glycogen synthase kinase -3β</i>
GPS :	<i>GPCR proteolytic site</i>
HAT :	histones acétyltransférases
HDAC :	histones deacetylases
HDR :	<i>hypoparathyroidism, sensorineural deafness, and renal disease</i>
HG :	<i>homologous gene</i>
hGF :	<i>hormone growth factor</i>
Hgf :	<i>hepatocyte growth factor</i>
Hnf-1 β :	<i>hepatocyte nuclear factor-1β</i>
HSC :	<i>Hematopoietic stem cells</i>
Igf1 :	<i>insulin-like growth factor</i>
InsP3 :	inositol-1,4,5-triphosphate
Inv :	inversine
IRC :	insuffisance rénale chronique
JAK :	<i>janus kinase</i>
jck :	<i>juvenile cystic kidney</i>
jcpk :	<i>juvenile congenital polycystic kidney</i>
JNK :	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kat :	<i>kidney, anemia, testes</i>
Kgf :	<i>Keratinocyte growth factor</i>
Kif3A:	<i>kinesine superfamily proteins 3A</i>
LDL-A :	lipoprotéines de basse densité-A
Lef :	<i>Lymphoid enhancer factor</i>
Lif :	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LRR :	répétitions riches en leucines
MAPK :	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MCD :	maladies kystiques de la médulla
MDCK :	<i>Mardin-Darby canine kidney cells</i>
MET:	transition du mésenchyme à l'épithélium
MKS :	syndrome de Meckel
MM :	mésenchyme métanéphrique
MODY5 :	<i>maturity-onset diabetes of the young</i>
MOMP :	perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie
mTOR :	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NDGA :	<i>nordihydroguaiaretic acids</i>
NFAT :	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-kappaB :	<i>nuclear factor-kappaB</i>
NIMA :	<i>never in mitosis A</i>
NPC :	<i>Neuronal progenitor cells</i>
NPHP:	néphronophthisie
Odd :	<i>odd-skipped related 1</i>
OFD1 :	syndrome orofaciodigital de type 1

Orpk :	<i>oak Ridge polycystic kidneys</i>
PBP :	<i>polycystic break point</i>
PC1 :	<i>polycystine-1</i>
PCP :	<i>polarité cellulaire planaire</i>
Pcy :	<i>polycystic</i>
Pdgf :	<i>platelet-derived growth factor</i>
PG-E ₂ :	<i>prostaglandines E₂</i>
Pi3K :	<i>phosphatidyl-inositol-3-kinase</i>
PKA :	<i>protéine kinase A</i>
PKC :	<i>protéine kinase C</i>
Pkhd1 :	<i>polycystic kidney and hepatic disease 1</i>
PLAT :	<i>polycystine-1, lipo-oxygénase, alpha toxine</i>
PPAR γ :	<i>peroxisome proliferative activated receptor gamma</i>
QTL :	<i>loci liés à un caractère quantitatif</i>
REJ :	<i>receptor for egg jelly</i>
RGS7 :	<i>regulators of G-protein signaling</i>
RIP :	<i>regulated intramembrane proteolysis</i>
Siah :	<i>Sina-Seven in absentia homolog</i>
Six :	<i>Sina oculis</i>
STAT :	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TCF :	<i>T-cell factor</i>
Tgf :	<i>Transforming growth factor</i>
TM :	<i>domaine transmembranaire</i>
TRAIL :	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRP :	<i>transient receptor potential</i>
TRRAP :	<i>Transactivation-transformation domain-associated protein</i>
Tnfa :	<i>Tumour necrosis factor α</i>
Tnfr :	<i>Tumour necrosis factor α receptor</i>
Tsc2 :	<i>Tuberous Sclerosis 2</i>
VACC α 1E :	<i>sous-unité alpha du canal calcique voltage dépendant</i>
Vegf :	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VHL :	<i>von Hippel-Lindau</i>
Wpk :	<i>Wistar polycystic kidneys</i>
WSC1 :	<i>cell wall integrity and stress component protein</i>
Wt1 :	<i>Wilm's tumor 1</i>

À Marie-Claude et mon fils Samuel

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier tout le jury d'examen pour le temps investi à la lecture de ma thèse. Je dois également remercier les membres permanents de mon comité d'évaluation, les docteurs, Timothy L. Reudelheuber, Jerry Pelletier, Gerardo Ferbeyre, et Jean-Philippe Gratton. Mes remerciements à ma directrice de thèse Dre Marie Trudel, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir dirigé mes travaux de façon constructive. Merci aussi à tous les membres du laboratoire Trudel, présents et passés dont la présence, le support et l'encouragement ont été pour moi une motivation et une inspiration à persévérer dans l'adversité. Merci donc, sans ordre précis, à Richard Guillaume, Marie-Josée Blouin, Caroline Thivierge, Hugues Beauchemin, Olivier Côté, Almira Kurbegovic, Hady Felfly, Marthe-Sandrine Eiyimo Mwa Mpollo. Je voudrais également remercier les gens du laboratoire du Dr Jean Vacher, dont Jean Vacher lui-même, Mathieu Ferron, Monica Pata, Janie Beauregard et Céline Hérault pour leurs critiques constructives sur mes travaux. Plusieurs professionnels de l'institut m'ont été d'une grande aide incalculable et pour n'en citer que certains : Annie Vallée, Dominic Fillion, Mylène Cawthorn, Daniela Baggio, Nicole Campeau et Claudia Jones.

D'un point de vue plus personnel, je tiens à remercier toute ma famille, incluant ma petite famille : mon fils Samuel de m'avoir si gentiment interrompu pendant l'écriture de ma thèse et une note toute particulière à la femme de ma vie, Marie-Claude, sans qui l'écriture de cette thèse aurait été impossible. Je vais me souvenir à jamais de son soutien inestimable au long de mes études. Finalement, je veux dire un gros merci à mes amis, Simon, Patrick et Bastien ainsi que mon équipe de hockey et de soccer (MU) qui ont été une grande source d'énergie.

I INTRODUCTION

I.1 Le développement rénal des mammifères

I.1.1 Développement du pro- et mésonéphros

Le rein mammalien dérive du mésoderme intermédiaire où la formation du canal pronéphrique débute vers le 22^e jour de gestation chez l'homme ou le 8^e jour embryonnaire (e8.0) chez la souris. Ce tube épithélial bilatéral s'étend en direction caudale pour atteindre le cloaque, une région terminale commune au canal intestinal et au canal urogénital. Le canal pronéphrique est organisé en une série de tubules dérivés du mésenchyme adjacent qui migre médioventralement vers l'aorte dorsale (Figure I-1, page 3) (Dressler, 2006). Les tubules antérieurs, dénommés pronéphriques, sont très rudimentaires, alors que les tubules mésonéphriques plus caudaux sont mieux développés avec des glomérules et des structures tubulaires. Les tubules mésonéphriques sont des unités de filtration transitoire qui dégénèrent lorsque le rein adulte ou métanéphrique prend place. Cette dégénérescence est totale chez la femelle, alors que chez le mâle, le canal et quelques tubules mésonéphriques persistent pour devenir les canaux déférents des testicules.

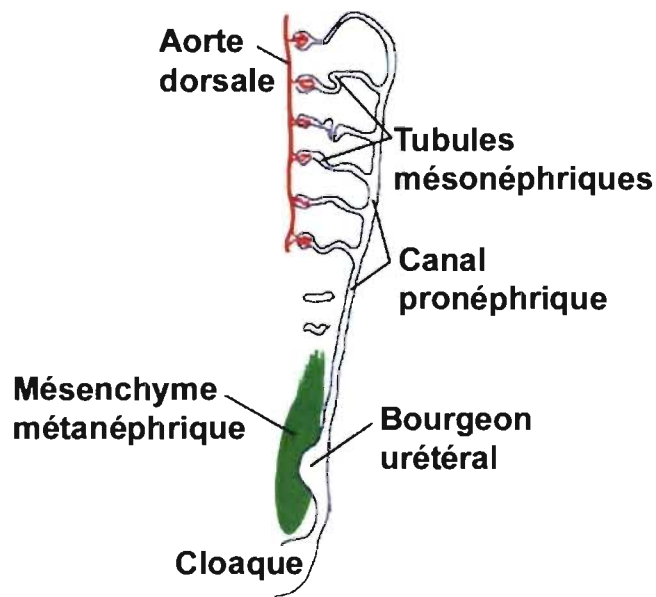


Figure I-1 : Développement rénal précoce chez la souris

Schématisation du système urinaire au jour e10.5 de l'embryogenèse murine. Image adaptée de (Dressler, 2006).

I.1.2 Développement du métanéphros

Le rein mammalien adulte, le métanéphros, se développe à partir d'interactions réciproques entre le bourgeon urétéral et le mésenchyme métanéphrique au 35^e jour de gestation chez l'humain ou e10.5-e11 chez la souris. Le bourgeon urétéral est originellement un diverticule généré par le canal pronéphrique (ou canal de Wolff) qui envahit le blastème métanéphrogénique pour entreprendre une morphogenèse de branchement (Figure I-1 et Figure I-2, page 4) (Saxen, 1987). À l'extrémité des nouveaux branchements formés s'agrègent certaines cellules mésenchymateuses pour amorcer un processus de transition du mésenchyme à l'épithélium, alors que d'autres cellules mésenchymateuses vont former le stroma interstitiel. Les agrégats sont donc formés de cellules mésenchymateuses induites par le bourgeon urétéral pour condenser et se polariser afin de former une suite de structures appelées vésicules rénales, corps en virgule puis corps en S (Figure I-2, page 4). À ce stade, le corps en S est déjà organisé le long de l'axe proximal-distal. La partie distale fusionne avec le bourgeon urétéral pour former un tubule épithélial continu. Par contre, la partie proximale forme une cavité glomérulaire qui va être envahie par des cellules endothéliales. Cette interaction entre les cellules endothéliales et mésenchymateuses mène à la formation de cellules épithéliales appelées podocytes afin de générer l'échafaudage de la barrière filtrante du glomérule. Le bourgeon urétéral continue ses embranchements pour induire de nouveaux néphrons tout au long de l'axe radial du rein de sorte que les plus vieux néphrons sont situés près de la médulla et les plus récemment formés se retrouvent en périphérie corticale dans la zone néphrogénique. Chez l'humain, ce processus est complété avant la naissance alors que chez la souris, il continue jusqu'à une semaine après la naissance.

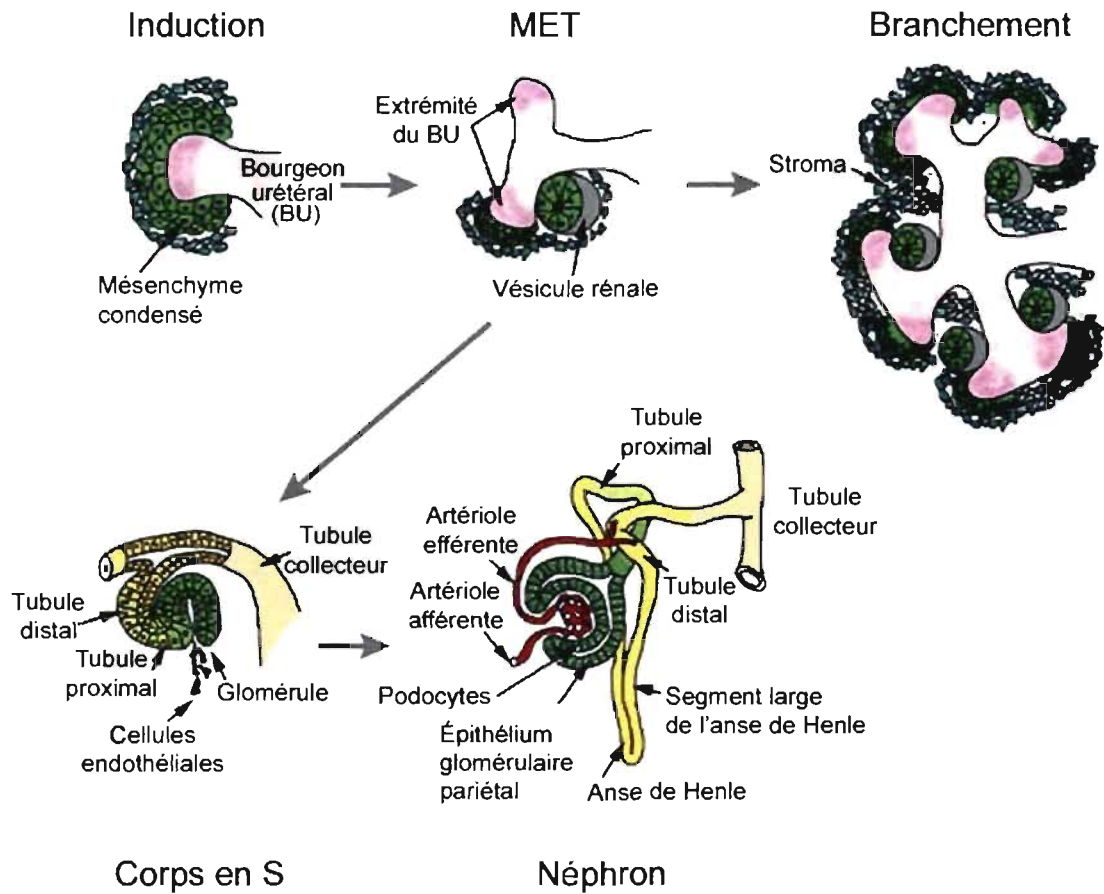


Figure I-2 : Étapes séquentielles de la néphrogénèse

Schématisation de la formation d'un néphron qui débute par l'induction de la condensation du mésenchyme métanéphrique causée par la croissance du bourgeon urétéral (BU). Ce dernier subit une série de branchement, alors que le mésenchyme subit une transition mésenchyme-épithélium (MET) ou constitue le stroma. Suite à la MET, il y a formation de la vésicule rénale et du corps en S, puis raccordement au système collecteur. L'épithélium se différencie et se spécialise afin de générer les différentes parties du néphron. Image adaptée de (Dressler, 2006)

I.1.3 Les gènes régulateurs du développement rénal

I.1.3.1 Établissement du mésoderme intermédiaire

Le mésoderme intermédiaire d'où provient le système urogénital est entouré du mésoderme axial (ou somitique) et du mésoderme de la plaque latérale. Certains gènes comme *Lim1* et *Odd* (*odd-skipped related 1*) sont exprimés dans le mésoderme adjacent au mésoderme intermédiaire bien avant toute indication morphologique du développement urogénital (James and Schultheiss, 2005; Tsang et al., 2000). La spécification du mésoderme intermédiaire est ensuite déterminée par l'expression des gènes à domaine *paired Pax2* et *Pax8* (Bouchard et al., 2002; Patel and Dressler, 2004). Chez la souris, l'ablation génique des gènes *Pax2/8*, *Lim1* et *Odd1* a démontré leur rôle essentiel dans l'établissement adéquat des structures épithéliales dérivées du mésoderme intermédiaire, incluant le canal pronéphrique, les tubules mésonéphriques et métanéphriques (Tableau I-I, page 14) (Kobayashi et al., 2005; Pedersen et al., 2005; Shawlot and Behringer, 1995; Wang et al., 2005a).

I.1.3.2 Établissement et induction du bourgeon urétéral

I.1.3.2.1 Régulation de c-Ret dans le bourgeon urétéral

Le canal pronéphrique est le premier constituant épithélial du système urogénital. À son extrémité postérieure, la croissance du bourgeon urétéral est une étape cruciale qui doit être régulée le long de l'axe antéro-postérieur. Un mauvais positionnement du bourgeon urétéral le long du canal de Wolff peut causer de graves anomalies du canal urinaire pouvant mener à un reflux, de l'obstruction ou de l'hydrourète. Le récepteur c-Ret est exprimé tout au long du canal pronéphrique tandis que son ligand Gdnf (*glial-derived neurotrophic factor*) est localisé au niveau du mésenchyme métanéphrique (Costantini and Shakya, 2006). Gdnf et son corécepteur glycoprophosphatidylinositol (GFR α 1) active le domaine intracellulaire tyrosine kinase de c-Ret pour promouvoir la migration, l'invasion et

la prolifération cellulaire du bourgeon (Figure I-3, page 7) (Watanabe and Costantini, 2004). L'expression de *c-Ret* par le canal néphrique semble dépendante du facteur de transcription Gata3 qui à son tour requiert Pax2/8 (Grote et al., 2006). Chez l'humain, une haploinsuffisance de *GATA-3* et de *PAX2* est associée au syndrome HDR (*hypoparathyroidism, sensorineural deafness, and renal disease*) et au syndrome coloboma rénal respectivement (Sanyanusin et al., 1995; Van Esch et al., 2000).

I.1.3.2.2 Régulation de *Gdnf* dans le mésenchyme métanéphrique

Plusieurs gènes préviennent l'excroissance de bourgeons urétéraux ectopiques en régulant la voie de signalisation c-Ret/Gdnf (Figure I-3, page 7). Les facteurs de transcription FoxC1 et FoxC2 ainsi que la protéine transmembranaire Slit2 et son récepteur Robo2 aident à définir la limite antérieure d'expression de Gdnf, puisqu'une délétion de chacun de ces gènes résulte en la formation de multiples bourgeons urétéraux ectopiques antérieurs à la position normale (Grieshammer et al., 2004; Kume et al., 2000). D'autres régulateurs négatifs ont été identifiés tels que Bmp4 (*Bone morphogenetic protein 4*) et Sprouty (un inhibiteur intracellulaire de la voie ERK/MAP kinase), mais ces derniers agiraient sans affecter directement l'expression de Gdnf (Basson et al., 2005; Brophy et al., 2001).

À l'inverse, différents régulateurs positifs de Gdnf comme les gènes du groupe paralogue *Hox11*, *Pax2*, *Eya1* (*eyes absent homolog 1*) et *Six1* (*Sina occulis 1*) sont responsables du positionnement approprié du mésenchyme métanéphrique (Sajithlal et al., 2005; Wellik et al., 2002; Xu et al., 1999). La famille de protéines Eya coopère avec celle de Six pour réguler des cibles communes dans plusieurs systèmes de développement dont celui du rein. Chez la souris, les mutants de *Eya1* et *Six1* démontrent le même défaut d'induction du mésenchyme métanéphrique (Xu et al., 2003b), alors que chez l'humain, des mutations dans *Eya1* (Abdelhak et al., 1997) ou *Six1* (Ruf et al., 2004) sont associées au syndrome branchio-oto-rénal (Tableau I.1, p.15).

D'autres gènes exclusivement exprimés par le mésenchyme et qui influencent la croissance du bourgeon urétéral sont *Wt1* et *Sall1*. Le gène suppresseur de tumeur de Wilms, *Wt1*, est essentiel à l'expression de *Gdnf* et à la survie du mésenchyme non-induit (Kreidberg et al.,

1993). *Sall1* est requis pour l'invasion complète du bourgeon urétéral et de l'induction du mésenchyme métanéphrique (Nishinakamura et al., 2001).

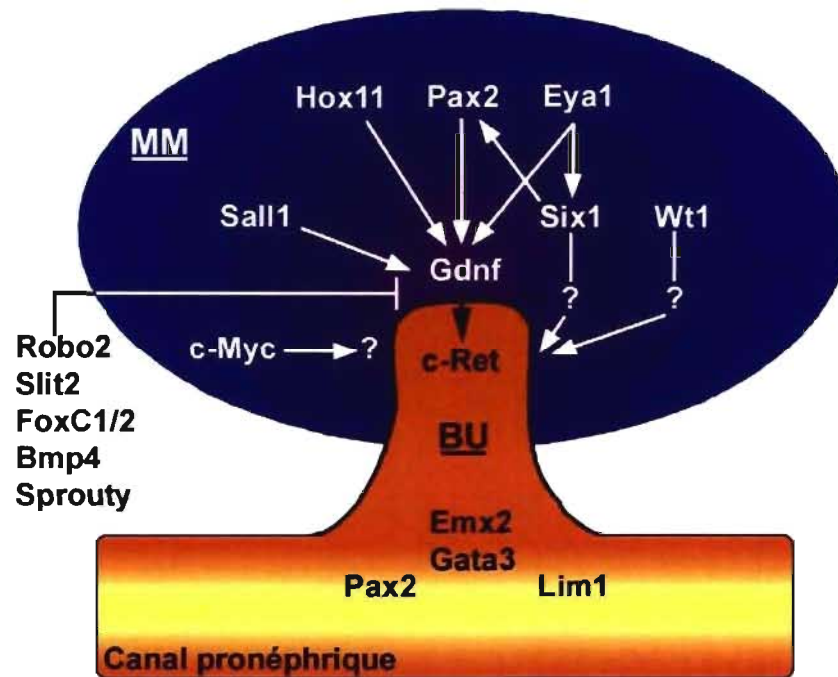


Figure I-3 : Gènes régulateurs de l'induction du bourgeon urétéral

Légende : MM : mésenchyme métanéphrique ; BU : bourgeon urétéral. Voir texte de la section I.1.3.2 pour plus de détails.

I.1.3.3 Induction du mésenchyme métanéphrique

I.1.3.3.1 Signaux d'induction du mésenchyme

Suite à l'invasion du mésenchyme métanéphrique par le bourgeon urétéral, ce dernier subit une série de branchements qui stimule la condensation du mésenchyme. Au cours de ce processus, un signal émanant du bourgeon active le programme intrinsèque de différenciation du mésenchyme (Figure I-4, page 10). La génération de ce signal requiert l'activité du facteur de transcription *Emx2*. En effet, chez les souris *Emx2*^{-/-}, il y a invasion

du bourgeon dans le mésenchyme métanéphrique, mais aucun branchement ne se forme. Par conséquent, les cellules mésenchymateuses meurent par apoptose, faute de stimulation (Miyamoto et al., 1997).

Le signal majeur d'induction du mésenchyme provient de la famille des Wnt dont plusieurs membres (Wnt-2b, -4, -6, -7b, -9b et -11) sont exprimés au cours du développement rénal. Cependant, seuls Wnt-4 et Wnt-9b possèdent un rôle essentiel pour la transition du mésenchyme à l'épithélium et la tubulogenèse (Carroll et al., 2005; Stark et al., 1994). Il est peu probable qu'un seul signal soit responsable de l'induction du mésenchyme. D'ailleurs, la différenciation épithéliale d'explants de mésenchymes métanéphriques est stimulée par l'action concertée de facteurs mitogènes et de survie tels que le *leukemia inhibitory factor* (Lif), le *fibroblast growth factor 2* (Fgf2) et les *transforming-growth factor* Tgf- β 2 ou Tgf- α (Barasch et al., 1999; Karavanova et al., 1996; Plisov et al., 2001). Cependant, l'effet de Lif/Fgf/Tgf semble dépendant de l'activité des ligands Wnt, suggérant que plusieurs signaux doivent coopérer pour une induction adéquate du mésenchyme (Plisov et al., 2001).

I.1.3.3.2 Réception du signal d'induction par le mésenchyme

L'expression de facteurs de transcription tels que *Wt1*, *Six1* et *Pax2* par le mésenchyme est nécessaire à l'interprétation des signaux d'induction provenant du bourgeon urétéral, mais la nature biochimique de ces signaux commence à peine à être bien comprise (Brophy et al., 2001; Donovan et al., 1999; Xu et al., 2003b). Des cibles de choix pour ces facteurs de transcription semblent être Fgf8 et Wnt4 qui agissent de façon autocrine pour stimuler la l'épithélialisation du mésenchyme (Figure I-4, page 10) (Grieshammer et al., 2005; Perantoni et al., 2005; Stark et al., 1994).

I.1.3.4 Branchement du bourgeon urétéral

Plusieurs voies de signalisation et protéines de la matrice extracellulaire sont impliquées positivement ou négativement dans la régulation du branchement par le bourgeon urétéral (Figure I-4, page 10). Gdnf y joue un rôle important, mais des études *in vitro* ont indiqué

qu'il est nécessaire, mais insuffisant pour promouvoir la morphogenèse de branchement (Sakurai et al., 2001). Une combinaison d'autres facteurs comme Fgf, Tgfa, Bmp, Hgf (*hepatocyte growth factor*) et Egf (*epithelial growth factor*) est requise durant les premières phases de branchement *in vivo* (Shah et al., 2004). L'activité de ces facteurs est modulée par les protéoglycans héparan sulfate de la matrice extracellulaire (Shah et al., 2004). D'ailleurs, le protéoglycan héparan sulfate glypican-3 (*Gpc3*) est muté dans le syndrome Simpson-Golabi-Behmel qui est associé à de la dysplasie rénale et des anomalies du système collecteur d'où dérive le bourgeon urétéral (Tableau I-I, page 14) (Pilia et al., 1996). De plus, la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire et l'inhibition de métalloprotéinases sont stimulées par le TGFa afin d'empêcher les branchements de l'épithélium ou du moins de les stabiliser une fois formés (Penttinen et al., 1988; Ritvos et al., 1995). À l'inverse, la morphogenèse de branchement est stimulée suite à la sécrétion d'activine qui déclenche la digestion de la matrice extracellulaire aux nouveaux sites de branchement (Ritvos et al., 1995). Enfin, pour permettre l'adhésion à la matrice, l'expression de différentes intégrines telles que $\alpha 8 \beta 1$ et $\alpha 3 \beta 1$ est cruciale pour les multiples branchements du bourgeon (Kreidberg et al., 1996; Muller et al., 1997).

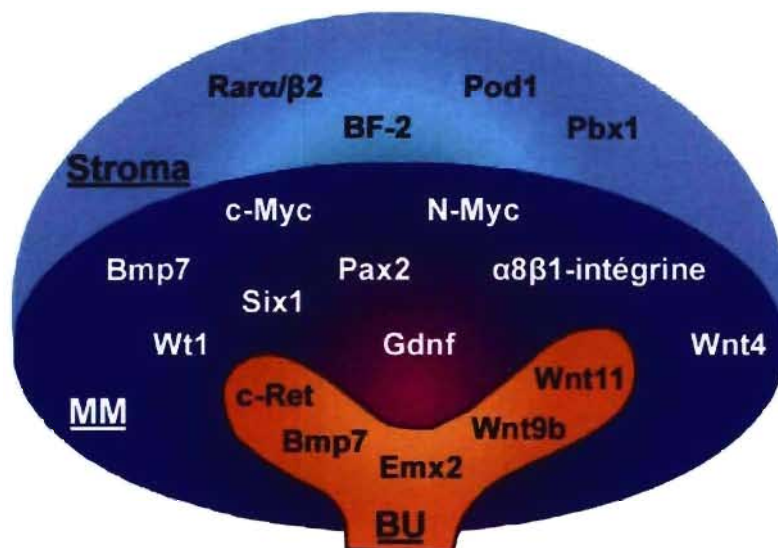


Figure I-4 : Gènes régulateurs du branchement du bourgeon urétéral et de l'induction du mésenchyme et du stroma

Légende : MM : mésenchyme métanéphrique ; BU : bourgeon urétéral. Voir texte des sections 1.1.3.3 à 1.1.3.5 pour plus de détails.

1.1.3.5 Différenciation des cellules stromales

Les cellules stromales sont d'origine mésenchymateuse et entourent les structures épithéliales différenciées du rein. Elles ne jouent pas seulement un rôle de support, mais participent activement dans le branchement du bourgeon urétéral, la régulation des cellules progénitrices rénales et la maturation du néphron. Les mutants de souris de trois facteurs de transcription associés aux cellules stromales, BF-2 (ou FoxD1), Pod1 et Pbx1, démontrent un déficit en cellules stromales, des défauts de branchements du bourgeon et une absence de condensation du mésenchyme (Figure I-4, page 10) (Hatini et al., 1996; Quaggin et al., 1999; Schnabel et al., 2003).

Un autre signal important provenant du stroma et qui influence l'interaction mésenchyme-épithélium fait partie de la voie de l'acide rétinolique. En effet, une carence en vitamine A

in vivo ou même le double mutant des récepteurs nucléaires à l'acide rétinoïque *Rara/β2* démontrent une diminution d'expression de c-Ret associée à des problèmes de branchement et une hypoplasie rénale (Lelievre-Pegorier et al., 1998; Mendelsohn et al., 1999; Moreau et al., 1998). De manière intéressante, ce phénotype peut être complété par la surexpression de c-Ret dans ce double mutant, suggérant l'existence d'un système paracrine entre le stroma et l'épithélium rénal (Batourina et al., 2001).

Ce système est d'ailleurs réciproque puisqu'il a été démontré que l'épithélium rénal régule la maturation du compartiment stromal par la sécrétion de Fgf2 et Bmp7. Ces facteurs augmentent la population de cellules stromales tout en inhibant l'apoptose du mésenchyme induit (Dudley et al., 1999). Le développement adéquat du rein implique donc un contrôle approprié de l'interaction entre les trois principaux compartiments cellulaires rénaux, soit les dérivés du bourgeon urétéral, du mésenchyme métanéphrique et du stroma.

I.1.3.6 Maturation du néphron

I.1.3.6.1 Maturation tubulaire

Les premières étapes menant à la maturation du néphron impliquent la transition du mésenchyme en épithélium. Un changement dans l'expression des molécules d'adhésion telles que l'augmentation de la R- et K-cadhérine (ou cadhérine-6) et la perte de la cadhérine-11 y joue un rôle important pour l'agrégation et la polarisation cellulaire (Cho et al., 1998; Dahl et al., 2002; Goto et al., 1998). Parmi toutes les cadhérines exprimées au cours du développement rénal et malgré leur probable redondance, seule la souris mutante pour K-cadhérine démontre des anomalies rénales (Mah et al., 2000).

La spécialisation de l'épithélium rénal comprend une organisation le long de l'axe proximal distal du néphron afin de distinguer le glomérule du tubule proximal et distal. Le récepteur transmembranaire Notch semble jouer un rôle important dans cette prise de décision en favorisant un destin proximal de l'épithélium (Cheng et al., 2007), tandis que le destin tubulaire distal semble régulé par les gènes *Pax-2* et *-8* (Narlis et al., 2007).

I.1.3.6.2 *Maturation glomérulaire*

Pour sa part, le développement du glomérule débute lors de la formation du corps en S où les cellules les plus proximales commencent à exprimer des protéines spécifiques aux podocytes telles que *Wt1*, *Pod1*, *Nephrine* et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF. VEGF stimule l'attraction de cellules endothéliales dans la cavité proximale du corps en S (Eremina et al., 2003). En dernier lieu, vient l'établissement de la barrière de filtration du glomérule dans laquelle le facteur de transcription *Lmx1b* est responsable de l'expression de collagène IV et d'autres gènes spécifiques aux podocytes (Chen et al., 1998; Miner et al., 2002; Morello et al., 2001). D'ailleurs, des glomérulopathies sont associées à des mutations dans les gènes de *Lmx1b* et des chaînes de collagènes IV, responsables du syndrome Nail-Patella et d'Alport respectivement (Tableau I-I, page 14) (Hudson et al., 2003; Morello et al., 2001).

I.1.4 Les malformations du rein

Chez l'humain, il existe plus d'une centaine de syndromes de malformation congénitale rénale. Certains peuvent être d'origine sporadique et d'autres sont dus à des défauts génétiques. Parmi ces défauts, unilatéraux ou bilatéraux, la forme la plus sévère est l'aplasie rénale où il y a une absence de rein. Un second phénotype est l'hypoplasie rénale qui se définit par une diminution de la taille du rein et d'un nombre réduit de structures rénales bien développées. Par opposition, la dysplasie rénale se caractérise par des anomalies dans la structure d'une ou plusieurs parties du néphron. Le rein dysplasique peut être de taille variable et peut parfois présenter des kystes. Par contre, d'autres phénotypes ont été identifiés et incluent des défauts du pelvis, des calyces et de l'uretère comme l'hydronéphrose, la duplication du système collecteur, méga-uretère, sténose urétérale et reflux vésicourétéral. Toutes ces malformations rénales sont regroupées sous le terme **CAKUT** pour *congenital anomalies of the kidney and urinar tract* et représentent le tiers des maladies congénitales affectant environ 1.5% des nouveaux nés (Woolf et al., 2004). Les études sur les patients affectés et les modèles de souris ont démontré que des mutations

dans différents gènes peuvent présenter des phénotypes semblables. Cette variation phénotypique peut être causée par des interactions épistatiques entre les différents gènes impliqués dans des voies de signalisation communes lors du développement. La plupart de ces gènes ont été mentionnés et décrits dans la section I.1.3. Le phénotype observé chez les souris mutantes ainsi que les maladies humaines associées à ces gènes sont résumés dans le Tableau I-I, page 14.

Tableau I-I : Phénotypes ou syndromes associés à des mutations dans des gènes régulateurs du développement rénal

Gène	Expression	Phénotype rénal de la souris mutante homozygote	Syndrome humain associé (OMIM)	Réf
<i>Wt1</i>	MM, podocytes	Aplasie bilatérale	Tumeur de Wilms (607102), Denys Drash (194080), Frasier (136680), WAGR (194072)	1
<i>Pax2</i>	MM, BU	Aplasie bilatérale	Rénal coloboma (167409)	2
<i>Eya1; Six1</i>	MM	Aplasie bilatérale	Brancho-oto-renal (113650)	3,4
<i>Sall1</i>	MM	Aplasie, hypoplasie	Townes-Brock (107480)	5
<i>Hoxa11/d11</i>	MM	Aplasie, dysplasie		6
<i>Lim1</i>	BU	Aplasie bilatérale		7
<i>Gdnf</i>	MM	Aplasie bilatérale; (hétéro: dysplasie)		8,9
<i>Ret</i>	BU	Aplasie uni-bilatérale		10,11
<i>Gfra1</i>	MM, BU	Aplasie uni-bilatérale		12
<i>Gata3</i>	BU	Dysplasie kystique	Syndrome HDR (146255)	13
<i>Foxc1</i>	MM	Système collecteur dupliqué		14
<i>Bmp4</i>	MM	Absence de mésoderme; (hétéro : système collecteur dupliqué)		15,16
<i>Bmp7</i>	MM, BU	Hypo/dysplasie		17-19
<i>Emx2</i>	MM, BU	Aplasie bilatérale		20
<i>Fgf7</i>	S	Hypoplasie		21
<i>Fgf10</i>	MM	Hypoplasie		22
<i>BF2</i>	S	Hypoplasie		23
<i>Rara/β2</i>	S	Hypoplasie		24
<i>Pod1</i>	MM, S, podocytes	Hypoplasie		25
<i>Lmx1b</i>	podocytes	Glomerulopathie	Nail-patella (161200)	26
<i>Wnt9b</i>	BU	Aplasie bilatérale		27
<i>Wnt4</i>	MM	Hypo/dyplasie		28
<i>Wnt11</i>	BU	Hypoplasie		29
<i>Integrine α8</i>	MM	Dysplasie bilatérale		30
<i>Gpc3</i>	MM, BU	Dysplasie et kystes	Simpson-Golabi-Behmel (312870)	31
<i>N-myc</i>	MM	Défaut dans la formation du mésoderme; (allèle hypomorphe : Hypoplasie)		32-35

MM : mésenchyme métanéphrique; BU : bourgeon urétéral; S : Stroma; hétéro : hétérozygote;

Légende du tableau I-I suite:

OMIM : « Online Mendelian Inheritance in Man » <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>
Références : 1-(Kreidberg et al., 1993); 2-(Torres et al., 1995); 3-(Xu et al., 1999); 4-(Xu et al., 2003b); 5-(Nishinakamura et al., 2001); 6-(Wellik et al., 2002); 7-(Shawlot and Behringer, 1995); 8-(Pichel et al., 1996); 9-(Sanchez et al., 1996); 10-(Schuchardt et al., 1994); 11-(Schuchardt et al., 1996); 12-(Enomoto et al., 1998); 13-(Grote et al., 2006); 14-(Kume et al., 2000); 15-(Winnier et al., 1995); 16-(Dunn et al., 1997); 17-(Dudley et al., 1995); 18-(Luo et al., 1995); 19-(Karsenty et al., 1996); 20-(Miyamoto et al., 1997); 21-(Qiao et al., 1999); 22-(Ohuchi et al., 2000); 23-(Hatini et al., 1996); 24-(Mendelsohn et al., 1999); 25-(Quaggin et al., 1999); 26-(Chen et al., 1998); 27-(Carroll et al., 2005); 28-(Stark et al., 1994); 29-(Majumdar et al., 2003); 30-(Muller et al., 1997); 31-(Cano-Gauci et al., 1999); 32-(Stanton et al., 1992); 33-(Charron et al., 1992); 34-(Sawai et al., 1993); 35-(Bates et al., 2000).

I.2 Les maladies génétiques rénales polykystiques

Une des malformations rénales les plus fréquentes est la formation de kystes. Le Tableau I-II, page 16, résume les principales maladies génétiques rénales polykystiques ainsi que leurs gènes associés. Une similitude quant à la localisation subcellulaire des protéines encodées par ces gènes au niveau des jonctions cellulaires et du cil primaire/centrosome suggère que des voies de signalisation communes sont affectées dans les différentes maladies kystiques. Toutefois, ces maladies diffèrent en plusieurs points dont le mode de transmission, la sévérité de la progression des kystes avec l'âge, les parties affectées du néphron et les effets extrarénaux.

Tableau I-II : Les maladies kystiques humaines du rein

Maladie	Trait	Gène	Protéine	Localisation subcellulaire	OMIM
ADPKD					
ADPKD1	AD	<i>PKD1</i>	Polycystine-1	Cil primaire, desmosomes, jonctions adhérentes, serrées, adhésions focales	601313
ADPKD2	AD	<i>PKD2</i>	Polycystine-2	Cil primaire, centrosome, reticulum endoplasmique	173910
ARPKD					
	AR	<i>PKHD1</i>	Fibrocystine /polyductine	Cil primaire, membrane apicale	263200
Nephronophthésies (NPHP)					
NPHP1 (Juvenile)	AR	<i>NPHP1</i>	Nephrocystine-1	Cil primaire, centrosome, jonctions adhérentes, adhésions focales	256100
NPHP2 (Infantile)	AR	<i>NPHP2</i>	Inversine	Cil primaire, centrosome, jonctions cellulaires, noyau	602088
NPHP3 (Adolescente)	AR	<i>NPHP3</i>	Nephrocystine-3	Cil primaire, centrosome	604387
NPHP4 (Juvenile)	AR	<i>NPHP4</i>	Nephrocystine-4 /nephrorétinine	Cil primaire, centrosome, jonctions adhérentes	606966
NPHP5	AR	<i>NPHP5;</i> <i>IQCB1</i>	Nephrocystine-5	Cil primaire	609254
SLSN6 ou NPHP6	AR	<i>NPHP6;</i> <i>CEP290</i>	NPHP6; CEP290	Centrosome, noyau	610189
Maladie kystique rénale médullaire (MCKD)					
MCKD1	AD	<i>UMOD1</i>	ND	ND	174000
MCKD2	AD	<i>UMOD2</i>	Uromoduline/TH	ND	603860
Syndrome de Bardet-Biedl (BBS)					
BBS1 à 12	AR	<i>BBS1 à 12</i>	BBS1 à 12	Centrosome	209900
Syndrome de Joubert (JBTS)					
JBTS1 à 5	AR	<i>JBTS3</i>	Joubertine (AHI1)	ND	608629
Syndrome de Meckel (MKD)					
MKS1	AR	<i>MKS1</i>	MSK1	Cil primaire, centrosome	249000
MKS3	AR	<i>MKS3</i>	TMEM67	Cil primaire	607361
Syndrome Orofaciodigital (OFD)					
OFD1	X-L	<i>OFD1;</i> <i>CXORF5</i>	OFD1	Centrosome	311200
Reins kystiques et syndrome diabétique					
MODY5	AD	<i>HNF1β</i>	HNF-1B	Noyau	137920
Sclérose tubéreuse (TSC)					
TSC	AD	<i>TSC2</i>	Tubérine	Cytoplasme	191100
Syndrome von Hippel-Lindau (VHL)					
VHL	AD	<i>VHL</i>	pVHL	Cytoplasme, cil primaire	193300

AD: autosomique dominant; AR: autosomique récessif; X-L : liée au chromosome X (dominant); ND : non déterminé; TH : Tam-Horsfall ; MODY5 : *maturity onset diabetes of the young, type V*.

OMIM : « Online Mendelian Inheritance in Man » <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

I.2.1 La polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD)

La polykystose peut se transmettre de façon dominante (ADPKD) ou récessive (ARPKD) (voir section I.2.2). L'ADPKD (*Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease*), est la maladie génétique héréditaire rénale de loin la plus commune avec une prévalence de 1/1000 personnes (0.1% de la population générale) (Iglesias et al., 1983). L'ADPKD se manifeste par la formation de kystes tubulaires rénaux bilatéraux dans toutes les parties du néphron (Figure I-5, page 18) (Faraggiana et al., 1985; Fick et al., 1993). Les kystes peuvent se développer *in utero* (Michaud et al., 1994), ou encore peuvent apparaître après la naissance et grossir graduellement en nombre et en taille au cours de la vie adulte, causant une insuffisance rénale chronique (IRC) dans 50% des cas d'ADPKD avant 60 ans (Parfrey et al., 1990; Sessa et al., 1997). Cependant, outre l'insuffisance rénale, l'ADPKD est une maladie systémique souvent accompagnée par des manifestations extrarénales kystiques (foie, pancréas, rate et ovaires) et non-kystiques (hypertension, prolapse de la valve mitrale et anévrismes cérébraux) (Everson, 1993; Huston et al., 1993; Ruggieri et al., 1994; Torra et al., 1997; Torres, 1999). Le diagnostic de l'ADPKD repose sur l'examen de l'abdomen à l'aide de méthodes non-invasives telles que la radiographie, l'ultrasonographie ou l'imagerie par résonance magnétique. Les seuls traitements connus sont la dialyse à long terme et/ou la transplantation rénale. Toutefois, plusieurs laboratoires, dont le nôtre, étudient la possibilité d'une thérapie génique ou moléculaire pour diminuer ou empêcher le développement et la progression de kystes.

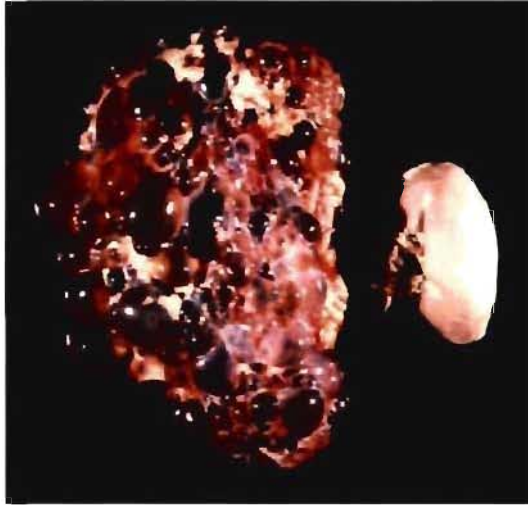


Figure I-5 : Aspect macroscopique d'un rein polykystique

Rein ADPKD (à gauche) et rein normal (à droite). Image tirée du site de la *PKD foundation*: <http://www.pkdcure.org/images/content/pagebuilder/12523.jpg>

Au point de vue génétique, l'ADPKD est une maladie hétérogène. Deux gènes majeurs sont impliqués: PKD1 et PKD2. Les mutations dans le gène PKD1 sont responsables de 85% des cas d'ADPKD (Torra et al., 1996) et mènent à une insuffisance rénale chronique à ~53 ans (Hateboer et al., 1999). 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., 1999). Ces gènes et leurs protéines (polycystine-1 et 2) seront décrits plus en détails dans les sections 1.4 et 1.5. Un troisième locus est très minoritaire (moins de 1%), mais n'a pas encore été cartographié (Daoust et al., 1995).

1.2.2 La polykystose rénale autosomique récessive (ARPKD)

L'ARPKD (*Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease*) 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. En plus de l'insuffisance rénale

s'ajoutent d'autres complications causées par la fibrose congénitale hépatique, l'hypertension et l'hyperplasie pulmonaire (Cole et al., 1987; Gang and Herrin, 1986; Lieberman et al., 1971).

Malgré la variabilité phénotypique observée chez les patients, un seul locus est impliqué dans la pathogenèse ARPKD. Découvert par clonage positionnel sur le chromosome 6p21-cen, le gène PKHD1 (*polycystic kidney and hepatic disease 1*) s'étale sur 472 kb du génome et contient 67 exons pouvant générer plusieurs transcrits par épissage alternatif (Harris and Rossetti, 2004). Il encode la fibrocystine/polyductine, une protéine de 4072 acides aminés avec un poids moléculaire prédit de 447 kDa (Onuchic et al., 2002; Ward et al., 2002). Cette protéine membranaire contient un grand domaine extracellulaire (3858 aa), un seul segment transmembranaire et un court domaine intracellulaire (192 aa). Quelques motifs protéiques connus ont été identifiés par homologie de séquence dont des domaines TIG/IPT, des répétitions PbH1 et un domaine RGD. Dans la partie carboxy-terminale, des sites potentiels de phosphorylation par les protéines kinases A et C (PKA et PKC) ont également été identifiés (Onuchic et al., 2002; Ward et al., 2002). La fonction de cette protéine est inconnue, mais un rôle au niveau de la différenciation terminale du tubule collecteur a été proposé. De plus, il a été récemment proposé que la fibrocystine et les polycystines pourraient faire partie d'un même complexe de mécano-sensation au niveau du cil primaire, suggérant que ces « kystoprotéines » peuvent faire partie d'une voie de signalisation commune (Garcia-Gonzalez et al., 2006; Kim et al., 2006; Wang et al., 2007; Wu et al., 2006).

I.2.3 Les néphronophthisies et les maladies kystiques de la médulla rénale

La néphronophthisie (NPHP) et les maladies kystiques de la médulla adultes (MCKD) sont deux néphropathies héréditaires qui ont longtemps été considérées comme une seule entité due à un phénotype histologiquement identique. Dans les deux cas, les kystes se forment au niveau de la frontière cortico-médullaire du rein et sont accompagnés par une infiltration interstitielle et une fibrose pouvant mener à de l'IRC. Les reins NPHP et MCKD sont de

tailles normales en comparaison aux reins énormes ADPKD ou ARPKD. Les différences entre NPHP et MCKD sont cependant observables au niveau du mode de transmission, de l'âge de l'apparition de l'insuffisance rénale et des effets extrarénaux. NPHP se transmet de manière autosomique récessive et affecte principalement les enfants et les adolescents tandis que MCKD est autosomique dominante et se manifeste beaucoup plus tardivement (Hildebrandt and Otto, 2000).

Six gènes NPHP (*NPHP1-6*) ont été identifiés et quatre d'entre eux ont été classés comme étant mutés dans trois formes de néphronophthosie soit infantile (*NPHP1*, 4), juvénile (*NPHP2* ou *INV*) ou adolescente (*NPHP3*). Les gènes *NPHP1*, 3 à 6 encodent respectivement pour les néphrocystine-1, 3 à 6 tandis que *NPHP2* ou *INV* encode pour l'inversine (Hildebrandt et al., 1997; Mollet et al., 2002; Olbrich et al., 2003; Otto et al., 2002; Otto et al., 2003; Sayer et al., 2006; Valente et al., 2006). Un rôle au niveau du cil primaire et des complexes d'adhésion a été proposé pour la plupart des néphrocystines. En effet, ces protéines interagissent entre elles ainsi qu'avec des protéines d'adhésion focales (p130^{cas} et Pyk2) et des protéines de liaison à l'actine (tensine, filamine A et B) (Benzing et al., 2001; Donaldson et al., 2000; Donaldson et al., 2002; Mollet et al., 2002; Olbrich et al., 2003; Otto et al., 2003).

Dans le cas des maladies kystiques de la médulla, deux locus (*MCKD1* et *MCKD2*) ont été identifiés, mais seul le gène *MCKD2* a été cloné et encode pour la glycoprotéine urinaire uromoduline dont la fonction est peu connue (Christodoulou et al., 1998; Hart et al., 2002; Hodanova et al., 2005; Scolari et al., 1999).

I.2.4 Les syndromes Bardet-Biedl et de Joubert

Parmi les principales dysplasies kystiques du rein, notons le syndrome Bardet-Biedl (gènes *BBS1* à *10*) (Katsanis, 2004; Nishimura et al., 2005; Stoetzel et al., 2006) et le syndrome de Joubert (gènes *JBTS1* à *5*) (Dixon-Salazar et al., 2004; Ferland et al., 2004; Saunier et al., 2005; Utsch et al., 2006), tous deux présentant une histopathologie similaire aux NPHP. D'ailleurs, des mutations dans le gène *NPHP1* et *NPHP6* ont été associées à certains

patients JBTS4 et JBTS5 respectivement (Parisi et al., 2004; Sayer et al., 2006; Utsch et al., 2006). Ces maladies se distinguent principalement par une combinaison de défauts développementaux dont le retard mental, la rétinopathie pigmentaire, la polydactylie, la malformation congénitale du cœur, l'obésité et le diabète mellitus.

I.2.5 Le syndrome de Meckel

Le syndrome de Meckel (MKS) est une maladie très sévère, souvent létale, caractérisée par la présence de reins dysplasiques kystiques bilatéraux, de la polydactylie et des malformations du système nerveux central (Salonen and Paavola, 1998). Deux principaux gènes ont été identifiés (*MKS1* et *3*), codant pour les protéines MKS1 et Meckeline. Ces deux protéines semblent pouvoir interagir entre elles et jouer un rôle fondamental dans la formation du cil primaire et la morphogenèse du branchement épithélial (Dawe et al., 2007).

I.2.6 Le syndrome orofaciodigital

Le syndrome orofaciodigital de type 1 (OFD1) se manifeste par une transmission dominante liée au chromosome X et est létal *in utero* chez les individus mâles. Les femmes affectées démontrent une variabilité phénotypique qui comprend des malformations du visage, des mains, des pieds, du système nerveux central et des kystes rénaux majoritairement glomérulaires (Feather et al., 1997). Le gène *OFD1* encode la protéine OFD1 qui joue un rôle dans la néphrogenèse au niveau de la transition mésenchyme à épithélium. OFD1 est localisée aux centrosomes et pourrait être impliquée dans l'organisation des microtubules et dans la mécanosensation via le cil primaire (Ferrante et al., 2001; Romio et al., 2004).

I.2.7 Kystes rénaux et syndrome diabétique

Différentes mutations dans le facteur de transcription HNF1 β (*Hepatocyte Nuclear Factor 1 β*) sont associées à des kystes rénaux et syndrome diabétique. D'ailleurs, les jeunes patients sont souvent diagnostiqués MODY5 pour *Maturity-Onset Diabetes of the Young*.

Le phénotype rénal est très variable et comprend entre autres des défauts dans la néphrogenèse menant à la formation de reins hypoplasiques et kystiques avec des irrégularités du système collecteur (Bellanne-Chantelot et al., 2004; Eller et al., 2006). *HNF1β* semble réguler l'expression de *PKHD1*, ce qui établirait un lien entre les deux maladies kystiques du rein, soit *MODY5* et *ARPKD* (Hiesberger et al., 2004; Hiesberger et al., 2005).

I.2.8 La sclérose tubéreuse

La sclérose tubéreuse est une maladie héréditaire autosomique dominante qui affecte 1/6000 individus. Cette maladie se manifeste d'abord par des anomalies du système nerveux et se caractérise principalement par la formation de tumeurs bénignes ou hamartomes dans plusieurs tissus. Elle se présente souvent avec une polykystose rénale de type autosomal dominante (Stillwell et al., 1987). Au niveau génétique, deux loci ont été identifiés soit *TSC1* et *TSC2*. Ces deux gènes encodent respectivement pour les protéines hamartine et tubérine qui sont impliquées dans la régulation de la voie de mTOR et la croissance cellulaire (Gao et al., 2002). De manière intéressante, tubérine peut jouer un rôle dans la localisation subcellulaire adéquate de la polycystine-1 (Kleymenova et al., 2001). De plus, le gène de *TSC2* est localisé sur le chromosome 16 en orientation queue à queue avec le gène de *PKD1*. Cette proximité des loci serait en cause dans le développement de kystes rénaux où une délétion génomique contiguë des gènes *TSC2* et *PKD1* a été détectée dans une majorité de cas (Brook-Carter et al., 1994; Longa et al., 1997; Sampson et al., 1997). Cependant, des études suggèrent que *TSC2* est suffisant pour causer la formation de kystes aux reins, mais des mutations dans le gène de *PKD1* contribuent à la sévérité de la kystogenèse.

I.2.9 Le syndrome tumoral von Hippel-Lindau

Le syndrome tumoral von Hippel-Lindau (VHL) est causé par une inactivation germinale d'un allèle du gène suppresseur de tumeur *VHL*. Le syndrome VHL se transmet de façon

autosomique dominante, mais le développement de la maladie requiert une mutation somatique sur l'allèle *VHL* sauvage. Cette maladie est associée à la formation de kystes rénaux, mais plus particulièrement à des carcinomes rénaux et des tumeurs vasculaires, appelées hémangioblastômes, dans le système nerveux central et la rétine (Kaelin, 2003; Kim and Kaelin, 2004; Lubensky et al., 1996). Le rôle de pVHL, la protéine encodée par *VHL*, est principalement associé à la réponse hypoxique, mais des études récentes ont rapporté une localisation au cil primaire de pVHL pour contrôler la croissance des microtubules et la formation du cil (Lutz and Burk, 2006; Schermer et al., 2006). Ce nouveau rôle dans la ciliogenèse pourrait expliquer la présence de kystes rénaux dans le syndrome VHL.

I.3 Pathogenèse de la formation des kystes rénaux

Avant de décrire les gènes de l'ADPKD et leurs fonctions, il est important d'exposer les principaux mécanismes pathophysiologiques de la kystogénèse tels que la dérégulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose ainsi que des anomalies de la membrane basale, de la polarité cellulaire, des sécrétions trans-épithéliales de fluides kystiques et la fonction mécanosenseur du cil primaire.

I.3.1 Prolifération et apoptose

Normalement très élevées lors de l'organogenèse, la prolifération et l'apoptose sont pratiquement inexistantes dans un rein mature adulte (Sorenson, 1998). Leur présence est anormalement élevée dans les reins adultes de patients ADPKD. L'index de prolifération et d'apoptose augmente dans les reins ADPKD et ce, dans l'épithélium kystique et non-kystique, indiquant que la prolifération et l'apoptose représentent des éléments déclencheurs de la kystogénèse (Lanoix et al., 1996; Nadasdy et al., 1995; Woo, 1995).

I.3.1.1 Hyperplasie

La prolifération se traduit par une hyperplasie cellulaire très souvent rapportée chez les patients ADPKD. L'hyperplasie peut être expliquée en partie par une concentration élevée du ligand *Tgf- α* retrouvée dans le liquide kystique et une localisation cellulaire aberrante du récepteur *Egfr* (*epidermal growth factor receptor*) au niveau de l'épithélium kystique des patients ADPKD. En plus d'être surexprimé, *Egfr* est transloqué du côté apical, alors qu'il est normalement localisé à la membrane basolatérale de l'épithélium mature (Lee et al., 1998). La proximité apicale kystique du récepteur *Egfr* de son ligand permet une boucle d'activation autocrine qui mène à une prolifération cellulaire exagérée et non-contrôlée (Du and Wilson, 1995). Ce type de boucle autocrine a déjà été démontré dans plusieurs tumeurs incluant le carcinome rénal (Mydlo et al., 1989; Pekonen et al., 1989). De plus, l'hyperplasie de l'épithélium rénal kystique peut être déclenchée par la surexpression de plusieurs proto-oncogènes incluant *c-myc* et *c-erbB2* (Herrera, 1991; Lanoix et al., 1996). La kystogenèse a d'ailleurs été décrite comme une néoplasie déguisée (Grantham, 1990).

I.3.1.2 Apoptose

Un taux élevé d'apoptose ou de mort cellulaire programmée est une caractéristique pathologique de la polykystose rénale (Zhou and Kukes, 1998). Un rôle direct de l'apoptose dans la kystogenèse est moins bien défini, mais serait responsable de la destruction de plusieurs néphrons pouvant mener à l'insuffisance rénale. L'apoptose pourrait être étroitement liée à la prolifération étant donné que l'altération de l'intégrité cellulaire et la perte d'adhésion cellule-cellule causées par l'apoptose provoqueraient une prolifération des cellules avoisinantes.

Par ailleurs, il a été démontré *in vitro* que l'apoptose est essentielle à la formation de kystes (cavitation) par les cellules *Mardin-Darby canine kidney* (MDCK) sur une matrice de collagène-1 et qu'elle est inhibée par la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Lin et al., 1999). De plus, la transfection de *PKDI* dans ce système ralentit la progression des kystes et protège les cellules MDCK de l'apoptose (Boletta et al., 2000). Ainsi, le gène

responsable de l'ADPKD1 aurait pour fonction endogène de réguler les niveaux d'apoptose et de prolifération pour permettre aux cellules d'entrer dans la voie de différenciation menant à la formation de tubules.

I.3.2 La matrice extracellulaire

Chez les patients ADPKD adultes, la matrice extracellulaire du rein kystique contient plusieurs protéines normalement présentes seulement dans le rein foetal immature. Ce phénomène est associé à une différenciation incomplète de l'épithélium kystique (Cuppige et al., 1980; Granot et al., 1990). L'épaississement et la forme irrégulière de la membrane basale est accompagné par une production cellulaire anormale de laminine, du collagène de type I et IV, de fibronectine et des protéoglycans (Cuppige et al., 1980; Wilson et al., 1992); (Carone et al., 1998; Liu et al., 1992). En plus des composantes de la matrice, une altération de l'activité de certaines protéases de la matrice extracellulaire telles que MMP-2 et les cathepsines B, L et H a été décrite (Hartz and Wilson, 1997; Norman et al., 1995; Wilson, 1997). Un défaut de polarité dans la sécrétion de ces protéases a été également observé dans l'épithélium ADPKD *in vitro*. Normalement, ces protéines lysosomales sont sécrétées du côté apical, mais l'épithélium ADPKD démontre une augmentation du taux de sécrétion du côté basal (Hartz and Wilson, 1997; Wilson, 1997).

I.3.3 Polarité épithéliale

Comme nous venons de voir avec les protéases (section I.3.2) ou même le récepteur *Egfr* (section I.3.1.1), une dépolarisation de l'épithélium tubulaire et/ou une sécrétion trans-épithéliale anormale sont associées à la kystogenèse (Grantham et al., 1995; Wilson, 1991; Ye and Grantham, 1993). À titre d'exemple, la localisation apicale de la pompe à sodium Na^+, K^+ -ATPase chez les patients ADPKD suggère une persistance du programme foetal. Cette mauvaise localisation transforme une cellule normalement absorptive en une cellule sécrétoire. Ce processus accentue l'expansion des kystes où ces derniers finissent par se séparer des tubules originaux (Wilson and Falkenstein, 1995).

De plus, des défauts au niveau des protéines desmosomales et des jonctions adhérentes ont été observés dans l'ADPKD (Charron et al., 2000; Roitbak et al., 2004; Silberberg et al., 2005). Les membranes basolatérales de l'épithélium rénal kystique démontrent une perte de E-cadhérine qui est plutôt séquestrée dans des compartiments intracellulaires (Charron et al., 2000). Cependant, des jonctions cellulaires semblent se former, ce qui suggère une redondance des cadhérines. En effet, la N-cadhérine, aussi appelée la cadhérine mésenchymateuse, est surtout exprimée au niveau embryonnaire non-différencié et semble remplacer partiellement la E-cadhérine dans l'épithélium kystique (Roitbak et al., 2004). Enfin, il est à noter que les anomalies de la polarité épithéliale et de sécrétions trans-épithéliales surviennent généralement après la formation des kystes. Ceci suggère que ces mécanismes pathophysiologiques ne sont pas nécessairement à l'origine de la kystogénèse, mais contribuent au développement et à la croissance des kystes dans la pathogenèse ADPKD.

I.3.4 Mécanosensation par le cil primaire

La surface apicale de toutes les cellules tubulaires épithéliales, à l'exception des cellules intercalaires des tubules collecteurs, possède un cil primaire. La structure du cil primaire consiste en une membrane continue avec celle de la cellule et d'un axonème central composé de neuf doublets de microtubules. Le cil prend racine au centriole et est donc dépendant du cycle cellulaire. Il est présent à l'interphase et se résorbe lorsque la cellule se divise en phase S et que les centrioles migrent aux pôles mitotiques. La principale fonction du cil primaire serait la mécanosensation. Le cil primaire des cellules rénales MDCK transmet un stimulus mécanique (le courant du fluide urinaire) ou moléculaire, (l'interaction fibronectine- β -intégrine) en un influx de calcium (Praetorius et al., 2004; Praetorius and Spring, 2001). Plusieurs évidences indiquent que des défauts de structure ou de fonction du cil primaire et/ou du centrosome jouent un rôle majeur dans la formation de kystes rénaux. La plupart des « kystoprotéines » comme les polycystines-1 et -2 sont associées au cil primaire et/ou au centrosome, mais leur expression n'est pas exclusive à

cette organelle (Tableau I-II, page 16). Le prochain défi sera de déterminer comment une perturbation de la fonction du cil primaire/centrosome peut affecter les processus cellulaires comme la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la polarisation et différenciation épithéliale, tous perturbés dans la kystogenèse. Une description de la signalisation induite par la polycystine-1 au cil primaire est décrite plus bas (voir section I.6.1.2).

I.4 Gènes mutés dans l'ADPKD

Comme mentionné précédemment dans la section I.2.1, *PKD1* et *PKD2* sont les deux gènes principalement mutés dans l'ADPKD. Le gène de *PKD1* a été cloné grâce à l'identification d'une translocation chromosomique entre les chromosomes 16 et 22 chez une famille portugaise. La présence de mutations dans le gène *PBP* (*Polycystic Break Point*) chez d'autres patients ADPKD a confirmé qu'il s'agissait du gène recherché et *PBP* a été rebaptisé *PKD1* en 1994 (1994; 1995). Le gène candidat pour le deuxième locus a été découvert par clonage positionnel en 1996 et la ségrégation de mutations non-sens chez trois familles ADPKD2 a confirmé l'identité de *PKD2* (Mochizuki et al., 1996).

I.4.1 Structure des gènes *PKD1* et *PKD2*

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 (1995; Hughes et al., 1995). Les deux tiers du gène *PKD1* humain (~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 rétropositions et/ou de recombinaisons homologues. Les pseudogènes produisent des transcrits polyadénylés et ont 97% d'homologie avec le gène *PKD1*. Le gène *PKD1* contient également des séries de polypurines-polypyrimidines dans les introns 1, 21 et 22. Ces

structures sont capables de former des triplex intramoléculaires qui peuvent prédisposer le gène à la mutagenèse (Blaszak et al., 1999). De plus, l'énorme intron 1 d'environ 15 kb pourrait contenir des éléments régulateurs transcriptionnels. Le promoteur proximal du gène *PKD1* contient des séquences consensus de liaison de différents facteurs transcriptionnels tels que AP-1, AP-2, p53, Sp1, Ets et plusieurs éléments de liaison de LEF/TCF (Lantinga-van Leeuwen et al., 2005; Rodova et al., 2002; Van Bodegom et al., 2006). Enfin, l'extrémité 3' du gène *PKD1* est en orientation « queue à queue » avec celle de *TSC2* (voir section I.2.8). Le gène *PKD1* encode pour la protéine polycystine-1 qui sera décrite en détail dans la section I.5.2.1.

Comparativement à *PKD1*, la structure du gène *PKD2* est beaucoup plus simple. *PKD2* s'étend sur 68 kb séparé en 15 exons produisant un transcrit de 5,4 kb (Hayashi et al., 1997; Wu et al., 1997). Contrairement au gène *PKD1*, le gène *PKD2* n'est pas dupliqué. Il encode pour la protéine polycystine-2 qui sera décrite en détail dans la section I.5.2.2.

I.4.1.1 Orthologues murins *Pkd1* et *Pkd2*

La souris possède les orthologues de la polykystose rénale autosomique dominante humaine. Il s'agit de *Pkd1* et *Pkd2*, correspondant au *PKD1* et *PKD2* humain, respectivement (Lohning et al., 1997). *Pkd1* se trouve sur le chromosome murin 17, tandis que *Pkd2* est situé sur le chromosome 5 (Olsson et al., 1996; Pennekamp et al., 1998; Wu et al., 1997). Contrairement au *PKD1* humain, *Pkd1* murin n'est pas dupliqué et ne contient pas de répétitions de séquence polypurine-polypyrimidine (Olsson et al., 1996; Piontek and Germino, 1999). Toutefois, la région entre les sites de polyadénylation de *Pkd1* et *Tsc2* est très conservée. Malgré quelques différences, les gènes ADPKD humains et murins possèdent ~80% d'identité entre les gènes *PKD1* et ~95% d'homologie entre les gènes *PKD2* (Guillaume et al., 1999; Lohning et al., 1997; Pennekamp et al., 1998). En plus de 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 (Barr and Sternberg, 1999; Moy et al., 1996).

I.4.2 Mutations dans les gènes *PKD1* et *PKD2*

I.4.2.1 Variabilité génétique des mutations

Jusqu'à maintenant, plus de 250 mutations ont été identifiées dans le gène *PKD1* et 70 dans *PKD2*. Ces mutations comprennent des décalages du cadre de lecture, des non-sens, des faux sens, des insertions et des délétions (Tableau I-III, page 29). Dans les deux cas, les mutations sont réparties sur toute la longueur du gène sans regroupement apparent (Rossetti et al., 2001; Veldhuisen et al., 1997). Une banque de données (PKDB) regroupant toutes les mutations germinales et somatiques ainsi que les polymorphismes de *PKD1* et *PKD2* a récemment été mise à la disposition des chercheurs et cliniciens : <http://pkdb.mayo.edu> (Gout et al., 2007).

Tableau I-III : La répartition des mutations dans les gènes *PKD1* et *PKD2*

Type de mutation	Nombre des mutations (%)	
	<i>PKD1</i>	<i>PKD2</i>
Substitutions des nucléotides		
(Faux-sens et non-sens)	143 (53%)	28 (39%)
Substitutions des nucléotides (épissage)	21 (7%)	9 (13%)
Petites délétions	62 (23%)	23 (32%)
Petites insertions	21 (7%)	8 (11%)
Grosses délétions	17 (6%)	1 (~1%)
Grosses insertions & duplications	2 (~1%)	2 (~2%)
Réarrangements complexes (inversions)	3 (~1%)	0 (0%)
TOTAL	269 (~100%)	71 (~100%)

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

I.4.2.2 Variabilité phénotypique des mutations

Une grande variabilité phénotypique inter- et intra-familiale a été observée chez les patients ADPKD, mais il ne semble pas y avoir de corrélation entre le type de mutations et la sévérité du phénotype (Hateboer et al., 1999; Milutinovic et al., 1992; Rossetti et al., 2002b). Des analyses statistiques ont montré qu'en général, les mutations à l'extrémité 5' du gène causent un phénotype plus sévère que celles à l'extrémité 3'. De plus, ces mutations en 5' sont souvent associées à un phénotype vasculaire (Rossetti et al., 2003). Les manifestations extrarénales telles que l'anévrisme cérébral ont également tendance à se regrouper chez certaines familles (Huston et al., 1993; Ruggieri et al., 1994). Malgré ces associations, une variabilité importante inter- et même intrafamiliale du phénotype est souvent rapportée chez les patients ADPKD (Fick et al., 1994; Geberth et al., 1995; Hateboer et al., 1999; Milutinovic et al., 1992). Une même mutation peut donner lieu à un phénotype différent (Milutinovic et al., 1992; Rossetti et al., 2002a). Le meilleur exemple de cette variabilité intrafamiliale est le cas de jumeaux dizygotiques porteurs d'une même mutation non-sens, mais démontrant une sévérité du phénotype très différente (Peral et al., 1996). 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; Gretz et al., 1989). En effet, le développement d'IRC survient ~5 ans plus tôt chez l'homme que chez la femme et les femmes ADPKD enceintes ont aussi plus de risque de faire de l'hypertension, suggérant un rôle hormonal dans ADPKD (Choukroun et al., 1995; Gretz et al., 1989).

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

I.4.3 Mécanismes pathogénétiques de l'ADPKD

Différentes théories ont été postulées pour expliquer la pathogenèse de la maladie, mais deux d'entre elles sont maintenant plus acceptées, soit la théorie du deuxième hit (perte d'hétérozygotie) et l'effet de dosage (haploinsuffisance).

I.4.3.1 La théorie du deuxième hit

L'ADPKD étant une maladie autosomique dominante, cela suggère qu'un seul allèle muté dans toutes les cellules permet le développement de la maladie. Toutefois, seulement une minorité de tubules (<10%) devient kystique (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 résulte en une perte totale de fonction de la polycystine. D'après cette théorie, l'inactivation d'un deuxième allèle PKD est nécessaire au développement de l'ADPKD. Dans ce cas, la polykystose rénale autosomique dominante serait une maladie récessive au niveau cellulaire. Bien qu'aucune évidence directe n'a été prouvée, il a été proposé que la formation de kystes résulterait de l'expansion clonale de cellules individuelles qui ont subi le deuxième hit dans l'allèle sauvage PKD. En effet, des mutations somatiques ou une perte d'hétérozygotie dans les allèles sauvages PKD de l'épithélium rénal et hépatique kystique ADPKD1 (Brasier and Henske, 1997; Koptides et al., 1998; Qian et al., 1996; Watnick et al., 1998b) et ADPKD2 (Koptides et al., 1999; Pei et al., 1999) ont été détectées. De plus, l'inactivation des gènes *Pkd1* et *Pkd2* chez les souris homozygotes mène à la formation de kystes rénaux (voir sections I.7.3.1 et I.7.3.5).

Enfin, l'accumulation de plusieurs conditions pourrait expliquer le haut taux de mutations somatiques observé dans l'ADPKD : 1) Le rein a un métabolisme oxydatif 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 promouvoit la mutagenèse par un mécanisme de conversion (Watnick et al., 1998a); 4) La présence d'une région riche en polypurine-polypyrimidine dans les introns 21 et 22 prédispose le gène *PKD1* à la

mutagenèse au cours de la mitose (Wang et al., 1996); 5) Certains kystes apparaissent pendant la période fœtale, soit durant une phase d'intense prolifération cellulaire et donc plus propice à l'accumulation de mutations somatiques.

La théorie du deuxième hit n'explique cependant pas la présence d'une expression élevée des polycystines-1 et -2 dans l'épithélium kystique rénal ADPKD1 et ADPKD2, respectivement (voir section I.5.4). De plus, les mutations somatiques ou les pertes d'hétérozygotie ont été détectées dans seulement ~30% des kystes (Brasier and Henske, 1997; Koptides et al., 1998; Koptides et al., 1999; Pei et al., 1999; Qian and Germino, 1997; Qian et al., 1996; Torra et al., 1996). L'épithélium rénal de ces kystes étant dans un état dédifférencié, cela suggère que les mutations somatiques représenteraient un effet secondaire plutôt qu'un initiateur de la kystogénèse.

I.4.3.2 La théorie de l'effet de dosage

Selon la théorie de l'effet de dosage, il existe un seuil critique d'expression du gène *PKD1* nécessaire pour une homéostasie rénale adéquate. Une dérégulation de ce seuil, provoquée par une augmentation ou une diminution des niveaux d'expression de *PKD1*, affecte l'homéostasie rénale et mène à la formation de kystes. La théorie d'effet dosage propose que le niveau d'expression des polycystines soit un élément important du destin de l'épithélium rénal et de l'homéostasie rénale. De manière importante, une augmentation d'expression de *PKD1* a été détectée dans les reins de patients ADPKD (Lanoix et al., 1996). Les modèles murins ADPKD renforcent également cette théorie. Une surexpression de *Pkd1/PKD1* chez deux modèles murins transgéniques (Pritchard et al., 2000; Thivierge et al., 2006), tout comme les niveaux réduits générés par un allèle *Pkd1* hypomorphe (Lantinga-van Leeuwen et al., 2004) mènent tous deux à la polykystose rénale (voir sections I.7.3.2 et I.7.3.4).

I.5 Analyses moléculaires des polycystines dans l'ADPKD

I.5.1 La famille des polycystines

Comme mentionné précédemment, les gènes *PKD1* et *PKD2* codent pour les polycystines-1 (PC1) et -2 (PC2) respectivement. Les polycystines définissent une nouvelle famille de protéines transmembranaires. En plus de PC1 et PC2, six nouveaux membres ont été identifiés par homologie de séquence. Cette famille est divisée en deux sous-groupes de protéines en tenant compte 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) (Tableau I-IV, page 34). Toutefois, seules les polycystine-1 et -2 semblent être impliquées dans la pathogenèse ADPKD.

Tableau I-IV : La famille des polycystines

Gène	Espèce	Expression	Fonction potentielle	Réf.
Famille PC1-like				
<i>PKDI</i>	humain/souris	rein, cerveau, poumon, cœur (expression ubiquitaire, forte dans le tissu fœtal)	récepteur, régulateur de canal	1,2
<i>PKDREJ</i>	humain	testicules exclusivement	récepteur	3
<i>PKD1L1</i>	humain	testicules, cœur, jéjunum, sein, cerveau, placenta	récepteur	4
<i>PKD1L2</i>	humain/souris	cœur, cerveau, rein, foie, testicules, muscle squelettique, placenta, poumon, pancréas	récepteur, canal	5,6
<i>PKD1L3</i>	humain/souris	foie, testicules, placenta, rein (expression faible)	récepteur, canal	5,6
Orthologues de PC1				
<i>lov-1</i>	<i>C. elegans</i>	neurones sensoriels mâles	récepteur, régulateur de canal	7
<i>suREJ1 à 3</i>	oursin de mer	sperme, membrane plasmique acrosomale	récepteur	8-10
Famille PC2-like				
<i>PKD2</i>	humain/souris	rein, cerveau, poumon, cœur (expression ubiquitaire, forte dans le tissu fœtal et adulte)	canal (calcium)	11,12
<i>PKD2L1</i> (<i>PKDL</i>)	humain	muscle cardiaque, muscle squelettique, cerveau, rate, testicules, rétine, rein (expression forte chez adulte)	canal (calcium)	13-16
<i>PKD2L2</i>	humain/souris	testicules	canal (calcium)	17,18
Orthologues de PC2				
<i>suPKD2</i>	oursin de mer	sperme, membrane plasmique acrosomale	canal (calcium)	19
<i>pkd-2</i>	<i>C. elegans</i>	neurones sensoriels mâles	canal (calcium)	7,12
<i>amo</i>	Drosophile	flagelle, sperme	canal (calcium)	20

Légende: *lov-1*: location of vulva; *amo*: almost there.

Références; 1-(Hughes et al., 1995); 2-(1995); 3-(Hughes et al., 1999); 4-(Yuasa et al., 2002); 6-(Li et al., 2003a); 6-(Yuasa et al., 2004); 7-(Barr and Sternberg, 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); 16-(Murakami et al., 2005); 17-(Veldhuisen et al., 1999); 18(Guo et al., 2000); 19-(Neill et al., 2004); 20-(Watnick et al., 2003).

I.5.2 Structure et interactions protéiques des polycystines

I.5.2.1 Polycystine-1

PC1 est une protéine transmembranaire de 4302 acides aminés dont la fonction n'est pas encore clairement définie (1995; Hughes et al., 1995) (Figure I-6). Elle a une masse moléculaire prédite de 460 kDa qui s'élève à environ 520 kDa en tenant compte des multiples sites de glycosylation (~60 sites de glycosylation) (Boletta et al., 2001). Elle contient plusieurs motifs protéiques distincts lui conférant un rôle potentiel dans les interactions cellules-cellules et/ou cellules matrice (Tableau I-V, page 39). La PC1 possède 11 domaines transmembranaires dont une partie amino-terminale extracellulaire qui couvre les deux tiers de la protéine (3074 aa) ainsi qu'une partie carboxy-terminale intracellulaire (199 aa) (Sandford et al., 1997).

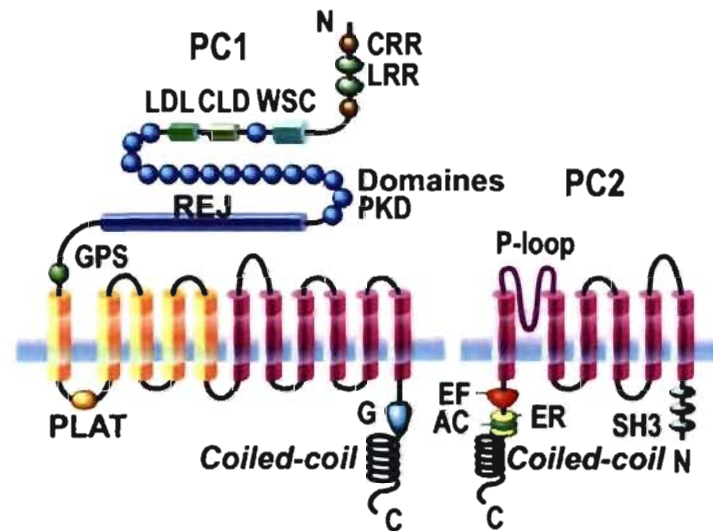


Figure I-6 : Structure protéique proposée pour la polycystine 1 et 2 (PC1 et PC2)

Légende : N : extrémité N-terminale; C : extrémité C-terminale; CRR : domaines riches en cystéines; LRR : régions riches en leucines; WSC : *cell wall integrity and stress component protein*; CLD : domaine lectine de type C; LDL : domaine de lipoprotéines de basse densité-A; REJ : *receptor for egg jelly*; GPS : *GPCR proteolytic site*; PLAT : polycystine-1, lipo-oxygénase, alpha toxine; EF : motif *EF-hand*; ER : signal de rétention du réticulum

endoplasmique; AC : domaine acide; SH3 : *Src homology domain 3*. Image adaptée de (Bichet et al., 2006).

I.5.2.1.1 *Partie extracellulaire (amino-terminale)*

Dans la partie extracellulaire de la PC1, plusieurs domaines connus pour leur implication dans différents types d'interactions cellulaires ont été identifiés par homologie de séquence. La séquence codante débute par un peptide signal de 23 aa suivi de deux répétitions riches en leucines (LRR) de type B. Le LRR se caractérise par une séquence consensus de 20-29 aa qui contient des leucines ou des acides aminés aliphatiques à des positions clés. En plus de la séquence consensus, des domaines riches en cystéines (CRR) sont situés de part et d'autre du LRR. Le motif LRR est présent chez plusieurs familles de protéines et est généralement impliqué dans les interactions protéines-protéines (Kobe and Kajava, 2001). Celui de la PC1 peut lier différentes protéines de la matrice extracellulaire telles que le collagène I, la laminine et la fibronectine et peut également interagir avec des composantes non-identifiées du liquide kystique et diminuer la prolifération cellulaire (Malhas et al., 2002). Le domaine LRR est suivi d'un domaine WSC, nommé d'après la protéine WSC1 chez *Saccharomyces cerevisiae* (*cell wall integrity and stress component protein*) et aurait un rôle de senseurs de stress environnementaux (Ponting et al., 1999). Ensuite, un domaine lectine de type C (CLD) a été identifié et pouvant lier des sucres spécifiques en présence de calcium (Weston et al., 2001). Le domaine C-lectine de PC1 est similaire à celui des protéoglycans qui interagissent avec les glycoprotéines de la matrice extracellulaire. Il y a également une séquence riche en cystéine appelée domaine LDL-A (lipoprotéines de basse densité-A) qui est généralement impliquée dans la liaison du ligand chez les récepteurs de type LDL (Sandford et al., 1997). La PC1 contient également seize nouveaux motifs appelés domaines PKD qui sont composés de 80 aa et constitués de deux feuillets β ayant un repliement similaire au domaine immunoglobuline (Bycroft et al., 1999). Des interactions homophiliques entre les différents domaines PKD ont été montrées par des essais de liaison *in vitro* (van Adelsberg, 1999). De plus, l'ajout d'un anticorps dirigé contre le domaine PKD, dans une culture de cellules MDCK perturbe les interactions

cellules-cellules (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 2000). Le module REJ qui signifie *receptor for egg jelly* a été découvert initialement chez l'oursin de mer suite à la caractérisation du récepteur impliqué dans la réaction acrosomiale (suREJ) (Tableau I-IV, page 34). Ce module d'environ 1000 aa contient dix résidus cystéines conservés pouvant être impliqué dans la régulation du transport d'ions (Moy et al., 1996). Juste en amont du premier domaine transmembranaire, se trouve un domaine GPS (*GPCR proteolytic site*) qui est un site de clivage protéolytique que l'on retrouve principalement dans les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) appartenant à la famille LNB-TM7 (Krasnoperov et al., 2002). Des études de co-immunoprécipitation ont montré que la PC1 est potentiellement clivée *in vitro* (Ponting et al., 1999; Qian et al., 2002).

I.5.2.1.2 Domaines transmembranaires

Onze domaines transmembranaires (TM I-XI) ont été identifiés par des analyses d'hydrophobicité puis récemment confirmées par des analyses biochimiques (Nims et al., 2003; Sandford et al., 1997). La première boucle intracellulaire entre les domaines transmembranaires I et II comprend un domaine PLAT (polycystine-1, lipo-oxygénase, alpha toxine). La structure tri-dimensionnelle de ce domaine est un sandwich bêta et il est généralement impliqué dans des interactions protéines-protéines et lipides-protéines (Bateman and Sandford, 1999). Cette région est certainement importante pour l'interaction avec d'autres protéines membranaires impliquées dans la fonction de PC1.

I.5.2.1.3 Partie intracellulaire (carboxy-terminale)

La partie carboxy-terminale de la PC1 est relativement courte, mais elle comprend plusieurs sites de phosphorylation potentiels, une séquence d'activation des protéines G hétérotrimériques et un domaine *coiled-coil* (Li et al., 1999; Nims et al., 2003; Parnell et al., 1999; Parnell et al., 1998; Qian et al., 1997). Une séquence PEST a également été identifiée dans le domaine cytoplasmique de la PC1 et pourrait cibler cette dernière à la dégradation limitant et contrôlant ainsi sa demie-vie. Cependant, l'interaction de la partie carboxy-terminale de PC1 avec Siah-1 semble être en partie responsable de sa dégradation

par le protéasome (Kim et al., 2004). Le domaine *coiled-coil* de la PC1 interagit avec la partie carboxy-terminale de la protéine encodée par *PKD2*, soit PC2 (Hanaoka et al., 2000; Newby et al., 2002; Qian et al., 1997; Tsiokas et al., 1997). Ce domaine interagit également avec des composantes des filaments intermédiaires et RGS7, une protéine régulatrice de la signalisation des protéines G (Kim et al., 1999a; Xu et al., 2001).

Des études de colocalisation et de co-immunoprécipitation ont également montré que la PC1 fait partie de complexes multiprotéiques. Elle peut interagir avec les cadhérines, les caténines, des protéines de liaison à l'actine (vinculine, taline et α -actinine) ainsi que des composantes des complexes d'adhésion focales (intégrine $\alpha2\beta1$, paxilline, pp125 FAK, pp60src et p130Cas) (Geng et al., 2000; Huan and van Adelsberg, 1999; Wilson et al., 1999) (Tableau I-V, page 39).

Enfin, il a été proposé que la partie C-terminale de PC1 possède un site de clivage. La protéase n'est pas connue, mais le clivage protéolytique résulte en la translocation nucléaire d'une partie de la queue cytoplasmique de PC1 (Chauvet et al., 2004) (voir section I.6.6).

Tableau I-V : Partenaires protéiques de la polycystine-1

Partenaire	Domaine de PC1 impliqué	Fonction suggérée/complexe protéique impliqué	Réf.
Canal/régulation du transport d'ions			
Polycystine-2 (hétérodimère)	CT	Canal de calcium	1-4
Polycystine-1 (homodimère ?)	ND	Canal de calcium	5
Polycystine-L	ND	Canal de calcium	6
Na-K-ATPase sous-unité α	CT	Régulation du fluide membranaire et transport d'électrolytes (ions)	7
Adhésion cellulaire			
Vinculine, paxiline, FAK	ND	Adhésion focale, cytosquelette d'actine	8, 9
Taline, p130cas, α -actinine, pp60c-src	ND	Adhésion focale, cytosquelette d'actine	9
Vimentine, cytokératine K8/K18, desmine	CT	Filaments intermédiaires	10
Collagen I, II, IV	NT-domaine C-lectine	Matrice extracellulaire	11
Fibronectine collagène I, laminine	NT-domaine LRR	Matrice extracellulaire	12
E-cadhérine, caténines (α, β, γ)	ND	Jonctions adhérentes	9, 13
Intégrine	ND	Adhésion focale, matrice extracellulaire	8, 9
Polycystine-1 (homophilique)	NT-domaine PKD	Polycystines	14
Homer 1/Vesl-1	BC (entre TM5-6)	Remodelage et plasticité synaptique	15
Annexine A5	NT-domaine LRR	Jonctions adhérentes	16
Signalisation			
JAK 2	ND	Régulation de la voie JAK/STAT	17
Tubérine	CT	Régulation de la voie PI3K/mTOR	18
Protéine G	CT	Signalisation par protéines G/voie AP1	19
RGS7	CT	Signalisation par protéines G	20
E-cadhérine, caténines (α, β, γ)	ND	Régulation de la voie Wnt	9, 14
Siah-1	CT	Ubiquitine-protéasome	21
RPTP	CT	Tyrosine phosphatase	22

Légende : NT: N-terminal; CT: C-terminal; BC: Boucle cytoplasmique; TM: transmembranaire; ND: non-déterminé; TRPC : *Transient receptor potential channel* ; FAK: *focal adhesion kinase*; RGS7: *regulator of G-proteins signaling-7* ; JAK: *janus kinase*; Siah: *Sina-Seven in absentia homolog*;

Références: 1-(Qian et al., 1997); 2-(Tsiokas et al., 1997); 3-(Hanaoka et al., 2000); 4-(Newby et al., 2002); 5-(Babich et al., 2004); 6-(Bui-Xuan et al., 2006); 7-(Zatti et al., 2005); 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 and van Adelsberg, 1999); 14-(Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 2000); 15-(Stokely et al., 2006); 16-(Markoff et al., 2007); 17-

(Bhunia et al., 2002); 18-(Shillingford et al., 2006); 19-(Parnell et al., 1998); 20-(Kim et al., 1999a); 21-(Kim et al., 2004); 22-(Sandford et al., 2006).

I.5.2.2 Polycystine-2

Contrairement à la polycystine-1, la polycystine-2 (PC2) est une protéine beaucoup plus petite de 968 acides aminés et d'un poids moléculaire de 110 kDa. PC2 contient six domaines transmembranaires et deux extrémités cytoplasmiques, amino- et carboxy-terminale (Figure I-6, page 35). Elle possède une similarité structurale avec la PC1 et est à 25% identique et à 50% similaire aux 6 derniers domaines transmembranaires de la PC1 (Mochizuki et al., 1996). De plus, il y a 30% d'identité et 50% d'homologie entre les extrémités C-terminales de PC2 et PC1 contenant toutes deux un domaine « *coiled-coil* » (Hughes et al., 1995). À son extrémité carboxy terminale, la PC2 possède en plus un signal de rétention du réticulum endoplasmique (ER) et un motif *EF-hand* (EF) (Cai et al., 1999; Mochizuki et al., 1996). Le motif *EF-hand* a une structure hélice-boucle-hélice particulière responsable de la liaison aux ions Ca^{2+} (Nakayama and Kretsinger, 1994). Du côté extracellulaire, PC2 possède une boucle (*P-loop*) entre les segments transmembranaires 5 et 6 qui semble être impliquée dans la formation du pore (Hanaoka et al., 2000). D'ailleurs, PC2 possède une similarité de séquence d'environ 50% avec la sous-unité alpha du canal calcique voltage dépendant ($VACC_{\alpha 1E}$). Elle partage également 25% d'homologie avec les canaux membranaires Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et les canaux de cations TRP (*transient receptor potential*) d'où son deuxième nom, la TRPP2. La fonction potentielle de PC2 serait un canal cationique non sélectif perméable au calcium, pouvant réguler le cycle cellulaire et la prolifération (Gonzalez-Perrett et al., 2001; Grimm et al., 2006; Hanaoka et al., 2000; Li et al., 2005c; Vassilev et al., 2001). En plus de former des homodimères, la PC2 interagit avec plusieurs protéines dont la PC1, le canal TRPC1 et le récepteur IP3 de type I, un canal du réticulum endoplasmique sensible aux niveaux de calcium intracellulaires (Li et al., 2005d; Qian et al., 1997; Tsiokas et al., 1999; Tsiokas et al., 1997). PC2 est d'ailleurs localisée au RE et son transport intracellulaire est régulé, entre autres, par l'interaction de son domaine acide (AC) avec les protéines PACS 1 et 2 (Kottgen et al., 2005). La PC2 se

lie également à des protéines du cytosquelette incluant CD2AP, HAX-1, tropomyosine-1, la troponine-1 et mDia-1 (Tableau I-VI) (Gallagher et al., 2000; Lehtonen et al., 2000; Li et al., 2003b; Li et al., 2003c; Rundle et al., 2004).

Tableau I-VI : Partenaires protéiques de la polycystine-2

Partenaire	Domaine de PC2 impliqué	Fonction suggérée/ Complexe protéique impliqué	Références
Polycystine-1 (hétérodimère)	CT	Canal ionique	1-4
Polycystine-2 (homodimère)	CT	Canal ionique	3-6
Fibrocystine		Mécanotransduction au cil primaire	7
TRPC1	CT	Canal ionique	8
Récepteur IP ₃ type I	CT	Canal ionique	9
CD2AP	CT	Cytosquelette d'actine	10
Hax-1	CT	Cytosquelette d'actine	11
Troponine-1	CT	Cytosquelette d'actine	12
Tropomyosine-1	CT	Cytosquelette d'actine	13
α -actinine	NT, CT	Cytosquelette d'actine	14
PACS1; PACS2	CT	Transport intracellulaire	15
PIGEA-14	CT	Transport intracellulaire	16
mDia1	CT	Canal ionique nécessaire lors de la division cellulaire	17
Pericentrine	ND	Assemblage de cils primaires	18
Id2	CT	Cycle cellulaire	19
Kim1	CT	Mécanotransduction au cil primaire	20
Kif3B	CT	Mécanotransduction au cil primaire	21
Kif3A	CT	Mécanotransduction au cil primaire	22
TAZ	CT	Dégradation via E3 ubiquitine ligase	23

Légende : CT: C-terminal; NT: N-terminal; ND: non déterminé; TRPC: *transient receptor potential channel*; PIGE-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*;

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-(Wang et al., 2007); 8-(Tsiokas et al., 1999); 9-(Li et al., 2005d); 10-(Lehtonen et al., 2000); 11-(Gallagher et al., 2000); 12-(Li et al., 2003c); 13-(Li et al., 2003b); 14-(Li et al., 2005b); 15-(Kottgen et al., 2005); 16-(Hidaka et al., 2004); 17-(Rundle et al., 2004); 18-(Jurczyk et al., 2004); 19-(Li et al., 2005c); 20-(Kotsis et al., 2007); 21-(Wu et al., 2006); 22-(Li et al., 2006); 23-(Tian et al., 2007).

I.5.3 L'expression endogène des polycystines

I.5.3.1 Localisation intracellulaire des polycystines

I.5.3.1.1 Polycystine-1

PC1 étant une protéine transmembranaire, elle est principalement détectée à la membrane plasmique apicale et basolatérale, mais est également présente dans le cytoplasme (Boletta et al., 2001; Geng et al., 1996; Huan and van Adelsberg, 1999; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1997; Peters et al., 1999; Scheffers et al., 2000). Cette localisation membranaire et cytoplasmique peut s'expliquer par un recyclage continu de PC1 à l'intérieur de la cellule et dépend des conditions cellulaires et de ses partenaires protéiques. En effet, la localisation intracellulaire de la PC1 est dictée par d'autres protéines telles que la PC2 et la tubérine (Grimm et al., 2003; Kleymenova et al., 2001). Elle est également dépendante du stade de développement et de la polarisation de l'épithélium tubulaire. La PC1 a été détectée aux jonctions serrées et adhérentes, aux desmosomes, aux adhésions focales et aux vésicules apicales. De plus, PC1 est localisée au niveau du cil primaire de l'épithélium rénal, un organelle qui semble jouer un rôle important dans l'ADPKD (Nauli et al., 2003; Yoder et al., 2002a). Une localisation nucléaire a même été observée par le groupe du Dr. Caplan qui a proposé que le fragment C-terminal de PC1 est clivé et transloqué au noyau (Chauvet et al., 2004).

I.5.3.1.2 Polycystine-2

Jusqu'à tout récemment, la localisation sous-cellulaire de la PC2 était assez controversée puisque, selon les études effectuées, elle est localisée au niveau du réticulum endoplasmique ou à la membrane plasmique (Foggensteiner et al., 2000; Koulen et al., 2002; Vassilev et al., 2001). Sa localisation sub-cellulaire peut également varier selon le type de cellules employées et même selon qu'on étudie la protéine transfectée ou endogène (Luo et al., 2003). PC2 a donc comme fonction de réguler l'accumulation cytosolique de

calcium tant au niveau de la membrane plasmique qu'au niveau de la relâche de Ca^{2+} par le réticulum endoplasmique. De plus, tout comme PC1 ou même en complexe avec ce dernier, PC2 est localisée au cil primaire. Le complexe PC1/PC2 au niveau du cil répond à la force du fluide urinaire dans la lumière des tubules par une réponse mécanosensorielle, en régulant l'entrée de calcium intracellulaire (Nauli et al., 2003).

I.5.3.2 L'expression tissulaire des polycystines

I.5.3.2.1 Expression comparative de Pkd1 et Pkd2

Étant donné la controverse entourant la spécificité des nombreux anticorps générés contre les polycystines, des études comparatives de l'expression des transcrits *Pkd1* et *Pkd2* ont été réalisées au cours du développement murin. Ces études d'hybridation *in situ* ont montré que *Pkd1* et *Pkd2* sont exprimés au stade de la morula (8-16 cellules) et au cours du développement embryonnaire ils sont exprimés dans tous les tissus mésenchymateux et cartilagineux. Des divergences entre les profils d'expression de *Pkd1* et *Pkd2* sont cependant observées au niveau des tissus dérivés des cellules de la crête neurale et du système nerveux central où l'expression de *Pkd1* est élevée alors que celle de *Pkd2* est difficilement détectable. De plus, contrairement à *Pkd2*, *Pkd1* est exprimé pendant la condensation du mésenchyme (Guillaume et al., 1999; Guillaume and Trudel, 2000).

I.5.3.2.2 Expression rénale des polycystines

I.5.3.2.2.1 Polycystine-1

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. Dans le rein foetal humain, l'expression de PC1 est élevée dans l'épithélium tubulaire tout le long du néphron, alors que dans le rein mature, elle se concentre principalement dans les tubules distaux et collecteurs (Ibraghimov-Beskrovnya et al., 1997; Ong et al., 1999a; Ong et al., 1999b; Palsson et al., 1996; Peters et al., 1996; Ward et al., 1996). Chez la souris,

l'expression rénale élevée au stade fœtal atteint des niveaux d'expression maximale entre les jours embryonnaires 15.5 et 18.5, puis diminue de façon importante au stade adulte (Geng et al., 1997; Griffin et al., 1997; Van Adelsberg et al., 1997). Cette prédominance d'expression de PC1 dans l'épithélium tubulaire mature ainsi que son absence à l'extrémité du bourgeon urétéral et dans le mésenchyme non-induit, suggère un rôle de la PC1 dans la différenciation terminale tubulaire plutôt que dans l'induction même de la tubulogenèse.

I.5.3.2.2 Polycystine-2

La PC2 humaine et murine est exprimée dans toutes les parties épithéliales du néphron et est très élevée chez le fœtus. Toutefois, contrairement à la PC1, ces niveaux d'expression ne semblent pas diminuer avec la maturité du tissu (Foggensteiner et al., 2000; Markowitz et al., 1999; Ong et al., 1999a; Ong et al., 1999c).

I.5.3.2.3 Expression extrarénale des polycystines

I.5.3.2.3.1 Polycystine-1

La PC1 humaine est exprimée dans les hépatocytes et l'épithélium biliaire du foie, les cellules endocrines des îlots pancréatiques, les cellules musculaires lisses des valves cardiaques, les myofibres du muscle squelettique, les cellules épithéliales pulmonaires, l'intestin, la peau, la rate et le cerveau (Peters et al., 1999; Weston et al., 1997). Chez la souris, le profil d'expression extrarénal de la PC1 est très semblable à celui de l'humain (Geng et al., 1997; Griffin et al., 1997). La PC1 murine est détectée à des niveaux élevés dans le système cardiovasculaire, le cœur et l'endothélium des vaisseaux majeurs, incluant l'aorte et les artères intracrânielles (Boulter et al., 2001).

I.5.3.2.3.2 Polycystine-2

La PC2 humaine est détectée dans les structures épithéliales du pancréas, du foie, des poumons et des intestins ainsi que dans le cerveau, les neurones, le cœur, les muscles vasculaires lisses et les muscles squelettiques (Ong et al., 1999c). À l'exception d'une haute expression dans le rein, la PC2 murine est cependant particulièrement détectée 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).

I.5.4 L'expression des polycystines dans l'ADPKD

Chez les patients ADPKD1 adultes, une majorité de cellules épithéliales tubulaires kystiques exprime la PC1 à des niveaux particulièrement élevés, alors qu'une minorité des kystes en est complètement dépourvue. De plus, la distribution intracellulaire de la PC1 chez les patients ADPKD est anormale où elle acquiert surtout une localisation cytoplasmique plutôt que membranaire (Palsson et al., 1996). Quant aux patients ADPKD2, les mêmes observations sont rapportées où une majorité des kystes exprime la PC2, alors qu'une minorité n'en exprime pas, suggérant des mécanismes de pathogenèse d'ADPKD1 et d'ADPKD2 similaires (Ong et al., 1999c).

I.6 Voies de signalisation de la polycystine-1

La PC1 est généralement vue comme un régulateur de la croissance et de la maturation de l'épithélium tubulaire rénal, mais ce mécanisme n'est pas clairement défini. La PC1 semble faire partie d'un complexe multi-protéique comprenant entre autre la PC2 et ayant la capacité d'activer plusieurs voies de signalisations. Pour comprendre la fonction de la PC1 et ainsi trouver des nouveaux traitements pour l'ADPKD, il est impératif de connaître les voies de signalisation régulées par la PC1 (Figure I-7, page 46).

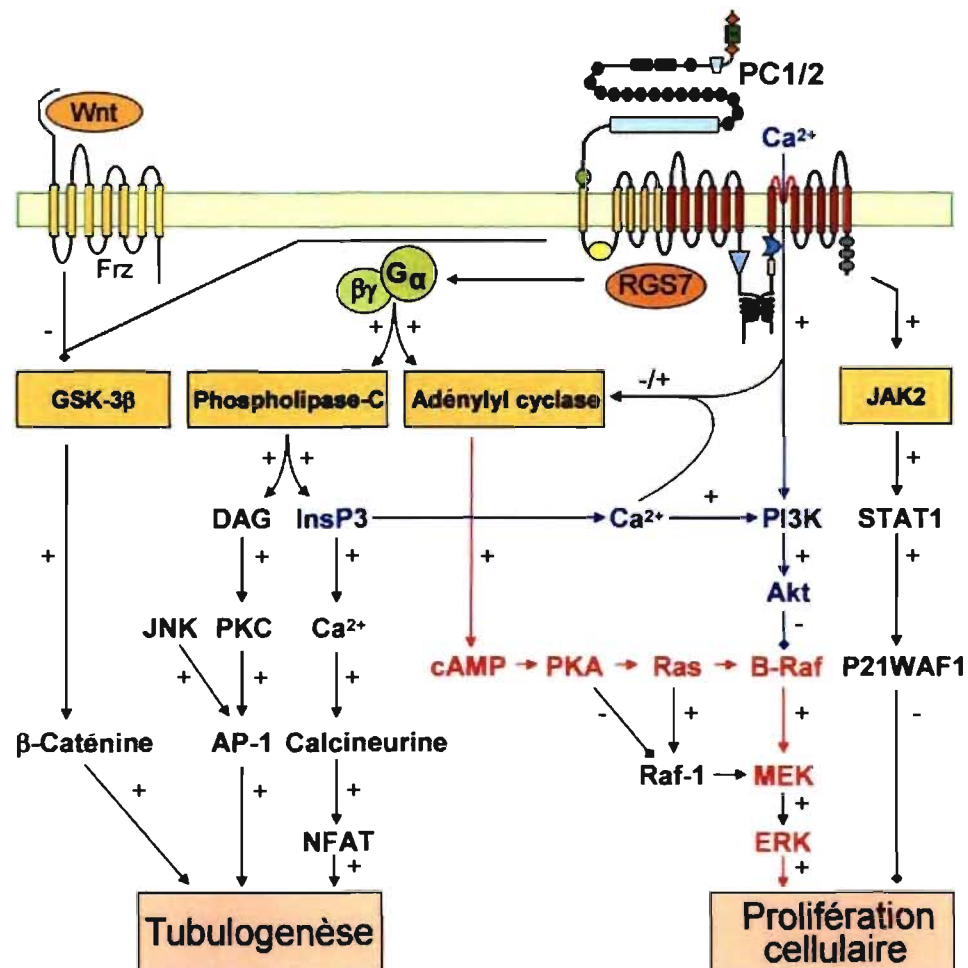


Figure I-7 : Voies de signalisation induites par les polycystines

Schéma représentant la plupart des voies de signalisation induites par PC1/PC2. Les voies d'activation de la prolifération sont en rouge, alors que les voies d'inhibition sont en bleu. Image adaptée de (Delmas, 2005)

I.6.1 Régulation de l'influx de calcium

I.6.1.1 Relâche de calcium intracellulaire

Le calcium est un second messenger très puissant qui est impliqué dans une série d'événements intracellulaires de signalisation. La PC1, située soit à la membrane plasmique ou au cil primaire (voir section I.6.1.2), peut réguler l'entrée de Ca²⁺ dans la

cellule par l'entremise de l'activité du canal ionique de la PC2 (Babich et al., 2004; Delmas et al., 2004; Hanaoka et al., 2000; Xu et al., 2003a). Cet influx de Ca^{2+} peut par la suite induire la relâche de Ca^{2+} intracellulaire initiée par l'inositol-1,4,5-triphosphate (InsP3), puis amplifiée par la PC2 située à la membrane du réticulum endoplasmique, afin de réguler la prolifération cellulaire (Koulen et al., 2002; Nauli and Zhou, 2004). Le calcium intracellulaire régule la concentration d'AMP cyclique (AMPC), un stimulateur de la sécrétion de fluide et de la prolifération des cellules épithéliales rénales (Belibi et al., 2004). L'AMPC a un effet activateur sur la voie MAPK/ERK (*mitogen-activated protein kinases/extracellularly regulated kinase*) dans ces cellules, mais a un effet inhibiteur dans des cellules de type sauvages (Hanaoka et al., 2000; Yamaguchi et al., 2003). Les taux réduits d'emmagasinage de Ca^{2+} intracellulaire observés dans les cellules ADPKD semblent augmenter l'efficacité de l'AMPC à stimuler la kystogénèse (Ahrabi et al., 2007; Yamaguchi et al., 2006).

I.6.1.2 Mécanosensation au niveau du cil primaire

La localisation du complexe PC1/PC2 au cil primaire joue rôle dans la stimulation de l'influx de calcium en réponse à une stimulation mécanique. L'influx de Ca^{2+} en réponse au courant urinaire est perturbé dans des cellules isolées de souris mutantes pour *Pkd1* et dans des cellules de type sauvage traitées avec un anticorps contre les domaines extracellulaires de PC1 ou PC2 (Nauli et al., 2003). Le mécanisme par lequel la mécanosensation et l'entrée de Ca^{2+} contrôlent la différenciation de l'épithélium tubulaire demeure inconnu. Cependant, le courant urinaire pourrait conduire à l'interruption de la voie canonique Wnt/ β -caténine et possiblement stimuler la voie noncanonique Wnt/ Ca^{2+} par l'augmentation de l'expression d'inversine (voir section I.6.3 et Figure I-8, page 51) (Simons et al., 2005).

I.6.2 Activation des petites protéines G hétérotrimériques

La présence d'un domaine GPS et d'une séquence d'activation des protéines G dans la PC1 (voir section I.5.2.1) suggère que celle-ci agit comme un récepteur couplé aux protéines G

(GPCR). Des études *in vitro* ont démontré que le domaine d'activation des protéines G de la PC1 peut lier et activer les protéines G hétérotrimériques $G\alpha\beta\gamma$ (Parnell et al., 1998), dont l'activité est régulée par l'interaction entre la partie carboxy-terminale de la PC1 et RGS7 *Regulators of G-protein signaling* (Kim et al., 1999a). Il a été rapporté que la relâche des sous-unités $G\beta\gamma$ par PC1 module l'activité de canaux ioniques Ca^{2+} et K^+ , mais est inhibée par la co-expression de la PC2 (Delmas et al., 2002). Cette activation des protéines-G stimule les voies de l'adénylate cyclase, des MAPK/ERK et de la calcineurine/NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) (Manzati et al., 2005; Puri et al., 2004), ce qui contribue à la formation de kystes en modulant la prolifération cellulaire, la sécrétion transépithéliale de fluide et la différenciation (Figure I-7, page 46).

Une cible majeure de la signalisation PC1/protéines-G est le facteur de transcription AP-1 (*activator protein-1*) dont l'activité est modulée par la PKC, le calcium intracellulaire, les kinases d'adhésion focale, la *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) et les petites GTPase de la famille Rho, Cdc42 et Rac-1 (Arnould et al., 1998; Le et al., 2004; Le et al., 2005; Parnell et al., 2002). De plus, il a été proposé que les voies NF-kappaB et PI3K/Akt sont impliquées dans la signalisation antiapoptotique de PC1/protéines-G pour obtenir une tubulogénèse normale (Banzi et al., 2006; Boca et al., 2006). Somme toute, ces données suggèrent qu'une perturbation du complexe des polycystines peut induire une activité anormale des protéines G dans l'ADPKD.

I.6.3 La voie des Wnt

L'activation de la voie des Wnt est impliquée dans différents processus au cours du développement rénal (voir section I.1.3.3.1), mais est aussi dérégulée dans la PKD. L'activation de la voie des Wnt induit la stabilisation de la β -caténine, provoquant sa translocation nucléaire et la transcription de gènes cibles impliqués dans plusieurs processus embryonnaires et adultes (Huelsenken and Behrens, 2002). Cette voie est communément appelée la voie canonique des Wnt, mais certains Wnt activent des voies noncanoniques indépendantes de la β -caténine. Chez les vertébrés, la voie noncanonique

contrôle entre autres des aspects du mouvement pendant la gastrulation via un mécanisme similaire à celui de la polarité cellulaire planaire (PCP) chez la drosophile.

D'un point de vue mécanistique, les ligands Wnt lient et transmettent leur signal via les récepteurs à 7 passages transmembranaires de la famille *frizzled* et leurs corécepteurs LRP5/6 (Logan and Nusse, 2004). Cette liaison conduit au recrutement à la membrane de la protéine cytoplasmique *dishevelled* (Dvl). C'est en aval de Dvl que les voies canoniques et noncanoniques divergent où la première utilise l'activité transcriptionnelle de la β -caténine et l'autre non.

I.6.3.1 La voie canonique des Wnt

La stabilité de la β -caténine est assurée par Dvl qui empêche la formation du complexe APC (*adenomatous polyposis coli*)/Axin/GSK-3 β (*Glycogen synthase kinase -3 β*). En effet, en absence de ligand Wnt, ce complexe est responsable de la dégradation de la β -caténine en la dirigeant vers le complexe ubiquitin-protéasome. En présence de ligand, l'activation de la voie canonique induit donc l'accumulation cytoplasmique de la β -caténine et sa translocation nucléaire en association avec Pygopus et Legless/BCL-9 pour stimuler l'activité transcriptionnelle des membres de la famille Lef/TCF (*Lymphoid enhancer factor/T-cell factor*) (Figure I-8, page 51) (Townsend et al., 2004). Parmi les nombreux gènes cibles du complexe β -caténine-Lef/TCF, certains possèdent un potentiel oncogénique tel que *c-myc*, *c-jun* et *cycline D1* (He et al., 1998; Mann et al., 1999; Tetsu and McCormick, 1999).

D'ailleurs, la β -caténine et certains de ces gènes cibles sont surexprimés dans plusieurs formes humaines et murine de polykystose rénale (Gattone et al., 2002; Hu et al., 2003; Kim et al., 1999b; Lanoix et al., 1996; Qian et al., 2005; Song et al., 2006; Sorenson, 1999). De plus, une surexpression de la β -caténine *in vivo*, soit chez des souris avec une délétion rénale-spécifique d'APC ou chez des souris qui surexpriment une forme constitutivement active de la β -caténine, développent des kystes rénaux (Qian et al., 2005; Saadi-Kheddouci et al., 2001). La voie canonique des Wnt semble jouer un rôle direct dans la PKD où la β -caténine serait impliquée dans la régulation de la survie et la prolifération

cellulaire. D'ailleurs, des évidences *in vitro* proposent que la partie C-terminale de PC1 module la voie des Wnt (Kim et al., 1999b). PC1 influence également la localisation de β -caténine à la membrane puisque PC1, E-cadhérine et les caténines forment un complexe aux jonctions adhérentes (Huan and van Adelsberg, 1999; Roitbak et al., 2005; Roitbak et al., 2004).

I.6.3.2 Les voies noncanoniques des Wnt

Les voies noncanoniques des Wnt impliquent l'activation de JNK et des petites GTPase de la famille de Rho qui vont contrôler le réarrangement du cytosquelette, coordonner la polarisation de l'épithélium ainsi que les mouvements morphogéniques durant le développement (Veeman et al., 2003; Wallingford et al., 2002). La voie Wnt/ Ca^{2+} est une autre voie noncanonique qui mène à la relâche intracellulaire de calcium impliquée dans la ventralisation chez le *Xenopus* et la régulation de mouvements cellulaires chez l'embryon (Miller et al., 1999; Veeman et al., 2003; Wallingford et al., 2002). Contrairement à la voie canonique qui stimule la prolifération cellulaire, la voie noncanonique contrôle plutôt l'orientation dans l'espace de la division cellulaire. En effet, il a été proposé qu'une division normalement orientée dans le plan proximal-distal de l'épithélium rénal résulte en une croissance tubulaire en longueur plutôt qu'en largeur (Fischer et al., 2006). Un défaut dans la voie noncanonique et subséquemment, une mauvaise orientation de la division cellulaire résulterait en la propagation de tubules plus larges, contribuant possiblement à la formation de kystes.

Les voies canoniques et noncanoniques pourraient être antagonistes l'une envers l'autre. Il est donc possible que l'activation de la voie canonique observée dans différents cas de polyktyoses inhibe la voie noncanonique et vice versa. Cette hypothèse est supportée par de récentes données sur le gène de la néphronothisie de type II, *Inversine* (voir section I.2.3). *Inversine* a été démontrée comme pouvant simultanément inhiber la voie canonique et promouvoir la voie noncanonique dans des embryons de *Xenopus* (Simons et al., 2005). *Inversine* agit en amont de la β -caténine en stimulant la dégradation de Dvl, laissant libre cours au complexe APC/Axin/GSK3 de conduire la β -caténine à la dégradation (figure I.8,

page 51). Des souris mutantes pour inversine développent des kystes rénaux (Phillips et al., 2004). Le rôle de la voie noncanonique dans le développement rénal et la kystogénèse tout comme une possible régulation par PC1 reste à définir.

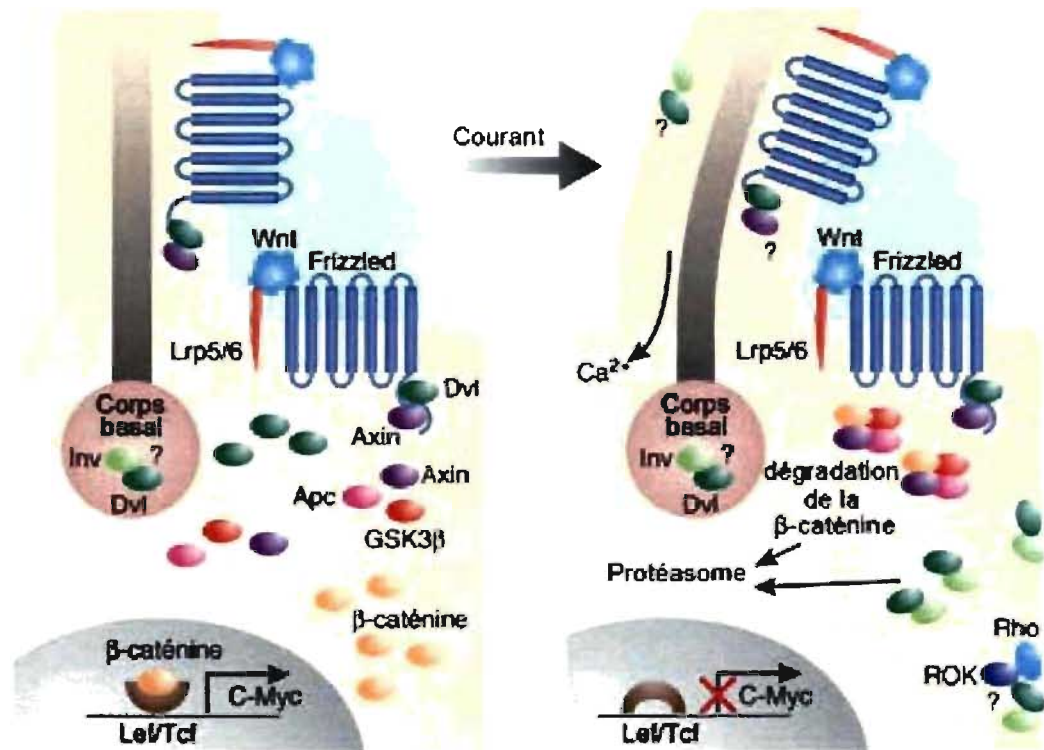


Figure I-8 : Modèle de la régulation de la voie des Wnt par le cil primaire rénal

Dans le modèle proposé par Simons *et al.*, la voie canonique des Wnt est activée en absence de courant urinaire (gauche). La stimulation du cil par le courant semble causer l'augmentation d'expression de l'inversine (Inv) qui réduit les niveaux de Dvl par la stimulation de sa dégradation protéasomique. Ce processus bloquerait la voie canonique en permettant l'assemblage du complexe de dégradation de la β -caténine. Inv pourrait également transporter Dvl à la membrane plasmique pour stimuler les composantes de la voie non-canonique (droite). Les points d'interrogation signifient que la présence des complexes Inv-Dvl ou Frizzle-Lrp aux cil/corps basal/centrosome est incertaine. Image adaptée de (Germino, 2005).

I.6.4 La voie mTOR

PC1 régule une voie importante de la croissance et de la prolifération cellulaire en inhibant l'activité de la Sérine/Thréonine kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (Shillingford et al., 2006). Cette inhibition est dépendante de l'interaction directe ou indirecte de la partie cytoplasmique de la PC1 avec la tubérine, le produit du gène TSC2 (voir section I.2.8) (Shillingford et al., 2006). La tubérine est un important régulateur de l'activité de mTOR (Inoki et al., 2005; Inoki et al., 2003; Li et al., 2004). Le rôle majeur de l'activation de mTOR dans la kystogenèse a également été démontré par l'amélioration du phénotype kystique chez des modèles murins de l'ADPKD, suite à un traitement à la rapamycin (ou sirolimus), un inhibiteur bien connu de mTOR (Tao et al., 2005a; Wahl et al., 2006).

I.6.5 La voie JAK/STAT

L'expression de la PC1 active la voie JAK2 (*Janus kinase*) et STAT1/3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) et ainsi permet à p21^{waf1} d'induire un arrêt du cycle cellulaire en G₀/G₁ (Figure I-7, page 46) (Bhunia et al., 2002). L'activation de cette voie est dépendante de l'expression du canal PC2 et peut expliquer en partie le fait que la croissance cellulaire est dérégulée suite à des mutations dans les gènes *PKD1* et *PKD2* dans l'ADPKD.

De plus, le fragment généré par clivage protéolytique de la partie C-terminale de PC1 interagit avec le facteur de transcription STAT6 et le coactivateur P100 pour stimuler l'expression de gènes STAT6-dépendants. Ce processus est en lien étroit avec la fonction de mécanosensation du cil primaire puisqu'en condition normale STAT6 est localisée au cil primaire et est transloquée au noyau suite à une perturbation du courant de fluide urinaire (Low et al., 2006).

I.6.6 Translocation nucléaire de la région carboxy-terminale de la PC1

Le clivage et la translocation nucléaire de la partie carboxy-terminale de la PC1 (CTT) ont d'abord été proposés par le groupe de Michael J. Caplan (Chauvet et al., 2004). Cependant, la taille de la queue cytoplasmique de PC1 générée suite au clivage protéolytique rapportée par ce groupe diffère de celle détectée par le groupe de Thomas Weimbs (Low et al., 2006) (voir section I.6.5). Ce processus protéolytique est connu sous le nom de *regulated intramembrane proteolysis* (RIP) et est subit par plusieurs protéines membranaires telles que Notch, APP, E-cadherine, ErbB-4 et CD44 (Brown et al., 2000; Urban and Freeman, 2002). Dans le cas de la PC1, la protéase impliquée dans le RIP est inconnue, mais semble être activée au niveau du cil primaire par un stimulus mécanique comme le courant urinaire dans la lumière du tubule. De plus, le mécanisme de translocation nucléaire n'est pas encore bien défini, mais la partie carboxy-terminale de la PC1 possède une séquence de localisation nucléaire potentielle communément appelée NLS. Finalement, la queue carboxy-terminale de la PC1 active la voie AP-1 et est modulée par la présence de la PC2 (Chauvet et al., 2004). Récemment, une coimmunoprécipitation a été réalisée entre la CTT et la β -caténine démontrant que ce complexe facilite la séquestration de la β -caténine dans le cytoplasme et ainsi empêcherait l'activation de gènes cibles de la voie de β -caténine tout en activant la voie non canonique JNK/AP-1 (Le Moellic et al., 2006).

I.7 Modèles murins de polykystose rénale

Les modèles animaux sont essentiels pour étudier les maladies génétiques et développer des stratégies thérapeutiques. Bien avant que les gènes humains de *PKD1* et *PKD2* ne soient clonés, une pathologie rénale similaire à PKD a été observée chez plusieurs modèles de rat et de souris. Plusieurs de ces modèles sont le résultat de mutations spontanées, alors que d'autres ont été générés par mutagenèse insertionnelle ou chimique, par transgénèse et par ablation génique germinale ou conditionnelle (Tableau I-VII, page 56 ; I-VIII, page 58 et I-IX, page 59). Le modèle idéal devrait reproduire le phénotype typique de l'ADPKD ou

ARPKD et porter des mutations sur les gènes orthologues. Toutefois, peu ou même aucun modèle existant ne rencontre tous ces critères. Par exemple, le rat *pck* est un modèle produit par une mutation dans le gène orthologue de l'ARPKD, *Pkhd1*, mais démontre une progression phénotypique lente avec des caractéristiques de l'ADPKD et l'ARPKD (Lager et al., 2001). Étonnamment, aucun des modèles murins de polykystose rénale générés par mutations spontanées ou chimiques n'affecte les deux gènes orthologues responsables de l'ADPKD chez l'humain soit *Pkd1* et *Pkd2*. Depuis, les souris mutantes pour *Pkd1* et *Pkd2* ont été produites et sont décrites dans la section I.7.3.

I.7.1 Mutants spontanés, insertionnels et chimiquement induits

Les premiers modèles murins de la polykystose ont été produits suite à des traitements chimiques comme les dérivés des diphénylamine (DPA) (Carone et al., 1974), les acides nordihydroguaiarétiques (NDGA) (Goodman et al., 1970) et les glucocorticoïdes (Baylis and Brenner, 1978), suggérant que des facteurs environnementaux peuvent influencer le développement de kystes rénaux.

La plupart des gènes mutés dans les différents modèles de mutants spontanés sont maintenant identifiés (Tableau I-VII, page 56). Plusieurs de ces gènes codent pour des protéines associées aux cils primaires. C'est le cas entre autres du premier modèle PKD généré par mutation spontanée, la souris *cpk* (*congenital polycystic kidneys*), dont le gène muté *Cys1*, code pour la protéine cystine (Hou et al., 2002; Preminger et al., 1982). Cette protéine joue un rôle au niveau du cil primaire des cellules épithéliales rénales où elle est colocalisée avec PC1, PC2 et polaris (protéine mutée chez le modèle *orpk*) (Hou et al., 2002; Yoder et al., 2002a). Par contre, la progression rapide des kystes rénaux chez le modèle *cpk* s'apparente plutôt à la forme récessive de la maladie (ARPKD). L'homologue humain du gène *Cys1* a été localisé, mais n'a toujours pas été associé à une pathogenèse humaine (Fliegauf et al., 2003).

Certains gènes comme *Pkhd1*, *Nphp3* et *Mks3*, identifiés dans des maladies kystiques rénales présentées dans la section I.3, ont été associés à différents modèles PKD de mutants

spontanés, soit *Pck*, *Pcy* et *Wpk* respectivement (Lager et al., 2001; Nauta et al., 2000b; Olbrich et al., 2003; Smith et al., 2006b; Ward et al., 2002). De plus, le rat *Han:SPRD-cy* est un modèle fréquemment utilisé pour étudier l'ADPKD et porte une mutation dans le gène *Pkdr1* codant pour la SamCystine dont la fonction demeure inconnue à ce jour (Bihoreau et al., 1997; Brown et al., 2005; Cowley et al., 1993).

Parmi les modèles générés par mutation insertionnelle, notons la souris *jck* (*juvenile cystic kidney*), dont le gène *Nek8* de la famille des kinases NIMA (*never in mitosis A*) a été identifié (Liu et al., 2002). La fonction des *Nek* est de coordonner la formation du cil et la progression du cycle cellulaire (Mahjoub et al., 2005; Smith et al., 2006a). Deux autres mutants d'insertion ont été générés, soit *orpk* et *inv* qui ont entre autres été utilisés pour étudier le rôle du cil primaire dans la kystogénèse. Ces gènes mutés codent respectivement pour les protéines polaris et inversine, toutes deux localisées et impliquées dans la formation du cil primaire (Nurnberger et al., 2004; Phillips et al., 2004; Yoder et al., 2002b).

Tableau I-VII : Modèles murins de la polykystose rénale par mutations spontanées, insertionelles et chimiquement induites

Modèle (espèce)	Trait	Gène (protéine)	Fonctions proposées	Réf
Mutations spontanées				
<i>Pck</i> (r)	AR	<i>Pkhd1</i> (Fibrocystine)	Ciliogenèse	1
<i>Cpk</i> (s)	AR	<i>Cys1</i> (Cystine)	Ciliogenèse	2
<i>Pcy</i> (s)	AR	<i>Nphp3</i> (Nephrosistine-3)	Ciliogenèse	3
<i>Wpk</i> (r)	AR	<i>Mks3</i> (Meckeline)	ND	4
<i>Han:SPRD-cy</i> (r)	AD/AR	<i>Pkdr1</i> (SamCystine)	Fonction indéterminée	5
<i>Kat; Kat^{2J}</i> (s)	AR	<i>Nek1</i> (Nek1)	Ciliogenèse et cycle cellulaire	6
<i>Bpk</i> (s)	AR	<i>Bicc1</i> (Bicaudal C)	Régulation de la traduction	7
Mutations insertionelles				
<i>Jck</i> (s)	AR	<i>Nek8</i> (Nek8)	Ciliogenèse et organisation du cytosquelette	8
<i>Orpk</i> (s)	AR	<i>TG737</i> (Polaris)	Ciliogenèse	9
<i>Inv</i> (s)	AR	<i>Inv</i> ou <i>Nphp2</i> (Inversine)	Ciliogenèse, adhésion cellulaire, voie des Wnt	10
<i>Eker</i> (r)	AR	<i>Tsc2</i> (tubérine)	Suppresseur de tumeur	11
Mutations chimiquement induites				
DPT (r)	-	-	-	12
NDGA (r)	-	-	-	13
Glucocorticoïde (r)	-	-	-	14
DC101 et MF1 (s)	-	VEGFR	Angiogenèse	15
<i>Jcpk</i> (s)	AD/AR	<i>Bicc1</i> (Bicaudal C)	Régulation de la traduction	16

Légende : r: rat; s: souris; AR: autosomique récessive; AD: autosomique dominante; ND: non déterminé; -: non applicable; *cpk*: congenital polycystic kidneys; *pcy*: polycystic; *Wpk*: Wistar polycystic kidneys; *Han*: Hannover; *kat*: kidney anemia and testis; *bpk*: BAL/C polycystic kidneys; *jck*: juvenile cystic kidneys; *orpk*: Oak Ridge polycystic kidneys; *inv*: inversion of embryonic turning.; NDGA: acide nordihydroguaiarétique; DPT: 2-amino-4,5-diphényl thiazole; DC101 et MF1 : anticorps contre VEGFR; *jcpk*: juvenile congenital polycystic kidney

Références : 1-(Lager et al., 2001); 2-(Preminger et al., 1982); 3-(Takahashi et al., 1986); 4-(Nauta et al., 2000a); 5-(Cowley et al., 1993); 6-(Janaswami et al., 1997); 7-(Guay-Woodford et al., 1996); 8-(Atala et al., 1993); 9-(Moyer et al., 1994); 10-(Mochizuki et al., 1998); 11-(Kobayashi et al., 1995); 12-(Kanwar and Carone, 1984); 13-(Goodman et al., 1970); 14-(Baylis and Brenner, 1978); 15-(McGrath-Morrow et al., 2006); 16-(Flaherty et al., 1995)

I.7.2 Ablations géniques et transgéniques

Dans le même ordre d'idée, les technologies d'ablation génique et de transgénèse ont permis d'identifier des gènes majeurs ou modificateurs de la kystogénèse. En général, ces gènes sont impliqués dans le développement rénal au niveau de la prolifération, l'adhésion et la différenciation cellulaire ainsi que l'apoptose et la ciliogénèse. Ils codent pour des protéines retrouvées à différents niveaux dans les cascades signalétiques, incluant des cytokines ou des facteurs de croissance (*BMP7*, *HGF*, *KGF*, *TGF- α* , *Wnt9b*), des récepteurs (*c-erbB2*, *ALK3*, *Pkd1*), des molécules de signalisation (*ras*, *src*, *β -caténine*) et des facteurs de transcription (*c-myc*, *Pax2*, *HNF-1 β*) (Tableau I-VIII, page 58 et I-IX, page 59). De manière intéressante, les composantes de la voie canonique des *Wnt* comme la β -caténine et *c-myc* sont modulées directement ou indirectement dans plusieurs de ces modèles PKD. Une translocation nucléaire de la β -caténine a été rapportée chez la souris *Bcl-2^{-/-}* (Sorenson, 1999). La voie β -caténine/*c-myc* est stimulée dans les reins kystiques des souris mutantes conditionnelles du gène *Kif3A* et d'un modèle de dysplasie kystique de la médulla, la souris transgénique *ALK3(QD)* (Hu et al., 2003; Hu and Rosenblum, 2005; Lin et al., 2003). De plus, les souris transgéniques exprimant une forme constitutivement active de la β -caténine et l'ablation génique conditionnelle d'*APC*, un inhibiteur de la voie canonique des *Wnt*, développent des kystes rénaux (Qian et al., 2005; Romagnolo et al., 1999; Saadi-Kheddouci et al., 2001). Même constat suite à la surexpression de *c-myc* dans les souris transgéniques SBM (Trudel et al., 1991) ou une de ses cibles transcriptionnelles, la *prothymosine- α* (Li et al., 2005a), suggérant un rôle important de cette voie dans l'ADPKD. La souris SBM est un excellent modèle pour étudier le rôle de *c-myc* dans la polykystose rénale. Chez ces souris, une surexpression de *c-myc* est ciblée à l'épithélium tubulaire rénal causant un phénotype kystique similaire à l'ADPKD (Trudel et al., 1991). En effet, les kystes rénaux observés chez les souris SBM sont accompagnés de taux anormalement élevés de prolifération cellulaire et d'apoptose ainsi qu'un défaut de la polarité épithéliale (Barisoni et al., 1995; Trudel et al., 1998; Trudel et al., 1997).

Tableau I-VIII : Modèles murins de la polykystose rénale par ablations géniques

Gènes délétés	Fonctions proposées	Références
Ablations géniques		
<i>TG737^{Δ2-3Gal}</i>	Ciliogenèse	1
<i>Bcl-2</i>	Proto-oncogène, anti apoptotique	2,3
<i>Ap-2β</i>	Facteur de transcription, développement embryonnaire (antagoniste de c-Myc)	4
<i>α3β1-Intégrine</i>	Adhésion cellulaire, développement rénal	5
<i>ACE</i>	Maintien de la pression sanguine (système rénine-angiotensine)	6
<i>Bmp7</i>	Facteur de croissance, développement rénal	7
<i>EGFR</i>	Récepteur de facteur de croissance, prolifération cellulaire	8
<i>RhoGDIα</i>	Organisation du cytosquelette	9
<i>Socs/Ifny</i>	Inflammation	10
<i>Cox-2</i>	Inflammation, contractilité vasculaire	11
<i>Tensine</i>	Organisation du cytosquelette	12
<i>Aquaporine-11</i>	Canal	13
<i>Makorinel-p1</i>	Pseudogène qui régule la stabilité de l'ARNm de Makorinel1	14
<i>Wwtr1/TAZ</i>	Ciliogenèse	15,16
<i>Mxil</i>	Suppresseur de tumeurs (antagoniste de c-Myc)	17
<i>Wnt9b</i>	Activation de la voie canonique ou noncanonique des Wnt	18
<i>XylT2</i>	Enzyme de la biosynthèse des protéoglycans	19
<i>Pkd1</i>	Récepteur, canal, adhésion cellulaire, mécanosensation	Voir Tableau I-X et I-XI
<i>Pkd2</i>	Canal	I-X et I-XI
Ablations géniques conditionnelles (rénaux spécifiques)		
<i>Kif3A</i>	Ciliogenèse	20
<i>Apc</i>	Oncogène, Inhibiteur de la voie canonique des Wnt	21
<i>Hnf-1β</i>	Facteur de transcription, développement embryonnaire	22
<i>PrkcsH</i>	Enzyme de glycosylation du reticulum endoplasmique	23
<i>Sec63</i>	Machinerie de translocation du reticulum endoplasmique	23
<i>Vhl</i>	Suppresseur de tumeur	24
<i>Pkd1</i>	Récepteur, canal, adhésion cellulaire, mécanosensation	Voir Tableau I-X

Légende: *Socs/Ifny* : suppressors of cytokine signalling/interferon γ ; *Cox-2* : Cyclooxygenase-2; *Wwtr1* : WW-domain containing transcription regulator 1; *XylT2* : Xylosyltransférase 2; *Kif3A*: kinesine superfamily proteins 3A; *Hnf-1β*: hepatocyte nuclear factor-1β; *PrkcsH*: protein kinase C substrate 80K-H ou noncatalytic beta-subunit of glucosidase II.

Références : 1-(Murcia et al., 2000) ; 2-(Nakayama et al., 1994) ; 3-(Veis et al., 1993) ; 4-(Moser et al., 2003) ; 5-(Kreidberg et al., 1996) ; 6-(Carpenter et al., 1996) ; 7-(Jena et al., 1997) ; 8-(Threadgill et al., 1995) ; 9-(Togawa et al., 1999) ; 10-(Metcalf et al., 2002) ; 11-(Dinchuk et al., 1995) ; 12-(Lo et al., 1997) ; 13-(Morishita et al., 2005) ; 14-(Yoshida et al., 2003) ; 15-(Hossain et al., 2007) ; 16-(Tian et al., 2007) ; 17-(Yoo et al., 2006) ; 18-(Karner et al., 2006) ; 19-(Condac et al., 2007) ; 20-(Lin et al., 2003) ; 21-(Qian et al., 2005) ; 22-(Gresh et al., 2004) ; 23-(Tian et al., 2006) ; 24-(Rankin et al., 2006).

Tableau I-IX : Modèles murins de la polykystose rénale par transgénèse

Gènes surexprimés	Fonctions proposées	Références
<i>β-caténine (forme active)</i>	Adhésion cellulaire, voie de signalisation canonique des Wnt	1, 2
<i>c-myc</i>	Facteur de transcription, proto-oncogène, apoptose, développement rénal	3, 4
<i>Prothymosine-α</i>	Prolifération cellulaire	5
<i>Hnf-1β (forme mutée)</i>	Facteur de transcription, développement rénal	6, 7
<i>Pax2</i>	Facteur de transcription, développement rénal	8
<i>H-rasT24</i>	Proto-oncogène, prolifération cellulaire	9
<i>v-src</i>	Proto-oncogène, prolifération cellulaire	9
<i>SV40 large T antigène</i>	Proto-oncogène, prolifération cellulaire	10, 11
<i>c-erbB2</i>	Récepteur de facteur de croissance, proto-oncogène, prolifération cellulaire	12
<i>Hgf</i>	Facteur de croissance, prolifération	13
<i>Kgf, Fgf-7</i>	Facteur de croissance, prolifération	14
<i>Tgf-α</i>	Facteur de croissance, prolifération	15
<i>hGF</i>	Hormone de croissance	16
<i>Sprouty2</i>	Antagoniste des récepteurs tyrosine kinase	17
<i>Endothéline-1</i>	Prolifération, vasoconstriction	18
<i>MAL</i>	Structure membranaire	19
<i>ALK3(QD)</i>	Récepteur de facteur de croissance, développement rénal	20
<i>Pkd2(tronquée)</i>	Canal	21
<i>PKD1-TSC2</i>	<i>PKD1</i> : Récepteur, canal, adhésion cellulaire, mécanosensation; <i>TSC2</i> : Suppresseur de tumeurs	22
<i>Pkd1 (SBPkd1_{TAC})</i>	Récepteur, canal, adhésion cellulaire, mécanosensation	23

Références : 1-(Romagnolo et al., 1999) ; 2-(Saadi-Kheddouci et al., 2001) ; 3-(Trudel et al., 1991) ; 4-(Geick et al., 2001) ; 5-(Li et al., 2005a) ; 6-(Hiesberger et al., 2004) ; 7-(Hiesberger et al., 2005) ; 8-(Dressler et al., 1993) ; 9-(Schaffner et al., 1993) ; 10-(MacKay et al., 1987) ; 11-(Kelley et al., 1991) ; 12-(Stocklin et al., 1993) ; 13-(Takayama et al., 1997) ; 14-(Nguyen et al., 1996) ; 15-(Lowden et al., 1994) ; 16-(Wanke et al., 1991) ; 17-(Chi et al., 2004) ; 18-(Hochoer et al., 1997) ; 19-(Frank et al., 2000) ; 20-(Hu et al., 2003) ; 21-(Gallagher et al., 2006) ; 22-(Pritchard et al., 2000) ; 23-(Thivierge et al., 2006).

I.7.3 Analyses fonctionnelles de *Pkd1* et *Pkd2*

Afin de connaître la fonction des gènes *PKD1* et *PKD2* ainsi que leur implication dans le développement et le mécanisme de pathogenèse ADPKD, plusieurs groupes ont généré des souris ayant des inactivations géniques totales ou partielles et des surexpressions de ces gènes (Tableau I-X, page 63 et I-XI, page 65).

I.7.3.1 Ablation génique de *Pkd1*

Plusieurs souris *knock-out* pour le gène *Pkd1* ont été générées (Tableau I-X, page 63) (Bhunja et al., 2002; Boulter et al., 2001; Herron et al., 2002; Kim et al., 2000; Lu et al., 1999; Lu et al., 1997; Lu et al., 2001; Muto et al., 2002; Piontek et al., 2004; Wu et al., 2002). Dans tous les modèles de souris *Pkd1* homozygotes, les premières étapes du développement rénal semblent se dérouler normalement jusqu'à e13.5, mais des kystes sont détectés à partir de e15.5. Des kystes pancréatiques sont également observés dans la plupart des cas à partir de e13.5, mais aucun kyste hépatique n'a été détecté. L'expression de *Pkd1* ne semble donc pas essentielle à l'induction de la néphrogenèse, mais joue un rôle au niveau du maintien et de la maturation de l'architecture tubulaire rénale. La plupart de ces souris meurent entre le jour embryonnaire e12.5 et la période périnatale. Des anomalies au niveau du développement cardiaque, pulmonaire et squelettique ainsi que de l'œdème sous-cutané et des hémorragies localisées ont été décrites, mais la cause exacte de leur décès demeure inconnue.

Récemment, deux mutants de PC1 ont été générés, dont le premier est dépourvu d'une partie de la queue cytoplasmique suite à la délétion des exons 45-46, mais le phénotype n'a pas été décrit (Wodarczyk and Boletta, 2006). Le second est un mutant ponctuel (Thr3041Val), nommé « *V-allele* », dans le domaine GPS de la PC1. Cette mutation empêche le clivage au site GPS et les souris *Pkd1*^{*V-allele*} homozygotes possèdent des reins élargis avec des tubules distaux dilatés, suggérant un rôle essentiel du site de clivage protéolytique de PC1 pour l'intégrité de la structure tubulaire (Yu et al., 2006).

I.7.3.2 Allèle hypomorphe de *Pkd1*

Il n'est pas nécessaire d'avoir une perte complète d'expression de *Pkd1* pour observer le développement de kystes rénaux. En effet, ce phénotype a été observé chez les souris possédant des allèles hypomorphes de *Pkd1*, dont les niveaux d'expression sont d'environ 20% la normale. Chez ces souris, un épissage aberrant du gène *Pkd1* a lieu suite à l'insertion d'une cassette *neo* (gène de résistance à la néomycine) dans l'intron 1. Ceci

mène à la production d'un codon-stop prématuré dans 80-85% des transcrits *Pkd1*. Les hétérozygotes ne sont pas affectés, mais les souris homozygotes sont viables et présentent plusieurs caractéristiques des patients ADPKD dont les défauts cardiovasculaires, les kystes hépatiques et pancréatiques (Tableau I-X, page 63) (Lantinga-van Leeuwen et al., 2004).

I.7.3.3 Ablation conditionnelle de *Pkd1*

Dans le but de générer un mutant conditionnel et ainsi de contourner la létalité embryonnaire des souris *Pkd1*^{-/-}, un autre allèle hypomorphe a été généré et nommé *Pkd1*^{L3}. L'introduction d'une cassette *mcl-néo* flanquée de sites *loxP* dans l'intron 30 et 34 du locus de *Pkd1* interfère avec la transcription ou l'épissage causant la diminution d'expression de PC1 (Jiang et al., 2006). Les reins des souris homozygotes *Pkd1*^{L3} se développent normalement jusqu'à la naissance, mais deviennent kystiques et élargissent rapidement dans les premiers 30 jours.

Une autre lignée de souris *Pkd1* avec un allèle « floxé » a été générée et développe des kystes rénaux et hépatiques lorsque croisée avec des souris exprimant la Cre recombinase dans les cellules germinales (*Meox-cre*) ou somatiques (*MMTV-cre*) (Piontek et al., 2004; Tallquist and Soriano, 2000; Wagner et al., 1997). De plus, certaines données ont été résumées et donnent un avant-goût de la diversité des souris Cre utilisées pour inactiver spécifiquement *Pkd1* dans les cellules endothéliales (*Tie2-Cre*) (Zhou et al., 2006), l'épithélium rénal (*KspCad-CreER^{T2}*) (Lantinga-van Leeuwen et al., 2006a; Lantinga-van Leeuwen et al., 2006b) ou même de façon ubiquitaire inductible au 4-Hydroxy-Tamoxifène (*Cg-Tg(cre/Esr1)*) (Tableau I-X, page 63) (Piontek et al., 2006). Pour une liste complète des souris transgéniques Cre rénaux-spécifiques, voir l'annexe 1.

I.7.3.4 Surexpression de *Pkd1*

Une surexpression de *Pkd1/PKDI* peut également causer la formation de kystes rénaux telle qu'observée chez deux modèles de souris transgéniques : SBPkd1_{TAG} et *PKDI-TSC2* (Thivierge 2006, Pritchard 2000). La souris transgénique SBPkd1_{TAG} surexprime *Pkd1*

spécifiquement aux reins en développement et adultes. Ces souris développent des kystes rénaux détectables dès la naissance et meurent d'insuffisance rénale entre 3 et 6 mois de vie. Ce phénotype supporte fortement le mécanisme pathogénétique d'effet dosage dans l'ADPKD (voir section I.4.3.2) et souligne l'importance d'un contrôle adéquat du niveau d'expression de *Pkd1* dans l'homéostasie rénale (Tableau I-X, page 63)

Dans le cas des souris transgéniques *PKD1-TSC2*, la surexpression de la PC1 serait suffisante pour provoquer occasionnellement la formation de kystes rénaux et hépatiques chez les souris adultes (Pritchard et al., 2000). Toutefois, la validité de ce modèle est contestée étant donné la présence du gène *TSC2* dans le transgène. *TSC2* est un des deux gènes impliqués dans la sclérose tubéreuse, une maladie génétique associée à la formation de kystes rénaux (voir section I.2.8) (Stillwell et al., 1987).

Récemment, une souris transgénique surexprimant uniquement la partie extracellulaire de PC1 comprenant l'extrémité N-terminale jusqu'au site GPS a été générée. Cette souris, nommée *Pkd1_{extra}*, développe des kystes rénaux de façon tardive et suggère un rôle important de la partie extracellulaire de PC1 dans la kystogenèse (Kurbegovic et al., 2004).

Tableau I-X : Mutagenèse murine de *Pkd1*

Mutant	Exons ciblés	Létalité	Kystes	Autres phénotypes	Réf
Ablations géniques de Pkd1					
<i>Pkd1</i> ^{del34}	34	e18.5	Reins, pancréas	Squelette, spina bifida	1, 2
<i>Pkd1</i> ^L	43-45	e14.5-15.5	Reins, pancréas	Hypoplasie pulmonaire	3
<i>Pkd1</i> ^{null}	4	e13.5-16.5	Reins, pancréas	Œdème, hydrofetalis, spina bifida, cartilage, squelettique	4
<i>Pkd1</i> ^{del17-21/geo}	17-	e13.5-14.5	Reins	Œdème, hémorragies, squelettique, cartilage, cardiaque	5
<i>Pkd1</i> ^{-/-}	2-6	e14.5	Reins	Hémorragies, cardiaque, hydrofetalis, squelette	6
<i>Pkd1</i> ^{-/-}	1	e12.5-naissance	Reins, pancréas	Œdème, hémorragies	7
<i>Pkd1</i> ^{βgal-null}	2-3	<i>In utero</i>	Reins, pancréas	Œdème, hémorragies, polyhydramnios	8
<i>Pkd1</i> ^{del2-4}	2-4	<i>In utero</i>	Reins, pancréas	Œdème, hémorragies, polyhydramnios	9
<i>Pkd1</i> ^{m1Bei}	26	<i>In utero</i>	Reins, pancréas	Œdème	10,11
<i>Pkd1</i> ^{V-allele}	Mutant GPS	3 mois	Reins	Fibrose, dilatation du canal biliaire et élargissement de la vésicule biliaire	12
Ablations géniques partielles de Pkd1					
<i>Pkd1</i> ^{m1}	2-11	Variable 1-12 mois	Reins, pancréas	Anévrismes aortiques, cardiaque	13
<i>Pkd1</i> ^{L3}	30-34	Variable 1-12 mois	Reins, foie, pancréas	ND	14
Ablations géniques conditionnelles de Pkd1					
<i>Pkd1</i> ^{cond/cond} ; MMTV-Cre	2-4	Normal	Reins	ND	9
<i>Pkd1</i> ^{m1/m1} ; KspCad-CreER ^{T2}	2-11	ND (transgène inductible)	Reins	ND	15,16
<i>Pkd1</i> ^{cond/cond} ; Cg-Tg (Cre/Esr1)	2-4	ND (transgène inductible)	Reins, foie	ND	17
<i>Pkd1</i> ^{cond/KO} ; Tie2-Cre	2-4	Périnatale (80%) et 9 mois (20%)	Absence de kystes rénaux	Polyhydramnios, anomalies du placenta	18

Mutant	Exons ciblés	Létalité	Kystes	Autres phénotypes	Réf
Surexpression de Pkd1					
<i>SBPkd1_{TAG}</i>	1-46	4-5 mois	Reins	ND	19
<i>PKD1-TSC2</i>	1-46	Normal	Reins, foie	ND	20
<i>Pkd1_{extra}</i>	1-25	20 mois	Reins	ND	21

Légende : ND : non déterminé.

Références : 1-(Lu et al., 1997) ; 2-(Lu et al., 1999) ; 3-(Kim et al., 2000) ; 4-(Lu et al., 2001) ; 5-(Boulter et al., 2001) ; 6-(Muto et al., 2002) ; 7-(Wu et al., 2002) ; 8-(Bhunja et al., 2002) ; 9-(Piontek et al., 2004) ; 10-(Herron et al., 2002) ; 11-(Xiao et al., 2006) ; 12-(Yu et al., 2006) ; 13-(Lantinga-van Leeuwen et al., 2004) ; 14-(Jiang et al., 2006) ; 15-(Lantinga-van Leeuwen et al., 2006b) ; 16-(Lantinga-van Leeuwen et al., 2006a) ; 17-(Piontek et al., 2006) ; 18-(Zhou et al., 2006) ; 19-(Thivierge et al., 2006) ; 20-(Pritchard et al., 2000) ; 21-(Kurbegovic et al., 2004).

I.7.3.5 Ablation génique de *Pkd2*

Tout comme les mutants de *Pkd1*, les souris homozygotes *Pkd2* meurent *in utero* et développent des kystes rénaux vers e15.5 (Pennekamp et al., 2002; Wu et al., 2000). La souris *Pkd2^{WS25}* a également été générée et a pour particularité de porter un allèle *Pkd2* instable. Par recombinaison homologue, l'allèle *Pkd2^{WS25}* peut subir soit une inactivation somatique, menant à une inactivation complète du gène, soit revenir à son état sauvage. Les souris homozygotes sont viables et développent des kystes rénaux vers 1 à 3 mois. Les souris hétérozygotes sont également affectées et développent des kystes rénaux, hépatiques et pancréatiques après 2.5 mois (Wu et al., 1998a). Contrairement aux mutants *Pkd1*, des mutants *Pkd2* développent une malformation de l'axe symétrique embryonnaire gauche/droit (Pennekamp et al., 2002) (Tableau I-XI, page 65).

Tableau I-XI : Mutagenèse murine de *Pkd2*

Mutant	Exons ciblés	Létalité	Kystes	Autres phénotypes	Réf
Ablations géniques de <i>Pkd2</i>					
<i>Pkd2</i> ^{-/-}	1	e13.5-18.5	Reins, pancréas	Edème, hémorragies, cardiaque	1
<i>Pkd2</i> ^{WS25}	1	1 an et plus	Reins, pancréas, foie	Anévrismes intracrâniens	1, 2
<i>Pkd2</i> ^{-/-LacZ}	1	e12.5-18.5	Reins, pancréas	Axe gauche/droite alléatoire, hyposplénie, dextrocardie	3

Légende : ND : non déterminé ; Références : 1-(Wu et al., 2000) ; 2-(Wu et al., 1998a) ; 3-(Pennekamp et al., 2002).

I.7.4 Essai de traitements précliniques sur les modèles murins

L'avancement des connaissances sur la compréhension de la génétique, et des mécanismes moléculaires et cellulaires responsables du développement de la polykystose rénale permettent l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques (Tableau I-XII, page 66) (Qian et al., 2001; Torres and Harris, 2007). Une grande diversité de modèles murins est présentement disponible pour tester ces thérapies (voir sections I.7.1 à I.7.3). Étant donné que les mécanismes de pathogenèse ne sont pas nécessairement reproductibles parmi tous ces modèles, les stratégies thérapeutiques envisagées devront être testées chez différents modèles.

Tableau I-XII : Interventions thérapeutiques dans les modèles de PKD

Interventions thérapeutiques	Modèles murins PKD		Références
	Effet curatif	Aucun effet	
Restriction en protéine	<i>Han:SPRD, pcy</i>		(Ogborn and Sareen, 1995; Tomobe et al., 1994)
Protéines à base de soya	<i>Han:SPRD, pcy</i>		(Ogborn et al., 2000; Tomobe et al., 1998)
Graines de lin	<i>Han:SPRD</i>		(Ogborn et al., 1999)
Bicarbonate/citrate	<i>Han:SPRD</i>	<i>pck, pcy, Pkd2^{WS25}</i>	(Tanner and Tanner, 2000; Torres et al., 2001)
Methylprednisolone	<i>Han:SPRD, pcy</i>		(Gattone et al., 1995)
Batimastat	<i>Han:SPRD</i>		(Obermuller et al., 2001)
Losartan/enalapril	<i>Han:SPRD</i>	<i>pck</i>	(Keith et al., 1994; Kenefick et al., 1999)
Taxanes	<i>cpk</i>	<i>Han:SPRD, pcy, orpk</i>	(Martinez et al., 1997; Sommardahl et al., 1997; Woo et al., 1997)
V2R antagoniste	<i>Pck, cpk, pcy, Pkd2^{WS25}</i>		(Gattone et al., 1999; Wang et al., 2005b)
EGFR inhibiteur	<i>Han:SPRD, bpk</i>	<i>pck</i>	(Sweeney et al., 2000; Torres et al., 2004)
Rapamycin	<i>Han:SPRD, bpk, orpk</i>		(Shillingford et al., 2006; Tao et al., 2005a; Wahl et al., 2006)
PPARγ agoniste	<i>Pck, Pkd1^{-/-}</i>		(Muto et al., 2002)
Lovastatin	<i>Han:SPRD</i>		(Gile et al., 1995)
ErbB2 inhibiteur	<i>Pck, bpk, Pkd1^{+/-}</i>		(Wilson et al., 2006)
c-Src inhibiteur	<i>Pck, bpk</i>		(Sweeney and Avner, 2006)
MEK inhibiteur	<i>pcy</i>		(Omori et al., 2006)
c-myc anti-sens	<i>cpk</i>		(Ricker et al., 2002)

I.7.4.1 Traitements anti-oxidatifs

Les traitements anti-oxidatifs ont pour but de diminuer le taux de mutations et peuvent donc être utilisés pour traiter des maladies affectées par la génération de mutations somatiques après la naissance telle que suggérée pour l'ADPKD (voir section I.4.3.1). C'est entre autre l'idée derrière une diète pauvre en protéine qui cause une diminution de la génération de radicaux libres (Ogborn and Sareen, 1995; Tomobe et al., 1994). Des diètes riches en soya et graines de lin peuvent avoir des effets bénéfiques et anti-oxydantes en réduisant les niveaux d'acides arachidoniques et la synthèse des prostaglandines PG-E₂ (Ogborn et al., 1999; Ogborn et al., 2000; Tomobe et al., 1998).

I.7.4.2 Traitement anti-inflammatoire

En plus de la prolifération de l'épithélium kystique, la progression de la polykystose rénale est caractérisée par une inflammation interstitielle et de la fibrose qui une fois inhibées, réduisent l'expansion des kystes et stabilisent la fonction rénale. Parmi les agents anti-inflammatoires, le methylprednisolone atténue la progression de la PKD dans la souris *pcy* et le rat *Han;SPRD (Cy/+)* (Gattone et al., 1995). La fibrose est contrôlée par des inhibiteurs des métallo-protéinases de la matrice extracellulaire (*MMP*) comme le batimastat qui s'est avéré efficace pour réduire le nombre de kystes et le poids des reins des rats *Han;SPRD (Cy/+)* (Obermuller et al., 2001).

I.7.4.3 Blocage du système rénine-angiotensine

Les facteurs vasoactifs comme l'angiotensine, l'endothéline et l'oxide nitrique (NO) contribuent à la prolifération de l'épithélium kystique, la progression de l'inflammation interstitielle et la fibrose (Grantham, 1997). L'utilisation d'agents anti-hypertenseurs comme le losartan (un antagoniste du récepteur à l'angiotensine de type II) et l'énalapril (un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine) réduit le phénotype kystique et

la perte de fonction rénale des rats *Han:SPRD (Cy/+)* (Keith et al., 1994; Kennefick et al., 1999).

I.7.4.4 Stabilisation des microtubules par les taxanes

Le rôle des microtubules dans la kystogenèse a été suggéré suite à la démonstration que certains dérivés des taxanes inhibent la formation de kystes en culture cellulaire, mais également suite à l'amélioration du phénotype kystique des souris *cpk* traitées au taxol (Woo et al., 1997). Le mécanisme par lequel la stabilisation des microtubules a un rôle protecteur chez ce modèle demeure incertain, mais pourrait être dû à la promotion de l'apoptose (Fan, 1999; Yeung et al., 1999). Cependant, l'administration de taxanes chez d'autres modèles s'est avérée infructueuse (Martinez et al., 1997; Sommardahl et al., 1997).

I.7.4.5 Traitements anti-prolifératifs

L'importance de la prolifération des cellules épithéliales kystiques a stimulé l'intérêt porté sur les essais utilisant des agents antiprolifératifs qui se sont d'ailleurs avérés très efficaces. Parmi ceux-ci, les inhibiteurs de la tyrosine kinase de EGFR et les antagonistes du récepteur de la vasopressine V2 sont les thérapies les plus étudiées (Gattone et al., 1999; Sweeney et al., 1999; Wang et al., 2005b). Vient ensuite la rapamycine, un inhibiteur de la voie de mTOR, dont l'efficacité a été testée chez trois modèles (Shillingford et al., 2006; Tao et al., 2005a; Wahl et al., 2006). Parmi le faible nombre d'agents testés chez la souris *Pkd1^{-/-}* notons les agonistes de la PPAR γ (*peroxisome proliferative activated receptor gamma*) (Muto et al., 2002). Des drogues ciblant l'inhibition de la farnésylation de l'oncogène ras sont envisagées, un mécanisme par lequel le lovastatin semble exercer son effet bénéfique sur le phénotype kystique des rats *Han:SPRD (Cy/+)* (Gile et al., 1995; Hill et al., 2000). Récemment, le roscovitine, un inhibiteur des kinases cycline-dépendante (CDK) s'est avéré efficace pour réduire la kystogenèse en bloquant la prolifération et l'apoptose des cellules kystiques des souris *jck* et *cpk* (Bukanov et al., 2006; Ibraghimov-Beskrovnaya, 2007). À cette liste s'ajoute les inhibiteurs de la tyrosine kinase de ErbB2, de la kinase c-Src et des MEK, qui sont des drogues développées pour le traitement de

néoplasies, mais qui peuvent être considérées pour le traitement de la polykystose rénale (Omori et al., 2006; Sweeney and Avner, 2006; Wilson et al., 2006).

L'inhibition de l'expression du proto-oncogène *c-myc* semble une stratégie anti-proliférative intéressante afin de réduire la kystogenèse (voir section I.8.5.5). Ce but a été atteint grâce à l'utilisation d'un oligonucléotide anti-sens contre *c-myc* qui a été testée avec succès chez les modèles d'ARPKD *C57BL/6J-cpk* et *BALBc-cpk* (Ricker et al., 2002). Cependant, ce traitement anti-prolifératif nécessite d'être testé chez d'autres modèles de PKD et plus particulièrement chez les modèles mutants de *Pkd1* étant donné que l'expression de *c-myc* est potentiellement régulée par la voie de signalisation de PC1.

Les évidences suggérant que *c-myc* est un joueur important dans la kystogenèse sont soulevées dans la section I.8.5.5 et le rôle de *c-myc* dans la voie de signalisation de PC1 est démontré dans le chapitre II-3.

D'abord, une description générale de *c-myc* et de ses différents rôles physiologiques et pathophysiologiques est présentée dans la section I.8.

I.8 Le facteur de transcription *c-myc* et les membres de la famille *Myc*

I.8.1 Historique des membres de la famille *Myc*

Les gènes membres de la famille *Myc* encodent pour des protéines structurellement et fonctionnellement reliées, dont *c-myc*, *N-myc* et *L-myc*. Le gène *c-myc* a premièrement été identifié comme l'homologue cellulaire de l'oncogène *v-myc* du rétrovirus aviaire myelocytomatose (Sheiness et al., 1980) et comme étant surexprimé dans les lymphomes de Burkitt (Dalla-Favera et al., 1982; Taub et al., 1982). L'identification de *N-myc* et *L-myc* a été fondée sur l'homologie de séquence avec *c-myc* et de leur amplification respective dans des neuroblastomes et carcinomes pulmonaires (Kohl et al., 1983; Nau et al., 1985; Schwab et al., 1983).

I.8.2 Structure génomique et protéique de *Myc*

Les membres de la famille de *Myc* partagent une structure génomique et protéique similaire. Ces gènes contiennent une organisation génomique à trois exons qui codent pour des transcrits à demi-vie très courte. Les protéines *Myc* sont des facteurs de transcription possédant en N-terminal un domaine de transactivation de la transcription contenant trois régions hautement conservées, appelées boîtes *Myc* I-III et en C-terminal, un domaine de dimérisation et d'interaction avec l'ADN de type région basique/hélice-boucle-hélice/leucine-zipper (BR/HLH/LZ) (Figure I-9, page 71).



Figure I-9 : La protéine c-Myc

Légende : La protéine c-Myc avec en N-terminal, les boîtes Myc I-III du domaine de transactivation de la transcription et en C-terminal, un domaine de dimérisation et d'interaction avec l'ADN de type région basique/hélice-boucle-hélice/leucine-zipper (BR/HLH/LZ). Image adaptée de Adhikary et al. 2005 (Adhikary and Eilers, 2005).

I.8.3 Partenaires de Myc dans la régulation transcriptionnelle

Aucun monomère de protéines Myc n'a été observé *in vivo*, mais Myc fonctionne plutôt en dimère avec une autre protéine BR/HLH/LZ, appelée Max (Blackwood and Eisenman, 1991; Blackwood et al., 1992). Max est présente en excès stœchiométrique par rapport à Myc et peut également former des homodimères ou des hétérodimères avec d'autres protéines similaires telles que Mad1, Mxi1, Mad3, Mad4 et Mnt (Ayer et al., 1993; Hurlin et al., 1997; Hurlin et al., 1996; Zervos et al., 1993). Tous ces dimères peuvent lier directement une même séquence consensus (CANNTG) appelée boîte-E. Cette séquence est liée par la plupart des facteurs de transcription de type BR/HLH (Blackwell et al., 1990). En général, la liaison de la boîte-E par l'hétérodimère Myc-Max active la transcription, alors que la liaison des hétérodimères Mad-Max et Mnt-Max l'inhibe (Figure I-10A, page 72). Toutefois, l'hétérodimère Myc-Max peut également réprimer la transcription indépendamment de la boîte-E via l'interaction avec le facteur de transcription Miz1 (Figure I-10B, page 72). *In vivo*, le complexe Myc-Max est prédominant dans les cellules en prolifération, alors que Mad-Max ou Mnt-Max sont associés à des cellules différenciées (Ayer and Eisenman, 1993).

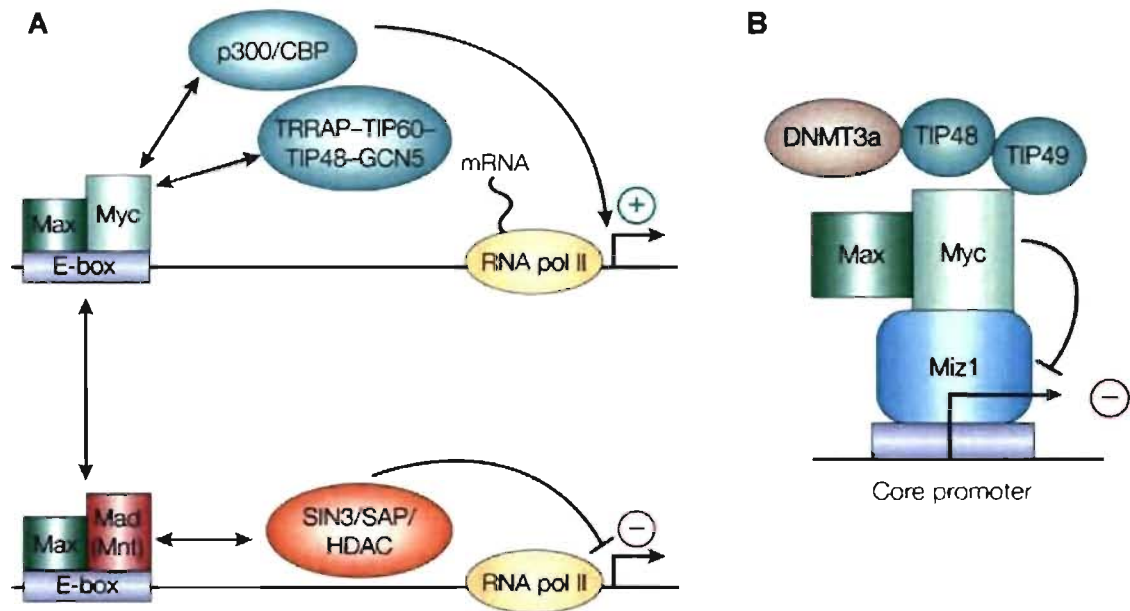


Figure I-10 : Régulation transcriptionnelle par Myc

(A) Activation transcriptionnelle par Myc. Les co-activateurs qui interagissent avec l'hétérodimère Myc-Max sont entre autres les histones acétyltransférases (HAT) p300/CBP et la protéine adaptatrice TRRAP (*Transactivation-transformation domain-associated protein*) qui est l'unité centrale d'un complexe HAT incluant TIP60 et GCN5 (McMahon et al., 1998; Vervoorts et al., 2003). Les complexes Mad-Max et Mnt-Max vont inhiber la transcription en recrutant des histones deacetylases (HDAC) via la protéine adaptatrice SIN3 (Laherty et al., 1997). **(B) Répression transcriptionnelle par Myc.** Le complexe Max-Myc-Miz1 inhibe la transcription par le recrutement de l'ADN méthyltransférase DNMT3a (Brenner et al., 2005; Schneider et al., 1997). Image adaptée de Adhikary et al. 2005 (Adhikary and Eilers, 2005).

I.8.3.1 Gènes cibles de Myc

L'activité transcriptionnelle du complexe Myc-Max régule un nombre très large de gènes cibles. En effet, des estimations récentes chez la mouche et la souris ont indiqué qu'environ 10 à 15% de tous les gènes pouvaient être modulés par l'activité de Myc (Fernandez et al., 2003; Orian et al., 2003). En plus des gènes régulés par la ARN polymérase II (ARN pol II), Myc affecte également la transcription par l'ARN pol I et III,

contrôlant ainsi la synthèse de plusieurs composants de la machinerie ribosomale (Arabi et al., 2005; Gomez-Roman et al., 2003; Grandori et al., 2005; Grewal et al., 2005; Poortinga et al., 2004). Les gènes cibles par lesquels Myc influencerait ces différentes fonctions ne sont pas encore bien définis. Un résumé de certains de ces gènes ainsi que leurs voies d'activation ou de répression par Myc est rapporté dans le Tableau I-XIII, page 74.

I.8.4 Fonctions cellulaires de Myc

Malgré leurs reconnaissances comme oncogènes, les fonctions cellulaires des protéines Myc, particulièrement leurs rôles physiologiques *in vivo*, demeure énigmatique. Les trois protéines Myc ont des activités similaires, tant en culture cellulaire qu'en souris transgéniques et contribuent à divers mécanismes cellulaires dont certains sont rapportés dans le Tableau I-XIII, page 74.

L'habileté de Myc à induire la prolifération (Eilers et al., 1991) et inhiber la différenciation cellulaire (Freytag et al., 1990) est reconnue depuis plus d'une décennie, mais des études plus récentes ont démontré qu'une dérégulation d'expression de Myc peut provoquer la croissance cellulaire (Iritani and Eisenman, 1999; Johnston et al., 1999), l'angiogenèse (Baudino et al., 2002), la perte d'adhésion cellulaire (Arnold and Watt, 2001; Frye et al., 2003; Wilson et al., 2004), l'instabilité génomique (Felsher and Bishop, 1999b) et promouvoir les métastases (Pelengaris et al., 2002b). À l'inverse, la tumorigenèse induite par Myc peut être limitée par sa capacité à promouvoir l'apoptose (voir section I.8.4.2). De plus, Myc joue un rôle important dans le renouvellement et la pluripotence des cellules souches (Cartwright et al., 2005; Murphy et al., 2005; Takahashi and Yamanaka, 2006).

Tableau I-XIII : Exemples des gènes cibles de Myc et leurs fonctions

Gènes cibles	Régulation	Signalisation	Fonction	Réf
<i>p21^{CIP1}</i>	Négative	Réponse aux dommages à l'ADN, Voie APC	Progression du cycle cellulaire, inhibition de la différenciation	1-3
<i>p15^{INK4B}</i>	Négative	Voie TGFβ	Prolifération	4,5
<i>Cycline D1, D2 et Cdk4</i>	Positive	Facteurs de croissance	Progression en G1 du cycle cellulaire	6,7
<i>E2F2</i>	Positive	Facteurs de croissance	Prolifération	8
<i>HDAC2</i>	Positive	Voie Wnt/β-caténine	Inhibition de la différenciation	9
<i>Irp2, H-ferritine</i>	Positive, négative	Métabolisme du fer	Métabolisme, croissance	10
<i>LdhA</i>	Positive	Glycolyse	Métabolisme, croissance	11
<i>Odc</i>	Positive	Biosynthèse des Polyamines	Métabolisme, prolifération	12
<i>Cad</i>	Positive	Biosynthèse des pyrimidines	Métabolisme, prolifération	13
<i>Vegf</i>	Positive	Interleukine-1β, hypoxie	Angiogenèse	14- 16
<i>eIF-4E</i>	Positive	Synthèse de protéines, voie Pi3K/Akt	Croissance	17, 18
<i>RNA pol I, III, ARN ribosomal</i>	Positive	Synthèse de la machinerie ribosomale	Croissance	19
<i>Bax</i>	Positive	Stress cellulaire	Apoptose	20

Références : 1-(Herold et al., 2002); 2-(Seoane et al., 2002); 3-(van de Wetering et al., 2002);4-(Staller et al., 2001); 5-(Seoane et al., 2001); 6-(Hermeking et al., 2000); 7-(Bouchard et al., 1999); 8-(Sears et al., 1997); 9-(Zhu et al., 2004); 10-(Wu et al., 1999); 11-(Shim et al., 1997); 12-(Bello-Fernandez et al., 1993); 13-(Miltenberger et al., 1995); 14-(Baudino et al., 2002); 15-(Shchors et al., 2006); 16-(Knies-Bamforth et al., 2004); 17-(Jones et al., 1996); 18-(Ruggero et al., 2004); 19-(Oskarsson and Trumpp, 2005) ; 20-(Mitchell et al., 2000).

1.8.4.1 Régulation de la croissance et de la division cellulaire

La transcription des gènes *myc* est absente dans les cellules quiescentes, mais rapidement stimulée par plusieurs cytokines et facteurs de croissance comme le Pdgf (*platelet-derived growth factor*), le Csf (*colony-stimulating factor*), Egf ou autres agents mitogènes (Nasi et al., 2001). À l'inverse, son expression est contrôlée négativement par le Tgfβ

(*Transforming growth factor β*), l'interféron γ et la protéine suppresseuse de tumeur APC (*adenomatous polyposis coli*) (He et al., 1998; Nasi et al., 2001). En conséquence, les protéines Myc régulent la croissance cellulaire et la progression du cycle cellulaire en coordonnant l'effet de plusieurs gènes. Cela inclut les régulateurs de la progression des phases G1-S comme les cyclines de type D et E, les kinases cyclines-dépendantes (Cdk4) et la protéine E2F (Bouchard et al., 2001; Hermeking et al., 2000; Perez-Roger et al., 1997; Sears et al., 1997). De plus, Myc régule négativement les gènes codant pour les inhibiteurs des Cdk p21^{CIP1}, p27^{Kip1} et p15^{INK4B} qui bloquent la progression en G1 (Claassen and Hann, 2000; Staller et al., 2001; Yang et al., 2001). D'ailleurs, la répression de p21^{CIP1} par Myc est un mécanisme important dans le renouvellement des cellules souches et la prolifération tumorale suite à une stimulation de la voie canonique des Wnt (qui inhibe APC, voir section I.6.3.1). Ce mécanisme ne fait pas qu'activer la prolifération, mais bloque aussi la différenciation cellulaire et l'apoptose induite par c-Myc (He et al., 1998; Pinto et al., 2003; Sierra et al., 2006; van de Wetering et al., 2002; You et al., 2002).

I.8.4.2 Induction de l'apoptose

Les membres de la famille de *Myc* ont la propriété d'induire l'apoptose dans certaines conditions (Hurlin, 2005). L'activation d'apoptose a été démontrée dans plusieurs types cellulaires qui expriment *c-myc* à l'aide d'un promoteur ectopique sous un stress cellulaire ou en présence limitée de signal de survie (ex : culture cellulaire en absence de sérum) (Evan et al., 1992). *In vivo*, l'apoptose induite par *c-myc* aurait un rôle protecteur contre la prolifération incontrôlée de cet oncogène (Evan and Littlewood, 1998; Green and Evan, 2002). Ainsi, les différentes voies apoptotiques induites par *c-myc* doivent être inhibées pour obtenir son plein potentiel oncogénique. C'est ce qui se produit dans les tumeurs où l'on observe une surexpression coordonnée de *c-myc* et de protéines anti-apoptotiques comme Bcl2 ou Bcl-X_L (Fanidi et al., 1992; Strasser et al., 1990). Cette synergie dans la progression tumorale est également retrouvée suite à la perte de gènes suppresseurs de tumeur comme *p53* ou *p19^{ARF}* (Blyth et al., 1995; Elson et al., 1995). Cependant, il a été démontrés que l'apoptose induite par *c-myc* pouvait être dépendante ou indépendante de

p53 (Sakamuro et al., 1995). En revanche, la plupart des voies apoptotiques induites par *c-myc* semblent impliquer la relâche du cytochrome c de la mitochondrie (Juin et al., 1999) (Figure I-11, page 77).

Une fois relâché dans le cytosol, le cytochrome c s'associe à Apaf1 (*apoptotic protease-activating factor 1*) pour créer l'apoptosome, un complexe qui active la procaspase-9. Ensuite, une cascade d'activation des caspases effectrices telles que les caspases-2, 3, 6 et 7 est déclenchée qui conduira à une perte d'intégrité et la mort cellulaire (Kagaya et al., 1997; Kangas et al., 1998). De plus, les protéines de la famille Bcl2 sont d'importants régulateurs de la perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie (MOMP) et semblent responsables de la relâche du cytochrome c. Un mécanisme par lequel c-Myc influencerait la balance entre les gènes anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl2, semble déterminer le destin de survie ou de mort de la cellule (Dansen et al., 2006; Eischen et al., 2001a; Eischen et al., 2001b; Iaccarino et al., 2003; Juin et al., 2002; Maclean et al., 2003; Mitchell et al., 2000).

La relâche du cytochrome c induite par c-Myc peut être empêché par IGF1 (*insulin-like growth factor*). Ce signal de survie active la voie de Ras et Akt et cause la séquestration, via la protéine 14-3-3, de la protéine proapoptotique Bad (Juin et al., 1999; Kauffmann-Zeh et al., 1997; Zha et al., 1996). De plus, IGF1/Akt inhibe également une autre voie apoptotique de *c-myc*, soit celle induite par les récepteurs de mort cellulaire (Rohn et al., 1998).

En effet, *c-myc* semble promouvoir l'apoptose induite par FasL, TNF α (*Tumour necrosis factor α*) et TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) (Hueber et al., 1997; Klefstrom et al., 1994; Klefstrom et al., 2002; Nieminen et al., 2007). La liaison du ligand FasL à son récepteur Fas (APO-1, CD95) recrute la molécule adaptatrice Fadd (*Fas-associated death domain*) à la partie intracellulaire du récepteur. Fadd, à son tour, recrute la procaspase-8, résultant en son auto-activation et activation des caspases effectrices (Boldin et al., 1996; Kischkel et al., 1995; Medema et al., 1997). Cette voie peut en principe contourner la mitochondrie pour induire l'apoptose. Cependant, la caspase-8 peut

également activer la protéine pro-apoptotique Bid qui provoque la perte d'intégrité de la membrane externe de la mitochondrie (Li et al., 1998) (Figure I-11).

La stimulation de la voie des récepteurs de mort cellulaire par c-Myc semble dépendante de son activité transcriptionnelle sur le promoteur de *FasL* (Brunner et al., 2000; Kasibhatla et al., 2000), (voir Chapitre II.1) (Couillard et al., 2002).

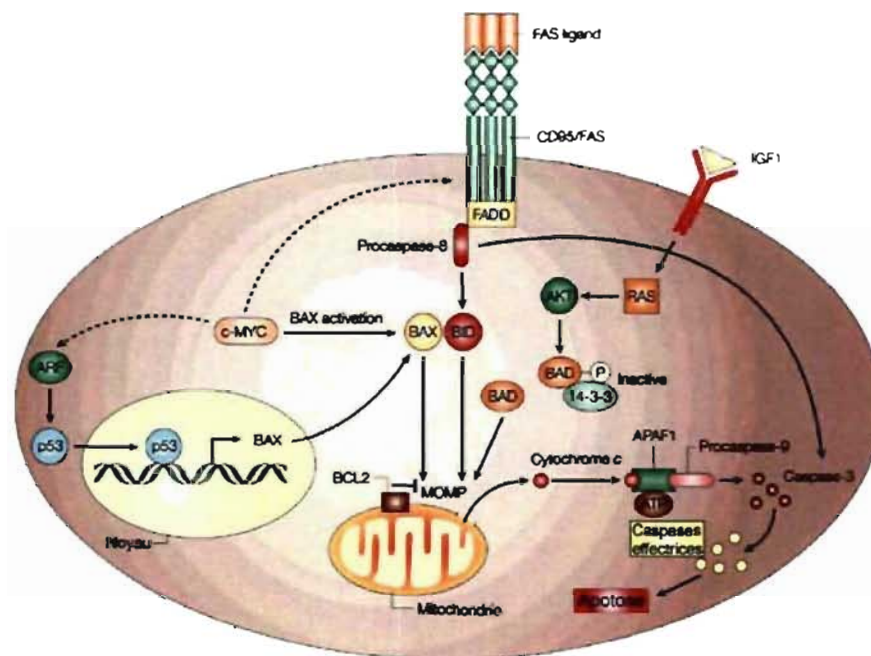


Figure I-11 : Voies de signalisation apoptotique de *c-myc*

c-Myc stimule différentes voies apoptotiques dépendantes de p53, FasL/Fas, Bcl2/Bax et les caspases. MOMP : perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie. Voir texte de la section I.8.4.2 pour plus de détails. Image adaptée de (Pelengaris et al., 2002a)

I.8.5 Rôle de *Myc* dans le développement

I.8.5.1 Expression embryonnaire de *Myc*

Les membres de la famille *Myc* sont impliqués dans plusieurs processus vitaux de la cellule et partagent ou non des rôles physiologiques importants au cours du développement. Leurs patrons d'expression spatiotemporelle au cours du développement embryonnaire sont distincts, mais se superposent dans certains cas (DePinho et al., 1991). L'expression de *c-*, *N-* et *L-myc* est à son maximum pendant l'embryogenèse et diminue après la naissance lorsque la différenciation cellulaire est complète et que la croissance des organes cesse. Même si le transcrite des trois gènes *Myc* est détectable aux stades de pré-implantation, *N-myc* est abondamment exprimé dans les cellules embryonnaires alors que *c-myc* est prédominant dans le tissu extraembryonnaire lors de la gastrulation (Downs et al., 1989). Au cours des étapes subséquentes du développement, l'expression de *N-myc* est restreinte à certains organes comme le cerveau et le rein, alors que *c-myc* demeure ubiquitaire (Downs et al., 1989; Mugrauer and Ekblom, 1991; Schmid et al., 1989; Zimmerman et al., 1986). La distribution de l'expression de *L-myc* est plus limitée que celle des autres membres et est souvent coexprimée avec *c-* et/ou *N-Myc* (Hatton et al., 1996; Zimmerman et al., 1986). En général, le patron d'expression de *c-myc* corrèle avec celui de la prolifération cellulaire et celui de *N-* et *L-myc* avec les cellules post-mitotiques qui sont en cours de différenciation (Morgenbesser and DePinho, 1994; Mugrauer et al., 1988; Mugrauer and Ekblom, 1991).

I.8.5.2 Ablation génique de *Myc*

Les souris homozygotes *null* pour *c-myc* et *N-myc* meurent *in utero* à l'âge embryonnaire e10.5 et e12.5 respectivement, alors que les souris *L-myc*^{-/-} sont viables (Hatton et al., 1996). Les embryons *N-myc*^{-/-} manifestent un retard de croissance et une diminution en taille de certains organes comme le cerveau, le mésonéphros et les poumons (Charron et al.,

1992; Sawai et al., 1991; Stanton et al., 1992). Ces anomalies surviennent malgré la compensation par une surexpression de *c-myc* dans le neuroépithélium, suggérant un rôle essentiel pour *N-myc* à ce stade du développement (Stanton et al., 1992). À son tour, *N-myc* ne peut pas compenser entièrement la condition de la souris *c-myc*^{-/-}, dont la létalité embryonnaire est associée à une diminution de la taille générale de l'embryon, d'un défaut de vascularisation et d'un retard dans le développement précoce de plusieurs organes comme le coeur et le tube neural (Davis et al., 1993). Il est d'ailleurs étonnant que les embryons *c-myc*^{-/-} et *N-myc*^{-/-} survivent aussi longtemps, suggérant des fonctions redondantes tôt dans le développement. La compensation moléculaire semble effectivement survenir puisque les embryons *null* pour *max*, le partenaire obligatoire des trois protéines Myc, démontrent un arrêt de développement beaucoup plus précoce (e6.5-7.5) que les embryons *null* pour *c-* et *N-myc* (Shen-Li et al., 2000). De plus, par insertion dirigée, le gène *N-myc* a été exprimé sous le contrôle des séquences régulatrices de *c-myc*. Ces souris homozygotes sont viables, fertiles et en santé, suggérant que *N-myc* peut substituer le rôle de *c-myc* au cours de l'embryogenèse et même au-delà (Malynn et al., 2000).

I.8.5.3 Rôle de *Myc* dans l'organogenèse murine

Le rôle des membres de la famille *Myc* dans les étapes plus tardives du développement et dans l'homéostasie tissulaire a été étudié suite à leur surexpression en souris transgéniques ou à leur inactivation par la génération d'allèles hypomorphes ou de délétion conditionnelle grâce au système *Cre-loxP* (Tableau I-XIV, page 81) (Morgenbesser and DePinho, 1994; Purity et al., 2006). Prises dans leur ensemble, ces études ont démontré le rôle essentiel de *Myc* dans le maintien des populations de cellules progénitrices et du contrôle de la balance entre la prolifération et la différenciation cellulaire. De manière intéressante, le rôle de *c-myc* dans l'apoptose ou la différenciation cellulaire a été démontré suite à la régression tumorale observée par délétion conditionnelle de *c-myc* dans certains cancers (Arvanitis and Felsher, 2005). Toutefois, l'utilisation du système *Cre-loxP* a permis d'investiguer le rôle physiologique de *c-myc* dans différents organes et tout particulièrement son rôle lors

du développement rénal (voir chapitre II.2). De plus, ce système a été employé pour étudier son rôle dans la pathologie de l'ADPKD (voir chapitre II.3).

Tableau I-XIV : Dérégulation de l'expression de *Myc* chez la souris

Organes ou type cellulaire	Surexpression		Perte ou réduction d'expression	
	Phénotypes	Réf	Phénotypes	Réf
Intestin	Cancer colorectal	1	Aucun effet sur l'épithélium; Cellules progénitrices : taille réduite et cycle ralenti	2, 3 4
Glandes mammaires	Adénocarcinomes tumeurs mammaires	5 6	Régression tumorale	7
Peau	Prolifération et différenciation stimulées	8, 9	Régression tumorale	10, 11
Lymphocytes B	Lymphomes B et T; Syndrome lymphoprolifératif;	12 13	Prolifération réduite; Apoptose résistant;	15 16
	Tailles augmentées	14	Régression tumorale	17
Lymphocytes T	Tumeurs thymiques; Lymphomes	18 12, 26	Prolifération réduite; Régression tumorale	19,20 17,21
Foie	Adénomes; Hépatocarcinomes	22 23	Régression tumorale; Un seul lobe (N)	24,25 27
Poumon	Hyperplasie	26	Hypoplasie pulmonaire (N)	27-30
Pancréas	Hyperplasie et apoptose	31,	Régression tumorale	32,
	Hyperplasie	23		
Coeur	Hyperplasie	33	Hypertrophie et péricardium dilaté; Myocardium mince (N)	34 30
Tube neural	ND		Retard ou absence de fermeture; Mince (N)	34 28
Cerveau	ND		Taille réduite et prolifération des NPC réduite (N)	35
Crystallin	Cataractes; Taille réduite (L)	36	Délai dans l'invagination de la vésicule optique (N)	37
Cellules endothéliales	Prolifération augmentée	38	Diminution de vasculogénèse	39
Hématopoïèse	HSC : Perte d'auto-renouvellement et différenciation accélérée	40	Accumulation de HSC et défaut de différenciation; Diminution d'érythrocytes primitifs	40 39
Ostéoblastes	Sarcome ostéogénique	41	Régression tumorale	42
Utérus	Adénocarcinome	26	ND	
Prostate	Hyperplasie et adénocarcinome	26	ND	
Développement des membres	ND		Prolifération réduite; syndactylie; population de mésenchymes non différenciés réduite (N)	43
Rein	Kystes;	44	Prolifération réduite et	45
	Adénocarcinome	26	Hypoplasie rénale (N)	

Légende : ND : non déterminé; (N): Phénotype associé à *N-myc*; (L) : Phénotype associé à *L-myc*; NPC : *Neuronal progenitor cells*; HSC : *Hematopoietic stem cells*.

Références : 1-(Sansom et al., 2004); 2-(Ignatenko et al., 2006); 3-(Bettess et al., 2005); 4-(Muncan et al., 2006); 5-(Stewart et al., 1984); 6-(Schoenenberger et al., 1988); 7-(D'Cruz et al., 2001); 8-(Arnold and Watt, 2001);

Légende Tableau I-XIV suite :

9-(Waikel et al., 2001); 10-(Pelengaris et al., 1999); 11-(Flores et al., 2004); 12-(Adams et al., 1985); 13-(Morello et al., 1989); 14-(Iritani and Eisenman, 1999); 15-(de Alboran et al., 2001); 16-(de Alboran et al., 2004); 17-(Marinkovic et al., 2004); 18-(Spanopoulou et al., 1989); 19-(Trumpf et al., 2001); 20-(Douglas et al., 2001); 21-(Felsher and Bishop, 1999b); 22-(Sandgren et al., 1989); 23-(Cartier et al., 1992); 24-(Beer et al., 2004); 25-(Shachaf et al., 2004); 26-(Geick et al., 2001); 27-(Sawai et al., 1993); 28-(Stanton et al., 1992); 29-(Moens et al., 1992); 30-(Moens et al., 1993); 31-(Sandgren et al., 1991); 32-(Pelengaris et al., 2002b); 33-(Jackson et al., 1990); 34-(Davis et al., 1993); 35-(Knoepfler et al., 2002); 36-(Morgenbesser et al., 1995); 37-(Charron et al., 1992); 38-(Brandvold et al., 2000); 39-(Baudino et al., 2002); 40-(Wilson et al., 2004); 41-(Felsher and Bishop, 1999a); 42-(Jain et al., 2002); 43-(Ota et al., 2007); 44-(Trudel et al., 1991); 45-(Bates et al., 2000).

I.8.5.4 Rôle de *Myc* dans l'organogenèse rénale

I.8.5.4.1 Expression rénale de *Myc*

Le rein constitue un excellent système pour étudier le rôle physiologique des membres de la famille *Myc*, car ils sont tous exprimés de manières distinctes au cours du développement rénal. Les études sur l'analyse de l'expression rénale des gènes *myc* et leurs fonctions sont principalement faites chez la souris (Figure I-12, page 84).

Dans le métanéphros, le transcrite de *c-myc* est détectable dans le mésenchyme non induit et les structures épithéliales précoces telles que les corps en virgule et en S. Son expression est maintenue dans les tubules en élongation, mais est fortement diminuée suite à la différenciation terminale de l'épithélium tubulaire (Figure I-12, page 84). Le patron d'expression de *c-myc* semble donc suivre celui des cellules en prolifération (Mugrauer and Ekblom, 1991; Schmid et al., 1989).

Contrairement à *c-myc*, *N-myc* est absent du mésenchyme non induit, mais son expression augmente pendant les premières phases de différenciation et décline après la phase du corps en S (Mugrauer and Ekblom, 1991). Il est donc exprimé seulement dans le mésenchyme en cours d'épithélialisation. (Figure I-12, page 84)

À l'inverse des deux autres membres, l'expression de *L-myc*, quoique faiblement observée dans tous les stades du développement rénal, est concentrée principalement dans l'épithélium dérivé du bourgeon urétéral comme le système collecteur, la papille, le pelvis et l'uretère (Hatton et al., 1996; Mugrauer and Ekblom, 1991).

I.8.5.4.2 Expression rénale dérégulée de *Myc*

Parmi les mutants de souris pour les trois gènes *myc* (voir section I.8.5.2), seule l'inactivation de *N-myc* a révélé des anomalies au niveau du développement rénal, tel qu'une diminution du nombre et de la taille du mésonéphros ayant subi une régression prématurée (Charron et al., 1992; Stanton et al., 1992). La génération d'une souris mutante pour un allèle hypomorphe de *N-myc* a permis l'analyse de son rôle dans le métanéphros et a déterminé qu'une déficience en *N-myc* diminue de façon dose dépendante le nombre de branchements du bourgeon urétéral et le nombre de glomérules menant à la formation de reins hypoplasiques. Cette hypoplasie est causée par une diminution de la prolifération cellulaire plutôt qu'une augmentation d'apoptose. Cependant, aucune étude n'a révélé un rôle des membres de la famille *Myc* dans l'hypoplasie rénale humaine, mais les études sur *N-myc* (Bates et al., 2000) et *c-myc* (voir chapitre II.2) réalisées chez la souris, laissent supposer ce lien.

Toutefois, certaines maladies rénales humaines démontrent un défaut d'expression de *Myc*, dont la surexpression de *c-myc* dans l'ADPKD (Figure I-12, page 84) (Husson et al., 2004; Klingel et al., 1991; Lanoix et al., 1996). Le mécanisme par lequel l'expression de *c-myc* est dérégulée dans l'ADPKD est inconnu et fera l'objet du chapitre II.3.

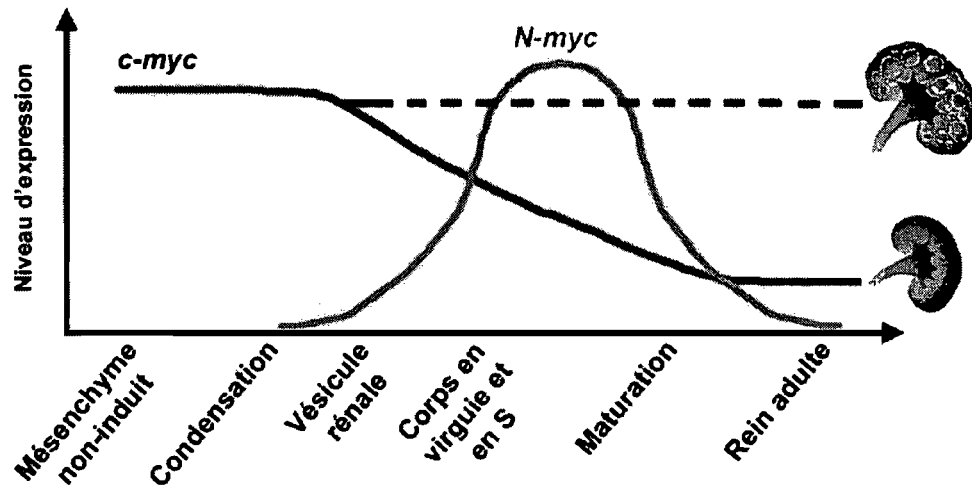


Figure I-12 : Expression rénale de *c-myc* et *N-myc*

Les niveaux relatifs d'expression de *c-myc* (ligne noire) et *N-myc* (ligne grise) sont représentés en fonction des différents stades de développement du mésenchyme métanéphrique. Une persistance d'expression de *c-myc* mène à la formation de reins kystiques (ligne noire pointillée). *L-myc* n'est pas représenté étant donné que son expression est principalement localisée dans l'épithélium dérivé du bourgeon urétéral.

I.8.5.5 Rôle de *c-myc* dans la polykystose rénale

Dans un rein adulte, l'expression de *c-myc* est maintenue à de faibles niveaux. Par contre, une augmentation d'expression de *c-myc* est détectée dans les reins polykystiques de patients ADPKD (Husson et al., 2004; Lanoix et al., 1996). Cette surexpression est suffisante pour déclencher la formation de kystes rénaux, tel que démontré chez la souris transgénique SBM (voir section I.7.2) (Trudel et al., 1991). Tant chez l'humain que chez la souris, la surexpression de *c-myc* dans l'épithélium kystique est associée à des taux anormalement élevés de prolifération cellulaire et d'apoptose (Geick et al., 2001; Lanoix et al., 1996; Trudel et al., 1998; Trudel et al., 1997). L'importance de *c-myc* dans la PKD a été suggérée par d'autres approches : 1- la détection d'une surexpression de *c-myc* dans d'autres modèles murins de PKD comme *cpk* (Cowley et al., 1987; Harding et al., 1992;

Ricker et al., 2000), *pcy* (Gattone et al., 1996), *Pkd1*^{del34} (Fan et al., 1998), le rat *Han:SPRD* (Cowley et al., 1993), la souris transgénique *ALK3(QD)* (Hu and Rosenblum, 2005) et le mutant conditionnel de *Kif3A* (Lin et al., 2003); 2- la surexpression de *c-myc* est associée à la formation de kystes rénaux chez la souris déficiente pour le gène *Mxil*, un antagoniste de c-Myc (Yoo et al., 2006 ; Yoo et al., 2007); 3- la souris mutante pour la protéine AP-2β, un régulateur négatif de la transactivation par c-Myc, développe des kystes rénaux (Gaubatz et al., 1995; Moser et al., 2003; Moser et al., 1997); 4- des kystes rénaux se développent chez les souris transgéniques surexprimant la *prothymosine-α*, un gène cible de c-Myc (Li et al., 2005a); 5- les souris SBM révertantes et leurs progénitures, caractérisées par une délétion partielle du transgène, ne démontrent aucune évidence de kystogenèse (Trudel et al., 1994); 6- les souris transgéniques surexprimant un autre protooncogène, *c-fos*, dans l'épithélium renal ne développent pas d'anomalies rénales (Trudel et al., 1997) ; 7- le traitement avec un oligomère anti-sens contre l'ARN messager de *c-myc* réduit partiellement le phénotype kystique chez les souris *cpk* (Ricker et al., 2002).

Tout récemment, notre groupe a découvert une surexpression de *c-myc* chez le modèle de gain de fonction de *Pkd1*, la souris transgénique SBPkd1_{TAG} (Thivierge et al., 2006). Par la suite, nous avons démontré qu'un effet de dosage d'expression de *c-myc* chez ce modèle module le phénotype kystique (voir chapitre II.3).

I.9 Hypothèses et mise en situation

La polykystose rénale autosomale dominante (ADPKD) est la maladie génétique rénale la plus répandue dans le monde, dont les seuls traitements connus sont la dialyse à long terme et/ou la transplantation rénale. La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires causant la kystogenèse est primordiale afin de créer de nouveaux traitements. Les études sur l'ADPKD autant chez l'humain que chez la souris démontrent que les cellules rénales kystiques présentent des taux anormalement élevés de prolifération cellulaire et d'apoptose. Ces processus cellulaires sont en partie déclenchés par une surexpression de *c-myc* dans l'épithélium kystique, mais les voies de signalisations empruntées demeurent inconnues (Trudel et al., 1998; Trudel et al., 1997). De plus, les cellules kystiques présentent des caractéristiques de cellules non différenciées que l'on retrouve uniquement au cours du développement rénal. *Pkd1* et *c-myc* semblent jouer un rôle important dans cette dédifférenciation cellulaire puisque leur expression est élevée dans l'ADPKD et dans le développement rénal (Lanoix et al., 1996; Mugrauer and Ekblom, 1991). Cependant, l'implication de *Pkd1* et de *c-myc* dans une voie pathogénétique commune n'a jamais été étudiée. L'objectif général de cette thèse est de déterminer le rôle de *c-myc* dans le développement rénal et l'ADPKD. En parallèle, le rôle de la β -caténine, un activateur transcriptionnel de *c-myc*, a été analysé dans le développement du rein et la polykystose rénale.

I.9.1 Hypothèse 1 : L'apoptose induite par *c-myc* est dépendante de l'interaction FasL/Fas *in vivo*

Au début de nos travaux, la contribution de l'apoptose dans la kystogenèse avait récemment été découverte et *c-myc* semblait en être un activateur majeur. Nous avons donc entrepris d'élucider la voie de signalisation apoptotique induite par *c-myc in vivo*, en utilisant la souris transgénique SBM (voir section I.7.2). Nos études précédentes chez ce

modèle d'ADPKD ont démontré que des régulateurs majeurs de l'apoptose comme p53 et les membres de la famille de Bcl-2, ne sont pas requis pour l'apoptose induite par *c-myc* (Trudel et al., 1997). Une voie apoptotique alternative a été décrite *in vitro* dans laquelle *c-myc* sensibilise les cellules à la voie induite par les récepteurs de mort cellulaire Fas (Hueber et al., 1997). Notre premier objectif est donc de vérifier la validité de cette voie apoptotique *in vivo* en croisant la souris SBM et la souris mutante du gène *FasL* afin d'évaluer s'il y a une amélioration du phénotype kystique.

I.9.2 Hypothèse 2 : *c-myc* joue un rôle dans l'organogenèse rénale

L'expression de *c-myc* a été détectée dans le mésenchyme métanéphrique au cours du développement rénal, mais sa fonction demeure inconnue. L'étude de son rôle dans l'organogenèse rénale a été limitée par la létalité embryonnaire précoce de la souris *c-myc*^{-/-} (Davis et al., 1993). Notre deuxième objectif est d'analyser le rôle de *c-myc* dans le mésenchyme et l'épithélium rénal au cours du développement en utilisant l'approche d'ablation génique conditionnelle. Nous avons émis l'hypothèse que *c-myc* stimule la prolifération cellulaire et l'apoptose de l'épithélium rénal en développement. Cette hypothèse est entre autres basée sur le fait que dans l'ADPKD, *c-myc* semble contribuer à la prolifération cellulaire et l'apoptose, deux processus normalement détectés uniquement dans le rein fœtal.

I.9.3 Hypothèse 3 : *c-myc* est un joueur important dans la polykystose rénale induite par une surexpression de *Pkd1*

L'expression rénale de *c-myc* est élevée dans le modèle d'ADPKD SBPkd1_{TAG}, dans lequel un phénotype kystique est induit suite à la surexpression rénale de *Pkd1* (voir section I.7.2) (Thivierge et al., 2006). Notre troisième objectif est de déterminer le rôle de *c-myc* dans la kystogenèse rénale déclenchée par une surexpression de *Pkd1*. Une étude d'ablation génique conditionnelle a été entreprise afin de vérifier si une diminution d'expression de *c-myc* dans les reins des souris SBPkd1_{TAG} réduit la sévérité du phénotype kystique.

I.9.4 Hypothèse 4 : β -caténine est essentielle au développement rénal

La voie canonique de Wnt/ β -caténine stimule l'expression de *c-myc* et est impliquée dans différents processus au cours du développement rénal. Tout comme celui de *c-myc*, le rôle de la β -caténine dans le développement rénal *in vivo* a été peu étudié étant donné la létalité précoce des embryons β -caténine^{-/-} (Haegel et al., 1995). Notre quatrième objectif est d'étudier le rôle de la β -caténine dans l'organogenèse rénale en déterminant si sa délétion conditionnelle embryonnaire ou adulte affecte le développement ou l'homéostasie rénale.

II RÉSULTATS

Avant propos et contribution des auteurs

Le chapitre II est subdivisé en quatre sections selon les publications des résultats obtenus au cours de mes études de doctorat. La première section (II.1) est un article publié dans le journal *Cancer Research*, dans lequel plusieurs auteurs ont contribué. Je tiens à souligner que toutes les expériences ont été exécutées par moi-même. Richard Guillaume m'a enseigné la plupart des protocoles utilisés dans cet article à l'exception des figures 2 et 3. Les résultats présentés dans les figures 2 et 3 ont été réalisés au cours d'un stage dans le laboratoire du Dre D'Agati (*Columbia University, College of Physicians and Surgeons, New York, N.Y.*) où le Dr Tanji m'a enseigné les techniques d'immunohistochimie et d'essai TUNEL. J'ai aussi rédigé l'article sous la supervision du Dre Trudel.

Les sections II.2 et II.3 sont en cours de préparation finale pour soumission. La section II.4 regroupe des résultats préliminaires d'un futur article. J'ai effectué toutes les expériences présentées dans ces trois sections. La rédaction de ces articles a également été accomplie par moi-même sous la supervision du Dre Trudel.

II.1 C-MYC-INDUCED APOPTOSIS IN POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE IS INDEPENDENT OF FASL/FAS INTERACTION

Martin Couillard¹, Richard Guillaume¹, Nozomu Tanji², Vivette D'Agati² and Marie Trudel¹

¹ Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

² Department of Pathology, Columbia University, College of Physicians and Surgeons, New York, N.Y., USA.

Key words: c-myc, apoptosis, Fas/FasL, polycystic kidney disease, epithelial cells

Correspondence:

M. Trudel,

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

ABSTRACT

Apoptosis is a critical early cellular event in the development of polycystic kidney disease (PKD) in humans and mice. In the SBM transgenic model of PKD, both apoptosis and proliferation are c-myc driven, and are independent of p53 and Bcl-2 pathways. Based on recent evidence implicating the FasL/Fas pathway in c-myc-induced apoptosis, we have investigated the potential interaction of these pathways *in vivo*. We first evaluated the expression of FasL in renal tissues of SBM mice. This analysis showed that the level of FasL expression was 3- to 4-fold elevated in the SBM kidneys, indicating a potential autocrine suicidal mechanism. Second, we crossed the SBM mice with *gld* mice mutated in FasL. The progenies have comparable renal epithelial apoptotic and proliferation rates, and cystic phenotype in all SBM genotypes irrespective of the FasL genotype. Our study proves that c-myc-induced apoptosis can be independent of FasL/Fas pathway *in vivo* and implicates the existence of a novel c-myc driven apoptotic pathway.

INTRODUCTION

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is one of the most frequent human genetic disorders affecting 1 in 1000 individuals, and constitutes a major cause of end stage renal failure worldwide. The PKD1 gene is responsible for 85-90% of ADPKD cases and is believed to encode an integral membrane protein. ADPKD affects both kidneys and cyst formation begins early during kidney development. This disorder is characterized by the progressive expansion of renal epithelial cysts involving tubules and glomeruli, leading to remodeling of the renal architecture and physiologic dysfunction. Interestingly, the cystic epithelium in adult ADPKD kidneys displays several cellular physiological properties of the developing renal epithelium. We and others have shown that the epithelial cell polarity is frequently altered in cystic and in non-cystic renal tubules (1, 2), similar to the immature renal epithelium. Moreover, ADPKD kidneys undergo extensive epithelial proliferation (3, 4), and apoptosis (4, 5), processes also prevailing during renal organogenesis. The renal apoptosis in ADPKD occurs in the face of increased expression levels of the anti-apoptotic factor Bcl-2, but unaltered p53 expression. Notably, in the kidneys of ADPKD patients both apoptosis and proliferation are associated with increased levels of c-myc, as they are in normal fetal kidneys. This association led us and others to propose that ADPKD may result from a failure of epithelial cells to fully differentiate and/or switch out of the renal developmental program.

As a parallel to these human studies, we have generated an ADPKD transgenic mouse model, called SBM, by targeted overexpression of *c-myc* to the renal tubular epithelium *in vivo* (6). All of our SBM mice in 18 transgenic lines consistently develop severe renal anomalies characteristic of PKD and die of renal failure at three to four months of age. Spontaneous mutations occurring in the transgene resulted in reversion of the PKD phenotype (7). At E16.5, the SBM transgenic fetuses produce tubular and glomerular renal cysts (8). Overexpression of c-myc in the renal epithelium of SBM mice results in 10- to 100-fold increased in cellular proliferation and in apoptosis relative to control (8, 9). The

relevance of this model to the human disease is further supported by the increased *c-myc* expression observed in both human ADPKD kidneys and in the model of renal cystic disease induced by targeted disruption of the mouse *Pkd1* gene (10).

Based on our observations that the kidneys of human ADPKD and murine SBM PKD manifest similar degrees of cellular proliferation and apoptosis, we sought to investigate the signaling pathways whereby *c-myc*-induced apoptosis modulates the disease progression. Since the initial discovery of a role of *c-myc* in apoptosis (11), the *c-myc* apoptotic pathway(s) has been extensively studied (12). Our murine studies have revealed that the two major modulators of *c-myc*-apoptotic pathway, p53 and Bcl-2, are not involved in renal cystogenesis. Indeed, crossmating SBM mice to mice with either p53 inactivation or Bcl-2 overexpression did not modulate the rate of *c-myc* apoptosis (9). More recently, an alternative apoptotic pathway for *c-myc* has been identified and can proceed through cell surface interaction of Fas ligand with its receptor Fas (APO-1, CD95) (13). This study proposed that *c-myc* acts by increasing sensitivity of fibroblasts to the Fas death signal through shared signaling pathways. To this point, there is evidence that *c-myc* can directly stimulate the regulation of FasL expression, possibly through an autocrine mechanism (13, 14). Although the full molecular apoptotic pathways shared by Fas and *c-myc* remain to be elucidated, it is known that the Fas death activation signal can bypass the mitochondrial Bcl-2 family members (15) and lead to the activation of caspase 8, a critical inductive event in the caspase executioner pathway (16). Hence, the Fas signaling pathway is an attractive candidate pathway to investigate in the murine SBM model of PKD for several reasons. First, introduction of *c-myc* into cell culture systems has supported the requirement of an autocrine FasL/Fas dependent signaling pathway in the induction of apoptosis (13). Second, FasL/Fas pathway is known to potentially bypass the Bcl-2 family members. Finally, our previous observations in both human and murine PKD of a clustering of apoptotic events in neighboring cystic epithelium suggested a role for local autocrine mechanisms. To explore the hypothesis that FasL/Fas signaling is central to the *c-myc*-induced apoptosis in PKD, we have introduced a mutation of the FasL into the SBM

murine model. Strikingly, our studies demonstrate that c-myc-induced apoptosis can occur independently of the Bcl-2, p53 or FasL/Fas autocrine pathways in PKD renal epithelial cells. Thus, these results implicate the existence of a yet unidentified myc-apoptotic pathway.

MATERIALS & METHODS

Genotype analysis

The SBM transgenic mice were previously produced using exons 2 and 3 of the c-myc gene linked to the β -globin promoter and SV40 enhancer on a (C57BL/6J X CBA/J)F2 background (6). SBM mice were crossed with the heterozygous FasL^{gld/+} mutant (C57BL/6J) mice (gld: generalized lymphoproliferative disease) obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor Maine). Double heterozygous FasL^{gld/+} SBM mice were then subsequently mated to the FasL^{gld/+} mutant mice. Six genotypes were generated, including FasL^{gld/gld}SBM, FasL^{gld/+}SBM, SBM, FasL^{gld/gld}, FasL^{gld/+}, and wild type.

The SBM genotype was revealed by Southern blot as previously described (7). Screening of FasL^{gld} genotype was performed by sequencing a PCR-amplified fragment containing the mutated FasL region. Genomic DNA (~100ng) was amplified in PCR buffer (Tris 10mM pH7.2, KCl 50mM, MgCl₂ 1.5mM), 0.2mM of each dNTP, 0.5 μ M of both primers: forward 5'-CACTCAAGGTCCATCCCTCTG-3' and reverse 5'-AATATTCCTGGTGCCCATGAT-3', with 0.5 unit of Taq polymerase. PCR conditions were 94°C, 2 min, followed by 30 cycles of 94°C, 1 min, 55°C, 1 min, 72°C, 1min, and a final elongation of 7 min at 72°C. The 442bp amplified products were then sequenced using a kit (Amersham Life Science: T7 Sequenase v2.0) with α -³⁵S-dATP and an internal primer 5'-TTCAATCTTACCAGTGCTGAC-3'. The wild type sequence for FasL is 5'-GAATCTAAGACCTTTTTC-3', whereas the FasL^{gld} sequence contains a point mutation

replacing a T for a C as follows: 5'-GAATCTAAGACCCTTTTC-3'. This point mutation in the FasL gene prevents recognition of the Fas receptor.

Expression analysis

RNA extraction:

Adult kidney samples (4 months) were obtained from the SBM75 transgenic line and control mice (CBA/J X C57BL/6J)F1. Adult testis and liver samples from control F1 mice were used as positive tissues for FasL and Fas expression. RNA was extracted by the guanidium thiocyanate method as described before (6). Finally, the RNAs were resuspended in RNase free diethyl-pyrocyanate-treated water. Integrity of RNA was monitored on 0.8% agarose formaldehyde gels.

Reverse transcription PCR:

All RNA samples (3µg) were simultaneously reverse transcribed in BRL RT buffer containing 0.5 mM each dNTP (Pharmacia), 1.2 U/µl RNasin (Boehringer Mannheim), 200 units of M-MLV reverse transcriptase (BRL) and 0.5µg of pd(N)₆ random primers (Pharmacia). Reverse transcription was performed at 37°C for 1 hour in a total reaction volume of 20µl.

For all of the amplification reactions, initial control experiments were carried out using varying quantities of RT aliquots to ensure that the conditions were within the linear range. The RT aliquots were subsequently amplified in PCR buffer (20mM Tris pH 8.8, 50 mM KCl, 3.0 mM MgCl₂), 0.2 mM each dNTP, 20 pmoles of each primer, α-³²P-CTP and 0.5 unit Taq polymerase in a total volume of 20µl (7). Parallel control reactions were carried out without DNA template. The primers used in these analysis were for FasL, 5'-CAGCTCTTCCACCTGCAGAAG-3' and 5'-CAGAGGGATGGACCTTGAGTG-3', Fas 5'-ACAGCAACCAGCAATACA-3' and 5'-GTGTCTTGGATGCTGTCA-3' and for internal control S16 ribosomal protein gene product, 5'-

AGGAGCGATTTGCTGGTGTGGA-3' (forward nucleotide 1451-1472 exon 3) and 5'-GCTACCAGGCCTTTGAGATGGA-3' (reverse nucleotide 1620-1641, exon 4) (9). Each pair of sense and anti-sens primers were designed such that only spliced mRNA would produce the predicted amplification product. Conditions for FasL and S16 amplification were 94°C for 5 min followed by 25 cycles of 94°C for 15 sec and 66°C for 30 sec. Conditions for Fas and S16 amplification were 94°C, 2 min followed by 25 cycles of 94°C for 30 sec, 52°C for 30 sec and 72°C for 30 sec, and final elongation of 7 min at 72°C. Samples were separated on 6% polyacrylamide/TBE gels and quantified by phosphorimager screen. The expected amplification fragments for the FasL, Fas and S16 gene products were 172 bp, 323 bp and 104 bp, respectively.

Histologic analysis

Five-micron-thick paraffin sections of formalin-fixed renal tissue of three-month old mice from the six different genotypes were deparaffinized and hydrated in graded alcohols. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin. Polycystic kidney disease features were evaluated semi-quantitatively by analysis of the percentage of renal parenchyma occupied by cysts and displaying epithelial hyperplasia: none (-), 1-30% (1+), 30-60% (2+), and 60-100% (3+). The numbers of mice analyzed per genotype were as follows: the FasL^{gld/gld}SBM (n=3), FasL^{gld/+}SBM (n=4), SBM (n=4), FasL^{gld/gld} (n=5), FasL^{gld/+} (n=3), and wild type (n=2).

Apoptotic Index: TUNEL assay

For each genotype, three-micron-thick sections of formalin-fixed renal tissue from 3 month-old mice were deparaffinized and hydrated in graded alcohols. After digestion in proteinase K and immersion in 2% H₂O₂, sections were incubated with 10μM biotin-16-dUTP and with 0.2 U/μl TdT in TdT buffer (30mM Tris-HCl pH 7.2, 140mM sodium cacodylate, 1mM Cobalt Chloride). The enzymatic reaction was stopped by immersion in TB buffer (300mM sodium Chloride, 30mM Sodium Citrate). After incubation with 2%

BSA, labeled nucleotides were reacted with Avidin/Biotin complex (Vector Elite Vectastain) followed by visualization with DAB and counterstained with Periodic Acid-Schiff (PAS). Apoptosis was quantitated by averaging the number of stained nuclei per cystic and non-cystic tubule in a minimum of 100 tubules per kidney. The number of mice analyzed was n=4 for each SBM positive genotype and n=2 for each SBM negative genotype.

Proliferation Index: MIB-1 Immunostaining

For each genotype, formalin-fixed renal tissues from three-month old mice were sectioned at three microns, deparaffinized and hydrated in graded alcohols. After antigen retrieval by microwaving in citric buffer for 25 minutes, slides were blocked for endogenous peroxidase activity. After blocking with 10% natural goat serum, sections were incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal antibody MIB-1 to Ki67 (Novacastra Laboratories, Ltd, UK) at 1:100 dilution. Incubation with biotinylated secondary goat anti-rabbit antibody was followed by Avidin/Biotin complex (Vector Elite Vectastain), DAB, and Periodic Acid-Schiff (PAS) counterstain. Proliferation index was calculated separately for cystic and non-cystic tubules. Proliferative index was expressed as the mean number of MIB-1 positive cells per tubule, calculated from a minimum of 100 tubules per kidney section. The number of mice analyzed was n=4 for each SBM positive genotype and n=2 for each SBM negative genotype.

RESULTS

C-myc overexpression induces FasL expression in vivo

Because c-myc-induced apoptosis is Bcl-2 and p53 independent, we investigated the potential involvement of the third known pathway of c-myc-induced apoptosis, the FasL/Fas pathway. We first evaluated the expression level of FasL in normal (CBA X C57BL/6)F1 and SBM mouse kidneys using RT-PCR. Figure 1A shows that FasL is expressed in normal mouse kidney and in SBM cystic kidney. However, expression levels of FasL appear greater in SBM kidneys by 3- to 4-fold compared to control kidneys. Testicular tissue, which is known to express FasL at very high levels in adult mice, was chosen as positive tissue control. The levels observed in SBM kidneys also appear greater than those in normal testis control.

Similarly, the presence of Fas receptor was investigated by RT-PCR in control and SBM mouse kidneys. As illustrated in Figure 1B, control and SBM kidneys demonstrated similar expression levels. The levels of expression were comparable to those of normal liver, which served as positive control (17).

c-myc-induced cystogenesis is unaffected by FasL mutation

On the basis of increased levels of FasL in SBM mice, we have mated the SBM transgenic mice to the FasL^{gld/gld} homozygote mutant mice to investigate the role of FasL in the c-myc-induced apoptotic pathway. For each of the 6 genotypes (FasL^{gld/gld}, FasL^{gld/+}, FasL^{+/+}, FasL^{gld/gld}SBM, FasL^{gld/+}SBM, SBM), the renal cystic phenotype was evaluated semi-quantitatively with respect to cyst number and size and the degree of epithelial hyperplasia. As shown in table 1, no renal cysts or epithelial hyperplasia were identified in the three genotypes (FasL^{gld/gld}, FasL^{gld/+}, FasL^{+/+}) that did not express SBM. Similar degrees of cyst formation and renal epithelial hyperplasia were observed in FasL^{gld/gld}SBM

and FasL^{gld/+} SBM genotypes as in the SBM genotype, indicating that a non-functional FasL/Fas pathway does not abrogate the cystic phenotype.

Inactivation of FasL signaling does not modulate c-myc apoptosis

The involvement of the FasL/Fas pathway in renal epithelial apoptosis was then quantified using TUNEL assay (Figure 2). No apoptosis was observed in any of the FasL genotypes lacking the SBM transgene. By contrast similar increased rates of apoptosis were observed in all three SBM genotypes, regardless of the FasL genotypes (FasL^{gld/gld}SBM, FasL^{gld/+}SBM, SBM). In general, 4- to 5- fold higher levels of apoptosis were seen in cystic than in noncystic tubular epithelium. Interestingly, apoptotic cells frequently occurred as clusters of 3-10 neighboring cells, as previously described (4, 8). Thus the inactivated FasL did not interfere with apoptosis nor did it prevent clusters of apoptotic cells.

c-myc proliferation is unaltered by FasL mutation in epithelial cells

Because of the high frequency of epithelial hyperplasia in SBM kidneys, we then measured the proliferation rate in renal tissues of mice from the FasL^{gld/gld} and SBM mating. All genotypes lacking SBM had low proliferation indices in the range of 0.2-0.4 cells per tubule. Proliferation indices were 2.4- to 29-fold higher in all 3 genotypes containing SBM, irrespective of the FasL genotype (Figure 3). As shown and illustrated in Figure 3, proliferation indices in SBM kidneys were consistently higher in cystic than in non-cystic epithelium, by 5- to 6-fold. Again proliferative cells were often observed in clusters of 3-10 adjacent epithelial cells, suggesting a zonal effect.

DISCUSSION

Studies in human and murine models have underscored the importance of c-myc in the pathogenesis of PKD. The dual functionality of c-myc in cell proliferation and in cell death appears to be tightly linked and central to the development of this disorder. Consequently, we sought to determine which molecular pathway(s) underlies the c-myc-dependent apoptotic phenotype in PKD. Based on our previous work, the cellular pathways are independent of both key regulators of apoptosis, Bcl-2 and p53. Since an alternative pathway for c-myc induced apoptosis in fibroblast was shown to act through the FasL/Fas system, we have investigated whether this pathway has a potential role in the SBM model. Even if the latter study showed that c-myc overexpression can stimulate FasL expression *in vivo*, our data demonstrate for the first time *in vivo* that disruption of the Fas signaling pathway does not rescue the c-myc apoptotic or cystic phenotype. Both renal proliferation rates and apoptotic rates were unaffected by inactivation of the FasL/Fas interaction in c-myc-induced PKD.

The potential interaction of the FasL and c-myc pathways has never been investigated in epithelial cells either *in vitro* or *in vivo*. This study demonstrates FasL expression in normal renal epithelium *in vivo* and most importantly, that this expression is upregulated in c-myc-induced PKD. This upregulation validates *in vivo*, the observation made *in vitro* by Kasibhatla et al in cultured Jurkat cells that the FasL promoter can be driven by c-myc (14). Our data suggest that the mechanism by which c-myc increases sensitivity to Fas/FasL signaling in epithelial cells could result from enhanced FasL expression. Together our findings of FasL regulation by c-myc *in vivo* involving a different cell type, the epithelial cell, suggest a general regulatory mechanism of c-myc on FasL gene expression.

The FasL upregulation by c-myc appears consistent with the suggestion by Hueber et al that the FasL/Fas pathway is required for c-myc-induced apoptosis (13). However, our results demonstrate that blocking the FasL/Fas pathway in no way modulates the c-myc-

driven cystic or apoptotic phenotype. Furthermore, the presence of apoptotic cells in clusters, presumably from autocrine or paracrine interaction, was as frequent upon abrogation of the FasL/Fas autocrine pathway in SBM kidneys as in SBM kidneys themselves. The seemingly contradictory role of FasL role in the c-myc apoptotic pathway may be attributable to tissue-specific effects. The experiments reported by Hueber, were performed in tissue cultures of immortalized fibroblasts, whereas our observations were made in renal epithelium *in vivo*. Such differences in the dependence of apoptotic mechanisms on p53 have been reported previously between fibroblasts and epithelial cells in culture (18, 19). Hence, our data suggest that c-myc can dictate programmed cell death through multiple pathways, including some that prevail for the fibroblast and hematopoietic cells (11, 18, 20-22) but appear ineffective for epithelial cells. That c-myc could induce distinct cell death programs in different cell types is consistent with the observations that alternative mechanisms of cell death and modes of apoptosis exist in a given cell type as described for both neurons and malignant cells (reviewed in (23)). It is highly possible that c-myc can promote in epithelial cells specific death mechanism(s) via cooperation with different partners and factors and/or alteration of the renal microenvironment through downregulation of integrin and cadherin survival signals mediating adhesion to neighboring cells and extracellular matrix (24-27). One such pathway could involve Bin-1 a known c-myc adapter protein that interacts with integrins and can induce a Bcl-2- and caspase-independent cell death mechanism (28, 29). Investigations into the potential role of Bin-1 in the epithelial c-myc apoptotic pathway may provide insights into an atypical cell death mechanism induced by c-myc.

In summary, our study demonstrates that blocking the FasL/Fas pathway in no way modulates the c-myc driven cystic phenotype. Our previous data have shown that this pathway is also independent of p53 and Bcl-2, both key regulators of c-myc-induced apoptosis. Taken together, our results prove that the c-myc-induced apoptotic pathway in PKD is uniquely independent of all three previously identified central regulators. Future

studies will be directed to the elucidation of this novel c-myc-dependent apoptotic pathway with possible therapeutic implications for prevention of cystogenesis in PKD.

REFERENCES

1. Avner, E. D., Sweeney, W. E. J., and Nelson, W. J. Abnormal sodium pump distribution during renal tubulogenesis in congenital murine polycystic kidney disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 7447-7451, 1992.
2. Barisoni, L., Trudel, M., Chretien, N., Ward, L., Adelsberg, J. V., and D'Agati, V. Analysis of the role of membrane polarity in polycystic kidney disease of transgenic SBM mice. *Am J Pathol.* 147: 1728-1735, 1995.
3. Nadasdy, T., Laszik, Z., Lajoie, G., Blick, K. E., Wheeler, D. E., and Silva, F. G. Proliferative activity of cyst epithelium in human renal cystic diseases. *J. Am. Soc. Nephrol.* 5: 1462-1468, 1995.
4. Lanoix, J., D'Agati, V., Szabolcs, M., and Trudel, M. Dysregulation of cellular proliferation and apoptosis mediates human autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Oncogene.* 13: 1153-1160, 1996.
5. Woo, D. Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *N Eng J Med.* 333: 18-25, 1995.
6. Trudel, M., D'Agati, V., and Costantini, F. C-myc as an inducer of polycystic kidney disease in transgenic mice. *Kidney Int.* 39: 665-671, 1991.
7. Trudel, M., Chretien, N., and D'Agati, V. Disappearance of polycystic kidney disease in revertant c-myc transgenic mice. *Mammalian Genome.* 5: 149-152, 1994.
8. Trudel, M., Barisoni, L., Lanoix, J., and 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.
9. Trudel, M., Lanoix, J., Barisoni, J., Blouin, M.-J., Desforges, M., L'Italien, C., and D'Agati, V. C-MYC-induced Apoptosis in Polycystic Kidney Disease is Bcl-2 and p53 Independent. *J. Exp. Med.* 186: 1873-1884, 1997.

10. Lu, W., Peissel, B., Babkhanlou, H., Pavlova, A., Geng, L., Fan, X., Larson, C., Brent, G., and Zhou, J. Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with a targeted PKD1 mutation. *Nature genetics*. *17*: 179-181, 1997.
11. Askew, D. S., Ashmun, R. A., Simmons, B. C., and Cleveland, J. L. Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene*. *6*: 1915-1922, 1991.
12. Prendergast, G. C. Mechanisms of apoptosis by c-myc, *Oncogene*. *18*: 2967-2987, 1999.
13. Hueber, A.-O., Zornig, M., Lyon, D., Suda, T., Nagata, S., and Evan, G.-I. Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-myc-induced apoptosis. *Science*. *278*: 1305-1309, 1997.
14. Kasibhatla, S., Beere, H. M., Brunner, T., Echeverri, F., and Green, D. R. A "non-canonical" DNA-binding element mediates the response of the Fas-ligand promoter to c-Myc. *Curr. Biol*. *10*: 1205-1208, 2000.
15. Kischkel, F.-C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.-T., and Peter, M.-E. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. *14*: 5579-5588, 1995.
16. Boldin, M.-P., Goncharov, T.-M., Goltsev, Y.-V., and Wallach, D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. *85*: 803-815, 1996.
17. Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Nagata, S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*. *356*: 314-317, 1992.
18. Hermeking, H. and Eick, D. Mediation of c-myc-induced apoptosis by p53. *Science*. *265*: 2091-2093, 1994.
19. Sakamuro, D., Eviner, V., Elliott, K. J., Showe, L., White, E., and Prendergast, G. C. c-Myc induces apoptosis in epithelial cells by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene*. *11*: 2411-2418, 1995.

20. Fanidi, A., Harrington, E. A., and Evan, G. I. Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature*. 359: 554-556, 1992.
21. Wagner, A. J., Kokontis, J. M., and Hay, N. Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21waf1/cip1. *Genes & Development*. 8: 2817-2830, 1994.
22. Shim, H., Chun, Y. S., Lewis, B. C., and Dang, C. V. A unique glucose-dependent apoptotic pathway induced by c-Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 1511-1516, 1998.
23. Leist, M. and Jaattela, M. Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews*. 2: 1-10, 2001.
24. Meier, P. Apoptosis in development, *Nature*. 407: 796-801, 2000.
25. Frisch, S. M. and Francis, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*. 124: 619-626, 1994.
26. Ruoslahti, E. and Reed, J. C. Anchorage Dependence, Integrins, and Apoptosis. *Cell*. 77: 477-478, 1994.
27. Sorenson, C. M. and Sheibani, N. Focal adhesion kinase, paxillin, and bcl-2: analysis of expression phosphorylation, and association during morphogenesis. *Dev. Dyn*. 215: 371-382, 1999.
28. Elliott, K., Ge, K., Du, W., and Prendergast, G. C. The c-myc-interacting adaptor protein Bin1 activates a caspase-independent cell death program. *Oncogene*. 19: 4669-4684, 2000.
29. DuHadaway, J. B., Sakamuro, D., Ewert, D. L., and Prendergast, G. C. Bin1 mediates apoptosis by c-myc in transformed primary cells. *Cancer Res*. 61: 3151-3156, 2001.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Canadian Institute for Health Research (CIHR) and by the Kidney Foundation of Canada; M.C. is a recipient of a CIHR studentship.

TABLE**Table 1: FasL inactivation does not reduce renal cyst formation in SBM mice**

No cystic phenotype was observed in mice that do not carry the SBM transgene. Cysts were present in SBM transgenic mice irrespective of the FasL genotypes. In addition, no difference in cyst severity or hyperplasia was observed in the three different SBM genotypes.

Genotype	n	Renal phenotype	
		Cysts	Hyperplasia
FasL ^{+/+}	3	-	-
FasL ^{+/gld}	3	-	-
FasL ^{gld/gld}	3	-	-
FasL ^{+/+} SBM	4	1½+	1½+
FasL ^{+/gld} SBM	4	2+	2+
FasL ^{gld/gld} SBM	4	1½+	2+

FIGURES

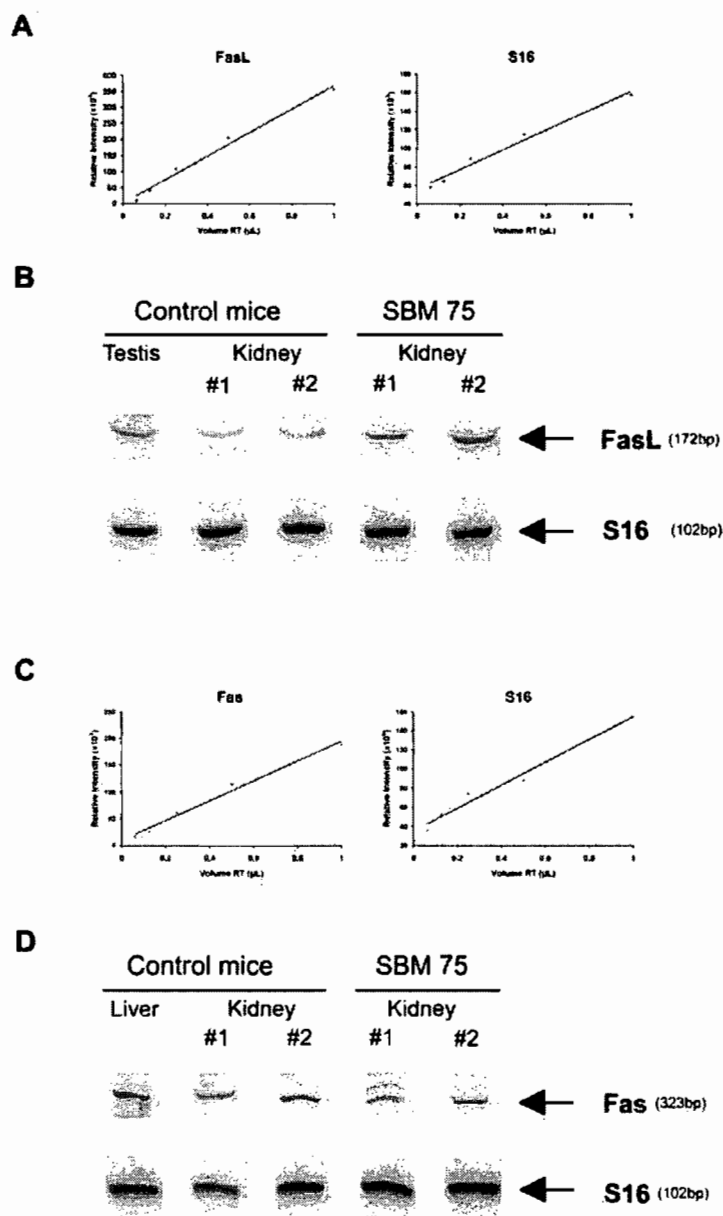


Figure 1: c-myc induces increased FasL renal epithelial expression *in vivo*

Demonstration of linearity of PCR amplification for FasL (A) and Fas (C). Total normal kidney cDNA (0.063 to 1 μ l) aliquots were amplified using specific primers for FasL or Fas and S16 as internal control (A and C). These reactions were semi-quantitatively evaluated on a polyacrylamide gel scanned with a phosphoimager and values were plotted on a linear graph.

RT-PCR analysis of the expression of FasL (B) and Fas (D). RNA samples were obtained from kidney tissues of two control (CBA X C57BL/6)F1 mice and two SBM mice. RNA of the S16 ribosomal protein served as internal control. Testis and liver served as positive tissue controls for FasL and Fas expression respectively. Semi-quantitative evaluation was carried out with 0.1 μ l RT aliquots of each sample for the FasL and control reaction and 0.25 μ l RT aliquots of each sample for the Fas and control reaction. FasL expression was greater in SBM than control kidneys, whereas Fas expression was similar in both groups.

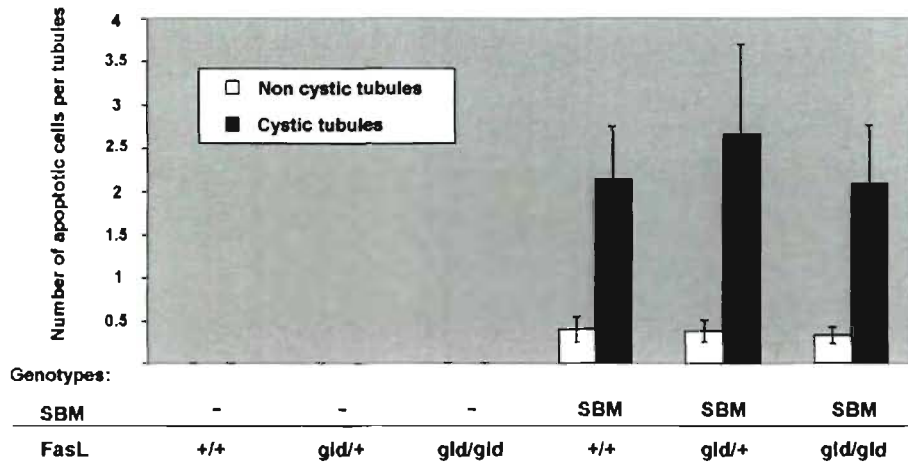
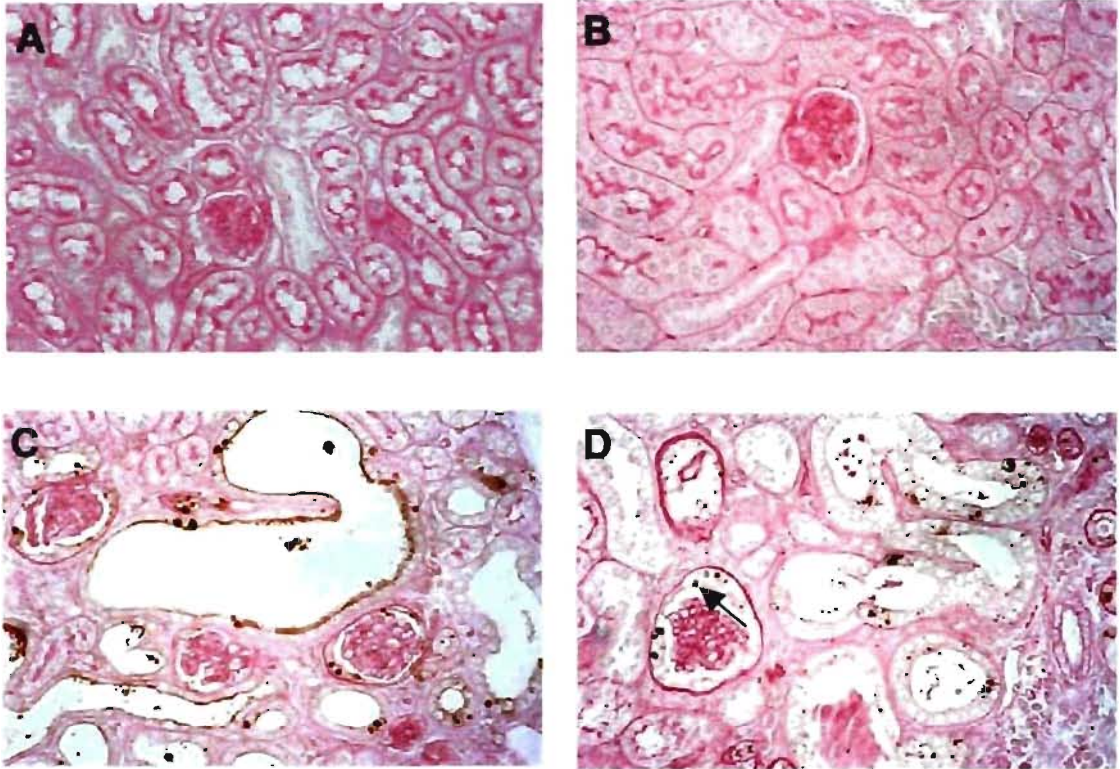


Figure 2: c-myc-induced apoptosis is independent of FasL/Fas interaction

No apoptotic cells were detected in renal tissue sections from adult wild type mice (FasL^{+/+}) (A) and gld homozygote mice (FasL^{gld/gld}) (B). However, apoptotic cells were detectable in cystic and non-cystic tubular cells from FasL^{+/+}SBM (C) and FasL^{gld/gld}SBM (D) mice. Apoptotic bodies can also be detected in the parietal epithelium lining the Bowman's capsule of the glomerulus (arrow) and shed into the cyst lumen. Epithelial hyperplasia was also evident in some cysts (D).

In the histogram, the mean number of apoptotic cells per tubule is indicated for non-cystic (white bars) and cystic tubules (black bars). No apoptotic cells were detected in genotypes lacking SBM. Irrespective of FasL genotype, no significant difference in the number of apoptotic cells was identified in the three SBM genotypes. There was a 4- to 5-fold higher apoptotic index in cystic versus non-cystic tubules.

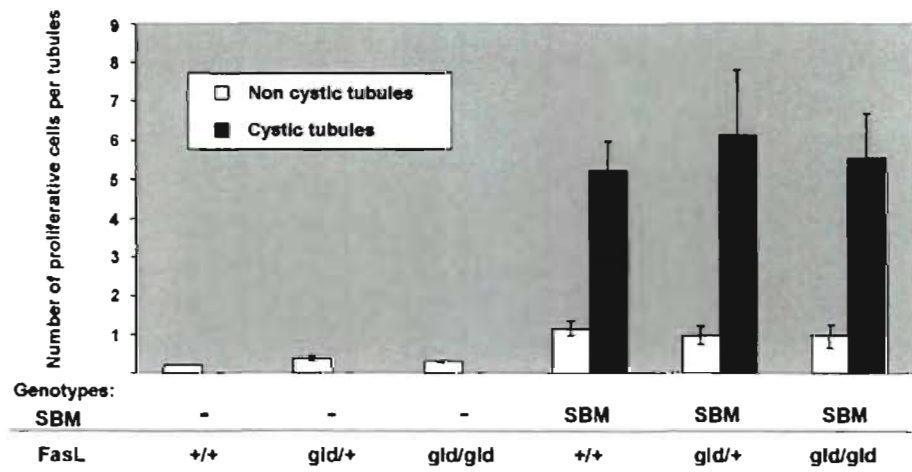
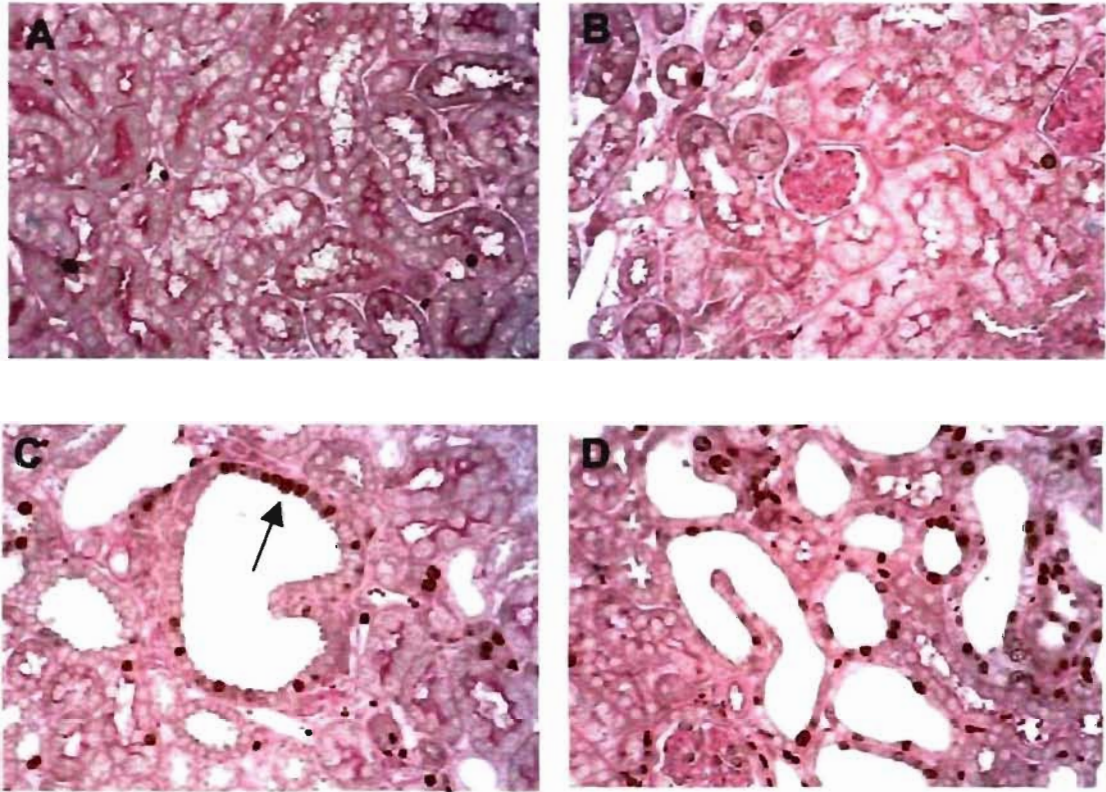


Figure 3: Inactivation of FasL does not modulate proliferation of c-myc in epithelial cells

Immunostaining for proliferation marker Ki67 reveals rare cell cycle-engaged cells in: wild type (FasL^{+/+}) (A) and FasL^{gld/gld} (B) kidneys. By contrast, high proliferation levels were observed in FasL^{+/+}SBM (C) and FasL^{gld/gld} SBM (D) kidneys. Proliferation was greater in cystic than non-cystic epithelium (C and D), often occurring in clusters of neighboring cells (arrow).

In the histogram, the mean number of Ki-67 positive cells per tubule is indicated for non-cystic (white bars) and cystic tubules (black bars) for each genotype. Low proliferative index was detected in non-cystic tubules of the three genotypes lacking SBM. Proliferation rates were much (2.4- to 29-fold) higher in the three genotypes expressing SBM, regardless of the FasL genotype. Five to six-fold increased proliferative index was observed in cystic versus non-cystic tubules.

II.2 C-MYC AS A KIDNEY DEVELOPMENTAL REGULATOR

Martin Couillard and Marie Trudel*

Institut de recherches cliniques de Montreal, Molecular Genetics and Development, Faculte de medecine de l'Universite de Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Running title: Renal hypoplasia upon c-myc ablation

Keywords: c-Myc; development; kidney; proliferation; mice

* Correspondence:

Marie Trudel, Ph.D.

Institut de recherches cliniques de Montreal

110 avenue des Pins Ouest

Montreal, Quebec, Canada

H2W 1R7

████████████████████
████████████████████
██

ABSTRACT

The role of *c-myc* transcription factor has been studied in gene regulation and oncogenesis but remains elusive in development. To determine the *c-myc* function during kidney development, organogenesis and homeostasis, conditional loss of *c-myc* was induced at two distinct phases of nephrogenesis, e11.5 and e17.5. Deletion of *c-myc*, specifically in the early metanephric mesenchyme (e11.5), led to decrease kidney size from e15.5 till adulthood, with significantly less developing glomeruli yet with normal renal architecture/structure specification. This phenotype reproduced the pathologic condition of renal hypoplasia, due to a reduction in proliferation rather than an increase in apoptosis during the late ureteric bud branching stage. However, loss of *c-myc* in late nephrogenesis from e17.5 onwards had no impact on kidney organogenesis or homeostasis. Together, this study first established that renal homeostasis is *c-myc* independent and, second, identified *c-myc* as an essential regulator in a critical developmental stage of late nephrogenesis.

INTRODUCTION

The proto-oncogene *c-myc* is a member of the *myc* gene family that includes *N-* and *L-myc*, all of which are basic region/helix-loop-helix/leucine zipper transcription factors. Several studies have shown a role of the *myc* proteins in cell proliferation, growth, apoptosis and differentiation. All of these cellular functions are ongoing during organogenesis and consistent with expression and involvement of one or more *myc* family members. Expression of *myc* becomes frequently decreased to undetectable following development and cell differentiation. However, misexpression of *myc* proteins have been associated with different forms of human cancer ranging from lymphomas to solid tumours as well as in genetic diseases such as polycystic kidney disease.¹⁻⁴

Renal organogenesis represents a model system to study the intricate role of *myc* family members in cellular mechanisms. Formation of the metanephros, the definitive kidney, begins at e10.5 in mice. This process involves mutual cellular inductive interactions between metanephric mesenchyme and ureteric bud.⁵ In development, two distinct phases of ureteric bud branching induced by the metanephric mesenchyme occur.⁶ The first phase consists of intense ureteric bud branching with short and uniform branch elongation until e15.5. Subsequently, the second phase is characterized by less ureteric bud branching but these last branching stages undergo important growth and elongation of ureteric bud interbranch segments.

The *myc* family members have distinct cellular pattern of expression in renal development. Expression of *c-myc* is present early in the uninduced metanephric mesenchyme and is downregulated later upon tubular maturation.^{3, 7-9} In contrast to *c-myc*, *N-myc* expression is even more transient with high levels during mesenchyme induction and is undetectable once the transition to epithelium is completed, whereas *L-myc* expression is confined to epithelium of the ureteric bud derivatives.⁷

Insights on the role of *L-* and *N-myc* genes in kidney were provided by gene targeting studies. While mice with targeted disruption of *L-myc* gene were viable and had no renal histological anomalies,¹⁰ an hypomorphic *N-myc* allele revealed hypoplastic kidneys at e13.5 with normal developing structures.¹¹ By contrast, analysis of *c-myc* function was precluded in renal development as well as in adult renal homeostasis because germline *c-myc* inactivation lead to small and developmentally retarded embryos, with fetal demise at e10.¹²

To determine the role of *c-myc* in early renal development and mature kidneys, *c-myc* expression was specifically suppressed in early metanephric mesenchyme at e11.5 or in late nephrogenic stage at e17.5. This study provides the first evidence that *c-myc* is an essential contributor to renal organogenesis at a crucial developmental phase of the ureteric branching stage.

RESULTS

Conditional ablation of *c-myc* during renal development

To investigate the role of *c-myc* in the kidney at early developmental and later maturation stages, we performed conditional inactivation of *c-myc* in mice carrying *c-myc*^{fl/fl} alleles¹³ using two *Cre* expressing mice with distinct renal specific temporal and spatial activities. The *Bmp7*^{cre/+} mice served to first target a loss of *c-myc* in early metanephric mesenchyme at ~e11.5 when endogenous *c-myc* expression is elevated.¹⁴ Second, *c-myc* was ablated at late stage of tubulogenesis with *KspCre* transgenic mice that target renal epithelium-mesenchyme at ~e17.5 where *c-myc* is expressed.¹⁵

The efficiency of *c-myc* gene deletion for both matings was quantified by genomic analysis of the *c-myc* locus. The band intensity of *c-myc* null allele relative to the floxed allele defined the level of *Cre*-recombination in adult kidney tissues at 68 ± 11% for *Bmp7*^{cre/+}; *c-myc*^{fl/fl} and 21 ± 6% for *KspCre*; *c-myc*^{fl/fl} mice (Figure 1A and S1). As anticipated from *Bmp7* expression studies, the *Bmp7*^{cre/+} gene was not kidney-specific, since recombination in *Bmp7*^{cre/+}; *c-myc*^{fl/fl} mice, was detected in tail DNA (Figure 1A). Noticeably, *c-myc* recombination in *Bmp7*^{+/+}; *c-myc*^{fl/fl} progenies from *Bmp7*^{cre/+}; *c-myc*^{fl/+} mated to *c-myc*^{fl/fl} mice occurred in tail, kidney (Figure 1A) and other tissues (data not shown), suggesting germinal transmission of a *c-myc*-null allele. Consequently, *Bmp7*^{+/+}; *c-myc*^{fl/+} progenies served as negative control. In contrast, *Cre* recombination appeared kidney specific in *KspCre*; *c-myc*^{fl/fl} mice, as inferred from the *c-myc*-null allele detected exclusively in kidney DNA (Figure S1).

c-myc inactivation in renal mesenchyme: premature death and growth delay

Mice from both conditional inactivation of *c-myc* bypassed the embryonic lethality of *c-myc*^{-/-}. At 4-weeks, the frequency of *KspCre*; *c-myc*^{fl/fl} mice was normal with a mendelian

transmission of 28% (expected 25%; n=99). By contrast, a major deficit was determined in the frequency of *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* mice (8%; n=73). These mice median lifespan was 14 days postnatally as evaluated by Kaplan-Meier curve (Figure 1B).

The few *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* mice that survived until adulthood showed ~2-fold decrease in total body mass compared to controls. Longitudinal studies (18 litters; n=123) initiated at birth till 8 weeks showed that the proportion of reduced body mass persisted throughout (Figure 1C and S2), indicating that early loss of *c-myc* during development has long-term consequences on growth. Interestingly, mice that survive into adulthood strive normally, indicating that *c-myc* function may not be as critical at later ages. In comparison to the *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}*, the *KspCre; c-myc^{fl/fl}* mice appeared healthy with normal body-weight (data not shown).

***Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* renal hypoplasia contrasts with *KspCre; c-myc^{fl/fl}* normal kidneys**

Loss of *c-myc* expression was monitored in embryonic and adult kidneys. No significant difference in the adult kidney-to-body-weight ratio of *KspCre; c-myc^{fl/fl}* mice compared to controls was detected (Table 1). However, despite reduced body mass of the adult *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* mice, the ratio of kidney-to-body-weight of *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* mice at 2 months was further reduced by 20% (Table 1). This significant decrease was kidney-specific since the ratio of other organs to body-weight was normal (data not shown).

Because *c-myc* inactivation was targeted in *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* embryos, the kidney weight was investigated at three stages: e15.5, e16.5 and e18.5. These embryos were transmitted at normal genetic frequency, and the body mass of *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* embryos at e15.5 were similar to controls whereas at e16.5 and e18.5 were significantly smaller (data not shown). The kidney-to-body-weight ratio was significantly reduced in e16.5 and e18.5 *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* embryos at levels comparable to those in adult mice (Table 1). At e15.5, the ratio of kidney-to-body-weight was not significantly affected but showed a

tendency toward decrease in size, suggesting that *c-myc* expression is necessary at the e15.5 stage.

Analysis of adult *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* and *KspCre; c-myc^{fl/fl}* kidney sections showed a normal renal architecture (Figure 2A-B; data not shown), indicating that both *c-myc* ablation did not give rise to renal dysplasia. Renal histology of the *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* was monitored in fetus. At e15.5, the entire renal section and cortical area were comparable to controls (Table 1). By e16.5 the renal section was significantly decreased relative to controls and correlated with the kidney-to-body-weight ratio (Table 1). Noticeably, the cortex area at e16.5 and e18.5 of the *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* was even further reduced in size (Table 1). In *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* sections, all typical renal developmental features of mesenchymal to epithelium transition were observed ranging from comma- and S-shaped bodies to mature glomeruli formation and displayed normal nephron organization along the corticomedullary axis (Figure 2C-D). To determine whether the *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* hypoplastic kidneys resulted from reduction in nephron formation due to less ureteric bud branching, the number of nephrons was evaluated by quantification of glomeruli in kidney cross-sections. While a significant decrease of glomeruli (36%) in e16.5 *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* embryos compared to controls (Table 1), it corresponded to decrease cortical area. In fact, the number of glomeruli per cortex area was equivalent in mutant kidneys as in controls (Table 1), suggesting that the late generations of ureteric branching have been compromised by *c-myc* ablation.

We investigated whether the hypoplasia was intrinsic to cell proliferation and/or death. Importantly, quantification of actively dividing cells by the nuclear antigen Ki67 showed major reduction in proliferation by 26% for the e18.5 mutant kidneys compared to controls (Table 2), consistent with the decreased cortex area and kidney-to-body-weight (Table 1). In contrast, the apoptosis level in the *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* by TUNEL assay was not significantly different from controls (Table 2), suggesting that *c-myc* induced cell proliferation is a major determinant in late renal development.

DISCUSSION

Although expression of *c-myc* was shown in developing kidneys, the early embryonic lethality in null mice precluded analysis of *c-myc* function in the kidneys. This study characterized the role of *c-myc* in mouse renal organogenesis, development and homeostasis from e11.5 till adulthood. *c-myc* disruption in metanephric mesenchyme revealed that *c-myc* plays a crucial role in kidney development during late branching stage. Significantly, this phenotype results from impeded *c-myc* proliferation rather than apoptosis and leads to renal hypoplasia in adult mice. Importantly, this *c-myc* essential function appeared restricted to a particular developmental window as no anomaly was detected in renal *c-myc* ablated expression from e17.5 onwards.

Mice ablated for *c-myc* with *Bmp7^{cre/+}* in contrast with *KspCre* displayed pronounced growth retardation at e16.5, reminiscent of the phenotype in null *c-myc* and *N-myc* at e9.5/10.5 and in hypomorphic *c-myc* at e16.5.^{12, 16, 17} Such differences in onset of growth retardation indicated that a minimal *c-myc* expression is required in early development whereas higher levels become necessary at e16.5 for a proliferative burst. In addition, ablation of *c-myc* in renal uninduced mesenchyme to cellular epithelium caused a disproportionate reduction in kidney size in e16.5 fetus that persisted throughout their lifespan.

Absence of *c-myc* does not seem to affect the initial stages of renal organogenesis but interferes with normal kidney development in the *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}*. Indeed, the mesenchymal-to-epithelial conversion potential proceeds appropriately from comma-shaped to mature nephron and showed that the developmental cues are present. However the developing kidneys of these mice had fewer glomeruli or developing nephrons. Presumably, the frequency of ureteric bud branching morphogenesis is affected in the late stages and the kidneys failed to complete nephrogenesis. This significant reduction in kidney size with normal cellular commitment, patterning and architecture specification, reproduces the pathologic condition of renal hypoplasia. This condition resulted mainly

from reduced cellular proliferation in the cortex since the apoptotic rate was unaffected. Such cellular responses in renal development by ablation of *c-myc* supported the observation in hematopoietic, fibroblastic and intestinal cells of slower cell cycle without altering apoptosis regulation.^{13, 18} Strikingly, the decreased proliferation occurred when the distance and growth between the ureteric branch points increase dramatically, as schematized in the renal developmental model of Figure 3. These results implied that *c-myc* plays a central role within the final ureteric bud branching.

One interpretation of our findings is that *c-myc* expression could be required for expansion of the uninduced mesenchymal cell population of the kidneys by promoting cell proliferation. In this case, the tubular branching defect resulting from absence of *c-myc* expression could be attributed to reduced renal precursor cell population. Alternatively, the loss of *c-myc* expression altered only the final ureteric branching stages, correlating with *c-myc* higher potential for growth and proliferation relative to *N-myc*.¹⁹ Although both hypotheses are possible, the former would be expected to develop an earlier phenotype based on the *N-myc* hypoplastic kidneys at e13.5¹¹ whereas our data seem to favor the latter because both the reduced proliferation and size of the kidney occur together in late nephrogenesis.

The decrease in ureteric bud branching is likely a secondary phenomenon since *c-myc* is not normally expressed in the ureteric bud epithelium.⁷ How lack of *c-myc* causes a decrease in kidney proliferation is not clear. One possibility would be that the decreased *c-myc* protein leads to slower cell cycle via targeting key mediators (p27, cyclin D1-E). Another possibility would be that *c-myc* regulates expression of growth factors important in kidney maturation (Bmp2, Fgf7). Conversely, growth and signaling factors as Bmp7, Wnt4, Pax2, Shh expressed within the spatio-temporal developmental window of *c-myc* renal hypoplasia, may induce *c-myc* proliferative function. These possibilities are not exclusive and in fact, more than one factor is likely to modulate or be modulated by *c-myc* cumulatively or successively. The ablation of *c-myc* in the renal mesenchyme appears to

have both paracrine and autocrine consequences as the ureteric bud and metanephric mesenchyme are affected. Our finding cannot definitively distinguish whether the phenotype results from a direct role of *c-myc* in regulating mesenchymal epithelium cells or is secondary to a defect in signaling to the ureteric bud emanating from renal mesenchyme.

The divergent phenotype of *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* and *KspCre; c-myc^{fl/fl}* relates to the *Cre* activation. Indeed, *c-myc* ablation with the *Bmp7^{cre/+}* occurs at e11.5 but the phenotype was detected only at and beyond e15.5 in most cells whereas *c-myc* ablation with *KspCre* just at a slightly later stage of e17.5 in mesenchymal-epithelial cells had no impact. Because no phenotype was detected in *KspCre; c-myc^{fl/fl}* and that the *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* phenotype from e16.5 onwards did not progress further, it suggests that *c-myc* is essential only in a critical developmental window restricted within e15-16.5 (Figure 3). Together these experiments provide compelling evidence that renal homeostasis can occur in a *c-myc*-independent manner. Interestingly, the absence of renal phenotype in *KspCre; c-myc^{fl/fl}* mice has set the basis to address the relevance of abnormal *c-myc* expression in adult pathological conditions such as polycystic kidney disease and renal cell carcinomas.²

In summary, this study shows that early *c-myc* deletion induces renal hypoplasia while late *c-myc* suppression from e17.5 onwards has no effect on kidney homeostasis. Our results identified *c-myc* as an essential modulator of mammalian kidney development by controlling cell proliferation in a critical window of final ureteric branching.

MATERIALS & METHODS

Transgenic mice

Characterization of *KspCre*, *Bmp7^{cre/+}* and *c-myc^{fl/fl}* mice (provided by Drs P. Igarashi, L. Oxburgh and F. Alt) have been described.¹³⁻¹⁵ The mating scheme to generate double transgenic mice (*KspCre; c-myc^{fl/fl}*) was F1 generation from *KspCre* crossed with *c-myc^{fl/fl}* mice and F2 generation from *KspCre; c-myc^{fl/+}* (F1) crossed with *c-myc^{fl/fl}* mice. A similar mating scheme was carried out for *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* mice.

Genomic analysis

KspCre and *Bmp7^{cre/+}* transgenes were detected by PCR on tail DNA.¹⁵ *c-myc^{fllox}* transgene was detected by Southern following EcoRI digestion.¹³ The intensity of bands for the *c-myc^{fllox}* (10kB), endogenous *c-myc^{+/+}* (20kB) and null *c-myc^{-/-}* (16kB) was quantified by Image Quant 5.0.

Histologic analysis

Embryonic and adult kidney tissues were fixed in 4% paraformaldehyde, paraffin-embedded and stained hematoxylin/eosin. The number of glomeruli per mm² was evaluated for the *KspCre; c-myc^{fllox}* mice by 20 non-overlapping cortical areas per mice and for *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fllox}* mice by quantifying the entire saggital sectional area of both kidneys.

Proliferation and TUNEL assays

Proliferative cells were quantified from immunohistochemistry against Ki67 (Novocastra, UK) and TUNEL assay was performed with 0.2U/ μ l of TdT enzyme and 1mM dUTP-biotin (Roche, QC) as described.²⁰ The proliferative and apoptotic indexes were quantified from the number of positive cells per mm², using Northern Eclipse v7.0 software.

Statistical analysis

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

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are very grateful to Drs L. Oxburgh, P. Igarashi and F. Alt for providing mice. This work was supported by the Canadian Institute of Health Research (CIHR) grant to MT and a studentship from the CIHR and Fonds de la Recherche en Santé du Québec to MC.

REFERENCES

1. Lanoix, J, D'Agati, V, Szabolcs, M & Trudel, M: Dysregulation of cellular proliferation and apoptosis mediates human autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Oncogene*, 13:1153-60, 1996.
2. Thivierge, C, Kurbegovic, A, Couillard, M, Guillaume, R, Cote, O & Trudel, M: Overexpression of PKD1 causes polycystic kidney disease. *Mol. Cell Biol.*, 26:1538-1548, 2006.
3. Zimmerman, KA, Yancopoulos, GD, Collum, RG, Smith, RK, Kohl, NE, Denis, KA, Nau, MM, Witte, ON, Toran-Allerand, D & Gee, CE: Differential expression of myc family genes during murine development. *Nature*, 319:780-783, 1986.
4. Pelengaris, S & Khan, M: The many faces of c-MYC. *Arch. Biochem. Biophys.*, 416:129-136, 2003.
5. Saxen, L: *Organogenesis of the kidney*, Cambridge Cambridgeshire, Cambridge University Press 1987.
6. Cebrian, C, Borodo, K, Charles, N & Herzlinger, DA: Morphometric index of the developing murine kidney. *Dev Dyn*, 231:601-8, 2004.
7. Mugrauer, G & Ekblom, P: Contrasting expression patterns of three members of the myc family of protooncogenes in the developing and adult mouse kidney. *J. Cell Biol.*, 112:13-25, 1991.
8. Schmid, P, Schulz, WA & Hameister, H: Dynamic expression pattern of the myc protooncogene in midgestation mouse embryos. *Science*, 243:226-229, 1989.

9. Semsei, I, Ma, SY & Cutler, RG: Tissue and age specific expression of the myc proto-oncogene family throughout the life span of the C57BL/6J mouse strain. *Oncogene*, 4:465-471, 1989.
10. Hatton, KS, Mahon, K, Chin, L, Chiu, FC, Lee, HW, Peng, D, Morgenbesser, SD, Horner, J & DePinho, RA: Expression and activity of L-Myc in normal mouse development. *Mol. Cell Biol.*, 16:1794-1804, 1996.
11. Bates, CM, Kharzai, S, Erwin, T, Rossant, J & Parada, LF: Role of N-myc in the developing mouse kidney. *Dev. Biol.*, 222:317-325, 2000.
12. Davis, AC, Wims, M, Spotts, GD, Hann, SR & Bradley, A: A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev.*, 7:671-682, 1993.
13. de Alboran, IM, O'Hagan, RC, Gartner, F, Malynn, B, Davidson, L, Rickert, R, Rajewsky, K, DePinho, RA & Alt, FW: Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. *Immunity*, 14:45-55, 2001.
14. Oxburgh, L, Chu, GC, Michael, SK & Robertson, EJ: TGFbeta superfamily signals are required for morphogenesis of the kidney mesenchyme progenitor population. *Development*, 131:4593-4605, 2004.
15. Shao, X, Somlo, S & Igarashi, P: Epithelial-specific Cre/lox recombination in the developing kidney and genitourinary tract. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 13:1837-1846, 2002.

16. Trumpp, A, Refaeli, Y, Oskarsson, T, Gasser, S, Murphy, M, Martin, GR & Bishop, JM: c-Myc regulates mammalian body size by controlling cell number but not cell size. *Nature*, 414:768-773, 2001.
17. Charron, J, Malynn, BA, Fisher, P, Stewart, V, Jeannotte, L, Goff, SP, Robertson, EJ & Alt, FW: Embryonic lethality in mice homozygous for a targeted disruption of the N-myc gene. *Genes Dev.*, 6:2248-2257, 1992.
18. Muncan, V, Sansom, OJ, Tertoolen, L, Pheesse, TJ, Begthel, H, Sancho, E, Cole, AM, Gregorieff, A, de Alboran, IM, Clevers, H, et al.: Rapid loss of intestinal crypts upon conditional deletion of the Wnt/Tcf-4 target gene c-Myc. *Mol Cell Biol*, 26:8418-26, 2006.
19. Malynn, BA, de Alboran, IM, O'Hagan, RC, Bronson, R, Davidson, L, DePinho, RA & Alt, FW: N-myc can functionally replace c-myc in murine development, cellular growth, and differentiation. *Genes Dev.*, 14:1390-1399, 2000.
20. 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.

Table 1**c-Myc impact on kidney morphology and nephrogenesis**

Mice	Age	n	Kw/Bw (%)	n	Total area (mm²)	Cortical area (mm²)	Glomeruli (No)	Glomeruli/cortical area (No/mm²)
<i>Bmp7</i> ^{+/+} ; <i>c-myc</i> ^{fl/+}	e15.5	7	0.58 ±0.12	5	1.03 ±0.26	0.57 ±0.20	9.8 ±1.8	16.8 ±2.7
<i>Bmp7</i> ^{cre/+} ; <i>c-myc</i> ^{fl/fl}	e15.5	10	0.50 ±0.10	7	0.96 ±0.28	0.53 ±0.18	8.8 ±1.6	16.6 ±2.6
<i>Bmp7</i> ^{+/+} ; <i>c-myc</i> ^{fl/+}	e16.5	7	0.70 ±0.10	5	1.61 ±0.14	1.13 ±0.06	19.1 ±2.2	16.9 ±1.7
<i>Bmp7</i> ^{cre/+} ; <i>c-myc</i> ^{fl/fl}	e16.5	7	0.56 ±0.13^a	6	1.20 ±0.14^d	0.76 ±0.07^d	12.3 ±1.7^d	16.2 ±1.9
<i>Bmp7</i> ^{+/+} ; <i>c-myc</i> ^{fl/+}	e18.5	7	0.90 ±0.09	4	3.74 ±0.60	2.71 ±0.34	42.3 ±5.4	15.6 ±1.4
<i>Bmp7</i> ^{cre/+} ; <i>c-myc</i> ^{fl/fl}	e18.5	9	0.69 ±0.12^b	5	2.82 ±0.50^a	1.70 ±0.14^d	26.2 ±5.9^d	15.4 ±3.1
<i>Bmp7</i> ^{+/+} ; <i>c-myc</i> ^{fl/+}	adult	13	1.24 ±0.15	6	nd	nd	nd	10.8 ±1.3
<i>Bmp7</i> ^{cre/+} ; <i>c-myc</i> ^{fl/fl}	adult	9	0.99 ±0.11^c	3	nd	nd	nd	10.2 ±1.3
<i>c-myc</i> ^{fl/+}	adult	7	1.32 ±0.14	5	nd	nd	nd	10.4 ±1.5
<i>KspCre</i> ; <i>c-myc</i> ^{fl/fl}	adult	7	1.35 ±0.12	5	nd	nd	nd	10.2 ±1.1

Kw/Bw: kidney to body weight ratio. Adult: 2-6 months; nd: not determined. Values are mean ± standard deviation.

^a $P \leq 0.05$; ^b $P \leq 0.01$; ^c $P \leq 0.001$; ^d $P \leq 0.0001$

Table 2***Bmp7*^{Cre/+}; *c-myc*^{fl/fl} renal hypoplasia caused by abrogated proliferation**

Mice	Age	n	Proliferative index (cells/cortical mm²)	n	Apoptotic index (cells/cortical mm²)
<i>Bmp7</i> ^{+/+} ; <i>c-myc</i> ^{fl/+}	e18.5	7	1135 ±153	4	129 ±30
<i>Bmp7</i> ^{Cre/+} ; <i>c-myc</i> ^{fl/fl}	e18.5	9	841 ±131^a	6	100 ±27

Values are mean ± standard deviation. *t* test sample. ^a *P* ≤ 0.05

FIGURES

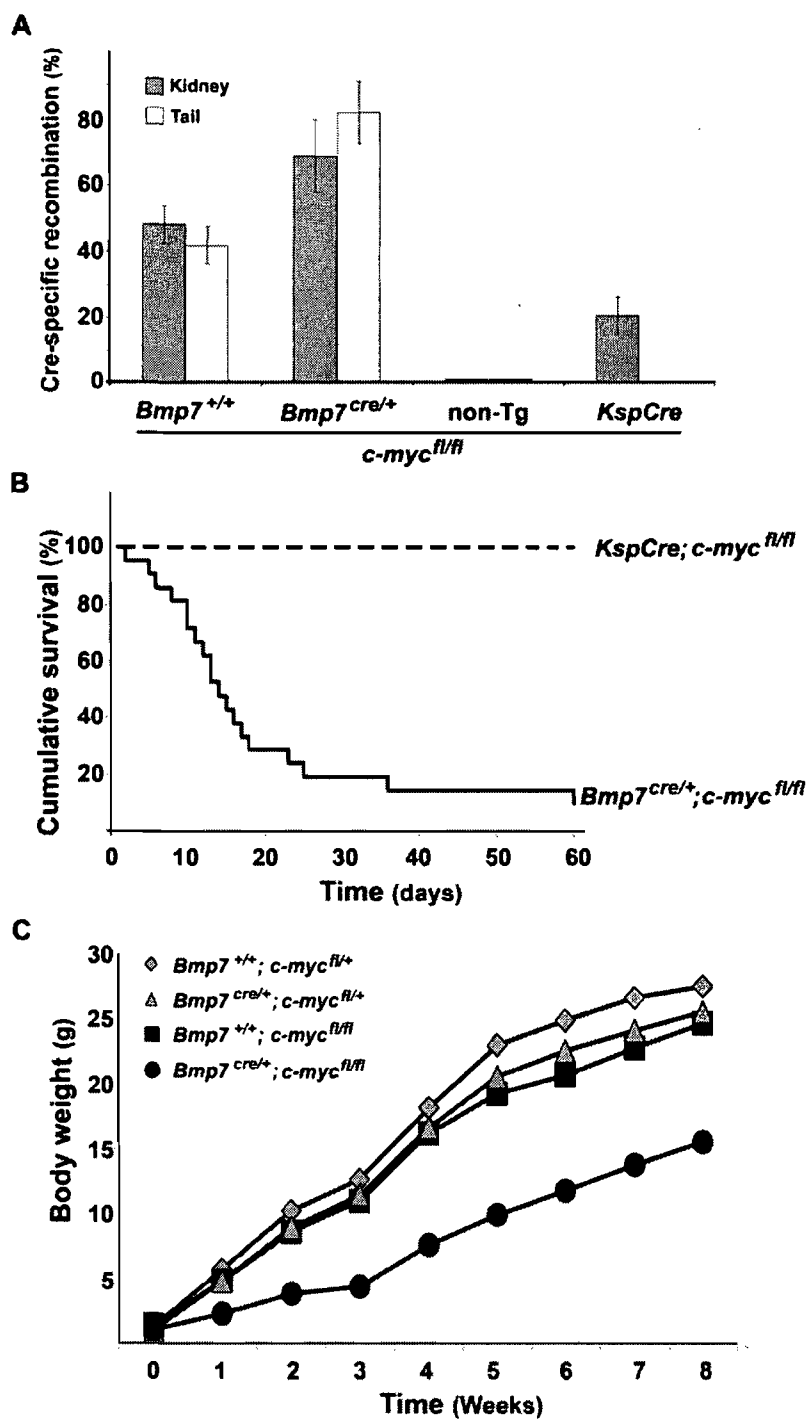


Figure 1. Influence of *c-myc* locus recombination on growth and lifespan with *Bmp7^{cre/+}* but not with *KspCre*

(A) Genomic analysis of the *c-myc^{flox}* locus from adult kidneys was performed to quantify the *Cre*-specific recombination levels in tail and kidney DNA, by the relative intensity of the null band to total bands (null and flox). Levels of *c-myc* recombination for *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{f/f}* mice in kidneys (n=9) and tail (n=26) was elevated whereas for *KspCre; c-myc^{f/f}* in kidneys (n=10) and in tail (n=20) was moderate and undetectable, respectively. Evidence of germline transmission of *c-myc* null allele in *Bmp7^{+/+}; c-myc^{f/f}* mice was obtained with recombination in kidney (n=10) and tail (n=24). non-Tg: non transgenic. (B) Kaplan Meier curve showed survival of *KspCre; c-myc^{f/f}* mice (n=28) compared to 14 days (median) *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{f/f}* mice (n=21). (C) Longitudinal analysis of body mass defined a reduction of ~2-fold in *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{flox}* mice compared to control progenies (n≥5 for each genotype of different ages).

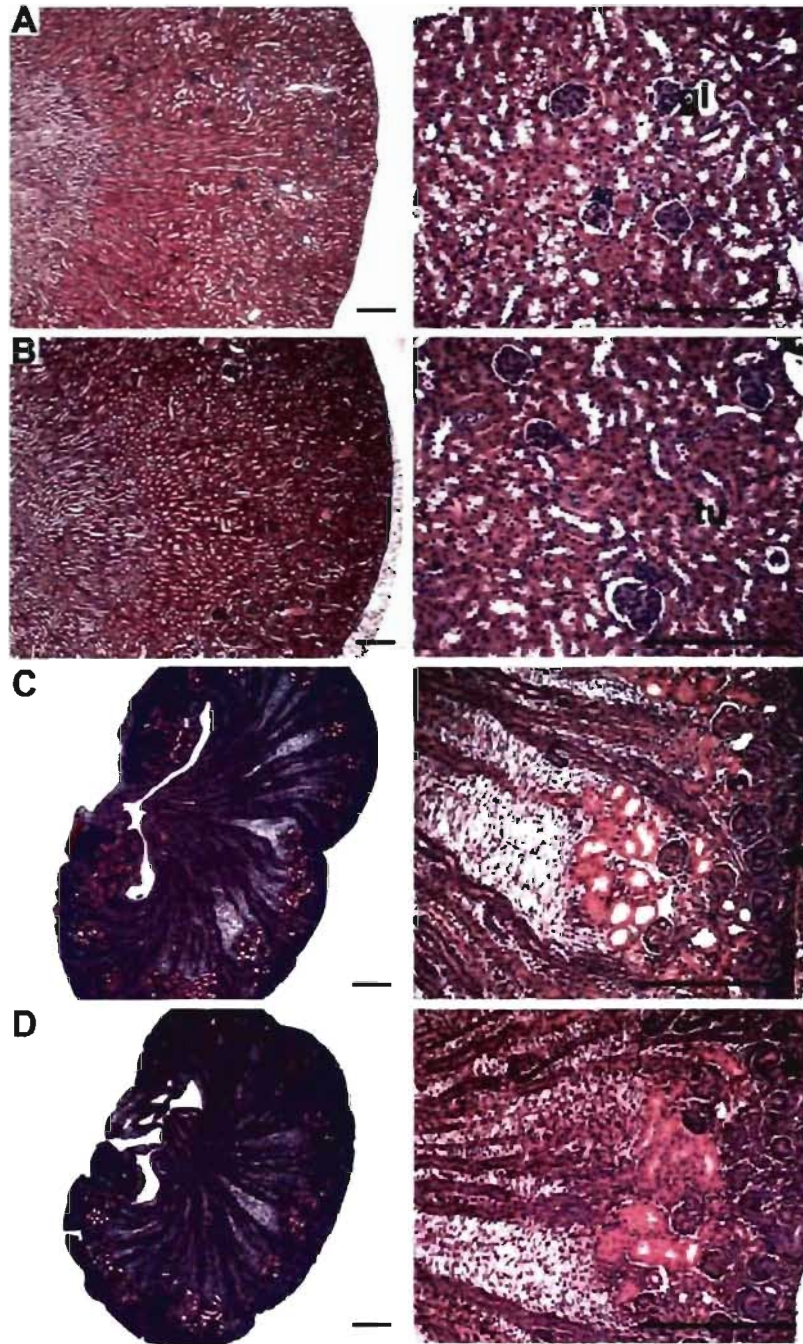


Figure 2. Normal renal architecture upon conditional ablation of *c-myc*

No difference in renal size or histology at 6 months was detectable from *c-myc*^{f/f} mice (A) and *KspCre; c-myc*^{f/f} mice (B). Overview of e18.5 renal sections from *Bmp7*^{+/+}; *c-myc*^{f/+} embryos (C) and *Bmp7*^{cre/+}; *c-myc*^{f/f} embryos (D). Normal histology was observed in *Bmp7*^{cre/+}; *c-myc*^{f/f} embryos, but total kidney and cortical areas were reduced compared to *Bmp7*^{+/+}; *c-myc*^{f/+} embryos. gl, glomeruli; tu, tubules; arrowhead, S-shaped body; *, comma-shaped body; Scale bar: 250µm.

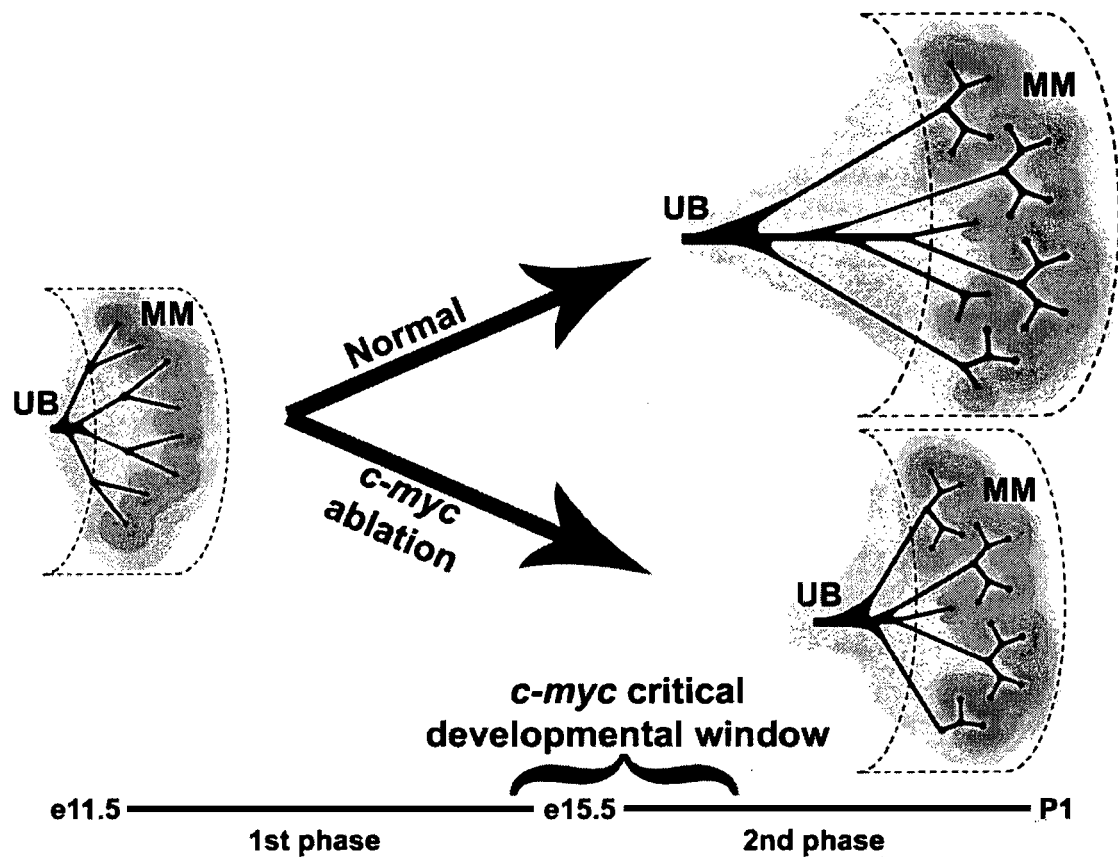


Figure 3

Schematic diagram of renal development depicts the first phase (e11.5 to e15.5) of uniform interbranch lengths of the ureteric bud tree (dashed line) and the second phase (e15.5 to P1) of increase interbranch segments with less ureteric bud branching. *c-myc* play a crucial role in growth of ureteric bud branching and elongation of interbranch segments at a particular developmental phase (e15-16.5). MM, metanephric mesenchyme, UB, ureteric bud.

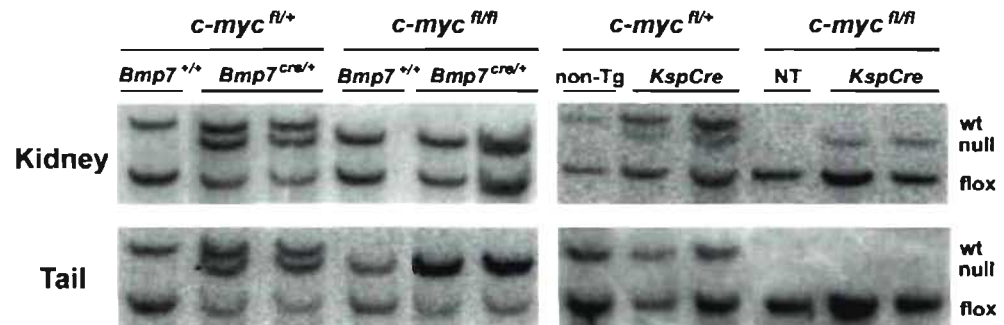


Figure S1

Genomic analysis of the *c-myc*^{fl^{ox}} locus from adult kidneys (lower gel) compared to tail as extrarenal tissue control (upper gel) obtained from *Bmp7*^{cre/+}; *c-myc*^{fl/fl} and *KspCre*; *c-myc*^{fl/fl} mice. *Bmp7*^{cre/+}; *c-myc*^{fl/fl} mice displayed *c-myc* null allele in kidney and tail, whereas *KspCre*; *c-myc*^{fl/fl} mice was kidney specific.

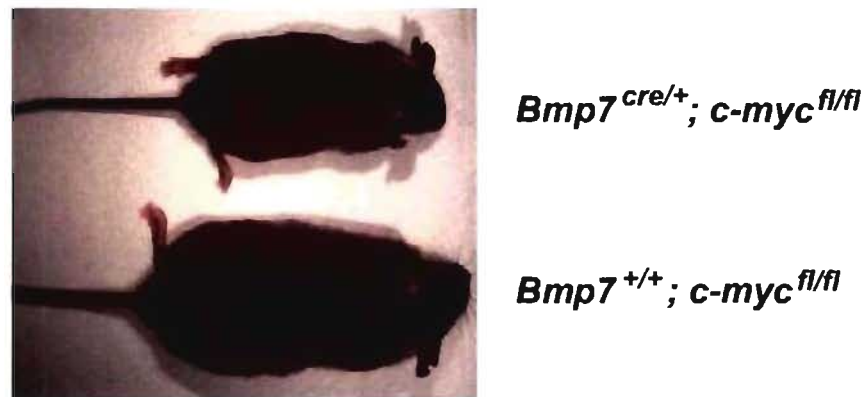


Figure S2

Smaller body size of *Bmp7*^{cre/+}; *c-myc*^{fl/fl} mice compared to *Bmp7*^{+/+}; *c-myc*^{fl/fl} mice at 2 months of age.

II.3 CYSTOGENESIS INDUCED BY PKD1 OVEXPRESSION STIMULATES β -CATENIN/C-MYC PATHWAY

Martin Couillard and Marie Trudel

Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Key words: Pkd1, c-myc, β -catenin, polycystic kidney disease, conditional knockout mice

Correspondence:

M. Trudel,

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

ABSTRACT

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is characterized by the development of renal cysts, which is accompanied by destruction of the renal parenchyma, interstitial fibrosis and loss of functional nephrons. Cellular processes anomalies, such as high proliferative and apoptotic rate, were etiologically linked to cystogenesis. In the vast majority of cases, ADPKD is caused by mutation in *PKD1* gene, which encodes Polycystin-1 (PC-1) transmembrane protein with unknown function. To understand its role in cystogenesis, we analyzed cellular and molecular change in kidneys of SBPkd1_{TAG} mouse, a *Pkd1* gain-of-function mouse model. High rate of cellular proliferation, apoptosis and fibrogenesis were observed, which were associated to an increase of β -catenin and *c-myc* expression. Transcriptional activity of β -catenin in renal cysts was detected in double SBPkd1_{TAG}; *Tcf/Lef-LacZ* (Wnt reporter line) transgenic mice. Moreover, nuclear colocalisation of β -catenin and *c-myc* were observed in cystic epithelium, suggesting that both proteins share common or additive role in cystogenesis induced by *Pkd1* overexpression. To further address the requirement of *c-myc* expression in cystogenesis, conditional inactivation of *c-myc* was generated in renal epithelium of SBPkd1_{TAG} mice. Partial removal of *c-myc* expression decreased cyst formation that is coupled to reduction of cellular proliferation, apoptosis and fibrosis. Taken together, our results indicate that β -catenin and *c-myc* are important mediators of cystogenesis in *Pkd1* signaling pathway.

INTRODUCTION

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is one of the most common monogenic diseases, with an incidence of 1:400 to 1:1000 in the general population ¹. ADPKD is characterized by progressive bilateral renal enlargement with numerous cysts and fibrosis in the renal parenchyma, while other organs can also develop cysts such as liver and pancreas ².

ADPKD pathogenesis shows a relatively slow progression that typically results in end-stage renal disease in late middle age. Renal cysts originate from less than 1% of all nephrons and can arise from any part as thin-walled dilatations. ADPKD cysts are heterogeneous in size, and lined by a single layer of epithelium. This ranges in phenotype from tightly apposed columnar or cuboidal cells to loosely apposed flattened cells with no resemblance to normal tubule segments. However, similarities with renal tubular cells at an earlier stage of differentiation were noticed, suggesting that ADPKD epithelium is trapped in a less differentiated state. Cystic epithelium present defect of apicobasal polarity and cell-cell contact, which are often associated with epithelial to mesenchymal transition (EMT) ³. Another sign of dedifferentiation is the modulation of the cystic microenvironment in which ADPKD cells produce abnormal basement membrane and extracellular matrix ⁴⁻⁶. Matrix expansion and EMT are also coupled to abnormally high levels of proliferation and apoptosis in cystic as well as noncystic ADPKD tubules ⁷⁻⁹. Underlying mechanisms for these anomalies include the aberrant expression of fetal gene products, such as *c-MYC*, *PAX2* and *EGF/EGFR* ^{7,10,11}.

In the vast majority of cases, the disease is caused by mutation in the *PKD1* gene. *PKD1* expression is elevated in adult ADPKD kidneys, reflecting level of expression normally observed during embryogenesis ⁷. Furthermore, persistent or enhanced expression of polycystin-1 (PC-1, the protein encoded by *PKD1*) was detected in the majority of renal epithelial cysts ^{7,12,13}.

PC-1 is a developmentally regulated membrane protein with a very large extracytoplasmic domain suggesting a potential surface receptor function. In order to understand the PC-1 function and downstream signaling pathways, several mouse models of PC-1 gain- or loss-of-function studies have been generated. *Pkd1*-null mice die in utero and exhibit renal cysts. On the other hand, transgenic mice that overexpress PC-1 also develop polycystic kidneys^{14, 15}. Altogether, these studies suggest that ADPKD therapeutic approach modulating PC-1 expression would be difficult. The downstream signaling pathways associated with this protein may provide greater potential therapeutic targets.

First evidence of PC-1 intracellular signalization came from cell culture experiments using PC-1 construct transfections or primary ADPKD cells. PC-1 has been shown to activate heterotrimeric G-proteins¹⁶⁻¹⁸, the transcription factor AP-1 via c-Jun N-terminal kinase and PKC^{19, 20}, and to regulate cell growth by blocking the mTOR pathway²¹ as well as cell-cycle via activation of the JAK-STAT pathway²². Importantly, PC-1 also interacts with the adherens junction protein E-cadherin and its associated cytoplasmic catenins^{23, 24}. Catenins play a role in cell polarity by linking the cell-cell adhesion complex to the actin cytoskeleton²⁵. Among them, β -catenin has an additional function in the Wnt signal transduction pathway in which it acts as a transcriptional co-regulator, primarily through interactions with the Lef/Tcf family of transcription factors²⁶. The C-terminus of PC-1 itself has been shown to modulate Wnt signalling pathway via stabilization of β -catenin²⁷. Most importantly, constitutive activation of β -catenin in adult kidney results in cystic phenotype reminiscent to ADPKD²⁸. Similarly, overexpression of *c-myc*, a key transcriptional target of β -catenin, also induces severe renal cysts formation, accompanied by high levels of proliferation and apoptosis^{29, 30}. As aforementioned, high level of *c-myc* renal expression was detected in ADPKD patients, but also in all rodent models of PKD tested so far^{7, 15, 31-36}. Moreover, *c-myc* antisense oligonucleotide treatment ameliorates cystic phenotype of *cpk* mouse, a model of the recessive form of PKD (ARPKD)³⁷.

Altogether, these data suggest that the level of β -catenin and *c-myc* expression has a major impact on renal cystogenesis but their role in PC-1 signalization *in vivo* is less defined.

The present study demonstrates that the renal cystogenesis induced by the overexpression of *Pkd1* in transgenic mice is associated with high level of cellular proliferation, apoptosis and fibrosis. We detected an increase of β -catenin and *c-myc* expression associated with enhancement of β -catenin transcriptional activity in cystic epithelium. We also determined the impact of a renal epithelium-specific inactivation of *c-myc* on cellular proliferation, apoptosis and the severity of cystogenesis and fibrogenesis. Thus, blocking the PC-1-induced β -catenin/*c-myc* pathway may be an appropriate therapeutic target for ADPKD.

RESULTS

Cystogenesis induced by *Pkd1* overexpression is associated with increased cellular proliferation, apoptosis and fibrosis

Based on our recently generated SBPkd1_{TAG} mouse model with *Pkd1* kidney-specific overexpression¹⁵, we have examined cellular defects that are etiologically linked to cystogenesis. First, cellular proliferation, amplified in human ADPKD and all PKD rodent models, was analyzed by Ki67 immunohistochemistry^{7, 8}. Few proliferative cells were detected in kidney sections of adult control mice (Figure 1A), but were clearly elevated in cystic and non-cystic tubules of SBPkd1_{TAG} mice (Figures 1B). Clusters of 2-4 proliferative cells were frequently observed in cystic epithelium (Figure 1B, arrows), and proliferative signals were also seen in interstitial fibrosis tissue (Figure 1B, arrowhead). We sought to quantify the proliferation index by counting the number of tubules (normal or cystic, separately) containing at least one proliferative cell. In SBPkd1_{TAG} mice, proliferation index was increased by 2.5-fold and 5.5-fold in normal and cystic epithelium respectively, compared to controls (Table I).

A second important cellular process that has been reported to be deregulated in ADPKD is apoptosis^{7, 9}. Cell death was rarely identified by Tunel assay in kidney sections of adult control mice (Figure 1C). Similarly to cell proliferation detection in adult SBPkd1_{TAG} mice, apoptosis was 3-fold and 8-fold higher in normal and cystic epithelium, respectively (Figure 1D and Table I). Cluster of 2-4 apoptotic cells were also observed in cystic epithelium (Figure 1D, arrows), as well as signals in interstitial fibrosis tissue (Figure 1D, arrowheads).

Another cystogenesis-associated anomaly, fibrogenesis, was assessed in our model⁴. Fibrosis quantification of kidney sections was evaluated by specific collagen staining to Sirius red. Weak signal was detected in normal tubules of adult control and SBPkd1_{TAG} mice (Figure 1E, F), compared to strong staining observed underlying or in close proximity

to cysts (Figure 1F). Fibrosis was 20-fold increased in SBPkd1_{TAG} renal tissue compared to controls (Table I).

Altogether, the high levels of proliferation, apoptosis and fibrosis suggest that SBPkd1_{TAG} mouse develop renal cystogenesis resembling human ADPKD.

Table I: High rate of cellular proliferation, apoptosis and fibrogenesis in SBPkd1_{TAG} kidneys

Mice	n	<u>Proliferative index</u>		<u>Apoptotic index</u>		<u>Fibrosis</u>
		Normal tubules	Cystic tubules	Normal tubules	Cystic tubules	(%)
Control	7	5.9 ±0.7	-	3.6 ±0.6	-	1.6 ±0.9
SBPkd1 _{TAG}	7	15.3 ±2.7 ^a	33.3 ±4.7 ^a	14.0 ±1.2 ^a	30.6 ±3.8 ^a	30.7 ±6.1 ^a

-: Not applicable; Values are means ± standard deviation; *t* test sample; *P* ≤ 0.05 was considered significant.

^a *P* ≤ 10⁻⁶.

Upregulation of β -catenin and *c-myc* expression in SBPkd1_{TAG} kidney

Because β -catenin and *c-myc* are thought to induce of both proliferation and apoptosis in cystogenesis^{7,28,29}, we hypothesized that they are involved in the formation of renal cyst in SBPkd1_{TAG} mouse. To investigate this potential PC-1 signaling pathway *in vivo*, we have evaluated the level of expression of β -catenin and *c-myc* in SBPkd1_{TAG} kidneys. A β -catenin overexpression of 3- to 4-fold in adult SBPkd1_{TAG} compared to control kidneys was measured (Figure 2A). A significant increase of *c-myc* expression by 2- to 3-fold was also detected (Figure 2B). Level of *c-myc* expression is comparable between new born control kidneys and adult SBPkd1_{TAG} kidneys. By opposition, the level of *N-myc* is completely downregulated in adult SBPkd1_{TAG} kidneys suggesting that *c-myc* is the only member of the *MYC* family gene that is deregulated in ADPKD (Figure 2B).

To localize β -catenin and *c-myc* expressing cells, we have undertaken immunohistological analyses in kidney sections of adult SBPkd1_{TAG} mice. In tubular epithelium of control mice, β -catenin expression is confined to cell-cell junctions (Figure 3A). In SBPkd1_{TAG} kidneys, stronger basolateral staining was observed in a majority of cysts (Figure 3B), although cytoplasmic accumulation and nuclear localization of β -catenin was also detected in a minority of cysts. To confirm that the nuclear β -catenin was transcriptionally active, the *TCF/Lef-LacZ* mouse was mated to the SBPkd1_{TAG} mouse. In *TCF/Lef-LacZ* mouse, detection of β -galactosidase activity provided an indication of the localization of β -catenin/TCF-dependent gene expression within the tissue³⁸. Very few signals were observed in adult renal tissue of *TCF/Lef-LacZ* mice (Figure 3C). In double SBPkd1_{TAG}; *TCF/Lef-LacZ* transgenic mice, most of the renal cysts have shown β -galactosidase activity (Figure 3D). Interestingly, larger cysts have shown weaker β -galactosidase staining than smaller and presumably newly form cysts, suggesting function of β -catenin activity in early cystogenesis.

Next, we explored the profile of expression of c-Myc, which is a known transcriptional target of β -catenin in renal dysplasia as well as in colorectal cancer^{35,39}. As expected, c-Myc expression was absent in control adult renal tissue (Figure 3E). Its overexpression in

SBPkd1_{TAG} kidneys was localized principally to hyperplastic renal epithelium lining the cysts (Figure 3F). Interestingly, clusters of c-Myc-expressing cells were observed in cystic epithelium (Figure 3F, arrow). Furthermore, nuclear colocalization of β -catenin and c-Myc was detected in several cysts of SBPkd1_{TAG} kidneys (Figure 3H-I), suggesting that both proteins share common or additive role in cystogenesis induced by PC-1 overexpression.

Loss of *c-myc* reduces cystogenesis

To validate the role of β -catenin/*c-myc* pathway in cystogenesis induced by overexpression of PC-1, we performed a kidney-specific *c-myc* loss of function study. Recently, we established that *c-myc* is dispensable for adult kidney homeostasis by the generation of a renal epithelium-specific *c-myc* knock-out mouse, called *KspCre; c-myc^{f/f}* (Couillard *et al.* manuscript in preparation). Based on that previous study, *KspCre; c-myc^{f/f}* mice were mated to the SBPkd1_{TAG} mice. In order to evaluate the efficacy of the *c-myc* deletion, renal c-Myc protein expression was measured and showed a reduction of approximately 20% in adult SBPkd1_{TAG}; *KspCre; c-myc^{f/f}* mice compared to SBPkd1_{TAG} mice (Figure 4A).

To establish whether this reduced level of *c-myc* expression in kidney of SBPkd1_{TAG}; *KspCre; c-myc^{f/f}* mice influences renal phenotype, we measured cystic parameters by histological analysis of kidney sections. Severity of cystogenesis was first assessed by counting the number of cyst and measuring the whole cystic area of kidney sections from adult SBPkd1_{TAG}; *KspCre; c-myc^{f/f}* mice relative to SBPkd1_{TAG} mice. Both number and overall area of cyst were reduced by 27% and 23%, respectively (Figure 4B, C). Interestingly, no significant variation was obtain by calculating the average and median of individual cyst area (data not shown), indicating that partial loss of *c-myc* influence the number of cyst rather than the size.

Because proliferation and apoptosis were significantly increased in SBPkd1_{TAG} kidneys, both cellular processes were assessed following *c-myc* renal partial ablation. Proliferative and apoptotic indexes of cystic epithelium were downregulated by 17% and 21%,

respectively (Figure 4C, D). Clusters of proliferative and apoptotic cells remained detectable in cystic epithelium (not shown). Normal tubules did not show a significant reduction of cell proliferation or deaths, and implies that high levels of proliferation and apoptosis observed in cystic epithelium of SBPkd1_{TAG} mouse were in part stimulated by *c-myc*.

Fibrosis was also drastically expanded in SBPkd1_{TAG} renal tissue, and was quantified in SBPkd1_{TAG}; *KspCre*; *Myc*^{n/n} mice (Figure 4E). The excessive fibrogenesis observed in SBPkd1_{TAG} kidney has dropped by 30% following partial *c-myc* ablation, indicating that the level of *c-myc* expression affects fibrosis formation.

DISCUSSION

In this study, we have shown that cystogenesis induced by *Pkd1* overexpression is associated with increased cellular proliferation, apoptosis and fibrosis. We sought to explore the molecular mechanism underlying these cellular processes and found that β -catenin/*c-myc* signalization was activated. Upregulation of β -catenin expression and transcriptional activity as well as c-Myc overexpression was detected in hyperplastic epithelium lining cysts. Moreover, partial ablation of *c-myc* in SBPkd1_{TAG} kidney ameliorated the cystic phenotype, including reduction of cellular proliferation, apoptosis and fibrosis, suggesting a role of *c-myc* in PC-1 signalization.

Our data indicates that high incidence of cellular proliferation and apoptosis are etiologically linked to cystogenesis, in which overexpression of β -catenin and *c-myc* may participate. As in our SBPkd1_{TAG} model, enhancement of both proliferation and apoptosis in cystogenesis has been observed in ADPKD as well as various rodent models of PKD, including transgenic mice overexpressing β -catenin or *c-myc*, supporting the view that abnormal proliferation and apoptosis of tubule epithelial cells is a primary event in the pathogenesis^{28, 29}. β -catenin and *c-myc* have been involved in activation of proliferation and apoptosis as well as inhibition of terminal differentiation in a wide variety of cell types^{40, 41}. On the other hand, PC-1 is probably required for cell survival and inhibition of cell proliferation to allow for the terminal differentiation of the tubular epithelial cells^{22, 42}. Failure to do so following PC-1 overexpression and β -catenin/*c-myc* activation would result in aberrant cell growth and cystogenesis. Furthermore, the fact that partial reduction of *c-myc* renal expression has ameliorated the cystic phenotype of adult SBPkd1_{TAG} kidneys, suggests that *c-myc* overexpression is not only a signature of cell proliferation or death but assumed that this dual functionality of *c-myc* plays a critical role in renal cystogenesis induced by *Pkd1* gain-of-function.

Our findings also provide evidence that PC-1/ β -catenin/*c-myc* pathway is required for the initiation phase rather than maintenance of cyst growth. First, β -catenin transcriptional activity was mostly observed in small and emerging cysts, and become downregulated in larger cysts that are surrounded by flattened and presumably dedifferentiated epithelium. Second, partial removal of *c-myc* expression in SBPkd1_{TAG} kidney reduced the number of cyst rather than cyst size. This proposes that once cystogenesis is induced and a dedifferentiated status of the epithelium is acquired, blocking the β -catenin/*c-myc* pathway would be ineffective to impede cyst progression. A parallel can be established with the involvement of *c-myc* overexpression in the genesis of many human tumors, for which once initiated, they would continue to grow without any further requirement of *c-myc* function⁴³. In that regard, cyst can be seen as “neoplasia in disguise”, in which deregulation of *PKDI* expression may abnormally induced the proto-oncogenic β -catenin/*c-myc* pathway to trigger cystogenesis^{44,45}.

Our data also propose that cystogenesis is coupled to fibrosis formation since Sirius red collagen staining was detectable predominantly underlying cyst. Altered extracellular matrix has been postulated to play a role in the pathogenesis of PKD⁴⁶. Studies suggests that cystic epithelial cells produce an abnormal basement membrane and have altered proliferative or death response to extracellular matrix proteins^{4, 31, 47-49}. Origin and stimulation process of fibrogenesis remains elusive, but fibrosis is often presumed to be derived from local activation of renal interstitial fibroblasts or from epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of tubular cells^{50,51}. Supporting evidence implicates PC-1, β -catenin and *c-myc* in EMT⁵²⁻⁵⁶. It is then tempting to speculate that EMT could occur in response to PC-1/ β -catenin/*c-myc* pathway overstimulation, which in turn could influence the progression of both fibrogenesis and cystogenesis. As observed in SBPkd1_{TAG} kidney, interstitial fibrosis expansion has been seen in ADPKD patient and PKD rodent models with β -catenin and/or *c-myc* overexpression^{30, 31, 36, 46, 57, 58}. However, the emergence of fibrosis has often been detected after cyst formation, including transgenic mice

overexpressing *c-myc*^{29, 48, 59}, which proposes that interstitial fibrosis is a secondary complication of the renal cyst development. Our data support to some extent this hypothesis, since no clear correlation was observed between fibrosis and cystogenesis level of reduction following partial loss of *c-myc* in SBPkd1_{TAG} kidney. In SBPkd1_{TAG} kidney, activation of PC-1/ β -catenin/*c-myc* pathway might be an early event in cystogenesis that indirectly induce fibrosis formation.

The investigation of intracellular pathogenetic mechanism of SBPkd1_{TAG} mouse has now identified PC-1, β -catenin and *c-myc* as major players of a common or additive signal transduction pathway that lead to cystogenesis. The mechanism of *c-myc* overexpression in ADPKD has never been investigated but our study suggests that it may be enhanced by the nuclear translocation of β -catenin, for which *c-myc* is a transcriptional target in colorectal cancer as well as in renal dysplasia^{35, 39}. Upregulation and nuclear colocalization of both proteins in cystic epithelium support that this mechanism occurs in SBPkd1_{TAG} kidney. This elevated β -catenin expression and transcriptional activity in SBPkd1_{TAG} kidneys proposes that PC-1 may cause stabilization of the cytoplasmic β -catenin by blocking its degradation. This is reinforced by the inhibition of GSK-3 β activity and stabilization of β -catenin followed by transfection of the C-terminal domain of PC-1 in HEK 293 cells²⁷. Expression level of β -catenin is also increased by overexpression of full-length PC-1 in HepG2 cells⁶⁰. However, conflicting results were obtained by other groups where both forms of PC-1 (C-terminal domain or full length) stimulate AP-1 expression but do not have a significant impact on cytoplasmic β -catenin activity^{19, 55}. Interestingly, both mechanisms could be additive since an AP-1/ β -catenin heterodimer is able to bind a TCF-responding element in the *c-myc* promoter^{61, 62}. Nevertheless, interpretation of these results suggests that cell type or physiological conditions (i.e. *in vivo* compare to cell culture) may influence the analysis of PC-1 signalization. In addition, the form of PC-1 should have importance as recently proposed by *in vivo* differential functions exerted by full-length and GPS-cleaved PC-1⁶³. Full-length PC-1 is overexpressed in SBPkd1_{TAG}

kidney, but GPS- or C-terminal-specific cleavage could possibly occur. It is interesting to note that cleavage of the C-terminal tail of PC-1 prior to its interaction with β -catenin has been proposed (unpublished result ⁶⁴). This alternative PC-1 signaling mechanism could regulate nuclear translocation of β -catenin and therefore activation of *c-myc* expression.

In conclusion, we have implicated a PC-1/ β -catenin/*c-myc* pathway in the induction of cystogenesis associated with abnormally high level of cell proliferation, apoptosis and fibrogenesis. Our data put forward the existence of a genetic link between *Pkd1* and *c-myc*. It favors the idea that a treatment for ADPKD targeting *c-myc* expression can be effective. However, those treatments, such as *c-myc* antisense, must be provided in early stage of ADPKD to prevent the emergence of new cysts.

MATERIALS AND METHODS

Transgenic mice

Generation and characterization of SBPkd1_{TAG}, *KspCre* (kindly provided by Dr P. Igarashi) and *c-myc*^{fl/fl} mice (generous gift from Dr F. Alt) have been previously described^{15, 65, 66}. These mice were maintained on a C57BL/6J background excepted for the SBPkd1_{TAG} mice that were on a mix C57BL/6J x CBA/J background. The mating scheme to generate the double transgenic mice (*KspCre*; *c-myc*^{fl/fl}) has been previously described (Couillard *et al.* manuscript in preparation). To generate the triple transgenic mice (SBPkd1_{TAG}; *KspCre*; *c-myc*^{fl/fl} mice), *KspCre*; *c-myc*^{fl/fl} mice were first crossed with SBPkd1_{TAG} mice. Second, SBPkd1_{TAG}; *KspCre*; *c-myc*^{fl/+} (F1) mice were crossed with *c-myc*^{fl/fl} mice.

Northern

RNA from SBPkd1_{TAG} adult kidneys and controls were extracted by TRIzol Reagent (Invitrogen, Life Technology). 20µg of RNA were loaded on a 1.5% agarose/0.6M formaldehyde gel and transferred on a nylon membrane. cDNA probes for *c-myc* (ex2-3), *N-myc* (ex2-3) and *rpl32* were synthesized using random primers DNA-labeling system with α³²P dCTP. The *c-myc* and *N-myc* probes were exposed for 4 days and *rpl32* probe for 4 hours to X-ray film (Biomax MS).

Western

Total proteins extract were prepared from adult kidney tissue by homogenization in RIPA solution (20mM Tris pH7.5, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 0.5% triton X-100) complemented with protease inhibitor cocktail (Sigma) and PMSF. Supernatant was recovered after centrifugation at 4°C and protein concentration was quantified by Bradford method. 20µg of protein were loaded on a 10% SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membrane (Biorad). The membranes were blocked in 5% skimmed milk and incubated with the primary antibody, rabbit anti-c-Myc (1:500 dilution, Santa Cruz

Biotechnology, CA) or rabbit anti- β -catenin (1:1000 dilution, Upstate Biotech, Lake Placid, NY) or mouse anti-gapdh (1:1000 dilution, Abcam), at 4°C overnight and the secondary antibody, anti-rabbit or anti-mouse IgG-HRP (1:10 000 dilution, Sigma), at 25°C for 1 hour. Chemiluminescence was performed using ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Immunohistochemistry

Adult kidney tissues were fixed by perfusion in 4% paraformaldehyde. Paraffin wax-embedded sections (4 μ m) were hydrated in graded alcohol followed by 10 minutes incubation in 3% H₂O₂ to quench endogenous peroxidase activity. Antigen retrieval from sections was accomplished in 0.01M citrate buffer pH6.0 heated twice in microwave pressure cooker for 15 minutes, including a boiling period of 10 minutes without pressure lid. Tissue sections were blocked for 1h at 25°C in normal goat serum and incubated overnight at 4°C with the primary antibody against c-Myc (1:25), β -catenin (1:50) and Ki67 (1:500, Vision Biosystems, Norwell, MA). The incubation with the secondary antibody anti-rabbit IgG-biotin (1:250) was achieved at 25°C for one hour followed by APC complex (Vectors Laboratories, Burlingame, CA), and then developed with peroxidase substrate DAB (diaminobenzyl, Sigma). Hematoxylin Mayer was used for counter stain and slides were visualized by bright field microscopy.

Proliferation and TUNEL assay

Proliferative cells were visualized by IHC against Ki67 that is expressed in all phases of the cell cycle, exempt G₀⁶⁷, as previously described⁶⁸. TUNEL assay was performed to detect apoptotic cells with 0.2U/ μ l of TdT enzyme and 1mM dUTP-biotin (Roche, Laval, QC), as described in Coullard *et al.* 2002⁶⁸.

The proliferative and apoptotic indexes represent the number of tubules containing at least one proliferative or apoptotic cell respectively. Approximately hundred (ranging from 90

to 110) normal and cystic tubules were counted per slide, separately. Positive signal for proliferation or apoptosis ranged from 1 to 10 cells per cystic tubules and 1 to 3 cells per non cystic tubules.

Cysts quantification

Eight images (50X magnification) per mice (minimum of n=7 per genotype) were taken from H&E kidney sections using bright field microscope (Zeiss Axiophot). Images were analyzed using Northern Eclipse 7.0 software to determine the number of cyst per mm², the whole cystic area relative to tissue area as well as the average and median of individual cyst area.

Fibrosis quantification

Kidney sections (5µm) were counterstained with Sirius Red to visualize collagen. Eight images (50X magnification) per mice (minimum of n=7 per genotype) were taken and the red pixels corresponding to fibrosis were evaluated relative to renal tissue area using Northern Eclipse 7.0 software.

REFERENCES

1. Gabow, PA: Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med*, 329:332-42, 1993.
2. Wilson, PD & Falkenstein, D: The pathology of human renal cystic disease. *Curr Top Pathol*, 88:1-50, 1995.
3. Wilson, PD: Epithelial cell polarity and disease. *Am J Physiol*, 272:F434-42, 1997.
4. Wilson, PD, Hreniuk, D & Gabow, PA: Abnormal extracellular matrix and excessive growth of human adult polycystic kidney disease epithelia. *J Cell Physiol*, 150:360-9, 1992.
5. Klingel, R, Ramadori, G, Schuppan, D, Knittel, T, Meyer zum Buschenfelde, KH & Kohler, H: Coexpression of extracellular matrix glycoproteins undulin and tenascin in human autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephron*, 65:111-8, 1993.
6. Zeier, M, Fehrenbach, 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.
7. 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.
8. Nadasdy, 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*, 5:1462-8, 1995.
9. Woo, D: Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *N Engl J Med*, 333:18-25, 1995.

10. Stayner, C, Iglesias, DM, Goodyer, PR, Ellis, L, Germino, G, Zhou, J & Eccles, MR: Pax2 gene dosage influences cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet*, 15:3520-8, 2006.
11. Du, J & Wilson, PD: Abnormal polarization of EGF receptors and autocrine stimulation of cyst epithelial growth in human ADPKD. *Am J Physiol*, 269:C487-95, 1995.
12. Griffin, MD, Torres, VE, Grande, JP & Kumar, R: Immunolocalization of polycystin in human tissues and cultured cells. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, 108:185-197, 1996.
13. Ong, AC, Harris, PC, Biddolph, S, Bowker, C & Ward, CJ: Characterisation and expression of the PKD-1 protein, polycystin, in renal and extrarenal tissues. *Kidney Int.*, 55:2091-2116, 1999.
14. Pritchard, L, Sloane-Stanley, JA, Sharpe, JA, Aspinwall, R, Lu, W, Buckle, V, Strmecki, L, Walker, D, Ward, CJ, Alpers, CE, et al.: A human PKD1 transgene generates functional polycystin-1 in mice and is associated with a cystic phenotype. *Hum Mol Genet*, 9:2617-27, 2000.
15. Thivierge, C, Kurbegovic, A, Couillard, M, Guillaume, R, Cote, O & Trudel, M: Overexpression of PKD1 causes polycystic kidney disease. *Mol. Cell Biol.*, 26:1538-1548, 2006.
16. 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*, 18:740-2, 2004.
17. Delmas, P, Nomura, H, Li, X, Lakkis, M, Luo, Y, Segal, Y, Fernandez-Fernandez, JM, Harris, P, Frischauf, AM, Brown, DA, et al.: Constitutive activation of G-proteins by polycystin-1 is antagonized by polycystin-2. *J. Biol. Chem.*, 277:11276-11283, 2002.

18. 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.
19. Le, NH, van der, BP, Huls, G, van de, WM, Loghman-Adham, M, Ong, AC, Calvet, JP, Clevers, H, Breuning, MH, van Dam, H, et al.: Aberrant polycystin-1 expression results in modification of activator protein-1 activity, whereas Wnt signaling remains unaffected. *J. Biol. Chem.*, 279:27472-27481, 2004.
20. Parnell, SC, Magenheimer, BS, Maser, RL, Zien, CA, Frischauf, AM & 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.
21. Shillingford, JM, Murcia, NS, Larson, CH, Low, SH, Hedgepeth, R, Brown, N, Flask, CA, Novick, AC, Goldfarb, DA, Kramer-Zucker, A, et al.: The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:5466-71, 2006.
22. Bhunia, AK, Piontek, K, Boletta, A, Liu, L, Qian, F, Xu, PN, Germino, FJ & Germino, GG: PKD1 induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2. *Cell*, 109:157-168, 2002.
23. 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.
24. 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.

25. Cox, RT, Kirkpatrick, C & Peifer, M: Armadillo is required for adherens junction assembly, cell polarity, and morphogenesis during *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Biol*, 134:133-48, 1996.
26. Brembeck, FH, Rosario, M & Birchmeier, W: Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev*, 16:51-9, 2006.
27. Kim, E, Arnould, T, Sellin, LK, Benzing, T, Fan, MJ, Gruning, W, Sokol, SY, Drummond, I & Walz, G: The polycystic kidney disease 1 gene product modulates Wnt signaling. *J. Biol. Chem.*, 274:4947-4953, 1999.
28. 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*, 20:5972-5981, 2001.
29. 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.
30. 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.
31. Cowley, BD, Jr., Gudapaty, S, Kraybill, AL, Barash, BD, Harding, MA, Calvet, JP & Gattone, VH: Autosomal-dominant polycystic kidney disease in the rat. *Kidney Int.*, 43:522-534, 1993.
32. Cowley, BD, Jr., Smardo, FL, Jr., Grantham, JJ & Calvet, JP: Elevated c-myc protooncogene expression in autosomal recessive polycystic kidney disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84:8394-8398, 1987.

33. Gattone, VH, 2nd, Kuenstler, KA, Lindemann, GW, Lu, X, Cowley, BD, Jr., Rankin, CA & Calvet, JP: Renal expression of a transforming growth factor-alpha transgene accelerates the progression of inherited, slowly progressive polycystic kidney disease in the mouse. *J Lab Clin Med*, 127:214-22, 1996.
34. Harding, MA, Gattone, VH, Grantham, JJ & Calvet, JP: Localization of overexpressed c-myc mRNA in polycystic kidneys of the cpk mouse. *Kidney Int.*, 41:317-325, 1992.
35. Hu, MC & Rosenblum, ND: Smad1, beta-catenin and Tcf4 associate in a molecular complex with the Myc promoter in dysplastic renal tissue and cooperate to control Myc transcription. *Development*, 132:215-225, 2005.
36. 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 U S A*, 100:5286-91, 2003.
37. Ricker, JL, Mata, JE, Iversen, PL & Gattone, VH: c-myc antisense oligonucleotide treatment ameliorates murine ARPKD. *Kidney Int.*, 61 Suppl 1:125-131, 2002.
38. Liu, H, Mohamed, O, Dufort, D & Wallace, VA: Characterization of Wnt signaling components and activation of the Wnt canonical pathway in the murine retina. *Dev. Dyn.*, 227:323-334, 2003.
39. He, TC, Sparks, AB, Rago, C, Hermeking, H, Zawel, L, da Costa, LT, Morin, PJ, Vogelstein, B & Kinzler, KW: Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, 281:1509-1512, 1998.
40. Clevers, H: Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127:469-80, 2006.

41. Pelengaris, S, Khan, M & Evan, G: c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer*, 2:764-76, 2002.
42. 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.
43. Felsher, DW & Bishop, JM: Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96:3940-3944, 1999.
44. Blaszak, RT, Potaman, V, Sinden, RR & Bissler, JJ: DNA structural transitions within the PKD1 gene. *Nucleic Acids Res.*, 27:2610-2617, 1999.
45. Grantham, JJ: Polycystic kidney disease: neoplasia in disguise. *Am. J. Kidney Dis.*, 15:110-116, 1990.
46. Gabow, PA, Johnson, AM, Kaehny, WD, Kimberling, WJ, Lezotte, DC, Duley, IT & Jones, RH: Factors affecting the progression of renal disease in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int*, 41:1311-9, 1992.
47. Beavan, LA, Carone, FA, Nakamura, S, Jones, JK, Reindel, JF & Price, RG: Comparison of proteoglycans synthesized by porcine normal and polycystic renal tubular epithelial cells in vitro. *Arch Biochem Biophys*, 284:392-9, 1991.
48. Jiang, ST, Chiou, YY, Wang, E, Lin, HK, Lin, YT, Chi, YC, Wang, CK, Tang, MJ & Li, H: Defining a link with autosomal-dominant polycystic kidney disease in mice with congenitally low expression of Pkd1. *Am J Pathol*, 168:205-20, 2006.
49. Taub, M, Laurie, GW, Martin, GR & Kleinman, HK: Altered basement membrane protein biosynthesis by primary cultures of cpk/cpk mouse kidney. *Kidney Int*, 37:1090-7, 1990.

50. Liu, Y: Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287:F7-16, 2004.
51. Okada, H, Ban, S, Nagao, S, Takahashi, H, Suzuki, H & Neilson, EG: Progressive renal fibrosis in murine polycystic kidney disease: an immunohistochemical observation. *Kidney Int*, 58:587-97, 2000.
52. Eger, A, Stockinger, A, Schaffhauser, B, Beug, H & Foisner, R: Epithelial mesenchymal transition by c-Fos estrogen receptor activation involves nuclear translocation of beta-catenin and upregulation of beta-catenin/lymphoid enhancer binding factor-1 transcriptional activity. *J. Cell Biol.*, 148:173-188, 2000.
53. Morali, OG, Delmas, V, Moore, R, Jeanney, C, Thiery, JP & Larue, L: IGF-II induces rapid beta-catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition. *Oncogene*, 20:4942-4950, 2001.
54. Kim, K, Lu, Z & Hay, ED: Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol Int*, 26:463-76, 2002.
55. Boca, M, D'Amato, L, Distefano, G, Polishchuk, RS, Germino, GG & Boletta, A: Polycystin-1 induces cell migration by regulating phosphatidylinositol 3-kinase-dependent cytoskeletal rearrangements and GSK3beta-dependent cell cell mechanical adhesion. *Mol Biol Cell*, 18:4050-61, 2007.
56. Hiscox, S, Jiang, WG, Obermeier, K, Taylor, K, Morgan, L, Burmi, R, Barrow, D & Nicholson, RI: Tamoxifen resistance in MCF7 cells promotes EMT-like behaviour and involves modulation of beta-catenin phosphorylation. *Int J Cancer*, 118:290-301, 2006.

57. Hu, MC, Piscione, TD & Rosenblum, ND: Elevated SMAD1/beta-catenin molecular complexes and renal medullary cystic dysplasia in ALK3 transgenic mice. *Development*, 130:2753-66, 2003.
58. Li, KJ, Shiau, AL, Chiou, YY, Yo, YT & Wu, CL: Transgenic overexpression of prothymosin alpha induces development of polycystic kidney disease. *Kidney Int*, 67:1710-22, 2005.
59. Nauta, J, Goedbloed, MA, Herck, HV, Hesselink, DA, Visser, P, Willemsen, R, Dokkum, RP, Wright, CJ & Guay-Woodford, LM: New rat model that phenotypically resembles autosomal recessive polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 11:2272-84, 2000.
60. Zhang, K, Ye, C, Zhou, Q, Zheng, R, Lv, X, Chen, Y, Hu, Z, Guo, H, Zhang, Z, Wang, Y, et al.: PKD1 inhibits cancer cells migration and invasion via Wnt signaling pathway in vitro. *Cell Biochem Funct*, 25:767-74, 2007.
61. Nateri, AS, Spencer-Dene, B & Behrens, A: Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development. *Nature*, 437:281-5, 2005.
62. Toualbi, K, Guller, MC, Mauriz, JL, Labalette, C, Buendia, MA, Mauviel, A & Bernuau, D: Physical and functional cooperation between AP-1 and beta-catenin for the regulation of TCF-dependent genes. *Oncogene*, 26:3492-502, 2007.
63. Yu, S, Hackmann, K, Gao, J, He, X, Piontek, K, Garcia Gonzalez, MA, Menezes, LF, Xu, H, Germino, GG, Zuo, J, et al.: Essential role of cleavage of Polycystin-1 at G protein-coupled receptor proteolytic site for kidney tubular structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:18688-93, 2007.
64. Le Moellic, C, Lal, M, Merrick, D, Chauvet, V, Gottardi, CJ & Caplan, MJ: The nuclear localization signal of the polycystin-1 C-terminal tail binds to beta-catenin

and inhibits Wnt signaling. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17:702A, 2006.

65. de Alboran, IM, O'Hagan, RC, Gartner, F, Malynn, B, Davidson, L, Rickert, R, Rajewsky, K, DePinho, RA & Alt, FW: Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. *Immunity*, 14:45-55, 2001.
66. Shao, X, Somlo, S & Igarashi, P: Epithelial-specific Cre/lox recombination in the developing kidney and genitourinary tract. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 13:1837-1846, 2002.
67. Scholzen, T & Gerdes, J: The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182:311-22, 2000.
68. 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.

FIGURES

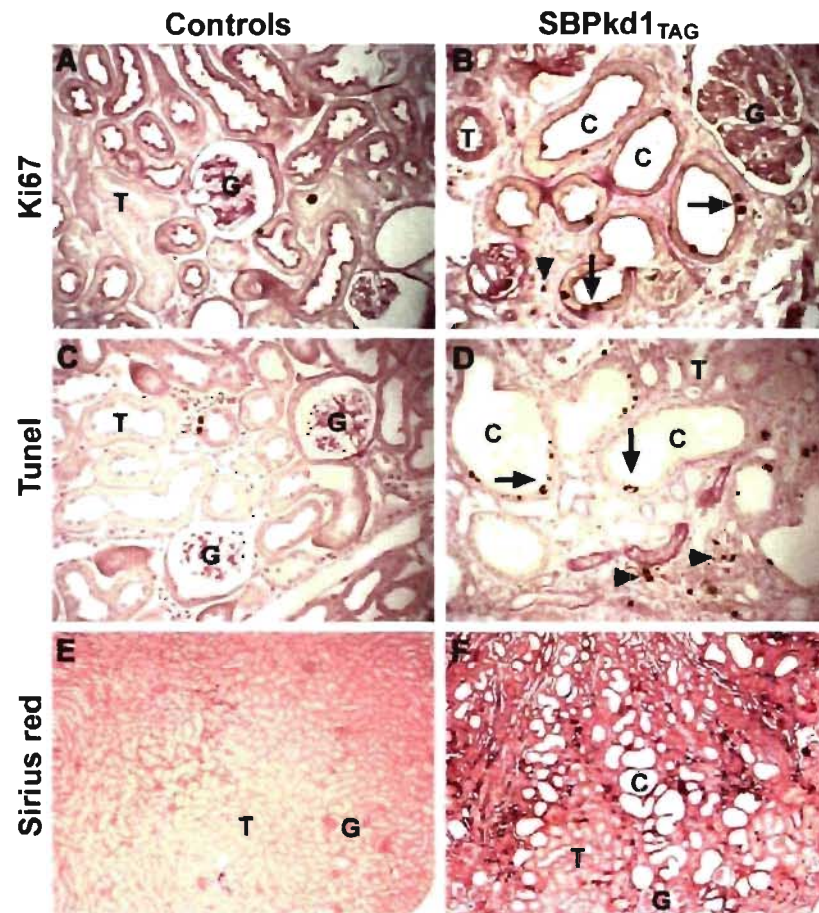


Figure 1. Elevated rate of cell proliferation, apoptosis and fibrosis induced by *Pkd1* overexpression in vivo. (A) Renal cellular proliferation detection by Ki67 immunochemistry of a 6-month-old control mouse (X400). (B) Ki67-positive cells detected in kidney section from a 6-month-old SBPkd1_{TAG} mouse (X400). Note clusters of proliferative cells (arrows) as well as signal in interstitial fibrosis (arrowhead). (C) Renal apoptotic cell detection by Tunel assay of a 6-month-old control mouse (X400). (D) Apoptosis in kidney section of a 6-month-old SBPkd1_{TAG} mouse (X400) that shows clusters of apoptotic cells (arrows) as well as signal in interstitial fibrosis (arrowhead). (E)

Weak renal fibrosis detection by Sirius red collagen staining was obtained in 6-month-old control mouse (X50). (F) Fibrosis examination in kidney section of 6-month-old SBPkd1_{TAG} mouse that exhibited strong Sirius red staining underlying cysts, and weaker staining surrounding normal tubules (X50). T: Tubule; G: glomerulus; C: Cyst.

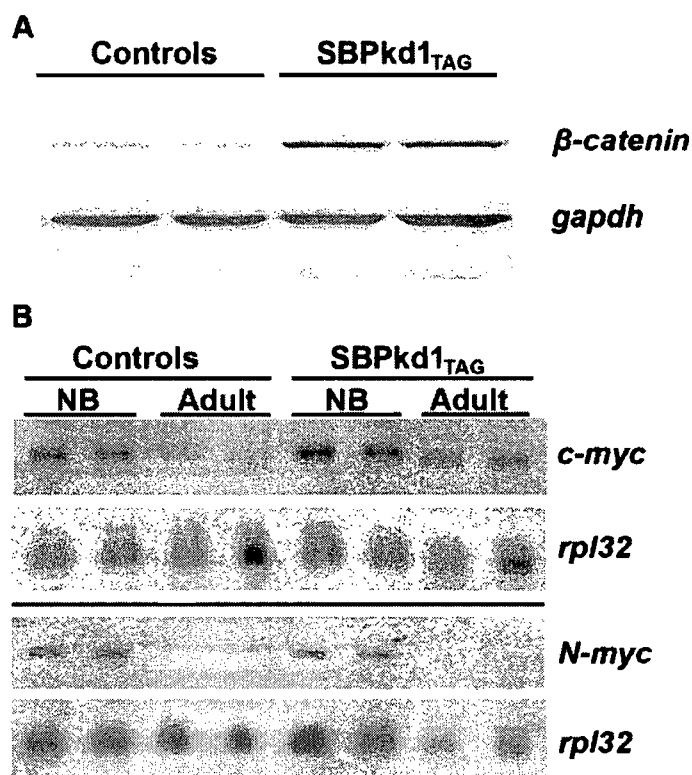


Figure 2. Increased β -catenin and *c-myc* expression in adult kidneys of SBPkd1_{TAG} mice. (A) Overexpression of β -catenin in adult SBPkd1_{TAG} kidneys compared to controls analyzed by Western blot. Molecular weight of β -catenin and Gapdh internal control is 92 kDa and 37 kDa, respectively. (B) Sustained fetal level of *c-myc* expression in adult SBPkd1_{TAG} kidneys, whereas N-myc was downregulated. RNA from controls and SBPkd1_{TAG} newborn and adult kidneys were extracted and hybridized with *c-myc* probe and *N-myc* probe. Transcript of *c-myc* and *N-myc* are 2.4 and 2.6 kb respectively, while *rpl32*, an internal control, is 517 bp. NB: new born.

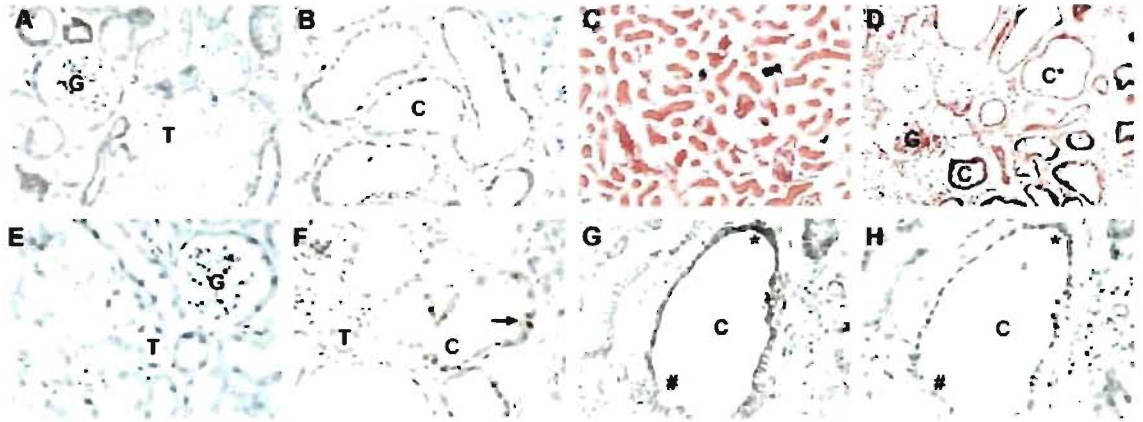


Figure 3. β -catenin and c-Myc overexpression in cystic epithelium of SBPkd1_{TAG} mice. (A) Endogenous β -catenin level of basolateral expression in renal tubules of kidney sections of a 6-month-old control mouse by immunohistochemistry (X400). (B) Strong basolateral staining by β -catenin immunohistochemistry in kidney sections of a 6-month-old SBPkd1_{TAG} mouse (X400). (C) Low level of β -catenin transcriptional activity assessed by LacZ staining in kidney sections of a 6-month-old Tcf-LacZ mouse (X200). (D) β -catenin activity detected in smaller cysts (C) and loss of LacZ staining in larger cysts (C*) in kidney sections of a 6-month-old SBPkd1_{TAG}; Tcf-LacZ mouse (X200). (E) Absence of detectable c-Myc expression by immunohistochemistry analysis in kidney sections of a 6-month-old control mouse (X400). (F) Kidney sections of a 6-month-old SBPkd1_{TAG} mouse with c-Myc expression in hyperplastic cells lining the cysts (X400). (G, H) Successive sections of SBPkd1_{TAG} kidney stained for β -catenin and c-Myc, respectively (X400). #: Basolateral localization of β -catenin correlates with absence of c-Myc expression. *: Nuclear colocalization of c-Myc and β -catenin. T: tubule; G: glomerulus; C: cyst.

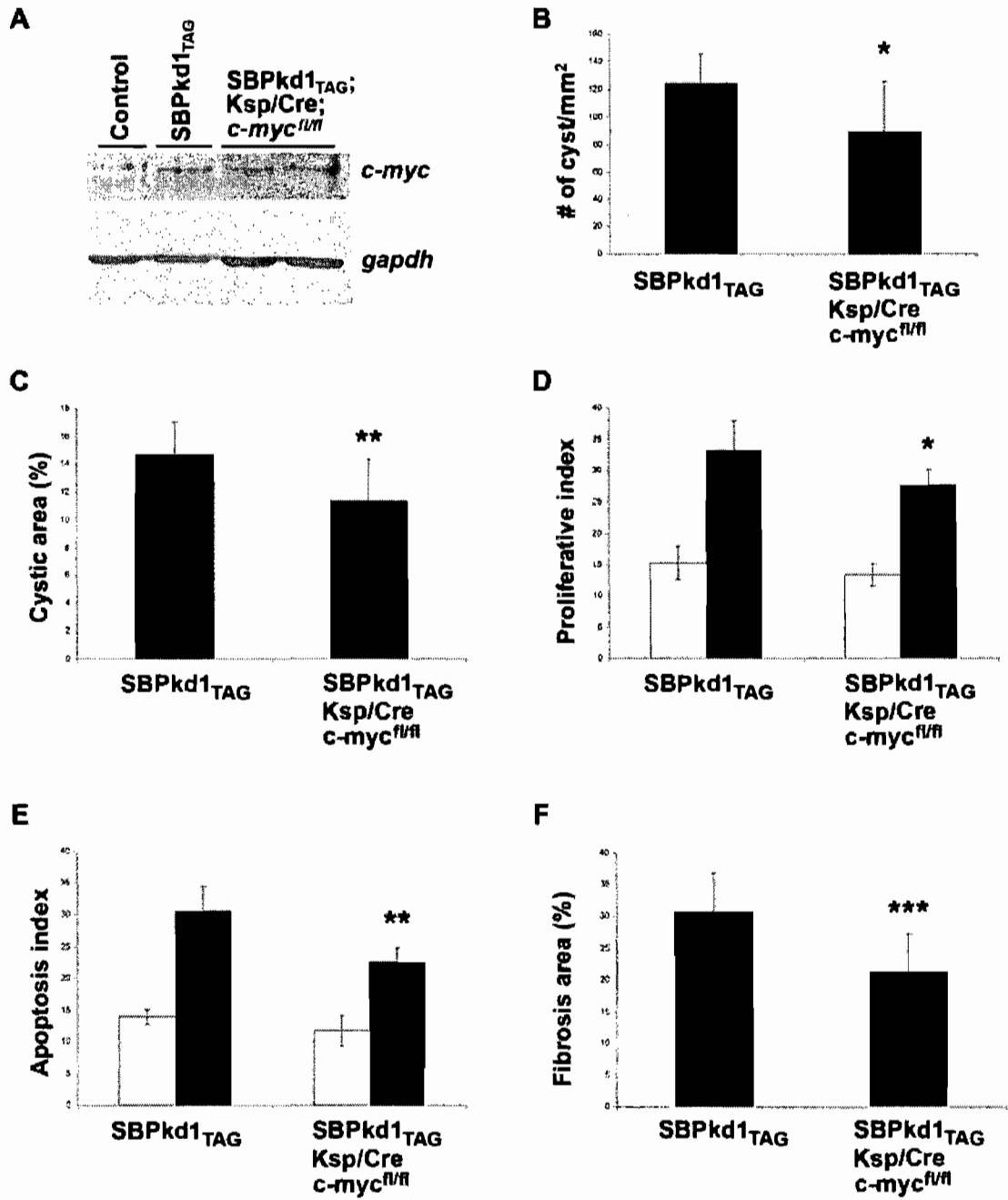


Figure 4. Renal PKD phenotype in SBPkd1_{TAG}; *KspCre*; *c-myc*^{f/f} mice. (A) Slight reduction of c-Myc (67 kDa) expression in SBPkd1_{TAG}; *KspCre*; *c-myc*^{f/f} compared to SBPkd1_{TAG} kidneys detected by western blot analysis. Gapdh (37kDa) has served as internal control. (B) The number of cystic per mm² of kidney sections of SBPkd1_{TAG} mice (n=13) was reduced in SBPkd1_{TAG}; *KspCre*; *c-myc*^{f/f} mice (n=11). (C) The high percentage of cystic area per kidney sections of SBPkd1_{TAG} mice (n=13) was significantly decreased in SBPkd1_{TAG}; *KspCre*; *c-myc*^{f/f} mice (n=11). (D) Proliferative indexes reduction in cystic tubules (■) of SBPkd1_{TAG}; *KspCre*; *c-myc*^{f/f} mice (n=11) compare to SBPkd1_{TAG} mice (n=7). No significant reduction of proliferative indexes was observed in normal tubules (□). (E) Apoptosis indexes reduction in cystic tubules (■) of SBPkd1_{TAG}; *KspCre*; *c-myc*^{f/f} mice (n=10) compare to SBPkd1_{TAG} mice (n=7). No significant reduction of apoptosis indexes was observed in normal tubules (□). (F) Fibrosis expansion in SBPkd1_{TAG} mice (n=10) was decreased in SBPkd1_{TAG}; *KspCre*; *c-myc*^{f/f} mice (n=9). * $P \leq 0.04$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$

II.4 β -CATENIN REGULATES DEVELOPMENT AND HOMEOSTASIS OF THE KIDNEY

Martin Couillard and Marie Trudel

Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Key words: β -catenin, metanephric mesenchyme, ureteric bud, papilla, cysts, conditional knockout mice

Correspondence:

M. Trudel,

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

ABSTRACT

Mutual inductive interactions between the ureteric bud and metanephric mesenchyme drive nephrogenesis. Recent evidence suggests that canonical Wnt/ β -catenin signaling is an important mediator of this interaction but its role in later stage of kidney development and homeostasis is less defined. To explore the requirement of β -catenin in kidney from early stage (e10.5) through adulthood, we generated of two distinct conditional ablations. Early loss of β -catenin in both ureteric buds and metanephric mesenchyme lead to lethality at birth with severe renal anomalies. These include small kidneys size associated with lack of active nephrogenic zone, reduced nephron numbers and cysts formation. However, inactivation of β -catenin in late renal epithelium has revealed any detectable defect during embryogenesis but showed dilation or loss of papilla in adulthood. In conclusion, β -catenin appears crucial for early kidney development in both ureteric bud branching and nephrogenesis. Post-natally, β -catenin is of critical importance for collecting duct epithelium maintenance and homeostasis in the papilla.

INTRODUCTION

Development of the renal tubular epithelium is derived from two distinct mesodermal populations, the ureteric bud and the metanephric mesenchyme¹. On embryonic (e) day 10 in mice, reciprocal interaction between these two cell populations induces branching of the ureteric bud and condensation of the overlying mesenchyme. A subset of cells within the condensate surrounding the tips of the ureteric bud will aggregate and undergo a mesenchyme to epithelium transition (MET), forming subsequently the renal vesicle, comma and S-shaped bodies. Ultimately, ureteric bud epithelium will give rise to the collecting duct system and extra-renal ureter whereas the epithelium derived from the metanephric mesenchyme will constitute the remaining tubular and glomerular structures of the nephron.

Considerable efforts using kidney explants or genetic approaches have been done over the past two decades to identify ligands and receptors regulating the inductive interaction of these cell populations for their survival, proliferation, differentiation and morphogenesis. Wnt signaling has been implicated in a wide array of these biological processes^{2,3}.

Classical signaling is initiated by interaction at the membrane of Wnt ligand with its receptor Frizzled. This activates the intracellular protein disheveled, which prevents a GSK-3 β -mediated complex from phosphorylating β -catenin for degradation. β -catenin is then stabilized in the cytoplasm and translocated to the nucleus in association with Pygo and Lgs proteins⁴. In the nucleus, β -catenin interacts with members of the TCF family of transcription factors for gene regulation. More recently, other "non-canonical" signaling mechanisms have been associated with Wnt binding to its receptor, including Jun-N-terminal kinase (JNK) and calcium release, which facilitate cell movement reminiscent to planar cell polarity (PCP) in drosophila^{5,6}. These alternative pathways appear to be independent of β -catenin activity. Canonical and non-canonical pathways seem to inhibit each other and evidence suggests that they are of critical importance in several stages of kidney development.

Dependence of Wnt signaling for renal tubulogenesis was first demonstrated by *in vitro* induction of metanephric mesenchyme polarization in cells expressing nonrenal Wnt1 or following treatment with lithium chloride, a canonical Wnt activator^{7, 8}. Analysis of mouse embryos has revealed expression and functions of several Wnt in the developing kidneys. Wnt9b is expressed by the ureteric bud and is essential for induction of the mesenchyme⁹. Wnt4 is made by the induced metanephric mesenchyme and is also required for nephrogenesis¹⁰. Furthermore, Wnt11 and Wnt2b have been implicated in the regulation of the ureteric bud branching^{11, 12}. Interestingly, these Wnt have been shown to signal through canonical mechanism but also, at least in some cases, through non-canonical pathways^{9, 13-15}.

The specific pathway stimulated by each Wnt ligands involved in the development of the metanephric kidney is unknown. It was generally thought that the canonical pathway was involved in tubule induction and the non-canonical pathway in ureteric bud branching. However, canonical Wnt signaling in the developing kidneys of *Bat-gal* mice was investigated and showed high level of β -catenin transcriptional activity in the developing collecting ducts but lower levels in the metanephric mesenchyme^{16, 17}. β -catenin activity is rapidly downregulated in maturing nephrons and becomes undetectable in postnatal kidney¹⁶. However, β -catenin plays a second role in epithelia, that is, as a component of adherens junctions¹⁸. Thus, β -catenin has been shown to regulate multiple cellular processes including cell proliferation, survival, adhesion as well as in the maintenance of stem or embryonic precursor cells¹⁹⁻²³.

Assessing the role of β -catenin in renal tissues has been hampered due to early embryonic lethality in null embryos²⁴. To determine directly the role of β -catenin in ureteric bud-derived epithelium compared to mesenchymal origin, tissue-specific ablation studies have recently been undertaken. Loss of β -catenin in ureteric bud lineage causes branching defect^{25, 26}, whereas mesenchyme-specific removal of β -catenin activity blocks induction and formation of renal vesicle²⁷. Altogether, these data suggest a major role of β -catenin in

premature renal epithelium, but its requirement in later stages of kidney development and in adulthood has never been directly investigated *in vivo*.

Here, we address whether β -catenin activity is limited or not to the early kidney development by the generation of two distinct conditional ablations. First, β -catenin inactivation was targeted simultaneously to early stages of ureteric bud and metanephric mesenchyme development, which lead to severe embryonic cystic dysplasia. Second, late stages of tubular maturation were aimed and normal renal organogenesis was observed, whereas progressive loss or dilatation of the papilla was detected postnatally. Our results revealed an essential role for β -catenin in ureteric bud branching and renal epithelial differentiation during kidney development as well as in homeostasis of mature collecting ducts of the papilla in adulthood.

RESULTS

Renal malformations after conditional deletion of β -catenin in early kidney development

To analyze the role of β -catenin in early renal development, we conditionally inactivated β -catenin to the premature epithelium of the ureteric buds as well as to the metanephric mesenchyme by generating $Bmp7^{cre/+}; \beta\text{-cat}^{fl/fl}$ mice. This inactivation occurred in the very first stages of metanephric development at e11.5 and was maintained throughout renal development²⁸. In the F2 generation from $Bmp7^{cre/+}; \beta\text{-cat}^{fl/+}$ and $\beta\text{-cat}^{fl/fl}$ mice backcross, we did not obtain any $Bmp7^{cre/+}; \beta\text{-cat}^{fl/fl}$ adult mice due to premature death at birth associated with severe edema, exencephaly and eyes defects (data not shown). In addition, bilateral kidney size reduction of $Bmp7^{cre/+}; \beta\text{-cat}^{fl/fl}$ newborn mice was observed, which could explain the perinatal lethality by renal insufficiency (data not shown).

Because β -catenin inactivation was targeted *in utero* in $Bmp7^{cre/+}; \beta\text{-cat}^{fl/fl}$ mice, we analyzed the phenotype at embryonic stage e18.5. Here, no embryonic lethality was observed (28% (n=39); expected frequency was 25%). These embryos had body weight comparable to controls, but exhibited the aforementioned anomalies of the body, brain, and eyes (Figure 1A). The kidney size of $Bmp7^{cre/+}; \beta\text{-cat}^{fl/fl}$ embryos was reduced by approximately 6-fold compared to controls (Figure 1B). To establish which renal structures of $Bmp7^{cre/+}; \beta\text{-cat}^{fl/fl}$ embryos were altered, we performed histological analysis of embryonic kidney section at e18.5. At that stage, immature renal structures are normally present in the nephrogenic zone at the cortical periphery and mature nephrons populate the inner corticomedullary region (Figure 2A). In $Bmp7^{cre/+}; \beta\text{-cat}^{fl/fl}$ embryos, we noticed kidney development retardation including the absence of nephrogenic zone and immature nephron structures such as comma- and S-shaped bodies (Figure 2D). Few tubules and glomeruli were observed in corticomedullary region at e18.5, indicating that some nephron maturation has occurred in early organogenesis (Figure 2D). The medulla was made up of undifferentiated mesenchyme, interspersed with branches of collecting duct epithelium.

These branches appeared structurally normal but were reduced in number compared to controls, suggesting a role for β -catenin in ureteric bud branching (Figure 2D). Several cortical tubular dilations as well as tubular and glomerular cysts composed of hyperplastic cells were detected, implying nephron maturation defect (Figure 2E-F). Altogether, conditional loss of β -catenin during early kidney development caused bilateral reduction in kidney size associated with lower number of nephrons formation and cystogenesis, suggesting crucial requirement of β -catenin in normal kidney organogenesis

Dilation or loss of papilla following conditional deletion of β -catenin in renal epithelium

To determine whether β -catenin plays a role in mature renal epithelium *in vivo*, we targeted its inactivation to the ureteric bud and its derivatives from e14.5 as well as to the mature epithelium derived from metanephric mesenchyme (after the S-shaped body phase at around e17.5)²⁹. To do so, we generated *KspCre; β -cat^{fl/fl}* mice by mating *KspCre* and *β -catenin^{fl/fl}* mice. *KspCre; β -cat^{fl/fl}* mice were viable through adulthood without any apparent organ anomalies except for the kidney. Analysis of renal function showed that *KspCre ; β -cat^{fl/fl}* mice at 8 to 12 months of age excreted twice as much urine as controls, but exhibited a normal hematocrit (Table I). The kidney to body weight ratio of these mice was reduced by 15% compared to controls (Table I). This reduction was kidney-specific since the mass of other organs, such as the spleen, was normal (Table I).

Table I : Physiological analysis of *KspCre* ; β -cat^{fl/fl} mice

Mice	Age	<i>n</i>	<u>Mass ratio</u>		<u>Renal Function</u>	
			KW/BW	SW/BW	Urinary volume (ml)	Hematocrit (%)
β -cat ^{fl/fl}	8-12m	8	1.43 ±0.20	0.40 ±0.10	1.03 ±0.54	49.0 ±1.5
<i>KspCre</i> ; β -cat ^{fl/fl}	8-12m	12	1.21 ±0.18 ^a	0.37 ±0.10	2.52 ±0.67 ^b	47.8 ±2.0

Values are means ± standard deviation; KW: kidney weight; SW: spleen weight; BW: body weight.
t test sample; $P \leq 0.05$ was considered significant. ^a $P \leq 0.03$; ^b $P \leq 0.01$.

Next, we sought to detect renal malformations by macroscopic and histological analysis. Interestingly, kidneys from 8 months-old *KspCre*; β -cat^{fl/fl} mice exhibited dilation of the papilla (Figure 3A). Histological analysis revealed a loss of the papilla region, but a normal appearance of the cortex and medulla (Figure 3B-C). Of note, papilla dilation was also observed by renal histological analysis of a 2 weeks-old *KspCre*; β -cat^{fl/fl} mice, suggesting that this malformation appeared early in life (data not shown). To determine if this phenotype came out from defect in the collecting ducts development, kidneys from *KspCre*; β -cat^{fl/fl} (e18.5) embryos were analyzed and no papilla dilation or loss was observed (Figure 3D-E). These data suggest that β -catenin is dispensable for renal epithelium maturation during kidney development, but is essential to the collecting ducts maintenance in the papilla of adult mice.

DISCUSSION

Some evidence proposed that β -catenin-mediated canonical Wnt pathway activates branching morphogenesis of the ureteric buds^{11, 16, 17, 30} as well as metanephric mesenchyme differentiation^{31, 32}. These include genetic studies that reported conditional inactivation of β -catenin in nascent ureteric bud branching^{25, 26} as well as in mesenchymal progenitors²⁷. By the generation of two distinct spatiotemporal ablations, the present study now reveals that, in addition to its function in early kidney development, β -catenin is also essential for the maintenance of the structural integrity of the collecting duct located in the papilla in adulthood.

Double function of β -catenin in embryonic kidney

Kidneys developmental defects observed in *Bmp7^{cre/+}; β -cat^{fl/fl}* embryos could be attributed to the role of β -catenin in both ureteric bud branching and mesenchymal induction and differentiation. These are first data that reported genetic ablation of β -catenin in ureteric bud epithelium and metanephric mesenchyme at the same temporal window of kidney organogenesis. *Bmp7^{cre/+}; β -cat^{fl/fl}* embryos phenocopies part of renal anomalies observed in both mesenchymal progenitor-cell (*Six2TGC; β -cat^{fl/fl}*) and branching ureteric buds (*Hoxb7-Cre-GFP; β -cat^{fl/fl}*)-specific removal of β -catenin²⁵⁻²⁷. Interestingly, the nephrogenesis defect observed in *Bmp7^{cre/+}; β -cat^{fl/fl}* embryos is similar to the entirely lack of an active nephrogenic zone reported for newborn *Six2TGC; β -cat^{fl/fl}* mice²⁷. This block of mesenchymal induction and/or epithelialisation in *Six2TGC; β -cat^{fl/fl}* mice has for consequence a reduction of ureteric branching. This proposes that the significant reduction in the number of branches of collecting duct epithelium observed in *Bmp7^{cre/+}; β -cat^{fl/fl}* embryos could also be a secondary effect. However, this is probably an additive effect, since β -catenin is also inactivated in ureteric bud-derived epithelium, in which an inherent requirement of β -catenin in branching has been demonstrated on cultured explants¹⁶. This is further supported by the severe renal dysplasia of *Hoxb7-Cre-GFP; β -cat^{fl/fl}* embryos,

which show anomalies in the number and morphology of the ureteric bud branching^{25, 26}. In these embryos, transcriptional activity of β -catenin is perturbed for which *Pax2* and *c-Ret* expression is reduced. Another known target of β -catenin could be fibronectin because its knock down in cultured mouse salivary glands, lungs and kidneys greatly decreased epithelial branching morphogenesis³³.

Overall, the renal phenotype of *Bmp7^{cre/+}; β -cat^{fl/fl}* embryos appears more severe than the two previously reported conditional knockout mice separately. The major phenotypic difference is the formation of tubular and glomerular cysts. This cystic epithelium may arise from mesenchymal origin (especially glomerular cysts) but also from the collecting duct, since tubular cysts were mainly located in the medulla. Interestingly, some cysts were detected in collecting duct of *Hoxb7-Cre-GFP; β -cat^{fl/fl}* embryos^{25, 34}. Thus, intrinsic requirement of β -catenin in ureteric-derived epithelium is needed to avoid cystogenesis. By contrast, glomerular cysts caused by loss of β -catenin have never been reported in loss-of-function experiments. Glomerular (or mesenchymal-derived tubules) cyst formation may arise from an impairment of paracrine signal between ureteric epithelium and mesenchyme with both β -catenin deficiency. Morphological and molecular analyses at early stages of kidney development are required to determine the exact mechanism.

Nevertheless, abnormal localization/expression of β -catenin has been implicated in the progression of polycystic kidney disease (PKD)³⁵⁻³⁸ (Couillard *et al.* manuscript in preparation). In those studies, genetic interaction between β -catenin and *Pkd1*, the gene mutated in autosomal dominant PKD type 1, is thought to occur. We now reported that downregulation of β -catenin per se induces cystogenesis and that its level of expression must be tightly regulated for normal kidney development and homeostasis. The control of β -catenin activity could be dependent of canonical *Wnt9b* signaling, since mice with hypomorphic allele of *Wnt9b* have cystic tubules highly reminiscent of polycystic kidney disease³⁹. In contrast, β -catenin upstream signalisation in later stages of development through adulthood is less defined.

Requirement of β -catenin in mature renal epithelium

The dilation or loss of papilla during adulthood in *KspCre; β -cat^{fl/fl}* mice suggests that β -catenin was required for the maintenance or homeostasis of the mature renal epithelium of the collecting ducts. As aforementioned (in the introduction) the canonical β -catenin transcriptional activity is downregulated postnatally¹⁶. Thus, the function of β -catenin at adherens junctions rather than in the canonical Wnt signalization seems to be essential for mature epithelium maintenance. Indeed, requirement of adequate epithelial cell contact for the genito-urinary tract integrity has been proposed since defects in protein components of the focal adhesion complex such as tensin, result in pelvis dilatation⁴⁰. Moreover, a recent study of the *Dlg5*^{-/-} mice has demonstrated renal pelvis dilation due to a deficiency in membrane delivery of cadherin/catenin adhesion complexes⁴¹.

Our data also propose that compensation by the closely related protein, γ -catenin, does not occur at adherens junctions of mature collecting duct epithelium, as opposed to γ -catenin compensation detected in early embryogenesis^{24, 25, 42}. Therefore, epithelial cells lacking β -catenin could have disorganization of intercellular junctions and/or polarity defect. These changes could parallel a decrease in cell-cell adhesion strength and a defect in collecting duct integrity. This may be more pronounced in neonatal kidneys, when the collecting ducts are exposed to high urinary flow, leading to urine leakage and accumulation in the renal papilla and pelvis throughout life.

This phenotype is also related to hydronephrosis which is defined by the enlargement of the kidney, as a result of urine collection in the renal pelvis. Hydronephrosis is associated with a number of congenital abnormalities including vesico-ureteral reflux and hydroureter, which can be caused by physical obstruction. However, in many cases, no physical obstruction could be established, but impairment in pyeloureteral peristalsis was demonstrated⁴³. Inactivation of β -catenin in the pelvis and ureter probably occurred in *KspCre; β -cat^{fl/fl}* mice, since the *KspCre* transgene was expressed in the genito-urinary tract²⁹. Our data suggest that β -catenin could have a role in the pelvis structure integrity or peristalsis. Physiological and molecular analyses are required to investigate the role of β -

catenin in the maintenance of intercellular contacts or in urinary tract function. The *KspCre; β -cat^{fl/fl}* mice could be useful to identify genetic pathways important in urinary tract formation and function.

Taken together, these data support the idea that β -catenin can play a role in mesenchymal differentiation as well as in ureteric buds branching during kidney development. Our results also demonstrated for the first time that, in adulthood, β -catenin is essential for the maintenance and homeostasis of collecting ducts in the papilla.

MATERIALS & METHODS

Transgenic mice

Generation and characterization of *KspCre*, *Bmp7^{cre/+}* mouse (kindly provided by Dr P. Igarashi and Dr. L. Oxburgh) and *β-catenin^{fl/fl}* mouse (The Jackson Laboratory: *Catnb^{tm2Kem}*) have been previously described^{28, 29, 44}. These mice were maintained on a C57BL/6J background. The mating scheme to generate the double transgenic mice (*KspCre*; *β-cat^{fl/fl}* mice) was F1 generation from *KspCre* mice crossed with *β-cat^{fl/fl}* mice and F2 generation from *KspCre*; *β-cat^{fl/+}* (F1) mice crossed with *β-cat^{fl/fl}* mice. Same mating scheme was done to generate *Bmp7^{cre/+}*; *β-cat^{fl/fl}* mice.

Histological analysis

Embryonic and adult kidney tissues were collected and fixed in 4% paraformaldehyde. Paraffin wax-embedded sections (4μm) were hydrated in graded alcohol followed standard hematoxylin & eosine staining.

Statistical analysis

Values were expressed as mean ± standard deviation. Unpaired two-sample Student's t-test was used for statistical analysis; $p < 0.05$ was considered significant.

REFERENCES

1. Saxen, L: *Organogenesis of the kidney*, Cambridge Cambridgeshire, Cambridge University Press 1987.
2. Perantoni, AO: Renal development: perspectives on a Wnt-dependent process. *Semin Cell Dev Biol*, 14:201-8, 2003.
3. Merkel, CE, Karner, CM & Carroll, TJ: Molecular regulation of kidney development: is the answer blowing in the Wnt? *Pediatr Nephrol*, 22:1825-38, 2007.
4. Thompson, B, Townsley, F, Rosin-Arbesfeld, R, Musisi, H & Bienz, M: A new nuclear component of the Wnt signalling pathway. *Nat Cell Biol*, 4:367-73, 2002.
5. Karner, C, Wharton, KA, Jr. & Carroll, TJ: Planar cell polarity and vertebrate organogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 17:194-203, 2006.
6. Pandur, P, Maurus, D & Kuhl, M: Increasingly complex: new players enter the Wnt signaling network. *Bioessays*, 24:881-4, 2002.
7. Davies, JA & Garrod, DR: Induction of early stages of kidney tubule differentiation by lithium ions. *Dev Biol*, 167:50-60, 1995.
8. Herzlinger, D, Qiao, J, Cohen, D, Ramakrishna, N & Brown, AM: Induction of kidney epithelial morphogenesis by cells expressing Wnt-1. *Dev Biol*, 166:815-8, 1994.
9. Carroll, TJ, Park, JS, Hayashi, S, Majumdar, A & McMahon, AP: Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Dev Cell*, 9:283-92, 2005.

10. Stark, K, Vainio, S, Vassileva, G & McMahon, AP: Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature*, 372:679-83, 1994.
11. Lin, Y, Liu, A, Zhang, S, Ruusunen, T, Kreidberg, JA, Peltoketo, H, Drummond, I & Vainio, S: Induction of ureter branching as a response to Wnt-2b signaling during early kidney organogenesis. *Dev Dyn*, 222:26-39, 2001.
12. Majumdar, A, Vainio, S, Kispert, A, McMahon, J & McMahon, AP: Wnt11 and Ret/Gdnf pathways cooperate in regulating ureteric branching during metanephric kidney development. *Development*, 130:3175-85, 2003.
13. Du, SJ, Purcell, SM, Christian, JL, McGrew, LL & Moon, RT: Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol*, 15:2625-34, 1995.
14. Maurus, D, Heligon, C, Burger-Schwarzler, A, Brandli, AW & Kuhl, M: Noncanonical Wnt-4 signaling and EAF2 are required for eye development in *Xenopus laevis*. *Embo J*, 24:1181-91, 2005.
15. Pandur, P, Lasche, M, Eisenberg, LM & Kuhl, M: Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. *Nature*, 418:636-41, 2002.
16. Iglesias, DM, Hueber, PA, Chu, L, Campbell, R, Patenaude, AM, Dziarmaga, AJ, Quinlan, J, Mohamed, O, Dufort, D & Goodyer, PR: Canonical WNT signaling during kidney development. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293:F494-500, 2007.
17. Maretto, S, Cordenonsi, M, Dupont, S, Braghetta, P, Broccoli, V, Hassan, AB, Volpin, D, Bressan, GM & Piccolo, S: Mapping Wnt/beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:3299-304, 2003.

18. Clevers, H: Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127:469-80, 2006.
19. DasGupta, R & Fuchs, E: Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development*, 126:4557-68, 1999.
20. Huelsken, J, Vogel, R, Erdmann, B, Cotsarelis, G & Birchmeier, W: beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*, 105:533-45, 2001.
21. Kielman, MF, Rindapaa, M, Gaspar, C, van Poppel, N, Breukel, C, van Leeuwen, S, Taketo, MM, Roberts, S, Smits, R & Fodde, R: Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. *Nat Genet*, 32:594-605, 2002.
22. Scheller, M, Huelsken, J, Rosenbauer, F, Taketo, MM, Birchmeier, W, Tenen, DG & Leutz, A: Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nat Immunol*, 7:1037-47, 2006.
23. Zechner, D, Fujita, Y, Hulsken, J, Muller, T, Walther, I, Taketo, MM, Crenshaw, EB, 3rd, Birchmeier, W & Birchmeier, C: beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Dev Biol*, 258:406-18, 2003.
24. Haegel, H, Larue, L, Ohsugi, M, Fedorov, L, Herrenknecht, K & Kemler, R: Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development*, 121:3529-37, 1995.

25. Marose, TD, Merkel, CE, McMahon, AP & Carroll, TJ: Beta-catenin is necessary to keep cells of ureteric bud/Wolffian duct epithelium in a precursor state. *Dev Biol*, 314:112-26, 2008.
26. Bridgewater, D & Rosenblum, ND: Beta-catenin controls renal branching morphogenesis and expression of Pax2 and c-Ret. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17:35A, 2006.
27. Park, JS, Valerius, MT & McMahon, AP: Wnt/beta-catenin signaling regulates nephron induction during mouse kidney development. *Development*, 134:2533-9, 2007.
28. Oxburgh, L, Chu, GC, Michael, SK & Robertson, EJ: TGFbeta superfamily signals are required for morphogenesis of the kidney mesenchyme progenitor population. *Development*, 131:4593-4605, 2004.
29. Shao, X, Somlo, S & Igarashi, P: Epithelial-specific Cre/lox recombination in the developing kidney and genitourinary tract. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 13:1837-1846, 2002.
30. Schwab, KR, Patterson, LT, Hartman, HA, Song, N, Lang, RA, Lin, X & Potter, SS: Pygo1 and Pygo2 roles in Wnt signaling in mammalian kidney development. *BMC Biol*, 5:15, 2007.
31. Kuure, S, Popsueva, A, Jakobson, M, Sainio, K & Sariola, H: Glycogen Synthase Kinase-3 Inactivation and Stabilization of beta-Catenin Induce Nephron Differentiation in Isolated Mouse and Rat Kidney Mesenchymes. *J Am Soc Nephrol*, 18:1130-9, 2007.
32. Schmidt-Ott, KM, Masckauchan, TN, Chen, X, Hirsh, BJ, Sarkar, A, Yang, J, Paragas, N, Wallace, VA, Dufort, D, Pavlidis, P, et al.: beta-catenin/TCF/Lef controls a

- differentiation-associated transcriptional program in renal epithelial progenitors. *Development*, 134:3177-90, 2007.
33. Sakai, T, Larsen, M & Yamada, KM: Fibronectin requirement in branching morphogenesis. *Nature*, 423:876-81, 2003.
 34. Bridgewater, D, Athaide, VC & Rosenblum, ND: Beta-catenin deficiency or overexpression induces renal malformation in vivo. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16:5A, 2005.
 35. 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.
 36. Roitbak, T, Ward, CJ, Harris, PC, Bacallao, R, Ness, SA & Wandering-Ness, A: A polycystin-1 multiprotein complex is disrupted in polycystic kidney disease cells. *Mol. Biol. Cell*, 15:1334-1346, 2004.
 37. 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*, 59:3875-9, 1999.
 38. 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*, 20:5972-5981, 2001.
 39. Karner, C, Wharton, KA & Carroll, TJ: Apical-basal polarity, Wnt signaling and vertebrate organogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 17:214-22, 2006.

40. Lo, SH, Yu, QC, Degenstein, L, Chen, LB & Fuchs, E: Progressive kidney degeneration in mice lacking tensin. *J Cell Biol*, 136:1349-61, 1997.
41. Nechiporuk, T, Fernandez, TE & Vasioukhin, V: Failure of epithelial tube maintenance causes hydrocephalus and renal cysts in *Dlg5*^{-/-} mice. *Dev Cell*, 13:338-50, 2007.
42. Murtaugh, LC, Law, AC, Dor, Y & Melton, DA: Beta-catenin is essential for pancreatic acinar but not islet development. *Development*, 132:4663-74, 2005.
43. Chang, CP, McDill, BW, Neilson, JR, Joist, HE, Epstein, JA, Crabtree, GR & Chen, F: Calcineurin is required in urinary tract mesenchyme for the development of the pyeloureteral peristaltic machinery. *J Clin Invest*, 113:1051-8, 2004.
44. Brault, V, Moore, R, Kutsch, S, Ishibashi, M, Rowitch, DH, McMahon, AP, Sommer, L, Boussadia, O & Kemler, R: Inactivation of the beta-catenin gene by *Wnt1*-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development*, 128:1253-64, 2001.

FIGURES

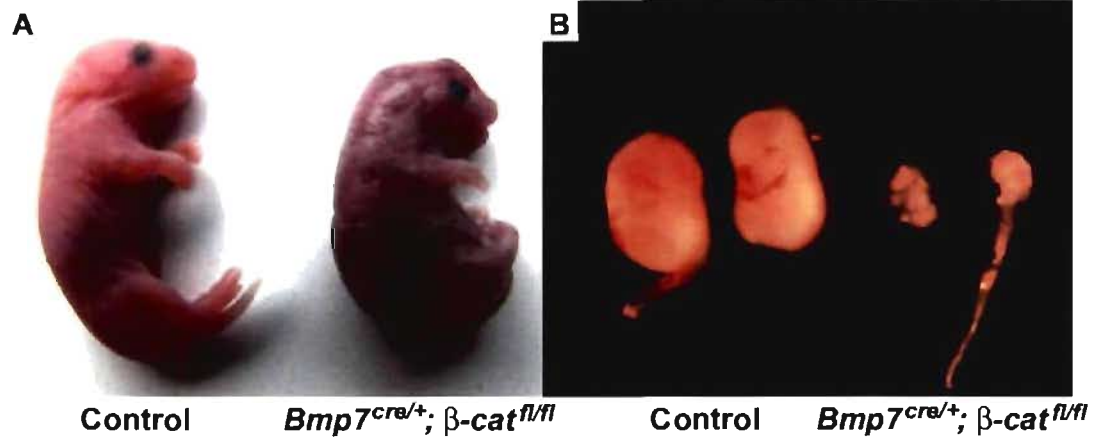


Figure 1: Developmental defects observed in $Bmp7^{cre/+}; \beta\text{-cat}^{fl/fl}$ embryos.

(A) Control embryos (left) and $Bmp7^{cre/+}; \beta\text{-cat}^{fl/fl}$ embryos (right) at 18.5 days of gestation. Note severe edema, exencephaly and eye defects in $Bmp7^{cre/+}; \beta\text{-cat}^{fl/fl}$ embryos. (B) Bilateral reduction in kidney size of $Bmp7^{cre/+}; \beta\text{-cat}^{fl/fl}$ embryos (right) compared to control (left) at e18.5.

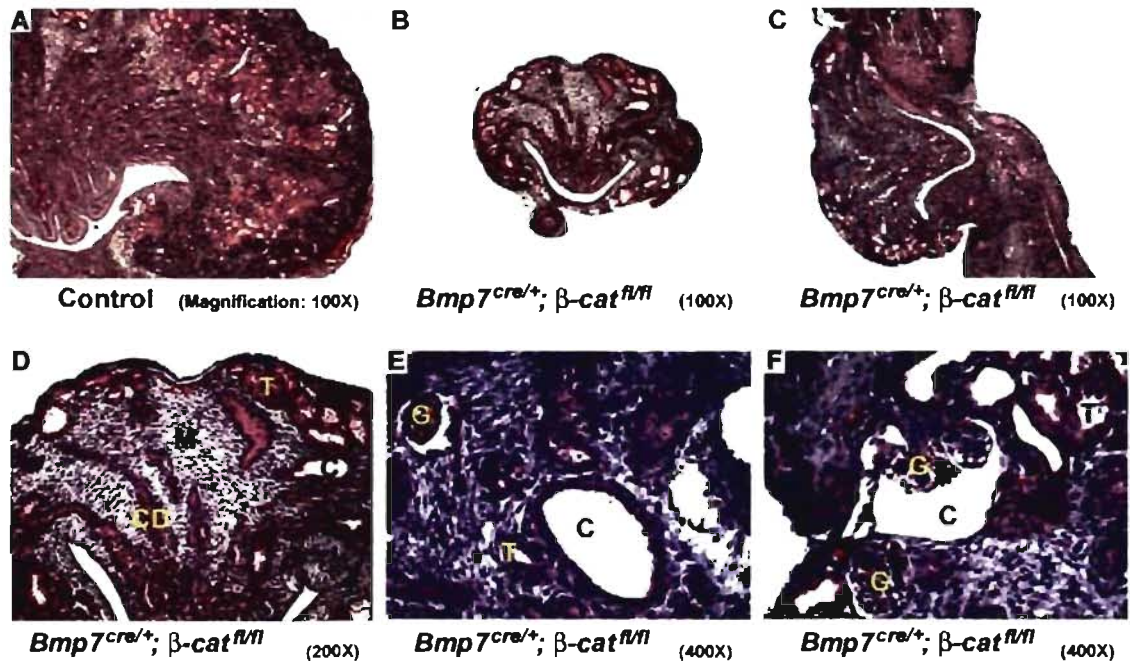


Figure 2: Renal histological anomalies in kidneys of $Bmp7^{cre/+}; \beta-cat^{fl/fl}$ embryos.

(A) Sagittal section of kidney from control embryo at e18.5 with nephrogenic zone at the cortical periphery and mature nephrons in the inner corticomedullary region. (B-C) Renal sagittal sections of $Bmp7^{cre/+}; \beta-cat^{fl/fl}$ embryos at e18.5. Same magnification (100X) was used to compare kidney size reduction between control (A) and two different $Bmp7^{cre/+}; \beta-cat^{fl/fl}$ embryos (B, C). (D-F) Higher magnification of $Bmp7^{cre/+}; \beta-cat^{fl/fl}$ kidneys. (D) Absence of nephrogenic zone with a medulla composed of undifferentiated mesenchyme (M) interspersed with branches of collecting duct epithelium (CD). (E) Tubular cysts (C) lined by hyperplastic cells. (F) Glomerular cysts (C). T: tubule; G: glomerulus.

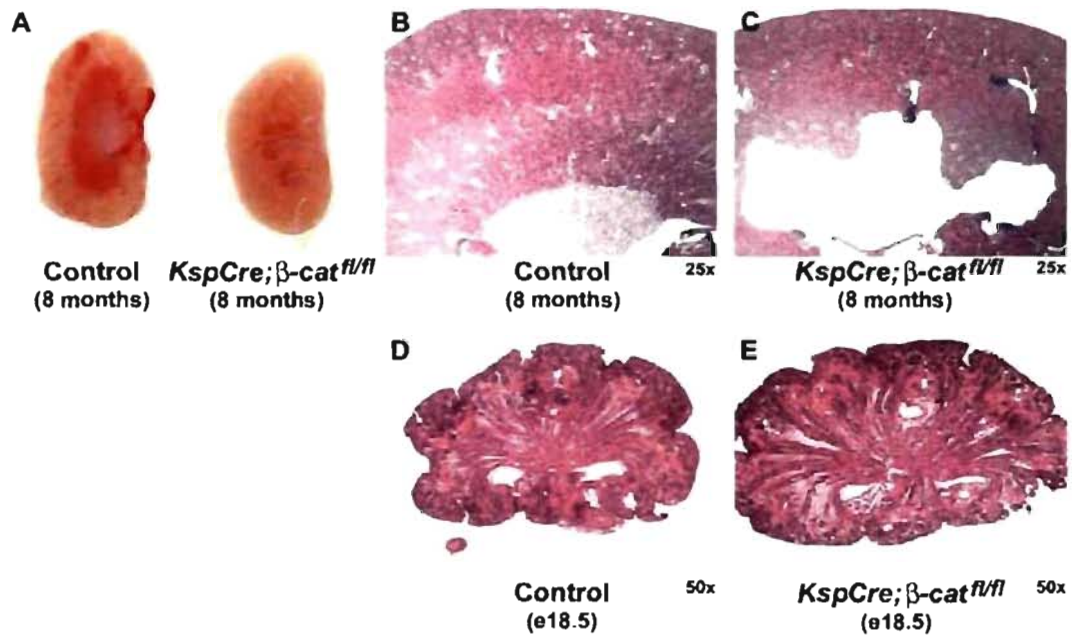


Figure 3: Dilution or loss of papilla in *KspCre; β-cat^{fl/fl}* adult mice.

(A) One half of kidney from control (left) and *KspCre; β-cat^{fl/fl}* (right) adult mice with dilation or loss of papilla. (B, C) Renal histological analysis of control (B) and *KspCre; β-cat^{fl/fl}* (C) adult mice with dilation or loss of papilla. (D, E) Normal renal histology of *KspCre; β-cat^{fl/fl}* embryo (E) compared to control (D) at e18.5.

III DISCUSSION

L'ADPKD est souvent décrite comme une persistance du programme de développement fœtal et l'étude des gènes exprimés au cours de l'organogenèse rénale peut nous renseigner sur leur rôle dans cette maladie. Cette thèse présente justement le rôle de deux gènes soit *c-myc* et β -caténine, dont l'expression est élevée dans les reins ADPKD tout comme dans le développement rénal. Nos travaux tendent à démontrer que ces gènes stimulent une voie de signalisation commune afin d'induire la prolifération et l'apoptose de l'épithélium kystique. Cependant, leurs rôles respectifs dans le développement et l'homéostasie rénal semblent plutôt divergents.

III.1 Rôle de *c-myc* dans le développement rénal

Au moment de débiter ces travaux, le rôle de *c-myc* dans le développement rénal et l'ADPKD était peu connu. Les seules données disponibles dans la littérature sur le rôle physiologique de *c-myc* dans le rein étaient basées sur des études d'expression de *c-myc*. Il avait été démontré que son expression corrèle avec le patron de cellules en prolifération et cesse suite à la différenciation terminale de l'épithélium tubulaire rénal, suggérant un rôle précoce de *c-myc* dans la survie du mésenchyme métanéphrique (Mugrauer and Ekblom, 1991; Schmid et al., 1989). Toutefois, l'étude de son rôle dans l'organogenèse rénale a été limitée par la létalité embryonnaire précoce de la souris *c-myc*^{-/-} au jour embryonnaire e10.5, soit avant l'induction du métanéphros (Davis et al., 1993). Nous avons donc eu recours au système Cre/LoxP pour réaliser la première étude génétique du rôle de *c-myc* dans le développement et l'homéostasie rénale à partir de e11.5 à l'adulte. Voir l'annexe 1 pour une liste complète des souris transgéniques qui expriment la Cre recombinase dans les différentes populations cellulaires rénales.

III.1.1 La perte de *c-myc* cause une réduction de la taille des reins associée à l'hypoplasie rénale

Notre étude a déterminé un rôle essentiel de *c-myc* dans le développement rénal puisque son inactivation dans le mésenchyme métanéphrique des souris *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* cause une réduction significative de la taille des reins dont l'architecture rénale est préservée, une condition associée à l'hypoplasie rénale. Celle-ci se définit par la présence d'un nombre réduit de néphrons structurellement normaux. La sévérité peut varier entre l'aplasie (une perte complète de néphrogenèse) à une hypoplasie rénale subtile. L'hypoplasie rénale est observée chez les embryons *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* à partir du jour e16.5 et persiste à l'âge adulte. La sévérité de la perte de poids du rein chez ces embryons est similaire à celle retrouvée chez les souris adultes avec une diminution d'environ 20%. Étant donné que le poids des reins des souris *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* ne tend pas à rattraper celui des contrôles au cours de la vie adulte, le rein semble posséder une capacité de régénérescence limitée au cours de la vie adulte dont les contraintes de croissance intrinsèques sont dictées lors du développement. Contrairement à la capacité de régénération du foie, celle du rein semble plutôt s'apparenter au pancréas dont la taille est limitée par un nombre prédéfini de cellules progénitrices (Stanger et al., 2007). Nos données ne nous permettent cependant pas d'écarter l'hypothèse que *c-myc* soit requis pour stimuler la prolifération des cellules progénitrices rénales avant e16.5. Si tel est le cas, l'absence de *c-myc* pourrait causer une diminution de cette population cellulaire dont l'effet sur la taille rénale est détectable seulement après e15.5. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par une analyse de marqueur de cellules progénitrices rénales comme *Six2* et *Cited1* sur des embryons *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* avant e15.5 (Plisov et al., 2005; Self et al., 2006). Une coopération potentielle entre *c-myc* et β -caténine dans les cellules progénitrices rénales sera discutée à la section III.3.1.

Outre une fonction potentielle de *c-myc* dans les cellules progénitrices rénales, nos résultats suggèrent un rôle non essentiel de *c-myc* dans le mésenchyme métanéphrique précoce. Le

développement rénal des souris $Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}$ est normal avant e16.5 même si l'expression endogène de $c-myc$ et sa délétion dans la souris $Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}$ sont présentes dans les premiers moments d'induction du mésenchyme. Pourtant, l'efficacité de recombinaison du transgène $Bmp7^{cre/+}$ a clairement été démontrée dans le mésenchyme non-induit à e11.5 et en condensation à e12 et e13.5 à l'aide de la souris rapporteuse ROSA26^R (Oxburgh et al., 2004; Soriano, 1999).

Néanmoins, d'autres membres de la famille *Myc*, comme *N-myc*, sont exprimés au cours du développement précoce du rein et colocalisent avec l'expression de $c-myc$ (Mugrauer and Ekblom, 1991). Une compensation par *N-myc* peut donc survenir suite à la perte de $c-myc$ dans le mésenchyme métanéphrique, tel que démontré dans d'autres organes (Aubry and Charron, 2000; Knoepfler et al., 2002; Malynn et al., 2000). Cette compensation expliquerait l'absence de phénotype rénal observée avant e16.5 chez les embryons $Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}$. De plus, l'hypoplasie rénale des embryons $Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}$ est similaire à celle retrouvée chez les embryons porteurs des allèles hypomorphes de *N-myc* ($N-myc^{H/H}$) où les embryons à e18.5 démontrent une réduction de la taille des reins de 25% associée à une diminution du taux de prolifération cellulaire en absence d'augmentation des niveaux d'apoptose (Bates et al., 2000). Ces données suggèrent que $c-$ et *N-myc* partagent les mêmes fonctions au cours du développement rénal. Toutefois, *N-myc* joue un rôle essentiel dans le développement précoce du rein étant donné que l'hypoplasie rénale des embryons $N-myc^{H/H}$ est détectable à partir de e13.5 où il semble y avoir absence de compensation par $c-myc$ (Bates et al., 2000). En comparaison, nos données sur les reins embryonnaires $Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}$ suggèrent qu'aucune compensation par *N-myc* ne survient après e15.5. D'ailleurs, *N-myc* ne peut pas compenser le rôle de $c-myc$ dans la réduction de la masse du corps des embryons $Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}$ après e15.5, tel que démontré précédemment chez d'autres mutants de $c-myc$ (Malynn et al., 2000; Trumpp et al., 2001). $c-Myc$ semble donc réguler la prolifération cellulaire d'une poussée de croissance tardive (après e15.5) du rein et même de l'organisme en général pendant

l'embryogenèse, une activité qui de toute évidence n'est pas redondante avec celle de *N-myc*.

Ainsi, nos résultats suggèrent que *c-myc* n'est pas essentiel à l'induction du mésenchyme avant e16.5, mais semble le devenir par la suite. D'un point de vue morphologique, le développement rénal se divise en deux étapes dont l'âge embryonnaire e16.5 semble être un point charnière. Avant e16.5, le bourgeon urétéral subit plusieurs branchements dichotomiques où 85% des branchements qui caractérisent le développement rénal murin sont effectués. Par contre, cette étape est accompagnée par un taux de néphrogenèse inégal par rapport au nombre de branchement déjà achevé, où seulement 70% des branchements formeront un néphron. Par la suite, une diminution du nombre de branchement et une accélération de la néphrogenèse sont observés entre e16.5 et la naissance, suggérant que le nombre de néphron induit par chaque branchement n'est pas constant (Cebrian et al., 2004). Nos données suggèrent que *c-myc* est important lors de cette dernière étape pour soutenir le taux adéquat de prolifération cellulaire afin d'obtenir le nombre requis de néphron. L'absence de *c-myc* causerait donc un ralentissement de cette néphrogenèse tardive sans la bloquer totalement et expliquerait la diminution du nombre de néphrons associée à une histologie et une densité glomérulaire normale observées dans les embryons *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* à e18.5.

Ainsi, l'effet de *c-myc* sur la prolifération du mésenchyme semble avoir des conséquences paracrines sur une diminution tardive du nombre de branchement du bourgeon urétéral. Le mécanisme d'un tel effet paracrine demeure inconnu, mais pourrait être due à la stimulation par *c-myc* de la sécrétion de facteurs de croissance ou de signaux mitotiques importants pour la maturation tubulaire, incluant les membres de la famille Wnt, Tgf- β (Bmp) et Fgf (Perantoni, 2003). Parmi ces voies, celle de Wnt/ β -caténine est particulièrement intéressante, puisque les souris mutantes pour différentes composantes de la voie des Wnt incluant *Wnt4*, *Wnt11* et *Pygo2* développent une hypoplasie rénale comparable à celle des souris *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* (voir l'annexe 2 pour un répertoire des modèles murins

d'hypoplasie rénale) (Hu and Rosenblum, 2005; Majumdar et al., 2003; Schwab et al., 2007; Stark et al., 1994). Récemment, plusieurs études se sont intéressées au rôle de la voie canonique Wnt/ β -caténine dans le développement rénal, dont la notre (chapitre II.4). Nous avons analysé le rôle de la β -caténine à l'aide d'une approche de délétion conditionnelle semblable à celle effectuée pour étudier la fonction de *c-myc* dans le développement du rein.

III.2 Rôle de la β -caténine dans le développement rénal

Des études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que le branchement du bourgeon urétéral ainsi que l'induction et la différenciation du mésenchyme métanéphrique sont en partie dépendants de la voie canonique Wnt/ β -caténine (Davies and Garrod, 1995; Herzlinger et al., 1994; Iglesias et al., 2007; Kispert et al., 1998; Kuure et al., 2007; Park et al., 2007; Schmidt-Ott et al., 2007; Schwab et al., 2007). Cependant, l'implication de cette voie dans l'épithélium rénal mature demeure inconnue. Par deux approches spatio-temporellement distinctes d'ablation génétique, nous avons déterminé le rôle essentiel de la β -caténine dans le rein embryonnaire, mais également dans l'homéostasie des tubules collecteurs de la papille au courant de la vie adulte.

La β -caténine joue un rôle essentiel au cours du développement rénal puisque son inactivation chez les embryons *Bmp7^{cre/+}; β -cat^{fl/fl}* résulte en une hypoplasie sévère associée à la formation de kystes. L'absence d'une zone néphrogénique chez ces embryons à e18.5, suggère un rôle de la β -caténine dans l'induction et la différenciation du mésenchyme. Il est important de noter que l'ablation de la β -caténine ne semble pas survenir dans la totalité du mésenchyme métanéphrique puisque plusieurs tubules et glomérules sont formés à e18.5. Ce même phénotype est d'ailleurs retrouvé chez un autre mutant conditionnel de la β -caténine, la souris *Six2TGC; β -cat^{fl/fl}*, où uniquement le mésenchyme est ciblé (Park et al., 2007).

De plus, les embryons *Bmp7^{cre/+}; β -cat^{fl/fl}* démontrent des défauts de structures rénales similaires à ceux observés chez les embryons mutants de *Wnt9b* ou *Wnt4*, incluant une perte de MET, de corps en virgule et en S (Carroll et al., 2005; Itaranta et al., 2002; Kispert et al., 1998; Lyons et al., 2004; Stark et al., 1994). *Wnt9b* ou *Wnt4* sont potentiellement des activateurs majeurs de la voie canonique des Wnt dans l'induction et/ou l'épithélialisation du mésenchyme métanéphrique. Quelque soit le ou les ligands Wnt responsable(s) de l'activation de la β -caténine, nos données proposent que la voie canonique des Wnt est nécessaire au bon déclenchement de la néphrogenèse.

Ceci implique également un rôle de la β -caténine dans la morphogénèse de branchement du du bourgeon urétéral pour expliquer la réduction du nombre de néphron chez les embryons *Bmp7^{cre/+}; β -cat^{fl/fl}* (Iglesias et al., 2007; Lin et al., 2001; Maretto et al., 2003; Schwab et al., 2007). Deux autres groupes ont aussi confirmé ce rôle, cette fois-ci en inactivant la β -caténine uniquement dans le bourgeon urétéral chez les embryons *Hoxb7-Cre-GFP; β -cat^{fl/fl}*. Les reins de ces embryons sont aplasiques ou démontrent une sévère dysplasie associée à des anomalies de morphologie du branchement du bourgeon urétéral (Bridgewater and Rosenblum, 2006; Carroll and McMahon, 2004). De plus, des tubules collecteurs kystiques ont été détectés chez ces embryons. Outre les kystes glomérulaires, l'origine tubulaire des kystes observés chez les embryons *Bmp7^{cre/+}; β -cat^{fl/fl}* n'a pas été investiguée, mais leur présence dans la médulla suggère une provenance du système collecteur.

Nous avons également inactivé la β -caténine dans l'épithélium du bourgeon urétéral chez la souris *KspCre; β -cat^{fl/fl}*, mais aucune hypoplasie ou dysplasie rénale n'a été observée au cours de l'embryogenèse. Cette absence de phénotype est probablement dûe au fait que le transgène *KspCre* cible principalement l'épithélium rénal mature plutôt que l'épithélium du bourgeon urétéral en développement. Ces données sont en accord avec l'activité transcriptionnelle de la β -caténine qui est principalement détectée aux extrémités des bourgeons urétéraux, alors qu'elle diminue dans le tronc (Iglesias et al., 2007; Maretto et

al., 2003) (voir annexe 3), suggérant que l'activité de la voie canonique est requise pour le branchement et non pour le maintien de l'épithélium une fois formé.

Néanmoins, nos résultats proposent que l'activité de la β -caténine est essentielle au développement du mésenchyme et de l'épithélium immature au cours de l'organogenèse rénale.

III.3 Rôle de la voie β -caténine/*c-myc* dans le développement rénal

Une corrélation semble exister entre les niveaux d'expression de la β -caténine et *c-myc* dans différentes pathologies, mais peu d'évidences ont été rapportées au niveau physiologique sur l'interaction de ces deux gènes dans une voie de signalisation commune (Hu and Rosenblum, 2005; Sansom et al., 2007). Un exemple intéressant est l'épithélium intestinal où un phénotype semblable sur la réduction de la prolifération des cellules souches a été observé suite à l'inactivation conditionnelle respective de la β -caténine et de *c-myc*. Toutefois, ces deux gènes semblent posséder certaines fonctions divergentes, entre autre en ce qui attrait à la survie des cellules intestinales où seule la perte de la β -caténine (et non celle de *c-myc*) induit l'apoptose (Ireland et al., 2004; Muncan et al., 2006). Pour ce qui est du rein, l'inactivation respective de *c-myc* et β -caténine dans le mésenchyme métanéphrique des embryons *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}* et *Bmp7^{cre/+}; β -cat^{fl/fl}* démontre dans les deux cas, une diminution de la taille des reins. Cependant, la malformation rénale des embryons *Bmp7^{cre/+}; β -cat^{fl/fl}* est nettement plus sévère que celle des embryons *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}*, suggérant que *c-myc* et β -caténine ne partagent pas toutes les mêmes fonctions dans le développement du rein. β -caténine et *c-myc* peuvent partager la même activité de régulateur transcriptionnelle où environ 60% des gènes cibles de la β -caténine sont dépendants de *c-myc* (Sansom et al., 2007). Par contre, le rôle de la β -caténine dans la stabilisation des jonctions adhérentes pourrait aussi expliquer cette différence de sévérité phénotypique. D'ailleurs, cette double fonction de la β -caténine, soit aux jonctions

cellulaires et dans la transcription génique, rend plus complexe l'interprétation des résultats obtenus suite à sa délétion. D'autant plus qu'une compensation par la γ -caténine (plakoglobine) peut survenir aux jonctions adhérentes, mais également au niveau transcriptionnelle sur le promoteur de *c-myc* (Haegel et al., 1995; Kleber and Sommer, 2004). Cette compensation pourrait expliquer en partie la formation de certains néphrons chez les embryons *Bmp7^{cre/+}; β -cat^{fl/fl}*. De manière intéressante, suite à la délétion de la β -caténine dans le bourgeon urétéral chez les embryons *Hoxb7cre; β -cat^{fl/fl}*, les jonctions adhérentes et cellulaires sont intactes dans l'épithélium en branchement, suggérant une compensation par la γ -caténine. Toutefois, aucune compensation n'a été détectée au niveau transcriptionnelle puisque les reins de ces embryons démontrent une diminution d'expression de gènes cibles de la β -caténine comme *Pax2* et *c-Ret* (Bridgewater and Rosenblum, 2006). Ainsi, la β -caténine contrôle le branchement du bourgeon urétéral au niveau transcriptionnelle indépendamment de *c-myc* puisque ce dernier n'est pas exprimé dans le bourgeon urétéral. La coopération entre β -caténine et *c-myc* se ferait plutôt dans le mésenchyme ou même au niveau des cellules souches ou progénitrices rénales.

III.3.1 Coopération de la voie β -caténine/*c-myc* dans la prolifération et le maintien des cellules souches rénales

Dans le rein adulte, des cellules souches restent à être clairement identifiées, mais la papille est potentiellement l'endroit où la niche de cellules souches rénales se trouve (Oliver et al., 2004). L'activité de ces cellules pourrait être régulée par *c-myc* et la β -caténine puisqu'il existe des évidences que ces deux gènes ont un rôle dans le renouvellement des cellules souches de certains tissus (Cartwright et al., 2005; Murphy et al., 2005). De plus, c-Myc joue un rôle critique dans la reprogrammation de cellules somatiques en cellules souches et fait partie des quatre facteurs de pluripotences (*c-Myc*, *Oct4*, *Sox2* et *Klf4*) (Takahashi and Yamanaka, 2006). *Oct4* est aussi un marqueur de cellules progénitrices rénales, suggérant que *c-Myc* pourrait jouer un rôle semblable dans le rein (Gupta et al., 2006). De plus, *Oct4*

peut lier le promoteur de *c-myc* ainsi que celui de certains ligands *Wnt* et leurs récepteurs *Frizzled* pouvant amplifier la réponse de pluripotence (Katoh and Katoh, 2007a; Katoh and Katoh, 2007b; Thompson, 1998). Oct4 et c-Myc sont deux marqueurs de pluripotence régulés négativement par GSK3 β dont l'inhibition par le lithium ou le 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO) active la voie des Wnt et maintien le phénotype dédifférencié des cellules souches (Sato et al., 2004; Sears et al., 2000; Sumi et al., 2007). D'ailleurs, la surexpression rénale de *c-myc* est associée à un état cellulaire non différencié de l'épithélium kystique des souris transgéniques SBM (Trudel et al., 1998). À l'inverse, l'absence de *c-myc* ou l'inhibition de la voie des Wnt peut induire une différenciation prématurée des progéniteurs tel que démontré dans l'épithélium intestinal (Pinto et al., 2003). Ce mécanisme pourrait aussi survenir dans l'épithélium rénal, expliquant ainsi l'hypoplasie rénale des souris *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}*. Cette hypothèse pourrait être vérifiée suite à l'utilisation de marqueurs de différenciation.

III.3.1.1 Rôle de la voie β -caténine/c-myc dans la niche de cellules souches rénales

Il a été proposé que *c-myc* joue un rôle crucial dans la régulation de la balance entre le renouvellement des cellules souches et leur différenciation, probablement en contrôlant l'interaction avec leur niche (Wilson et al., 2004). La localisation et la mobilisation des cellules souches dans la niche sont maintenues par l'expression de protéines d'ancrage comme la N-cadhérine et plusieurs intégrines dont l'expression est régulée négativement par c-Myc (Arnold and Watt, 2001; Frye et al., 2003; Wilson et al., 2004). Le rôle de *c-myc* dans la mobilisation des cellules souches de la niche rénale n'a pas encore été étudié. Cependant, les gènes régulés négativement par *c-myc* comme les cadhérines et les intégrines jouent un rôle important dans la tubulogenèse, suggérant que leur expression peut être contrôlée par *c-myc* dans les cellules souches rénales (Muller et al., 1997; Nouwen et al., 1993).

Ces mêmes cadhérines contrôlent aussi la stabilisation de la β -caténine. La perte de contacts cellulaires, due entre autre à la modification d'expression des cadhérines, provoque la translocation nucléaire de la β -caténine, suggérant une implication de cette

voie dans la mobilisation des cellules souches (Nelson and Nusse, 2004). Un tel rôle pour la β -caténine n'a pas encore été analysé dans le rein. Par contre, l'activité transcriptionnelle de la β -caténine a été examinée dans les reins des souris Tcf-LacZ qui expriment le gène rapporteur β -galactosidase en réponse à l'activité de la voie canonique des Wnt (Iglesias et al., 2007; Liu et al., 2003). Chez les embryons Tcf-LacZ, le signal est retrouvé dans la zone de néphrogenèse et est associé aux tubules en formation. Chez un rein adulte, le signal est peu ou pas détecté dans le cortex, mais plutôt dans la papille où se trouve potentiellement la niche des cellules souches rénales (voir annexe 3). Ces données suggèrent que l'activité transcriptionnelle de la β -caténine est stimulée dans les cellules souches rénales. Une analyse plus en détails de la co-expression de la β -caténine et *c-Myc* ou des marqueurs de cellules souches rénales comme Oct-4, Six2 et Cited-1 permettrait de vérifier cette hypothèse. Ainsi, la réduction de la taille des reins suite à la délétion conditionnelle de β -caténine dans la souris *BMP7^{Cre/+}; β -cat^{fl/fl}*, pourrait être causée par une perte d'activité des cellules souches rénales. L'étude du développement rénal précoce des embryons *BMP7^{Cre/+}; β -cat^{fl/fl}* doit donc être entreprise.

Ce rôle de la β -caténine dans l'activité des cellules souches rénales pourrait être également retrouvé à l'âge adulte et expliquer la perte de cellules de la papille dans les reins des souris *KspCre; β -cat^{fl/fl}*. Cependant, cette activité semble indépendante de l'expression de *c-myc* puisque son inactivation chez la souris *KspCre; c-myc^{fl/fl}* n'affecte en aucun cas l'intégrité de la papille.

III.3.2 Différents rôles de la β -caténine et de *c-myc* dans l'épithélium rénal mature

Au cours de l'embryogenèse, l'expression de la β -caténine et de *c-myc* n'est pas essentielle au développement de l'épithélium rénal mature puisqu'aucun phénotype rénal n'a été observé suite à leur inactivation respective chez les embryons *KspCre; β -cat^{fl/fl}* et *KspCre; c-myc^{fl/fl}*. Cependant, au cours de la vie adulte, l'expression de la β -caténine semble

nécessaire à l'intégrité des tubules collecteurs de la papille puisqu'il y a perte ou dilatation de la papille dans les reins des souris *KspCre; β -cat^{fl/fl}*. Par contre, *c-myc* n'est pas une cible transcriptionnelle de choix puisqu'aucun phénotype n'a été recensé au niveau de la papille des reins des souris *KspCre; c-myc^{fl/fl}* adultes. Il se peut même que ce ne soit pas l'activité transcriptionnelle de la β -caténine en général, mais plutôt son rôle dans l'adhésion cellulaire qui soit requis pour le maintien et l'homéostasie de l'épithélium rénal de la papille. Cette hypothèse est d'ailleurs supportée par une étude récente sur les embryons *Dgl5^{-/-}* dans lesquels une dilatation de la papille est causée par une déficience dans le transport des complexes E-cadhérine/caténine aux jonctions adhérentes (Nechiporuk et al., 2007). Ainsi, une perte de la β -caténine dans l'épithélium peut causer une désorganisation des jonctions intercellulaires et du cytosquelette, fragilisant l'intégrité du système collecteur. Ce phénotype devient plus marquant après la naissance où les tubules collecteurs sont exposés à un courant urinaire plus fort pouvant causer des fuites et une accumulation d'urine dans la papille et le pelvis. Ce phénomène est associé à de l'hydronéphrose qui se définit par un élargissement du rein suite à l'accumulation d'urine dans le pelvis. Cela peut-être causé par une obstruction de l'uretère ou à un défaut dans le péristaltisme de ce dernier (Chang et al., 2004). Une hydronéphrose causée par la perte de la β -caténine dans le pelvis et l'uretère des souris *KspCre; β -cat^{fl/fl}* est plausible puisque le transgène *KspCre* est exprimé dans le tractus génito-urinaire (Shao et al., 2002). C'est d'ailleurs l'explication évoquée par Gresh *et al.* qui ont observé une dilatation bilatérale de l'uretère dans les souris *KspCre; Hnf1 β ^{fl/fl}* (Gresh et al., 2004). Des études physiologiques et moléculaires sur les reins des souris *KspCre; β -cat^{fl/fl}* sont nécessaires pour découvrir la cause de cette perte ou de la dilatation de la papille. Ces souris peuvent donc s'avérer très utiles à l'étude des mécanismes impliqués dans l'intégrité du tractus urinaire.

Quant aux souris *KspCre; c-myc^{fl/fl}*, l'absence de phénotype rénal permet l'utilisation de celles-ci afin d'analyser le rôle de *c-myc* dans des pathologies rénales adultes associées à une surexpression de *c-myc* comme certaines formes de cancer du rein ou la polykystose

rénale (chapitre II.3) (Kinouchi et al., 1989; Lanoix et al., 1996; Lovisolo et al., 2006; Yao et al., 1988).

III.4 Rôle de *c-myc* et de la β -caténine dans l'ADPKD

Alors que la voie canonique des Wnt est indispensable au développement précoce du rein, une persistance de son activité à des stades plus tardifs du développement déclenche la formation de kystes (Qian et al., 2005; Romagnolo et al., 1999; Trudel et al., 1991). D'ailleurs, la surexpression de la β -caténine et plusieurs de ses gènes cibles, dont *c-myc*, a été rapportée dans des reins de patients d'ADPKD et de modèles murins (Cowley et al., 1993; Cowley et al., 1987; Lanoix et al., 1996; Lin et al., 2003; Qian et al., 2005; Song et al., 2006; Sorenson, 1999; Thivierge et al., 2006). De manière intéressante, la surexpression en souris transgénique de *Pkd1*, β -caténine ou *c-myc* indépendamment, est suffisante pour causer la kystogenèse (Saadi-Kheddouci et al., 2001; Thivierge et al., 2006; Trudel et al., 1991). La surexpression de la β -caténine et de *c-myc* observée dans les reins de souris *SBPkd1_{TAG}* suggère que *Pkd1*, β -caténine et *c-myc* régulent une voie de signalisation commune ou additive. La perturbation d'une de ces voies déclencherait la formation de kystes.

III.4.1 La voie β -caténine/*c-myc* est impliquée dans le déclenchement de la kystogenèse

Nos données suggèrent que la voie β -caténine/*c-myc* est requise pour l'initiation plutôt que le maintien de la croissance kystique. Premièrement, seuls les kystes de petites tailles, donc relativement jeunes, démontrent une activité transcriptionnelle de la β -caténine. Par contre, aucun signal n'a été observé dans des kystes étant dans un état avancé, c'est-à-dire possédant un volume plus grand que la moyenne et bordés de cellules épithéliales aplaties souvent associées à une dédifférenciation. Deuxièmement, un rôle de *c-myc* dans le déclenchement de la kystogenèse est supporté par la réduction du nombre de kystes plutôt que leurs tailles dans les souris *SBPkd1_{TAG}; Ksp/Cre; c-myc^{fl/fl}*. Il est cependant important

de noter que la complémentation phénotypique incomplète chez ces souris pourrait être due au fait que l'évènement de recombinaison Cre-spécifique cible spatio-temporellement qu'une mince partie de l'épithélium rénal kystique. En d'autres termes, les kystes observés seraient issus d'un épithélium n'exprimant pas le transgène Ksp/Cre ou de façon tardive, soit après le déclenchement de la kystogenèse. Ainsi, une fois la kystogenèse provoquée, sa progression semble irréversible suite à l'inactivation de la voie β -caténine/*c-myc*. Un parallèle peut être fait avec le rôle de *c-myc* dans la genèse de plusieurs cancers alors que sa fonction n'est plus requise par la suite pour le maintien de la croissance tumorale. Le rôle de *c-myc* dans l'induction de l'instabilité génomique semble en partie responsable de ce phénomène (Adhikary and Eilers, 2005; Felsher and Bishop, 1999b; Karlsson et al., 2003; Soucek and Evan, 2002). Dans la PKD, qui possède plusieurs caractéristiques tumorales, la surexpression de *c-myc* pourrait causer une instabilité génomique à laquelle le gène *Pkd1* est particulièrement sensible (Blaszak et al., 1999; Grantham, 1990). D'ailleurs, il a été proposé qu'une thérapie de la PKD devrait se baser sur les protocoles utilisés pour traiter les néoplasies, dont certains ciblent directement ou indirectement la voie β -caténine/*c-myc* (voir section III.5.3.2) (Grantham, 1990, 2000).

III.4.1.1 Mécanisme d'activation de *c-myc* dans l'ADPKD

III.4.1.1.1 Activation de *c-myc* par la voie canonique des Wnt

Nous avons démontré que l'activité transcriptionnelle de la β -caténine est stimulée suite à la surexpression de *Pkd1* dans les reins SBPkd1_{TAG}. De plus, la colocalisation nucléaire de la β -caténine et de *c-myc* dans les cellules kystiques de ces souris propose que la voie PC1/ β -caténine/*c-myc* est activée pour déclencher kystogenèse rénale. Nos données supporte une étude récente fait chez des patients ADPKD où des niveaux d'expression élevés de la β -caténine ainsi que certains de ses gènes cibles comme *c-myc*, *cyclinD1* et *Axin2* ont été détectés par analyse de micropuce à ADN (*microarray*) (Song et al., 2006). Ceci suggère que des mutations dans *Pkd1* peuvent influencer l'activité transcriptionnelle

de la β -caténine, mais le mécanisme d'activation de la voie canonique des Wnt par PC1 reste à être clairement défini (Figure III-1, page 207). La surexpression de la β -caténine détectée dans les reins SBPkd1_{TAG} suggère que des niveaux anormalement élevés de la PC1 inhibe le complexe de dégradation GSK-3 β /Axin/APC afin de permettre une translocation nucléaire de la β -caténine. Ceci est appuyé par une étude sur des cellules embryonnaires rénales humaines (HEK 293) dans lesquelles une transfection de la partie C-terminale de la PC1 active la voie des Wnt (Kim et al., 1999b).

Il est important de noter que la régulation de la dégradation de la β -caténine pourrait être dictée par un signal provenant du cil primaire où réside en partie PC1 (Figure III-1, page 207). Deux études récentes ont confirmé un rôle du cil primaire dans la répression de la voie Wnt/ β -caténine (Corbit et al., 2008; Gerdes et al., 2007). En effet, la β -caténine semble séquestrée dans le cil, mais dégradée au niveau du corps basal où le protéasome tend à se concentrer. Ainsi, l'élimination du cil a pour conséquence de stimuler la voie Wnt/ β -caténine. Il a donc été proposé qu'en condition normale, le cil primaire bloque l'activation de la β -caténine pour diriger la voie des Wnt vers la PCP (Gerdes et al., 2007; Simons et al., 2005). Ceci est consistant avec le fait que le cil primaire soit une structure post-mitotique et que la PCP soit une caractéristique de différenciation, alors que la signalisation via la β -caténine soit principalement mitotique. Cependant, un lien entre une perturbation du cil primaire et l'expression de la PC1 et *c-myc* reste à être démontré. Les souris SBPkd1_{TAG} pourraient être utilisées dans le but de vérifier cette hypothèse puisque des résultats préliminaires suggèrent que la structure des cils primaires est altérée chez ce modèle.

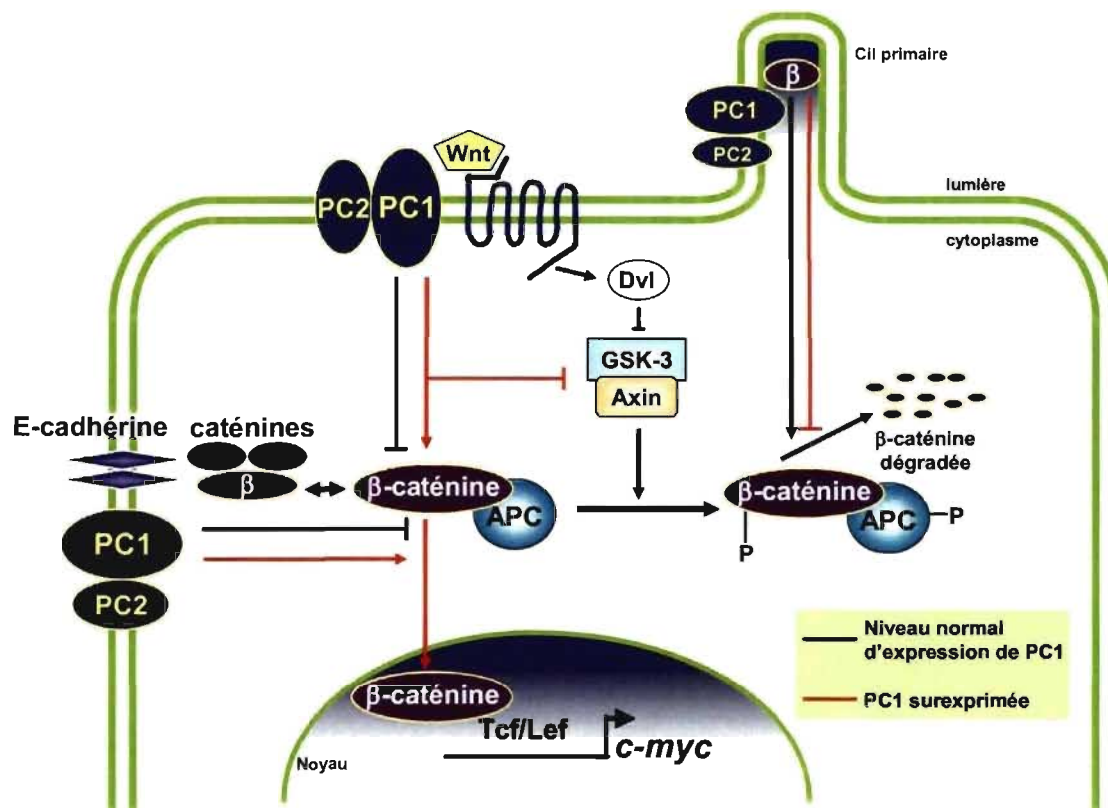


Figure III-1 : Modulation de la voie β -caténine/*c-myc* en fonction des niveaux d'expression de la polycystine-1

En condition physiologique (lignes noires), la polycystine-1 (PC1), souvent en complexe avec la PC2 à la membrane basolatérale et/ou au cil primaire, régule la stabilisation de la β -caténine cytoplasmique afin de contrôler sa translocation nucléaire et l'activation transcriptionnelle de *c-myc*. PC1 peut potentiellement séquestrer la β -caténine aux jonctions adhérentes via un complexe PC1/E-cadhérine/caténines ou au cil primaire. Suite à la surexpression de la PC1 (lignes rouges), la voie Wnt/ β -caténine est activée. Le mécanisme demeure incertain, mais la queue intracellulaire de PC1 pourrait interagir directement avec la β -caténine ou inhiber le complexe de dégradation GSK-3/Axin/APC.

III.4.1.1.2 Activation de *c-myc* par la voie non canonique des Wnt

Contrairement à nos résultats, une étude a démontré que la voie des Wnt n'est pas activée dans des cellules rénales ADPKD ou qui surexpriment la PC1. Ces cellules montrent plutôt

une stimulation de l'activité d'AP-1 (Le et al., 2004). De façon similaire, il a été proposé récemment que le mécanisme de clivage de la queue C-terminale de PC1 (CTT) inhibe la voie canonique des Wnt et active celle de JNK/AP-1 qui est connue comme étant une voie non canonique des Wnt. Ainsi, la CTT lie directement la β -caténine et l'empêche d'interagir avec le facteur de transcription TCF pour inhiber la dernière étape de la voie canonique des Wnt. La CTT aurait donc la capacité de moduler la voie canonique et non canonique des Wnt afin de contrôler la morphogenèse rénale (Le Moellic et al., 2006). Le clivage de la queue cytosolique de PC1 est un mécanisme qui n'a cependant pas encore été examiné chez la souris SBPkd1_{TAG}, mais des données préliminaires tendent à montrer une augmentation d'expression rénale d'AP-1 dans ces souris (données non publiées). De plus, l'expression de *c-myc* peut être activée directement par la liaison de son promoteur par un hétérodimère AP-1/ β -caténine, un mécanisme qui est indépendant du site consensus de liaison à AP-1, mais dépendant du site de liaison aux TCF (Nateri et al., 2005; Toualbi et al., 2007). Cette coopération entre les voies de la β -caténine et d'AP-1 est potentiellement induite par la voie de signalisation de PC-1 et nécessite une étude plus approfondie.

III.4.1.1.3 Rôle de la β -caténine dans l'adhésion cellulaire de l'épithélium rénal kystique

En plus de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, son niveau d'expression à la membrane basolatérale est augmenté dans les kystes rénaux des souris SBPkd1_{TAG}. Ceci suggère qu'une surexpression de *Pkd1* stimule la translocation de la β -caténine aux jonctions cellulaires et adhérentes (Figure III-1, page 207). Il a été démontré que PC1 forme un complexe avec les cadhérines et les caténines par lequel PC1 influence l'adhésion cellulaire (Huan and van Adelsberg, 1999; Zhang et al., 2007). De plus, les niveaux d'expression de la E-cadhérine et de la β -caténine sont augmentés suite à la surexpression de *Pkd1* dans des cellules cancéreuses (Zhang et al., 2007). Dans les reins SBPkd1_{TAG}, les niveaux élevés de la β -caténine retrouvés à la membrane plasmique pourrait être associés à une augmentation des niveaux d'expression des cadhérines, dont possiblement la N- ou la E-cadhérine qui semblent posséder une fonction redondante dans les cellules tubulaires kystiques (Roitbak et al., 2004). Par contre, une rétention de la β -caténine à la membrane

de cellules épithéliales kystiques n'est pas nécessairement dépendante de la présence de PC1 (Kugoh et al., 2002). En revanche, nous avons démontré à l'aide des embryons *Bmp7^{cre/+}; β-cat^{fl/fl}*, qu'une perte de la β-caténine est suffisante en elle-même pour déclencher la formation de kystes (chapitre II.4). Une analyse des jonctions cellulaires de l'épithélium rénal kystique des souris SBPkd1_{TAG} et des embryons *Bmp7^{cre/+}; β-cat^{fl/fl}* permettra d'identifier la formation ou la déstabilisation d'un complexe PC1/cadhérine/β-caténine à la membrane.

III.4.2 Rôle de *c-myc* et de la β-caténine dans le mécanisme pathogénétique de gain et perte de fonction de *Pkd1*

Notre étude du modèle SBPkd1_{TAG} combinée à des résultats préliminaires chez les embryons *Pkd1^{-/-}* suggèrent que le mécanisme pathogénétique est semblable suite à un gain ou une perte de fonction de *Pkd1*. En effet, nous avons détecté une surexpression de *c-myc* et de la β-caténine dans les reins d'embryons *Pkd1^{-/-}* à des taux comparables à ceux détectés dans les souris SBPkd1_{TAG} (voir annexe 4). Les modèles SBPkd1_{TAG} et *Pkd1^{-/-}* s'ajoutent donc à une liste de modèles murins d'ADPKD surexprimant la β-caténine et/ou *c-myc* comme la souris *cpk*, *bcl-2^{-/-}*, *KspCre; Kif3A^{fl/fl}* et le rat *Hans:SPRD* (Cowley et al., 1993; Cowley et al., 1987; Gattone et al., 2002; Lin et al., 2003; Sorenson, 1999).

Prises dans leurs ensembles, ces résultats proposent que *c-myc* et β-caténine puissent être des gènes modificateurs de l'ADPKD. D'autant plus qu'il y a plusieurs évidences supportant l'hypothèse que les gènes mutés dans la PKD et leurs gènes modificateurs peuvent définir une voie de signalisation impliquée dans la kystogenèse et sa progression. L'évaluation de la sévérité de la kystogenèse rénale a servi de base pour des études de loci liés à un caractère quantitatif (QTL) où parfois un gène muté dans un modèle murin de PKD est retrouvé comme gène modificateur candidat dans un autre modèle (Guay-Woodford, 2003). Ainsi, vu qu'une dérégulation d'expression de la β-caténine ou de *c-myc* est impliquée dans la kystogenèse chez plusieurs modèles murins de polykystose, leur niveau d'expression pourrait être considéré comme trait quantitatif chez le modèle

SBPkd1_{TAG}. Aucune étude de QTL n'a encore identifiée les gènes de la voie β -caténine/*c-myc* comme gènes modificateurs candidats de l'ADPKD, mais nos résultats suggèrent qu'une diminution d'expression de *c-myc* a un effet modificateur sur le phénotype kystique des souris SBPkd1_{TAG}. Notre étude propose que *c-myc* fait partie de et/ou module la voie de signalisation de *Pkd1* et est donc un gène modificateur candidat de l'ADPKD. Cette même fonction semble attribuable à la β -caténine, mais la dépendance de la β -caténine dans la kystogenèse induite par *Pkd1* n'a jamais été investiguée *in vivo*.

III.4.3 Perspectives à court terme

III.4.3.1 Inactivation de la β -caténine dans les reins des souris SBPkd1_{TAG}

Afin de déterminer l'importance du rôle de la β -caténine dans le mécanisme moléculaire de kystogenèse induite par une surexpression de *Pkd1*, nous proposons de faire une étude de complémentation phénotypique chez la souris SBPkd1_{TAG}. *c-Myc* étant une cible essentielle de la β -caténine dans différents systèmes (Sansom et al., 2007), nous avons émis l'hypothèse qu'une inactivation de la β -caténine dans les reins des souris SBPkd1_{TAG} provoquerait une complémentation phénotypique similaire à celle obtenue chez les souris SBPkd1_{TAG}; *KspCre*; *c-myc*^{fl/fl}. L'ablation génique conditionnelle de la β -caténine dans les reins adultes des souris SBPkd1_{TAG} est basée sur la même approche que celle utilisée pour la génération des souris SBPkd1_{TAG}; *KspCre*; *c-myc*^{fl/fl} (chapitre II.3). Cependant, l'avantage d'une telle approche pour étudier le rôle de *c-myc* a été que les souris *KspCre*; *c-myc*^{fl/fl} ne démontrent aucun phénotype rénal, alors que les reins des souris *KspCre*; β -cat^{fl/fl} adultes sont anormaux. Ainsi, dans le but d'éviter une addition de phénotypes rénaux entre les souris *KspCre*; β -cat^{fl/fl} et SBPkd1_{TAG}, l'utilisation d'une souris transgénique *Cre* alternative doit être envisagée. Pour ce faire, il est possible de générer une souris exprimant la *Cre* sous le contrôle des éléments régulateurs rénaux-spécifiques *SB* (voir le modèle *SBC*; Annexe 5) ou même d'utiliser des transgènes inductibles comme dans les souris *Ksp-cadhérine-CreER*^{T2}, *Sall1-CreER*^{T2} et γ GT- *CreER*^{T2} (Annexe 1) (Dworniczak et

al., 2007; Harada and Nishinakamura, 2004; Lantinga-van Leeuwen et al., 2006b). Cependant, nos résultats chez la souris *KspCre; β -cat^{fl/fl}* adultes suggèrent une fonction importante de la β -caténine aux jonctions cellulaires des tubules collecteurs de la papille et l'utilisation d'un transgène Cre alternatif risque de causer également une anomalie rénale. C'est pourquoi une approche visant à bloquer seulement l'activité transcriptionnelle de la β -caténine suite à la surexpression rénale d'une forme dominante négative du TCF, le facteur de transcription essentiel à l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, est également réalisable (van de Wetering et al., 2002). Ces études de complémentation phénotypique des souris SBPkd1_{TAG} adultes détermineront si l'inhibition de l'activité de la β -caténine est une avenue potentielle à l'établissement d'un traitement pour contrer l'ADPKD.

III.4.4 Perspectives à long terme

III.4.4.1 La voie β -caténine/*c-myc* comme cible thérapeutique de l'ADPKD

La découverte de l'implication de la voie β -caténine/*c-myc* dans le développement et la progression de la polykystose rénale peut mener à l'élaboration d'un traitement de cette maladie. Des essais précliniques utilisant des agents antiprolifératifs, dont certains ont le potentiel de contrôler la voie β -caténine/*c-myc*, sont déjà en cours (Qian et al., 2001; Torres and Harris, 2007).

III.4.4.1.1 Agents antiprolifératifs

Tout d'abord, les agonistes de la PPAR γ qui réduisent la progression des kystes rénaux chez la souris *Pkd1^{-/-}*, stimulent la dégradation de la β -caténine et inhibent l'expression de *c-myc* (Dai et al., 2006a; Laidler et al., 2007; Sharma et al., 2004). D'autres agents thérapeutiques visant plutôt à contrôler directement la progression du cycle cellulaire et ayant comme cible des gènes régulés par *c-myc* comme *p21^{CIP1}* et les *Cdk* ont été proposés

récemment pour améliorer le phénotype kystique dans certains modèles murins de l'ADPKD (Bukanov et al., 2006; Weiss et al., 2006). Un autre agent potentiel est la rapamycine qui régule négativement la voie de mTOR. Cette voie régule la traduction de près de 10 à 15% de toutes les protéines, incluant celle de c-Myc (Gera et al., 2004; Ruggero et al., 2004; Shi et al., 2005). Cette voie est d'ailleurs régulée par la PC1 via la formation d'un complexe avec la tubérine (Shillingford et al., 2006). La tubérine, le produit du gène *Tsc2*, est un important régulateur de l'activité de mTOR, mais stimule du même coup la dégradation de la β -caténine et ainsi inhibe la transcription de plusieurs gènes cibles dont *c-myc* (Inoki et al., 2006; Jozwiak et al., 2007; Mak et al., 2005; Mak et al., 2003). La rapamycine a été utilisée avec succès chez certains modèles de polykystose rénale indépendants de mutations dans le gène de *Pkd1*, mais les niveaux d'expression de *c-myc* n'ont pas été examinés (Shillingford et al., 2006; Tao et al., 2005a; Wahl et al., 2006). Cette expérience serait intéressante à reproduire chez la souris SBPkd1_{TAG} afin de vérifier si la kystogenèse induite par une surexpression de *Pkd1* nécessite l'activité de mTOR et si l'expression de *c-myc* en est affectée.

III.4.4.1.2 Utilisation d'ARN anti-sens contre *c-myc*

Une approche thérapeutique visant directement l'inhibition de l'expression de *c-myc* est également envisageable. De manière intéressante, un traitement avec un oligonucléotide anti-sens contre *c-myc* a été utilisé avec succès chez les souris *C57BL/6J-cpk* et *BALBc-cpk*, des modèles d'ARPKD (Ricker et al., 2002). Ce traitement réduit la croissance des kystes rénaux et la prolifération cellulaire, appuyant nos résultats qui démontrent que *c-myc* est un joueur important dans la prolifération des cellules kystiques. Nos données proposent également qu'un traitement avec l'anti-sens de *c-myc* chez les souris SBPkd1_{TAG}, de même que chez les patients ADPKD pourrait être efficace afin d'améliorer le phénotype kystique. D'ailleurs, l'étude de l'efficacité de ce genre de traitement est présentement en phase clinique Ib (Gattone, 2005). Finalement, notre étude confirme que *c-myc* pourrait être une cible thérapeutique de choix puisque son inactivation dans l'épithélium rénal ne provoque aucun effet secondaire apparent.

III.4.4.1.3 Agent anti-apoptotique

En plus de la prolifération cellulaire, des taux anormalement élevés d'apoptose sont étiologiquement reliés à la kystogenèse (Lanoix et al., 1996; Woo, 1995). Nos données sur le modèle de souris transgénique SBM, dont une partie est présentée dans le chapitre II-1, proposent que *c-myc* peut promouvoir un ou plusieurs mécanismes de mort cellulaire spécifiques aux cellules épithéliales indépendamment de *FasL/Fas*, *p53* et des membres de la famille *Bcl-2*. La découverte du mécanisme emprunté par *c-myc* pour induire l'apoptose dans l'ADPKD pourrait être une cible thérapeutique intéressante.

Certaines de ces voies apoptotiques alternatives, ayant entre autre été décrites dans des cellules épithéliales, sont dépendantes ou indépendantes des caspases. De manière intéressante, la voie de *FasL/Fas* n'est pas activée dans les reins kystiques des rats *Han:SPRD(Cy/+)*, mais la relâche de cytochrome c et l'activation de plusieurs caspases ont été détectées (Ecker et al., 2002; Tao et al., 2005b). Cette dépendance à l'activité des caspases a été observée chez plusieurs modèles de PKD (Ali et al., 2000; Goilav et al., 2006; Tao et al., 2005b; Tao et al., 2006) et est également retrouvée dans les études *in vitro* sur l'apoptose induite par *c-myc* (Iaccarino et al., 2003; Juin et al., 1999; Kangas et al., 1998). Prises dans leur ensemble, ces données suggèrent que les caspases pourraient être également activées dans le modèle SBM et pourraient être une cible thérapeutique.

Cependant, le fait que l'apoptose induite par *c-myc* dans le modèle SBM semble emprunter une voie de signalisation atypique, c'est-à-dire indépendante des voies apoptotiques classiques comme les membres de la famille *Bcl-2*, *p53* et *FasL/Fas*, suggèrent que même les caspases ne sont pas requises. Ces voies alternatives utiliseraient d'autres types de protéases comme les protéases à sérine, cathepsines et calpaines. D'ailleurs, le traitement de cellules à l'inhibiteur de protéases à sérine 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), bloque l'apoptose induite par *c-myc* (Kagaya et al., 1997). Cette voie apoptotique caspase-indépendante de *c-myc* pourrait-être modulée par l'interaction avec son partenaire Bin1. Bin1 est une protéine suppresseur de tumeur mutée dans plusieurs cancers et capable d'inhiber le pouvoir de transformation de *c-myc* (Elliott et al., 1999;

Sakamuro et al., 1996; Wechsler-Reya et al., 1997). Bin1 peut induire une apoptose caspase-indépendante qui est inhibée par AEBSF et non par une surexpression de *Bcl-2* ou une inactivation de *p53* (Elliott et al., 2000). Bin1, étant exprimée dans le rein, pourrait être une avenue potentielle à investiguer chez le modèle SBM.

Somme toute, la voie apoptotique induite par *c-myc* dans le modèle SBM est indépendante des membres de la famille Bcl-2, de p53 et maintenant de *FasL/Fas*. Cette voie apoptotique demeure inconnue et pourrait être indépendante des caspases. Il est aussi possible que *c-myc* stimule les voies apoptotiques d'autres récepteurs de mort cellulaire comme *TNF α /TNFR* et *TRAIL/DR4-5* (Klefstrom et al., 1994; Klefstrom et al., 2002; Nieminen et al., 2007; Rottmann et al., 2005). Les prochaines études vont tenter d'élucider cette nouvelle voie apoptotique induite par *c-myc* qui pourrait avoir des implications thérapeutiques pour la prévention de la kystogenèse dans la PKD.

CONCLUSION

Nos travaux ont contribué à l'avancement des connaissances sur le rôle de *c-myc* dans le rein et ce, tant au niveau du développement que dans la kystogenèse associée à l'ADPKD. Nous avons déterminé pour la première fois que *c-myc* joue un rôle essentiel dans le développement rénal murin où une diminution de son expression est associée à la formation de reins hypoplasiques. De manière intéressante, le rôle de *c-myc* n'est pas nécessaire au développement précoce du rein, mais est plutôt associé à une poussée tardive de la prolifération cellulaire à partir du seizième jour de gestation. De plus, nos données démontrent que l'expression de *c-myc* n'est pas requise pour l'homéostasie de l'épithélium rénal mature.

Cependant, chez les souris transgéniques SBM adultes, une surexpression de *c-myc* dans l'épithélium rénal mature déclenche la formation de kystes rénaux suite à l'induction anormale de prolifération cellulaire et d'apoptose. Nous avons constaté chez ce modèle que *c-myc* active une nouvelle voie apoptotique indépendante des gènes de la famille *Bcl-2*, *p53* et *FasL/Fas*.

Nos résultats révèlent que *c-myc* est aussi un activateur de la prolifération et de l'apoptose excessive dans un autre modèle murin d'ADPKD, soit la souris transgénique SBPkd1_{TAG}, un modèle de gain de fonction de *Pkd1*. L'expression de *c-myc* et de la β -caténine, est augmentée dans les reins des souris SBPkd1_{TAG}. Une colocalisation nucléaire de ces deux protéines a été détectée dans l'épithélium kystique, suggérant que la voie β -caténine/*c-myc* induit la kystogenèse. De plus, nos résultats obtenus suite à l'ablation conditionnelle de *c-myc* dans les reins des souris SBPkd1_{TAG}, indique que *c-myc* est un important modulateur de la voie de signalisation induite par *Pkd1* dans l'ADPKD.

Finalement, nous avons aussi analysé le rôle de la β -caténine dans le développement rénal. L'expression de la β -caténine est essentielle au développement du rein où elle régule le branchement du bourgeon urétéral et la différenciation du mésenchyme. De manière intéressante, nous avons établi qu'une inactivation de la β -caténine à elle seule peut déclencher la formation de kystes chez l'embryon. Chez l'adulte, son expression est

requis pour le maintien des tubules collecteurs de la papille. Ainsi, une déficience ou une surexpression de la β -caténine cause la formation de kystes, suggérant que son expression doit être finement contrôlée dans le rein embryonnaire et adulte.

En résumé, vu la différence phénotypique que nous avons observée entre les mutants de *c-myc* et β -caténine, ces deux gènes semblent jouer des rôles différents au cours du développement rénal. Cependant, dans l'ADPKD, ces gènes semblent faire partie d'une voie de signalisation commune induite par *Pkd1* pouvant être ciblée dans une stratégie thérapeutique afin de contrer le développement de cette maladie.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdelhak, S., Kalatzis, V., Heilig, R., Compain, S., Samson, D., Vincent, C., Weil, D., Cruaud, C., Sahly, I., Leibovici, M., *et al.* (1997). A human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nat Genet* *15*, 157-164.
- Adams, J.M., Harris, A.W., Pinkert, C.A., Corcoran, L.M., Alexander, W.S., Cory, S., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* *318*, 533-538.
- Adhikary, S., and Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 635-645.
- Ahn, D., Ge, Y., Stricklett, P.K., Gill, P., Taylor, D., Hughes, A.K., Yanagisawa, M., Miller, L., Nelson, R.D., and Kohan, D.E. (2004). Collecting duct-specific knockout of endothelin-1 causes hypertension and sodium retention. *J Clin Invest* *114*, 504-511.
- Ahrabi, A.K., Terryn, S., Valenti, G., Caron, N., Serradeil-Le Gal, C., Raufaste, D., Nielsen, S., Horie, S., Verbavatz, J.M., and Devuyst, O. (2007). PKD1 Haploinsufficiency Causes a Syndrome of Inappropriate Antidiuresis in Mice. *J Am Soc Nephrol* *18*, 1740-1753.
- Ali, S.M., Wong, V.Y., Kikly, K., Fredrickson, T.A., Keller, P.M., DeWolf, W.E., Jr., Lee, D., and Brooks, D.P. (2000). Apoptosis in polycystic kidney disease: involvement of caspases. *Am J Physiol* *278*, R763-769.
- Arabi, A., Wu, S., Ridderstrale, K., Bierhoff, H., Shiue, C., Fatyol, K., Fahlen, S., Hydbring, P., Soderberg, O., Grummt, I., *et al.* (2005). c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nature cell biology* *7*, 303-310.
- Arnold, I., and Watt, F.M. (2001). c-Myc activation in transgenic mouse epidermis results in mobilization of stem cells and differentiation of their progeny. *Curr Biol* *11*, 558-568.
- Arnould, T., Kim, E., Tsiokas, L., Jochimsen, F., Gruning, W., Chang, J.D., and Walz, G. (1998). The polycystic kidney disease 1 gene product mediates protein kinase C alpha-dependent and c-Jun N-terminal kinase-dependent activation of the transcription factor AP-1. *J Biol Chem* *273*, 6013-6018.
- Arvanitis, C., and Felsher, D.W. (2005). Conditionally MYC: insights from novel transgenic models. *Cancer Lett* *226*, 95-99.

- Atala, A., Freeman, M.R., Mandell, J., and Beier, D.R. (1993). Juvenile cystic kidneys (jck): a new mouse mutation which causes polycystic kidneys. *Kidney Int* 43, 1081-1085.
- Aubry, S., and Charron, J. (2000). N-Myc shares cellular functions with c-Myc. *DNA Cell Biol* 19, 353-364.
- Ayer, D.E., and Eisenman, R.N. (1993). A switch from Myc:Max to Mad:Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation. *Genes Dev* 7, 2110-2119.
- Ayer, D.E., Kretzner, L., and Eisenman, R.N. (1993). Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* 72, 211-222.
- Babich, V., Zeng, W.Z., Yeh, B.I., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Cai, Y., Somlo, S., and Huang, C.L. (2004). The N-terminal extracellular domain is required for polycystin-1-dependent channel activity. *J Biol Chem* 279, 25582-25589.
- Baert, L. (1978). Hereditary polycystic kidney disease (adult form): a microdissection study of two cases at an early stage of the disease. *Kidney Int* 13, 519-525.
- Banzi, M., Aguiari, G., Trimi, V., Mangolini, A., Pinton, P., Witzgall, R., Rizzuto, R., and del Senno, L. (2006). Polycystin-1 promotes PKC α -mediated NF- κ B activation in kidney cells. *Biochem Biophys Res Commun* 350, 257-262.
- Barasch, J., Yang, J., Ware, C.B., Taga, T., Yoshida, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Parravicini, E., Malach, S., Aranoff, T., *et al.* (1999). Mesenchymal to epithelial conversion in rat metanephros is induced by LIF. *Cell* 99, 377-386.
- Barisoni, L., Trudel, M., Chretien, N., Ward, L., van Adelsberg, J., and D'Agati, V. (1995). Analysis of the role of membrane polarity in polycystic kidney disease of transgenic SBM mice. *Am J Pathol* 147, 1728-1735.
- Barr, M.M., and Sternberg, P.W. (1999). A polycystic kidney-disease gene homologue required for male mating behaviour in *C. elegans*. *Nature* 401, 386-389.
- Basson, M.A., Akbulut, S., Watson-Johnson, J., Simon, R., Carroll, T.J., Shakya, R., Gross, I., Martin, G.R., Lufkin, T., McMahon, A.P., *et al.* (2005). Sprouty1 is a critical regulator of GDNF/RET-mediated kidney induction. *Developmental cell* 8, 229-239.
- Bateman, A., and Sandford, R. (1999). The PLAT domain: a new piece in the PKD1 puzzle. *Curr Biol* 9, R588-590.
- Bates, C.M., Kharzai, S., Erwin, T., Rossant, J., and Parada, L.F. (2000). Role of N-myc in the developing mouse kidney. *Dev Biol* 222, 317-325.

- Batourina, E., Gim, S., Bello, N., Shy, M., Clagett-Dame, M., Srinivas, S., Costantini, F., and Mendelsohn, C. (2001). Vitamin A controls epithelial/mesenchymal interactions through Ret expression. *Nat Genet* 27, 74-78.
- Baudino, T.A., McKay, C., Pendeville-Samain, H., Nilsson, J.A., Maclean, K.H., White, E.L., Davis, A.C., Ihle, J.N., and Cleveland, J.L. (2002). c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev* 16, 2530-2543.
- Baylis, C., and Brenner, B.M. (1978). Mechanism of the glucocorticoid-induced increase in glomerular filtration rate. *Am J Physiol* 234, F166-170.
- Beer, S., Zetterberg, A., Ihrie, R.A., McTaggart, R.A., Yang, Q., Bradon, N., Arvanitis, C., Attardi, L.D., Feng, S., Ruebner, B., *et al.* (2004). Developmental context determines latency of MYC-induced tumorigenesis. *PLoS biology* 2, e332.
- Belibi, F.A., Reif, G., Wallace, D.P., Yamaguchi, T., Olsen, L., Li, H., Helmkamp, G.M., Jr., and Grantham, J.J. (2004). Cyclic AMP promotes growth and secretion in human polycystic kidney epithelial cells. *Kidney Int* 66, 964-973.
- Bellanne-Chantelot, C., Chauveau, D., Gautier, J.F., Dubois-Laforgue, D., Clauin, S., Beaufils, S., Wilhelm, J.M., Boitard, C., Noel, L.H., Velho, G., *et al.* (2004). Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Ann Intern Med* 140, 510-517.
- Bello-Fernandez, C., Packham, G., and Cleveland, J.L. (1993). The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7804-7808.
- Benzing, T., Gerke, P., Hopker, K., Hildebrandt, F., Kim, E., and Walz, G. (2001). Nephrocystin interacts with Pyk2, p130(Cas), and tensin and triggers phosphorylation of Pyk2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9784-9789.
- Bettess, M.D., Dubois, N., Murphy, M.J., Dubey, C., Roger, C., Robine, S., and Trumpp, A. (2005). c-Myc is required for the formation of intestinal crypts but dispensable for homeostasis of the adult intestinal epithelium. *Mol Cell Biol* 25, 7868-7878.
- Bhunja, A.K., Piontek, K., Boletta, A., Liu, L., Qian, F., Xu, P.N., Germino, F.J., and Germino, G.G. (2002). PKD1 induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2. *Cell* 109, 157-168.
- Bianco, R.A., Keen, H.L., Lavoie, J.L., and Sigmund, C.D. (2003). Untraditional methods for targeting the kidney in transgenic mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 285, F1027-1033.
- Bichet, D., Peters, D., Patel, A.J., Delmas, P., and Honore, E. (2006). Cardiovascular polycystins: insights from autosomal dominant polycystic kidney disease and transgenic animal models. *Trends Cardiovasc Med* 16, 292-298.

- Bihoreau, M.T., Ceccherini, I., Browne, J., Kranzlin, B., Romeo, G., Lathrop, G.M., James, M.R., and Gretz, N. (1997). Location of the first genetic locus, PKD_{r1}, controlling autosomal dominant polycystic kidney disease in Han:SPRD cy/+ rat. *Hum Mol Genet* 6, 609-613.
- Blackwell, T.K., Kretzner, L., Blackwood, E.M., Eisenman, R.N., and Weintraub, H. (1990). Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* 250, 1149-1151.
- Blackwood, E.M., and Eisenman, R.N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251, 1211-1217.
- Blackwood, E.M., Luscher, B., and Eisenman, R.N. (1992). Myc and Max associate in vivo. *Genes Dev* 6, 71-80.
- Blaszak, R.T., Potaman, V., Sinden, R.R., and Bissler, J.J. (1999). DNA structural transitions within the PKD1 gene. *Nucleic Acids Res* 27, 2610-2617.
- Blyth, K., Terry, A., O'Hara, M., Baxter, E.W., Campbell, M., Stewart, M., Donehower, L.A., Onions, D.E., Neil, J.C., and Cameron, E.R. (1995). Synergy between a human c-myc transgene and p53 null genotype in murine thymic lymphomas: contrasting effects of homozygous and heterozygous p53 loss. *Oncogene* 10, 1717-1723.
- Boca, M., Distefano, G., Qian, F., Bhunia, A.K., Germino, G.G., and Boletta, A. (2006). Polycystin-1 induces resistance to apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *J Am Soc Nephrol* 17, 637-647.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.
- Boletta, A., Qian, F., Onuchic, L.F., Bhunia, A.K., Phakdeekitcharoen, B., Hanaoka, K., Guggino, W., Monaco, L., and Germino, G.G. (2000). Polycystin-1, the gene product of PKD1, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. *Mol Cell* 6, 1267-1273.
- Boletta, A., Qian, F., Onuchic, L.F., Bragonzi, A., Cortese, M., Deen, P.M., Courtoy, P.J., Soria, M.R., Devuyst, O., Monaco, L., *et al.* (2001). Biochemical characterization of bona fide polycystin-1 in vitro and in vivo. *Am J Kidney Dis* 38, 1421-1429.
- Bouchard, C., Dittrich, O., Kiermaier, A., Dohmann, K., Menkel, A., Eilers, M., and Luscher, B. (2001). Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev* 15, 2042-2047.

- Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J., and Eilers, M. (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J* 18, 5321-5333.
- Bouchard, M., Souabni, A., and Busslinger, M. (2004). Tissue-specific expression of cre recombinase from the Pax8 locus. *Genesis* 38, 105-109.
- Bouchard, M., Souabni, A., Mandler, M., Neubuser, A., and Busslinger, M. (2002). Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. *Genes Dev* 16, 2958-2970.
- Boulter, C., Mulroy, S., Webb, S., Fleming, S., Brindle, K., and Sandford, R. (2001). Cardiovascular, skeletal, and renal defects in mice with a targeted disruption of the Pkd1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12174-12179.
- Boyle, S., Mortlock, D., and Baldwin, S. (2006). Generation of a metanephric mesenchyme specific, temporally regulated cre-recombinase. *J Am Soc Nephrol* 17, 241A.
- Brandvold, K.A., Neiman, P., and Ruddell, A. (2000). Angiogenesis is an early event in the generation of myc-induced lymphomas. *Oncogene* 19, 2780-2785.
- Brasier, J.L., and Henske, E.P. (1997). Loss of the polycystic kidney disease (PKD1) region of chromosome 16p13 in renal cyst cells supports a loss-of-function model for cyst pathogenesis. *J Clin Invest* 99, 194-199.
- Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Lorient, A., Vire, E., De Smet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., *et al.* (2005). Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J* 24, 336-346.
- Bridgewater, D., and Rosenblum, N.D. (2006). Beta-catenin controls renal branching morphogenesis and expression of Pax2 and c-Ret. *J Am Soc Nephrol* 17, 35A.
- Brook-Carter, P.T., Peral, B., Ward, C.J., Thompson, P., Hughes, J., Maheshwar, M.M., Nellist, M., Gamble, V., Harris, P.C., and Sampson, J.R. (1994). Deletion of the TSC2 and PKD1 genes associated with severe infantile polycystic kidney disease--a contiguous gene syndrome. *Nat Genet* 8, 328-332.
- Brophy, P.D., Ostrom, L., Lang, K.M., and Dressler, G.R. (2001). Regulation of ureteric bud outgrowth by Pax2-dependent activation of the glial derived neurotrophic factor gene. *Development* 128, 4747-4756.
- Brown, J.H., Bihoreau, M.T., Hoffmann, S., Kranzlin, B., Tychinskaya, I., Obermuller, N., Podlich, D., Boehn, S.N., Kaisaki, P.J., Megel, N., *et al.* (2005). Missense mutation in sterile alpha motif of novel protein SamCystin is associated with polycystic kidney disease in (cy/+) rat. *J Am Soc Nephrol* 16, 3517-3526.

- Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B., and Goldstein, J.L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100, 391-398.
- Brunner, T., Kasibhatla, S., Pinkoski, M.J., Fruttschi, C., Yoo, N.J., Echeverri, F., Mahboubi, A., and Green, D.R. (2000). Expression of Fas ligand in activated T cells is regulated by c-Myc. *J Biol Chem* 275, 9767-9772.
- Bui-Xuan, E.F., Li, Q., Chen, X.Z., Boucher, C.A., Sandford, R., Zhou, J., and Basora, N. (2006). More than colocalizing with polycystin-1, polycystin-L is in the centrosome. *Am J Physiol Renal Physiol* 291, F395-406.
- Bukanov, N.O., Smith, L.A., Klinger, K.W., Ledbetter, S.R., and Ibraghimov-Beskrovnaya, O. (2006). Long-lasting arrest of murine polycystic kidney disease with CDK inhibitor roscovitine. *Nature* 444, 949-952.
- Bycroft, M., Bateman, A., Clarke, J., Hamill, S.J., Sandford, R., Thomas, R.L., and Chothia, C. (1999). The structure of a PKD domain from polycystin-1: implications for polycystic kidney disease. *EMBO J* 18, 297-305.
- Cai, Y., Maeda, Y., Cedzich, A., Torres, V.E., Wu, G., Hayashi, T., Mochizuki, T., Park, J.H., Witzgall, R., and Somlo, S. (1999). Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product. *J Biol Chem* 274, 28557-28565.
- Cano-Gauci, D.F., Song, H.H., Yang, H., McKerlie, C., Choo, B., Shi, W., Pullano, R., Piscione, T.D., Grisaru, S., Soon, S., *et al.* (1999). Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *J Cell Biol* 146, 255-264.
- Carone, F.A., Bacallao, R., and Kanwar, Y. (1998). Role of the matrix in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Ren Fail* 20, 181-189.
- Carone, F.A., Rowland, R.G., Perlman, S.G., and Ganote, C.E. (1974). The pathogenesis of drug-induced renal cystic disease. *Kidney Int* 5, 411-421.
- Carpenter, C., Honkanen, A.A., Mashimo, H., Goss, K.A., Huang, P., Fishman, M.C., Asaad, M., Dorso, C.R., and Cheung, H. (1996). Renal abnormalities in mutant mice. *Nature* 380, 292.
- Carroll, T., and McMahon, A. (2004). The role of beta-catenin in ureteric bud development and disease. *J Am Soc Nephrol* 15, 420A.
- Carroll, T.J., Park, J.S., Hayashi, S., Majumdar, A., and McMahon, A.P. (2005). Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Developmental cell* 9, 283-292.

- Cartier, N., Miquerol, L., Tulliez, M., Lepetit, N., Levrat, F., Grimber, G., Briand, P., and Kahn, A. (1992). Diet-dependent carcinogenesis of pancreatic islets and liver in transgenic mice expressing oncogenes under the control of the L-type pyruvate kinase gene promoter. *Oncogene* 7, 1413-1422.
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., and Dalton, S. (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 132, 885-896.
- Cebrian, C., Borodo, K., Charles, N., and Herzlinger, D.A. (2004). Morphometric index of the developing murine kidney. *Dev Dyn* 231, 601-608.
- Chang, C.P., McDill, B.W., Neilson, J.R., Joist, H.E., Epstein, J.A., Crabtree, G.R., and Chen, F. (2004). Calcineurin is required in urinary tract mesenchyme for the development of the pyeloureteral peristaltic machinery. *J Clin Invest* 113, 1051-1058.
- Charron, A.J., Nakamura, S., Bacallao, R., and Wandinger-Ness, A. (2000). Compromised cytoarchitecture and polarized trafficking in autosomal dominant polycystic kidney disease cells. *J Cell Biol* 149, 111-124.
- Charron, J., Malynn, B.A., Fisher, P., Stewart, V., Jeannotte, L., Goff, S.P., Robertson, E.J., and Alt, F.W. (1992). Embryonic lethality in mice homozygous for a targeted disruption of the N-myc gene. *Genes Dev* 6, 2248-2257.
- Chauvet, V., Tian, X., Husson, H., Grimm, D.H., Wang, T., Hiesberger, T., Igarashi, P., Bennett, A.M., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Somlo, S., *et al.* (2004). Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus. *J Clin Invest* 114, 1433-1443.
- Chen, H., Lun, Y., Ovchinnikov, D., Kokubo, H., Oberg, K.C., Pepicelli, C.V., Gan, L., Lee, B., and Johnson, R.L. (1998). Limb and kidney defects in *Lmx1b* mutant mice suggest an involvement of *LMX1B* in human nail patella syndrome. *Nat Genet* 19, 51-55.
- Chen, X.Z., Vassilev, P.M., Basora, N., Peng, J.B., Nomura, H., Segal, Y., Brown, E.M., Reeders, S.T., Hediger, M.A., and Zhou, J. (1999). Polycystin-L is a calcium-regulated cation channel permeable to calcium ions. *Nature* 401, 383-386.
- Cheng, H.T., Kim, M., Valerius, M.T., Surendran, K., Schuster-Gossler, K., Gossler, A., McMahon, A.P., and Kopan, R. (2007). *Notch2*, but not *Notch1*, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron. *Development* 134, 801-811.
- Chi, L., Zhang, S., Lin, Y., Prunskaitė-Hyyryläinen, R., Vuolteenaho, R., Itaranta, P., and Vainio, S. (2004). Sprouty proteins regulate ureteric branching by coordinating reciprocal epithelial

- Wnt11, mesenchymal Gdnf and stromal Fgf7 signalling during kidney development. *Development* *131*, 3345-3356.
- Cho, E.A., Patterson, L.T., Brookhiser, W.T., Mah, S., Kintner, C., and Dressler, G.R. (1998). Differential expression and function of cadherin-6 during renal epithelium development. *Development* *125*, 803-812.
- Choukroun, G., Itakura, Y., Albouze, G., Christophe, J.L., Man, N.K., Grunfeld, J.P., and Jungers, P. (1995). Factors influencing progression of renal failure in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* *6*, 1634-1642.
- Christodoulou, K., Tsingis, M., Stavrou, C., Eleftheriou, A., Papapavlou, P., Patsalis, P.C., Ioannou, P., Pierides, A., and Constantinou Deltas, C. (1998). Chromosome 1 localization of a gene for autosomal dominant medullary cystic kidney disease. *Hum Mol Genet* *7*, 905-911.
- Claassen, G.F., and Hann, S.R. (2000). A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 9498-9503.
- Cole, B.R., Conley, S.B., and Stapleton, F.B. (1987). Polycystic kidney disease in the first year of life. *J Pediatr* *111*, 693-699.
- Colgin, L.M., Hackmann, A.F., Emond, M.J., and Monnat, R.J., Jr. (2002). The unexpected landscape of in vivo somatic mutation in a human epithelial cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 1437-1442.
- Condac, E., Silasi-Mansat, R., Kosanke, S., Schoeb, T., Towner, R., Lupu, F., Cummings, R.D., and Hinsdale, M.E. (2007). Polycystic disease caused by deficiency in xylosyltransferase 2, an initiating enzyme of glycosaminoglycan biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Consortium, T.E. (1994). The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. The European Polycystic Kidney Disease Consortium. *Cell* *77*, 881-894.
- Consortium, T.I. (1995). Polycystic kidney disease: the complete structure of the PKD1 gene and its protein. The International Polycystic Kidney Disease Consortium. *Cell* *81*, 289-298.
- Corbit, K.C., Shyer, A.E., Dowdle, W.E., Gauden, J., Singla, V., and Reiter, J.F. (2008). Kif3a constrains beta-catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms. *Nature cell biology* *10*, 70-76.
- Costantini, F., and Shakya, R. (2006). GDNF/Ret signaling and the development of the kidney. *Bioessays* *28*, 117-127.

- Couillard, M., Guillaume, R., Tanji, N., D'Agati, V., and Trudel, M. (2002). c-myc-induced apoptosis in polycystic kidney disease is independent of FasL/Fas interaction. *Cancer Res* 62, 2210-2214.
- Cowley, B.D., Jr., Gudapaty, S., Kraybill, A.L., Barash, B.D., Harding, M.A., Calvet, J.P., and Gattone, V.H. (1993). Autosomal-dominant polycystic kidney disease in the rat. *Kidney Int* 43, 522-534.
- Cowley, B.D., Jr., Smardo, F.L., Jr., Grantham, J.J., and Calvet, J.P. (1987). Elevated c-myc protooncogene expression in autosomal recessive polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 8394-8398.
- Cuppige, F.E., Huseman, R.A., Chapman, A., and Grantham, J.J. (1980). Ultrastructure and function of cysts from human adult polycystic kidneys. *Kidney Int* 17, 372-381.
- D'Cruz, C.M., Gunther, E.J., Boxer, R.B., Hartman, J.L., Sintasath, L., Moody, S.E., Cox, J.D., Ha, S.I., Belka, G.K., Golant, A., *et al.* (2001). c-MYC induces mammary tumorigenesis by means of a preferred pathway involving spontaneous Kras2 mutations. *Nat Med* 7, 235-239.
- Dahl, U., Sjodin, A., Larue, L., Radice, G.L., Cajander, S., Takeichi, M., Kemler, R., and Semb, H. (2002). Genetic dissection of cadherin function during nephrogenesis. *Mol Cell Biol* 22, 1474-1487.
- Dai, B., Liu, Y., Xiong, X., Fu, L., and Mei, C. (2006a). Experimental study on the treatment of ADPKD with PPAR gamma agonists. *J Am Soc Nephrol* 17, 777A.
- Dai, C., Monga, S.P.S., Holzman, L.B., and Liu, Y. (2006b). Beta-catenin mediates podocyte dysfunction and albuminuria. *J Am Soc Nephrol* 17, 65A.
- Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R.C., and Croce, C.M. (1982). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7824-7827.
- Dansen, T.B., Whitfield, J., Rostker, F., Brown-Swigart, L., and Evan, G.I. (2006). Specific requirement for Bax, not Bak, in Myc-induced apoptosis and tumor suppression in vivo. *J Biol Chem* 281, 10890-10895.
- Daoust, M.C., Reynolds, D.M., Bichet, D.G., and Somlo, S. (1995). Evidence for a third genetic locus for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Genomics* 25, 733-736.
- Davies, J.A., and Garrod, D.R. (1995). Induction of early stages of kidney tubule differentiation by lithium ions. *Dev Biol* 167, 50-60.

- Davis, A.C., Wims, M., Spotts, G.D., Hann, S.R., and Bradley, A. (1993). A null *c-myc* mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev* 7, 671-682.
- Davis, A.P., Witte, D.P., Hsieh-Li, H.M., Potter, S.S., and Capecchi, M.R. (1995). Absence of radius and ulna in mice lacking *hoxa-11* and *hoxd-11*. *Nature* 375, 791-795.
- Dawe, H.R., Smith, U.M., Cullinane, A.R., Gerrelli, D., Cox, P., Badano, J.L., Blair-Reid, S., Sriram, N., Katsanis, N., Attie-Bitach, T., *et al.* (2007). The Meckel-Gruber Syndrome proteins MKS1 and meckelin interact and are required for primary cilium formation. *Hum Mol Genet* 16, 173-186.
- de Alboran, I.M., Baena, E., and Martinez, A.C. (2004). *c-Myc*-deficient B lymphocytes are resistant to spontaneous and induced cell death. *Cell Death Differ* 11, 61-68.
- de Alboran, I.M., O'Hagan, R.C., Gartner, F., Malynn, B., Davidson, L., Rickert, R., Rajewsky, K., DePinho, R.A., and Alt, F.W. (2001). Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. *Immunity* 14, 45-55.
- Delmas, P. (2005). Polycystins: polymodal receptor/ion-channel cellular sensors. *Pflugers Arch* 451, 264-276.
- Delmas, P., Nauli, S.M., Li, X., Coste, B., Osorio, N., Crest, M., Brown, D.A., and Zhou, J. (2004). Gating of the polycystin ion channel signaling complex in neurons and kidney cells. *FASEB J* 18, 740-742.
- Delmas, P., Nomura, H., Li, X., Lakkis, M., Luo, Y., Segal, Y., Fernandez-Fernandez, J.M., Harris, P., Frischauf, A.M., Brown, D.A., *et al.* (2002). Constitutive activation of G-proteins by polycystin-1 is antagonized by polycystin-2. *J Biol Chem* 277, 11276-11283.
- DePinho, R.A., Schreiber-Agus, N., and Alt, F.W. (1991). *myc* family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res* 57, 1-46.
- Dinchuk, J.E., Car, B.D., Focht, R.J., Johnston, J.J., Jaffee, B.D., Covington, M.B., Contel, N.R., Eng, V.M., Collins, R.J., Czerniak, P.M., *et al.* (1995). Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* 378, 406-409.
- Dixon-Salazar, T., Silhavy, J.L., Marsh, S.E., Louie, C.M., Scott, L.C., Gururaj, A., Al-Gazali, L., Al-Tawari, A.A., Kayserili, H., Sztriha, L., *et al.* (2004). Mutations in the *AHI1* gene, encoding joubertin, cause Joubert syndrome with cortical polymicrogyria. *Am J Hum Genet* 75, 979-987.

- Donaldson, J.C., Dempsey, P.J., Reddy, S., Bouton, A.H., Coffey, R.J., and Hanks, S.K. (2000). Crk-associated substrate p130(Cas) interacts with nephrocystin and both proteins localize to cell-cell contacts of polarized epithelial cells. *Exp Cell Res* 256, 168-178.
- Donaldson, J.C., Dise, R.S., Ritchie, M.D., and Hanks, S.K. (2002). Nephrocystin-conserved domains involved in targeting to epithelial cell-cell junctions, interaction with filamins, and establishing cell polarity. *J Biol Chem* 277, 29028-29035.
- Donovan, M.J., Natoli, T.A., Sainio, K., Amstutz, A., Jaenisch, R., Sariola, H., and Kreidberg, J.A. (1999). Initial differentiation of the metanephric mesenchyme is independent of WT1 and the ureteric bud. *Dev Genet* 24, 252-262.
- Douglas, N.C., Jacobs, H., Bothwell, A.L., and Hayday, A.C. (2001). Defining the specific physiological requirements for c-Myc in T cell development. *Nature immunology* 2, 307-315.
- Downs, K.M., Martin, G.R., and Bishop, J.M. (1989). Contrasting patterns of myc and N-myc expression during gastrulation of the mouse embryo. *Genes Dev* 3, 860-869.
- Dressler, G.R. (2006). The cellular basis of kidney development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 509-529.
- Dressler, G.R., Wilkinson, J.E., Rothenpieler, U.W., Patterson, L.T., Williams-Simons, L., and Westphal, H. (1993). Deregulation of Pax-2 expression in transgenic mice generates severe kidney abnormalities. *Nature* 362, 65-67.
- Du, J., and Wilson, P.D. (1995). Abnormal polarization of EGF receptors and autocrine stimulation of cyst epithelial growth in human ADPKD. *Am J Physiol* 269, C487-495.
- Dudley, A.T., Godin, R.E., and Robertson, E.J. (1999). Interaction between FGF and BMP signaling pathways regulates development of metanephric mesenchyme. *Genes Dev* 13, 1601-1613.
- Dudley, A.T., Lyons, K.M., and Robertson, E.J. (1995). A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 9, 2795-2807.
- Dunn, N.R., Winnier, G.E., Hargett, L.K., Schrick, J.J., Fogo, A.B., and Hogan, B.L. (1997). Haploinsufficient phenotypes in Bmp4 heterozygous null mice and modification by mutations in Gli3 and Alx4. *Dev Biol* 188, 235-247.
- Dworniczak, B., Skryabin, B., Tchinda, J., Heuck, S., Seesing, F.J., Metzger, D., Chambon, P., Horst, J., and Pennekamp, P. (2007). Inducible Cre/loxP Recombination in the Mouse Proximal Tubule. *Nephron Exp Nephrol* 106, e11-e20.

- Ecdler, T., Melnikov, V.Y., Stanley, M., Korular, D., Lucia, M.S., Schrier, R.W., and Edelstein, C.L. (2002). Caspases, Bcl-2 proteins and apoptosis in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* *61*, 1220-1230.
- Eilers, M., Schirm, S., and Bishop, J.M. (1991). The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *EMBO J* *10*, 133-141.
- Eischen, C.M., Packham, G., Nip, J., Fee, B.E., Hiebert, S.W., Zambetti, G.P., and Cleveland, J.L. (2001a). Bcl-2 is an apoptotic target suppressed by both c-Myc and E2F-1. *Oncogene* *20*, 6983-6993.
- Eischen, C.M., Woo, D., Roussel, M.F., and Cleveland, J.L. (2001b). Apoptosis triggered by Myc-induced suppression of Bcl-X(L) or Bcl-2 is bypassed during lymphomagenesis. *Mol Cell Biol* *21*, 5063-5070.
- El-Aouni, C., Herbach, N., Blattner, S.M., Henger, A., Rastaldi, M.P., Jarad, G., Miner, J.H., Moeller, M.J., St-Arnaud, R., Dedhar, S., *et al.* (2006). Podocyte-specific deletion of integrin-linked kinase results in severe glomerular basement membrane alterations and progressive glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* *17*, 1334-1344.
- Eller, P., Kaser, S., Lhotta, K., Edghill, E.L., Ellard, S., Ebenbichler, C., and Patsch, J.R. (2006). Renal cysts and diabetes due to a heterozygous HNF-1 {beta} gene deletion. *Nephrol Dial Transplant*.
- Elliott, K., Ge, K., Du, W., and Prendergast, G.C. (2000). The c-Myc-interacting adaptor protein Bin1 activates a caspase-independent cell death program. *Oncogene* *19*, 4669-4684.
- Elliott, K., Sakamuro, D., Basu, A., Du, W., Wunner, W., Staller, P., Gaubatz, S., Zhang, H., Prochownik, E., Eilers, M., *et al.* (1999). Bin1 functionally interacts with Myc and inhibits cell proliferation via multiple mechanisms. *Oncogene* *18*, 3564-3573.
- Elson, A., Deng, C., Campos-Torres, J., Donehower, L.A., and Leder, P. (1995). The MMTV/c-myc transgene and p53 null alleles collaborate to induce T-cell lymphomas, but not mammary carcinomas in transgenic mice. *Oncogene* *11*, 181-190.
- Enomoto, H., Araki, T., Jackman, A., Heuckeroth, R.O., Snider, W.D., Johnson, E.M., Jr., and Milbrandt, J. (1998). GFR alpha1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron* *21*, 317-324.
- Eremina, V., Sood, M., Haigh, J., Nagy, A., Lajoie, G., Ferrara, N., Gerber, H.P., Kikkawa, Y., Miner, J.H., and Quaggin, S.E. (2003). Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest* *111*, 707-716.

- Eremina, V., Wong, M.A., Cui, S., Schwartz, L., and Quaggin, S.E. (2002). Glomerular-specific gene excision in vivo. *J Am Soc Nephrol* 13, 788-793.
- Evan, G., and Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science* 281, 1317-1322.
- Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z., and Hancock, D.C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119-128.
- Everson, G.T. (1993). Hepatic cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 22, 520-525.
- Fan, W. (1999). Possible mechanisms of paclitaxel-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 57, 1215-1221.
- Fan, X., Lu, W., Reeders, S.T., and Zhou, J. (1998). Enhanced apoptosis in Pkd1 targeted mice. *J Am Soc Nephrol* 9.
- Fanidi, A., Harrington, E.A., and Evan, G.I. (1992). Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature* 359, 554-556.
- Faraggiana, T., Bernstein, J., Strauss, L., and Churg, J. (1985). Use of lectins in the study of histogenesis of renal cysts. *Lab Invest* 53, 575-579.
- Feather, S.A., Woolf, A.S., Donnai, D., Malcolm, S., and Winter, R.M. (1997). The oral-facial-digital syndrome type 1 (OFD1), a cause of polycystic kidney disease and associated malformations, maps to Xp22.2-Xp22.3. *Hum Mol Genet* 6, 1163-1167.
- Felsher, D.W., and Bishop, J.M. (1999a). Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol Cell* 4, 199-207.
- Felsher, D.W., and Bishop, J.M. (1999b). Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 3940-3944.
- Ferland, R.J., Eyaid, W., Collura, R.V., Tully, L.D., Hill, R.S., Al-Nouri, D., Al-Rumayyan, A., Topcu, M., Gascon, G., Bodell, A., *et al.* (2004). Abnormal cerebellar development and axonal decussation due to mutations in AH11 in Joubert syndrome. *Nat Genet* 36, 1008-1013.
- Fernandez, P.C., Frank, S.R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A., and Amati, B. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* 17, 1115-1129.

- Ferrante, M.I., Giorgio, G., Feather, S.A., Bulfone, A., Wright, V., Ghiani, M., Selicorni, A., Gammara, L., Scolari, F., Woolf, A.S., *et al.* (2001). Identification of the gene for oral-facial-digital type I syndrome. *Am J Hum Genet* 68, 569-576.
- Fick, G.M., Duley, I.T., Johnson, A.M., Strain, J.D., Manco-Johnson, M.L., and Gabow, P.A. (1994). The spectrum of autosomal dominant polycystic kidney disease in children. *J Am Soc Nephrol* 4, 1654-1660.
- Fick, G.M., Johnson, A.M., Strain, J.D., Kimberling, W.J., Kumar, S., Manco-Johnson, M.L., Duley, I.T., and Gabow, P.A. (1993). Characteristics of very early onset autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 3, 1863-1870.
- Fischer, E., Legue, E., Doyen, A., Nato, F., Nicolas, J.F., Torres, V., Yaniv, M., and Pontoglio, M. (2006). Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Nat Genet* 38, 21-23.
- Flaherty, L., Bryda, E.C., Collins, D., Rudofsky, U., and Montgomery, J.C. (1995). New mouse model for polycystic kidney disease with both recessive and dominant gene effects. *Kidney Int* 47, 552-558.
- Fliegau, M., Frohlich, C., Horvath, J., Olbrich, H., Hildebrandt, F., and Omran, H. (2003). Identification of the human *CYS1* gene and candidate gene analysis in Boichis disease. *Pediatr Nephrol* 18, 498-505.
- Flores, I., Murphy, D.J., Swigart, L.B., Knies, U., and Evan, G.I. (2004). Defining the temporal requirements for Myc in the progression and maintenance of skin neoplasia. *Oncogene* 23, 5923-5930.
- Foggensteiner, L., Bevan, A.P., Thomas, R., Coleman, N., Boulter, C., Bradley, J., Ibraghimov-Beskrovnya, O., Klinger, K., and Sandford, R. (2000). Cellular and subcellular distribution of polycystin-2, the protein product of the *PKD2* gene. *J Am Soc Nephrol* 11, 814-827.
- Frank, M., Atanasoski, S., Sancho, S., Magyar, J.P., Rulicke, T., Schwab, M.E., and Suter, U. (2000). Progressive segregation of unmyelinated axons in peripheral nerves, myelin alterations in the CNS, and cyst formation in the kidneys of myelin and lymphocyte protein-overexpressing mice. *J Neurochem* 75, 1927-1939.
- Freytag, S.O., Dang, C.V., and Lee, W.M. (1990). Definition of the activities and properties of c-myc required to inhibit cell differentiation. *Cell Growth Differ* 1, 339-343.
- Frye, M., Gardner, C., Li, E.R., Arnold, I., and Watt, F.M. (2003). Evidence that Myc activation depletes the epidermal stem cell compartment by modulating adhesive interactions with the local microenvironment. *Development* 130, 2793-2808.

- Gabow, P.A., Johnson, A.M., Kaehny, W.D., Kimberling, W.J., Lezotte, D.C., Duley, I.T., and Jones, R.H. (1992). Factors affecting the progression of renal disease in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 41, 1311-1319.
- Galindo, B.E., Moy, G.W., and Vacquier, V.D. (2004). A third sea urchin sperm receptor for egg jelly module protein, suREJ2, concentrates in the plasma membrane over the sperm mitochondrion. *Dev Growth Differ* 46, 53-60.
- Gallagher, A.R., Cedzich, A., Gretz, N., Somlo, S., and Witzgall, R. (2000). The polycystic kidney disease protein PKD2 interacts with Hax-1, a protein associated with the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4017-4022.
- Gallagher, A.R., Hoffmann, S., Brown, N., Cedzich, A., Meruvu, S., Podlich, D., Feng, Y., Konecke, V., de Vries, U., Hammes, H.P., *et al.* (2006). A truncated polycystin-2 protein causes polycystic kidney disease and retinal degeneration in transgenic rats. *J Am Soc Nephrol* 17, 2719-2730.
- Gang, D.L., and Herrin, J.T. (1986). Infantile polycystic disease of the liver and kidneys. *Clin Nephrol* 25, 28-36.
- Gao, X., Zhang, Y., Arrazola, P., Hino, O., Kobayashi, T., Yeung, R.S., Ru, B., and Pan, D. (2002). Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nature cell biology* 4, 699-704.
- Garcia-Gonzalez, M., Piontek, K., Meneses, L., Kaimori, J., Huso, D.L., Watnick, T., Onuchic, L.F., Guay-Woodford, L., and Germino, G.G. (2006). Genetic interaction studies link the major loci responsible for human autosomal dominant and recessive polycystic kidney disease in a common pathway. *J Am Soc Nephrol* 17, 88A.
- Gattone, V.H., 2nd (2005). Emerging therapies for polycystic kidney disease. *Current opinion in pharmacology* 5, 535-542.
- Gattone, V.H., 2nd, Cowley, B.D., Jr., Barash, B.D., Nagao, S., Takahashi, H., Yamaguchi, T., and Grantham, J.J. (1995). Methylprednisolone retards the progression of inherited polycystic kidney disease in rodents. *Am J Kidney Dis* 25, 302-313.
- Gattone, V.H., 2nd, Kuentler, K.A., Lindemann, G.W., Lu, X., Cowley, B.D., Jr., Rankin, C.A., and Calvet, J.P. (1996). Renal expression of a transforming growth factor-alpha transgene accelerates the progression of inherited, slowly progressive polycystic kidney disease in the mouse. *J Lab Clin Med* 127, 214-222.

- Gattone, V.H., 2nd, Maser, R.L., Tian, C., Rosenberg, J.M., and Branden, M.G. (1999). Developmental expression of urine concentration-associated genes and their altered expression in murine infantile-type polycystic kidney disease. *Dev Genet* 24, 309-318.
- Gattone, V.H., Ricker, J.L., Trambaugh, C.M., and Klein, R.M. (2002). Multiorgan mRNA misexpression in murine autosomal recessive polycystic kidney disease. *Kidney Int* 62, 1560-1569.
- Gaubatz, S., Imhof, A., Dosch, R., Werner, O., Mitchell, P., Buettner, R., and Eilers, M. (1995). Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2. *EMBO J* 14, 1508-1519.
- Ge, Y., Bagnall, A., Stricklett, P.K., Strait, K., Webb, D.J., Kotelevtsev, Y., and Kohan, D.E. (2006). Collecting duct-specific knockout of the endothelin B receptor causes hypertension and sodium retention. *Am J Physiol Renal Physiol* 291, F1274-1280.
- Ge, Y., Stricklett, P.K., Hughes, A.K., Yanagisawa, M., and Kohan, D.E. (2005). Collecting duct-specific knockout of the endothelin A receptor alters renal vasopressin responsiveness, but not sodium excretion or blood pressure. *Am J Physiol Renal Physiol* 289, F692-698.
- Geberth, S., Stier, E., Zeier, M., Mayer, G., Rambauser, M., and Ritz, E. (1995). More adverse renal prognosis of autosomal dominant polycystic kidney disease in families with primary hypertension. *J Am Soc Nephrol* 6, 1643-1648.
- Geick, A., Redecker, P., Ehrhardt, A., Klocke, R., Paul, D., and Halter, R. (2001). Uteroglobin promoter-targeted c-MYC expression in transgenic mice cause hyperplasia of Clara cells and malignant transformation of T-lymphoblasts and tubular epithelial cells. *Transgenic Res* 10, 501-511.
- Geng, L., Burrow, C.R., Li, H.P., and Wilson, P.D. (2000). Modification of the composition of polycystin-1 multiprotein complexes by calcium and tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1535, 21-35.
- Geng, L., Segal, Y., Pavlova, A., Barros, E.J., Lohning, C., Lu, W., Nigam, S.K., Frischauf, A.M., Reeders, S.T., and Zhou, J. (1997). Distribution and developmentally regulated expression of murine polycystin. *Am J Physiol* 272, F451-459.
- Geng, L., Segal, Y., Peissel, B., Deng, N., Pei, Y., Carone, F., Rennke, H.G., Glucksmann-Kuis, A.M., Schneider, M.C., Ericsson, M., *et al.* (1996). Identification and localization of polycystin, the PKD1 gene product. *J Clin Invest* 98, 2674-2682.
- Gera, J.F., Mellinghoff, I.K., Shi, Y., Rettig, M.B., Tran, C., Hsu, J.H., Sawyers, C.L., and Lichtenstein, A.K. (2004). AKT activity determines sensitivity to mammalian target of

- rapamycin (mTOR) inhibitors by regulating cyclin D1 and c-myc expression. *J Biol Chem* *279*, 2737-2746.
- Gerdes, J.M., Liu, Y., Zaghoul, N.A., Leitch, C.C., Lawson, S.S., Kato, M., Beachy, P.A., Beales, P.L., DeMartino, G.N., Fisher, S., *et al.* (2007). Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response. *Nat Genet* *39*, 1350-1360.
- Germينو, G.G. (2005). Linking cilia to Wnts. *Nat Genet* *37*, 455-457.
- Gile, R.D., Cowley, B.D., Jr., Gattone, V.H., 2nd, O'Donnell, M.P., Swan, S.K., and Grantham, J.J. (1995). Effect of lovastatin on the development of polycystic kidney disease in the Han:SPRD rat. *Am J Kidney Dis* *26*, 501-507.
- Godley, L.A., Kopp, J.B., Eckhaus, M., Paglino, J.J., Owens, J., and Varmus, H.E. (1996). Wild-type p53 transgenic mice exhibit altered differentiation of the ureteric bud and possess small kidneys. *Genes Dev* *10*, 836-850.
- Goilav, B., Satlin, L.M., and Wilson, P.D. (2006). Intracellular apoptotic pathways in human autosomal-dominant (AD) and autosomal-recessive (AR) polycystic kidney disease (PKD). *J Am Soc Nephrol* *17*, 705A.
- Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R.N., and White, R.J. (2003). Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* *421*, 290-294.
- Gonzalez-Perrett, S., Kim, K., Ibarra, C., Damiano, A.E., Zotta, E., Batelli, M., Harris, P.C., Reisin, I.L., Arnaout, M.A., and Cantiello, H.F. (2001). Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 1182-1187.
- Goodman, T., Grice, H.C., Becking, G.C., and Salem, F.A. (1970). A cystic nephropathy induced by nordihydroguaiaretic acid in the rat. Light and electron microscopic investigations. *Lab Invest* *23*, 93-107.
- Goto, S., Yaoita, E., Matsunami, H., Kondo, D., Yamamoto, T., Kawasaki, K., Arakawa, M., and Kihara, I. (1998). Involvement of R-cadherin in the early stage of glomerulogenesis. *J Am Soc Nephrol* *9*, 1234-1241.
- Gout, A.M., Martin, N.C., Brown, A.F., and Ravine, D. (2007). PKDB: Polycystic Kidney Disease Mutation Database-a gene variant database for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mutat*.

- Grandori, C., Gomez-Roman, N., Felton-Edkins, Z.A., Ngouenet, C., Galloway, D.A., Eisenman, R.N., and White, R.J. (2005). c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nature cell biology* 7, 311-318.
- Granot, Y., Van Putten, V., Przekwas, J., Gabow, P.A., and Schrier, R.W. (1990). Intra- and extracellular proteins in human normal and polycystic kidney epithelial cells. *Kidney Int* 37, 1301-1309.
- Grantham, J.J. (1990). Polycystic kidney disease: neoplasia in disguise. *Am J Kidney Dis* 15, 110-116.
- Grantham, J.J. (1997). Mechanisms of progression in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 63, S93-S97.
- Grantham, J.J. (2000). Time to treat polycystic kidney diseases like the neoplastic disorders that they are. *Kidney Int* 57, 339-340.
- Grantham, J.J., Ye, M., Gattone, V.H., 2nd, and Sullivan, L.P. (1995). In vitro fluid secretion by epithelium from polycystic kidneys. *J Clin Invest* 95, 195-202.
- Green, D.R., and Evan, G.I. (2002). A matter of life and death. *Cancer cell* 1, 19-30.
- Gresh, L., Fischer, E., Reimann, A., Tanguy, M., Garbay, S., Shao, X., Hiesberger, T., Fiette, L., Igarashi, P., Yaniv, M., *et al.* (2004). A transcriptional network in polycystic kidney disease. *EMBO J* 23, 1657-1668.
- Gretz, N., Zeier, M., Geberth, S., Strauch, M., and Ritz, E. (1989). Is gender a determinant for evolution of renal failure? A study in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 14, 178-183.
- Grewal, S.S., Li, L., Orian, A., Eisenman, R.N., and Edgar, B.A. (2005). Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during *Drosophila* development. *Nature cell biology* 7, 295-302.
- Grieshammer, U., Cebrian, C., Ilagan, R., Meyers, E., Herzlinger, D., and Martin, G.R. (2005). FGF8 is required for cell survival at distinct stages of nephrogenesis and for regulation of gene expression in nascent nephrons. *Development* 132, 3847-3857.
- Grieshammer, U., Le, M., Plump, A.S., Wang, F., Tessier-Lavigne, M., and Martin, G.R. (2004). SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Developmental cell* 6, 709-717.

- Griffin, M.D., O'Sullivan, D.A., Torres, V.E., Grande, J.P., Kanwar, Y.S., and Kumar, R. (1997). Expression of polycystin in mouse metanephros and extra-metanephric tissues. *Kidney Int* 52, 1196-1205.
- Grimm, D.H., Cai, Y., Chauvet, V., Rajendran, V., Zeltner, R., Geng, L., Avner, E.D., Sweeney, W., Somlo, S., and Caplan, M.J. (2003). Polycystin-1 distribution is modulated by polycystin-2 expression in mammalian cells. *J Biol Chem* 278, 36786-36793.
- Grimm, D.H., Karihaloo, A., Cai, Y., Somlo, S., Cantley, L.G., and Caplan, M.J. (2006). Polycystin-2 regulates proliferation and branching morphogenesis in kidney epithelial cells. *J Biol Chem* 281, 137-144.
- Grote, D., Souabni, A., Busslinger, M., and Bouchard, M. (2006). Pax 2/8-regulated Gata 3 expression is necessary for morphogenesis and guidance of the nephric duct in the developing kidney. *Development* 133, 53-61.
- Guay-Woodford, L.M. (2003). Murine models of polycystic kidney disease: molecular and therapeutic insights. *Am J Physiol Renal Physiol* 285, F1034-1049.
- Guay-Woodford, L.M., Bryda, E.C., Christine, B., Lindsey, J.R., Collier, W.R., Avner, E.D., D'Eustachio, P., and Flaherty, L. (1996). Evidence that two phenotypically distinct mouse PKD mutations, bpk and jcpk, are allelic. *Kidney Int* 50, 1158-1165.
- Guillaume, R., D'Agati, V., Daoust, M., and Trudel, M. (1999). Murine Pkd1 is a developmentally regulated gene from morula to adulthood: role in tissue condensation and patterning. *Dev Dyn* 214, 337-348.
- Guillaume, R., and Trudel, M. (2000). Distinct and common developmental expression patterns of the murine Pkd2 and Pkd1 genes. *Mech Dev* 93, 179-183.
- Guo, L., Chen, M., Basora, N., and Zhou, J. (2000). The human polycystic kidney disease 2-like (PKDL) gene: exon/intron structure and evidence for a novel splicing mechanism. *Mamm Genome* 11, 46-50.
- Gupta, S., Verfaillie, C., Chmielewski, D., Kren, S., Eidman, K., Connaire, J., Heremans, Y., Lund, T., Blackstad, M., Jiang, Y., *et al.* (2006). Isolation and characterization of kidney-derived stem cells. *J Am Soc Nephrol* 17, 3028-3040.
- Haegel, H., Larue, L., Ohsugi, M., Fedorov, L., Herrenknecht, K., and Kemler, R. (1995). Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development* 121, 3529-3537.
- Hanaoka, K., Qian, F., Boletta, A., Bhunia, A.K., Piontek, K., Tsiokas, L., Sukhatme, V.P., Guggino, W.B., and Germino, G.G. (2000). Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* 408, 990-994.

- Harada, M., and Nishinakamura, R. (2004). Generation of metanephric mesenchyme-specific conditional knockout system. *J Am Soc Nephrol* *15*, 417A.
- Harding, M.A., Gattone, V.H., Grantham, J.J., and Calvet, J.P. (1992). Localization of overexpressed c-myc mRNA in polycystic kidneys of the cpk mouse. *Kidney Int* *41*, 317-325.
- Harris, P.C., and Rossetti, S. (2004). Molecular genetics of autosomal recessive polycystic kidney disease. *Mol Genet Metab* *81*, 75-85.
- Hart, T.C., Gorry, M.C., Hart, P.S., Woodard, A.S., Shihabi, Z., Sandhu, J., Shirts, B., Xu, L., Zhu, H., Barmada, M.M., *et al.* (2002). Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy. *J Med Genet* *39*, 882-892.
- Hartz, P.A., and Wilson, P.D. (1997). Functional defects in lysosomal enzymes in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): abnormalities in synthesis, molecular processing, polarity, and secretion. *Biochem Mol Med* *60*, 8-26.
- Hateboer, N., v Dijk, M.A., Bogdanova, N., Coto, E., Saggar-Malik, A.K., San Millan, J.L., Torra, R., Breuning, M., and Ravine, D. (1999). Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. European PKD1-PKD2 Study Group. *Lancet* *353*, 103-107.
- Hatini, V., Huh, S.O., Herzlinger, D., Soares, V.C., and Lai, E. (1996). Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2. *Genes Dev* *10*, 1467-1478.
- Hatton, K.S., Mahon, K., Chin, L., Chiu, F.C., Lee, H.W., Peng, D., Morgenbesser, S.D., Horner, J., and DePinho, R.A. (1996). Expression and activity of L-Myc in normal mouse development. *Mol Cell Biol* *16*, 1794-1804.
- Hayashi, T., Mochizuki, T., Reynolds, D.M., Wu, G., Cai, Y., and Somlo, S. (1997). Characterization of the exon structure of the polycystic kidney disease 2 gene (PKD2). *Genomics* *44*, 131-136.
- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* *281*, 1509-1512.
- Hermeking, H., Rago, C., Schuhmacher, M., Li, Q., Barrett, J.F., Obaya, A.J., O'Connell, B.C., Mateyak, M.K., Tam, W., Kohlhuber, F., *et al.* (2000). Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 2229-2234.

- Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., Syvaioja, J., Saluz, H.P., Haenel, F., and Eilers, M. (2002). Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol Cell* *10*, 509-521.
- Herrera, G.A. (1991). C-erb B-2 amplification in cystic renal disease. *Kidney Int* *40*, 509-513.
- Herron, B.J., Lu, W., Rao, C., Liu, S., Peters, H., Bronson, R.T., Justice, M.J., McDonald, J.D., and Beier, D.R. (2002). Efficient generation and mapping of recessive developmental mutations using ENU mutagenesis. *Nat Genet* *30*, 185-189.
- Herzlinger, D., Qiao, J., Cohen, D., Ramakrishna, N., and Brown, A.M. (1994). Induction of kidney epithelial morphogenesis by cells expressing Wnt-1. *Dev Biol* *166*, 815-818.
- Hidaka, S., Konecke, V., Osten, L., and Witzgall, R. (2004). PIGEA-14, a novel coiled-coil protein affecting the intracellular distribution of polycystin-2. *J Biol Chem* *279*, 35009-35016.
- Hiesberger, T., Bai, Y., Shao, X., McNally, B.T., Sinclair, A.M., Tian, X., Somlo, S., and Igarashi, P. (2004). Mutation of hepatocyte nuclear factor-1beta inhibits Pkhd1 gene expression and produces renal cysts in mice. *J Clin Invest* *113*, 814-825.
- Hiesberger, T., Shao, X., Gourley, E., Reimann, A., Pontoglio, M., and Igarashi, P. (2005). Role of the hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) C-terminal domain in Pkhd1 (ARPKD) gene transcription and renal cystogenesis. *J Biol Chem* *280*, 10578-10586.
- Hildebrandt, F., and Otto, E. (2000). Molecular genetics of nephronophthisis and medullary cystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* *11*, 1753-1761.
- Hildebrandt, F., Otto, E., Rensing, C., Nothwang, H.G., Vollmer, M., Adolphs, J., Hanusch, H., and Brandis, M. (1997). A novel gene encoding an SH3 domain protein is mutated in nephronophthisis type 1. *Nat Genet* *17*, 149-153.
- Hill, B.T., Perrin, D., and Kruczynski, A. (2000). Inhibition of RAS-targeted prenylation: protein farnesyl transferase inhibitors revisited. *Crit Rev Oncol Hematol* *33*, 7-23.
- Hoche, B., Thone-Reineke, C., Rohmeiss, P., Schmager, F., Slowinski, T., Burst, V., Siegmund, F., Quertermous, T., Bauer, C., Neumayer, H.H., *et al.* (1997). Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J Clin Invest* *99*, 1380-1389.
- Hodanova, K., Majewski, J., Kublova, M., Vyletal, P., Kalbacova, M., Stiburkova, B., Hulkova, H., Chagnon, Y.C., Lanouette, C.M., Marinaki, A., *et al.* (2005). Mapping of a new candidate locus for uromodulin-associated kidney disease (UAKD) to chromosome 1q41. *Kidney Int* *68*, 1472-1482.

- Hossain, Z., Ali, S.M., Ko, H.L., Xu, J., Ng, C.P., Guo, K., Qi, Z., Ponniah, S., Hong, W., and Hunziker, W. (2007). Glomerulocystic kidney disease in mice with a targeted inactivation of *Wwtr1*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 1631-1636.
- Hou, X., Mrug, M., Yoder, B.K., Lefkowitz, E.J., Kremmidiotis, G., D'Eustachio, P., Beier, D.R., and Guay-Woodford, L.M. (2002). Cystin, a novel cilia-associated protein, is disrupted in the *cpk* mouse model of polycystic kidney disease. *J Clin Invest* *109*, 533-540.
- Hu, M.C., Piscione, T.D., and Rosenblum, N.D. (2003). Elevated SMAD1/beta-catenin molecular complexes and renal medullary cystic dysplasia in *ALK3* transgenic mice. *Development* *130*, 2753-2766.
- Hu, M.C., and Rosenblum, N.D. (2005). *Smad1*, beta-catenin and *Tcf4* associate in a molecular complex with the *Myc* promoter in dysplastic renal tissue and cooperate to control *Myc* transcription. *Development* *132*, 215-225.
- Huan, Y., and van Adelsberg, J. (1999). Polycystin-1, the *PKD1* gene product, is in a complex containing E-cadherin and the catenins. *J Clin Invest* *104*, 1459-1468.
- Hudson, B.G., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M., and Neilson, E.G. (2003). Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med* *348*, 2543-2556.
- Hueber, A.O., Zornig, M., Lyon, D., Suda, T., Nagata, S., and Evan, G.I. (1997). Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. *Science* *278*, 1305-1309.
- Huelsken, J., and Behrens, J. (2002). The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* *115*, 3977-3978.
- Hughes, J., Ward, C.J., Aspinwall, R., Butler, R., and Harris, P.C. (1999). Identification of a human homologue of the sea urchin receptor for egg jelly: a polycystic kidney disease-like protein. *Hum Mol Genet* *8*, 543-549.
- Hughes, J., Ward, C.J., Peral, B., Aspinwall, R., Clark, K., San Millan, J.L., Gamble, V., and Harris, P.C. (1995). The polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet* *10*, 151-160.
- Hurlin, P.J. (2005). N-Myc functions in transcription and development. *Birth Defects Res C Embryo Today* *75*, 340-352.
- Hurlin, P.J., Queva, C., and Eisenman, R.N. (1997). *Mnt*, a novel Max-interacting protein is coexpressed with *Myc* in proliferating cells and mediates repression at *Myc* binding sites. *Genes Dev* *11*, 44-58.
- Hurlin, P.J., Queva, C., Koskinen, P.J., Steingrimsson, E., Ayer, D.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Eisenman, R.N. (1996). *Mad3* and *Mad4*: novel Max-interacting transcriptional

repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation. *EMBO J* 15, 2030.

Husson, H., Manavalan, P., Akmaev, V.R., Russo, R.J., Cook, B., Richards, B., Barberio, D., Liu, D., Cao, X., Landes, G.M., *et al.* (2004). New insights into ADPKD molecular pathways using combination of SAGE and microarray technologies. *Genomics* 84, 497-510.

Huston, J., 3rd, Torres, V.E., Sullivan, P.P., Offord, K.P., and Wiebers, D.O. (1993). Value of magnetic resonance angiography for the detection of intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 3, 1871-1877.

Iaccarino, I., Hancock, D., Evan, G., and Downward, J. (2003). c-Myc induces cytochrome c release in Rat1 fibroblasts by increasing outer mitochondrial membrane permeability in a Bid-dependent manner. *Cell Death Differ* 10, 599-608.

Ibraghimov-Beskrovnaya, O. (2007). Targeting dysregulated cell cycle and apoptosis for polycystic kidney disease therapy. *Cell Cycle* 6, 776-779.

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

Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Dackowski, W.R., Foggensteiner, L., Coleman, N., Thiru, S., Petry, L.R., Burn, T.C., Connors, T.D., Van Raay, T., Bradley, J., *et al.* (1997). Polycystin: in vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6397-6402.

Iglesias, C.G., Torres, V.E., Offord, K.P., Holley, K.E., Beard, C.M., and Kurland, L.T. (1983). Epidemiology of adult polycystic kidney disease, Olmsted County, Minnesota: 1935-1980. *Am J Kidney Dis* 2, 630-639.

Iglesias, D.M., Hueber, P.A., Chu, L., Campbell, R., Patenaude, A.M., Dziarmaga, A.J., Quinlan, J., Mohamed, O., Dufort, D., and Goodyer, P.R. (2007). Canonical WNT signaling during kidney development. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, F494-500.

Ignatenko, N.A., Holubec, H., Besselsen, D.G., Blohm-Mangone, K.A., Padilla-Torres, J.L., Nagle, R.B., de Alboranc, I.M., Guillen, R.J., and Gerner, E.W. (2006). Role of c-Myc in intestinal tumorigenesis of the ApcMin/+ mouse. *Cancer biology & therapy* 5, 1658-1664.

Inoki, K., Corradetti, M.N., and Guan, K.L. (2005). Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat Genet* 37, 19-24.

- Inoki, K., Li, Y., Xu, T., and Guan, K.L. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* *17*, 1829-1834.
- Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., *et al.* (2006). TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* *126*, 955-968.
- Ireland, H., Kemp, R., Houghton, C., Howard, L., Clarke, A.R., Sansom, O.J., and Winton, D.J. (2004). Inducible Cre-mediated control of gene expression in the murine gastrointestinal tract: effect of loss of beta-catenin. *Gastroenterology* *126*, 1236-1246.
- Iritani, B.M., and Eisenman, R.N. (1999). c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 13180-13185.
- Itaranta, P., Lin, Y., Perasaari, J., Roel, G., Destree, O., and Vainio, S. (2002). Wnt-6 is expressed in the ureter bud and induces kidney tubule development in vitro. *Genesis* *32*, 259-268.
- Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T.M., Xue, C., Okada, H., and Neilson, E.G. (2002). Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* *110*, 341-350.
- Jackson, T., Allard, M.F., Sreenan, C.M., Doss, L.K., Bishop, S.P., and Swain, J.L. (1990). The c-myc proto-oncogene regulates cardiac development in transgenic mice. *Mol Cell Biol* *10*, 3709-3716.
- Jain, M., Arvanitis, C., Chu, K., Dewey, W., Leonhardt, E., Trinh, M., Sundberg, C.D., Bishop, J.M., and Felsher, D.W. (2002). Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science* *297*, 102-104.
- James, R.G., and Schultheiss, T.M. (2005). Bmp signaling promotes intermediate mesoderm gene expression in a dose-dependent, cell-autonomous and translation-dependent manner. *Dev Biol* *288*, 113-125.
- Janaswami, P.M., Birkenmeier, E.H., Cook, S.A., Rowe, L.B., Bronson, R.T., and Davisson, M.T. (1997). Identification and genetic mapping of a new polycystic kidney disease on mouse chromosome 8. *Genomics* *40*, 101-107.
- Jena, N., Martin-Seisdedos, C., McCue, P., and Croce, C.M. (1997). BMP7 null mutation in mice: developmental defects in skeleton, kidney, and eye. *Exp Cell Res* *230*, 28-37.
- Jiang, S.T., Chiou, Y.Y., Wang, E., Lin, H.K., Lin, Y.T., Chi, Y.C., Wang, C.K., Tang, M.J., and Li, H. (2006). Defining a link with autosomal-dominant polycystic kidney disease in mice with congenitally low expression of Pkd1. *Am J Pathol* *168*, 205-220.

- Johnston, L.A., Prober, D.A., Edgar, B.A., Eisenman, R.N., and Gallant, P. (1999). *Drosophila* myc regulates cellular growth during development. *Cell* *98*, 779-790.
- Jones, R.M., Branda, J., Johnston, K.A., Polymenis, M., Gadd, M., Rustgi, A., Callanan, L., and Schmidt, E.V. (1996). An essential E box in the promoter of the gene encoding the mRNA cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) is a target for activation by c-myc. *Mol Cell Biol* *16*, 4754-4764.
- Jozwiak, J., Kotulska, K., Grajkowska, W., Jozwiak, S., Zalewski, W., Oldak, M., Lojek, M., Rainko, K., Maksym, R., Lazarczyk, M., *et al.* (2007). Upregulation of the WNT pathway in tuberous sclerosis-associated subependymal giant cell astrocytomas. *Brain Dev* *29*, 273-280.
- Juin, P., Hueber, A.O., Littlewood, T., and Evan, G. (1999). c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes Dev* *13*, 1367-1381.
- Juin, P., Hunt, A., Littlewood, T., Griffiths, B., Swigart, L.B., Korsmeyer, S., and Evan, G. (2002). c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Mol Cell Biol* *22*, 6158-6169.
- Jurczyk, A., Gromley, A., Redick, S., San Agustin, J., Witman, G., Pazour, G.J., Peters, D.J., and Doxsey, S. (2004). Pericentrin forms a complex with intraflagellar transport proteins and polycystin-2 and is required for primary cilia assembly. *J Cell Biol* *166*, 637-643.
- Kaelin, W.G., Jr. (2003). The von Hippel-Lindau gene, kidney cancer, and oxygen sensing. *J Am Soc Nephrol* *14*, 2703-2711.
- Kagaya, S., Kitanaka, C., Noguchi, K., Mochizuki, T., Sugiyama, A., Asai, A., Yasuhara, N., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., and Kuchino, Y. (1997). A functional role for death proteases in s-Myc- and c-Myc-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* *17*, 6736-6745.
- Kangas, A., Nicholson, D.W., and Holtta, E. (1998). Involvement of CPP32/Caspase-3 in c-Myc-induced apoptosis. *Oncogene* *16*, 387-398.
- Kanwar, Y.S., and Carone, F.A. (1984). Reversible changes of tubular cell and basement membrane in drug-induced renal cystic disease. *Kidney Int* *26*, 35-43.
- Karavanova, I.D., Dove, L.F., Resau, J.H., and Perantoni, A.O. (1996). Conditioned medium from a rat ureteric bud cell line in combination with bFGF induces complete differentiation of isolated metanephric mesenchyme. *Development* *122*, 4159-4167.
- Karlsson, A., Deb-Basu, D., Cherry, A., Turner, S., Ford, J., and Felsher, D.W. (2003). Defective double-strand DNA break repair and chromosomal translocations by MYC overexpression. *Proc Natl Acad Sci USA* *100*, 9974-9979.

- Kamer, C., Wharton, K.A., and Carroll, T.J. (2006). Apical-basal polarity, Wnt signaling and vertebrate organogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 17, 214-222.
- Karsenty, G., Luo, G., Hofmann, C., and Bradley, A. (1996). BMP 7 is required for nephrogenesis, eye development, and skeletal patterning. *Ann N Y Acad Sci* 785, 98-107.
- Kasibhatla, S., Beere, H.M., Brunner, T., Echeverri, F., and Green, D.R. (2000). A 'non-canonical' DNA-binding element mediates the response of the Fas-ligand promoter to c-Myc. *Curr Biol* 10, 1205-1208.
- Katoh, M., and Katoh, M. (2007a). Conserved POU/OCT- and GATA-binding sites in 5'-flanking promoter region of mammalian WNT8B orthologs. *Int J Oncol* 30, 1273-1277.
- Katoh, Y., and Katoh, M. (2007b). Conserved POU-binding site linked to SP1-binding site within FZD5 promoter: Transcriptional mechanisms of FZD5 in undifferentiated human ES cells, fetal liver/spleen, adult colon, pancreatic islet, and diffuse-type gastric cancer. *Int J Oncol* 30, 751-755.
- Katsanis, N. (2004). The oligogenic properties of Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet* 13 *Spec No 1*, R65-71.
- Kauffmann-Zeh, A., Rodriguez-Viciano, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey, P., Downward, J., and Evan, G. (1997). Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* 385, 544-548.
- Keith, D.S., Torres, V.E., Johnson, C.M., and Holley, K.E. (1994). Effect of sodium chloride, enalapril, and losartan on the development of polycystic kidney disease in Han:SPRD rats. *Am J Kidney Dis* 24, 491-498.
- Kelley, K.A., Agarwal, N., Reeders, S., and Herrup, K. (1991). Renal cyst formation and multifocal neoplasia in transgenic mice carrying the simian virus 40 early region. *J Am Soc Nephrol* 2, 84-97.
- Kennefick, T.M., Al-Nimri, M.A., Oyama, T.T., Thompson, M.M., Kelly, F.J., Chapman, J.G., and Anderson, S. (1999). Hypertension and renal injury in experimental polycystic kidney disease. *Kidney Int* 56, 2181-2190.
- Kim, E., Arnould, T., Sellin, L., Benzing, T., Comella, N., Kocher, O., Tsiokas, L., Sukhatme, V.P., and Walz, G. (1999a). Interaction between RGS7 and polycystin. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 6371-6376.
- Kim, E., Arnould, T., Sellin, L.K., Benzing, T., Fan, M.J., Gruning, W., Sokol, S.Y., Drummond, I., and Walz, G. (1999b). The polycystic kidney disease 1 gene product modulates Wnt signaling. *J Biol Chem* 274, 4947-4953.

- Kim, H., Jeong, W., Ahn, K., Ahn, C., and Kang, S. (2004). 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.
- Kim, I., Mai, W., Qiao, H., Liang, D., Cho, S.-Y., Xiong, H., and Wu, Q. (2006). Pkhd1 mediates expression of polycystin in vivo. *J Am Soc Nephrol* *17*, 701A.
- Kim, K., Drummond, I., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Klinger, K., and Arnaout, M.A. (2000). Polycystin 1 is required for the structural integrity of blood vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 1731-1736.
- Kim, W.Y., and Kaelin, W.G. (2004). Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* *22*, 4991-5004.
- Kinouchi, T., Saiki, S., Naoe, T., Uenaka, A., Kotake, T., Shiku, H., and Nakayama, E. (1989). Correlation of c-myc expression with nuclear pleomorphism in human renal cell carcinoma. *Cancer Res* *49*, 3627-3630.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* *14*, 5579-5588.
- Kispert, A., Vainio, S., and McMahon, A.P. (1998). Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development* *125*, 4225-4234.
- Kleber, M., and Sommer, L. (2004). Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Curr Opin Cell Biol* *16*, 681-687.
- Kleefstrom, J., Vastrik, I., Saksela, E., Valle, J., Eilers, M., and Alitalo, K. (1994). c-Myc induces cellular susceptibility to the cytotoxic action of TNF-alpha. *EMBO J* *13*, 5442-5450.
- Kleefstrom, J., Verschuren, E.W., and Evan, G. (2002). c-Myc augments the apoptotic activity of cytosolic death receptor signaling proteins by engaging the mitochondrial apoptotic pathway. *J Biol Chem* *277*, 43224-43232.
- Kleymenova, E., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Kugoh, H., Everitt, J., Xu, H., Kiguchi, K., Landes, G., Harris, P., and Walker, C. (2001). 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.
- Klingel, R., Storkel, S., Dippold, W., Rumpelt, H.J., Moll, R., Kohler, H., and Meyer zum Buschenfelde, K.H. (1991). Autosomal dominant polycystic kidney disease--in vitro

culture of cyst-lining epithelial cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 61, 189-199.

- Knies-Bamforth, U.E., Fox, S.B., Poulson, R., Evan, G.I., and Harris, A.L. (2004). c-Myc interacts with hypoxia to induce angiogenesis in vivo by a vascular endothelial growth factor-dependent mechanism. *Cancer Res* 64, 6563-6570.
- Knoepfler, P.S., Cheng, P.F., and Eisenman, R.N. (2002). N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev* 16, 2699-2712.
- Knudson, A.G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 820-823.
- Kobayashi, A., Kwan, K.M., Carroll, T.J., McMahon, A.P., Mendelsohn, C.L., and Behringer, R.R. (2005). Distinct and sequential tissue-specific activities of the LIM-class homeobox gene *Lim1* for tubular morphogenesis during kidney development. *Development* 132, 2809-2823.
- Kobayashi, T., Hirayama, Y., Kobayashi, E., Kubo, Y., and Hino, O. (1995). 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.
- Kobe, B., and Kajava, A.V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 11, 725-732.
- Kohl, N.E., Kanda, N., Schreck, R.R., Bruns, G., Latt, S.A., Gilbert, F., and Alt, F.W. (1983). Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell* 35, 359-367.
- Kohlhase, J., Wischermann, A., Reichenbach, H., Froster, U., and Engel, W. (1998). Mutations in the *SALL1* putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome. *Nat Genet* 18, 81-83.
- Koptides, M., Constantinides, R., Kyriakides, G., Hadjigavriel, M., Patsalis, P.C., Pierides, A., and Deltas, C.C. (1998). Loss of heterozygosity in polycystic kidney disease with a missense mutation in the repeated region of *PKD1*. *Hum Genet* 103, 709-717.
- Koptides, M., Hadjimichael, C., Koupepidou, P., Pierides, A., and Constantinou Deltas, C. (1999). Germinal and somatic mutations in the *PKD2* gene of renal cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* 8, 509-513.

- Kotsis, F., Nitschke, R., Boehlke, C., Bashkurov, M., Walz, G., and Kuehn, E.W. (2007). Ciliary calcium signaling is modulated by kidney injury molecule-1 (Kim1). *Pflugers Arch* 453, 819-829.
- Kottgen, M., Benzing, T., Simmen, T., Tauber, R., Buchholz, B., Feliciangeli, S., Huber, T.B., Schermer, B., Kramer-Zucker, A., Hopker, K., *et al.* (2005). Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. *EMBO J* 24, 705-716.
- Koulen, P., Cai, Y., Geng, L., Maeda, Y., Nishimura, S., Witzgall, R., Ehrlich, B.E., and Somlo, S. (2002). Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nature cell biology* 4, 191-197.
- Krasnoperov, V., Lu, Y., Buryanovsky, L., Neubert, T.A., Ichtchenko, K., and Petrenko, A.G. (2002). Post-translational proteolytic processing of the calcium-independent receptor of alpha-latrotoxin (CIRL), a natural chimera of the cell adhesion protein and the G protein-coupled receptor. Role of the G protein-coupled receptor proteolysis site (GPS) motif. *J Biol Chem* 277, 46518-46526.
- Kreidberg, J.A., Donovan, M.J., Goldstein, S.L., Rennke, H., Shepherd, K., Jones, R.C., and Jaenisch, R. (1996). Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development* 122, 3537-3547.
- Kreidberg, J.A., Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., and Jaenisch, R. (1993). WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74, 679-691.
- Kugoh, H., Kleymenova, E., and Walker, C.L. (2002). Retention of membrane-localized beta-catenin in cells lacking functional polycystin-1 and tuberin. *Mol Carcinog* 33, 131-136.
- Kume, T., Deng, K., and Hogan, B.L. (2000). Murine forkhead/winged helix genes Foxc1 (Mf1) and Foxc2 (Mfh1) are required for the early organogenesis of the kidney and urinary tract. *Development* 127, 1387-1395.
- Kurbegovic, A., Couillard, M., and Trudel, M. (2004). Expression of polycystin-1 extracellular domain leads to loss of renal function. *J Am Soc Nephrol* 15, 220A.
- Kuure, S., Popsueva, A., Jakobson, M., Sainio, K., and Sariola, H. (2007). Glycogen Synthase Kinase-3 Inactivation and Stabilization of beta-Catenin Induce Nephron Differentiation in Isolated Mouse and Rat Kidney Mesenchymes. *J Am Soc Nephrol* 18, 1130-1139.
- Kuure, S., Sainio, K., Vuolteenaho, R., Ilves, M., Wartiovaara, K., Immonen, T., Kvist, J., Vainio, S., and Sariola, H. (2005). Crosstalk between Jagged1 and GDNF/Ret/GFRalpha1 signalling regulates ureteric budding and branching. *Mech Dev* 122, 765-780.

- Lager, D.J., Qian, Q., Bengal, R.J., Ishibashi, M., and Torres, V.E. (2001). The pck rat: a new model that resembles human autosomal dominant polycystic kidney and liver disease. *Kidney Int* 59, 126-136.
- Laherty, C.D., Yang, W.M., Sun, J.M., Davie, J.R., Seto, E., and Eisenman, R.N. (1997). Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* 89, 349-356.
- Laidler, P., Dulinska, J., and Mrozicki, S. (2007). Does the inhibition of c-myc expression mediate the anti-tumor activity of PPAR's ligands in prostate cancer cell lines? *Arch Biochem Biophys*.
- Lanoix, J., D'Agati, V., Szabolcs, M., and Trudel, M. (1996). Dysregulation of cellular proliferation and apoptosis mediates human autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Oncogene* 13, 1153-1160.
- Lantinga-van Leeuwen, I.S., Dauwese, J.G., Baelde, H.J., Leonhard, W.N., van de Wal, A., Ward, C.J., Verbeek, S., Deruiter, M.C., Breuning, M.H., de Heer, E., *et al.* (2004). Lowering of Pkd1 expression is sufficient to cause polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* 13, 3069-3077.
- Lantinga-van Leeuwen, I.S., Leonhard, W.N., Dauwese, H., Baelde, H.J., van Oost, B.A., Breuning, M.H., and Peters, D.J. (2005). Common regulatory elements in the polycystic kidney disease 1 and 2 promoter regions. *Eur J Hum Genet* 13, 649-659.
- Lantinga-van Leeuwen, I.S., Leonhard, W.N., van de Wal, A., Breuning, M., de Heer, E., and Peters, D.J. (2006a). Conditional inactivation of *Pkd1* in developing kidneys induces rapid cyst formation. *J Am Soc Nephrol* 17, 89A.
- Lantinga-van Leeuwen, I.S., Leonhard, W.N., van de Wal, A., Breuning, M.H., Verbeek, S., de Heer, E., and Peters, D.J. (2006b). Transgenic mice expressing tamoxifen-inducible Cre for somatic gene modification in renal epithelial cells. *Genesis* 44, 225-232.
- Le Moellic, C., Lal, M., Merrick, D., Chauvet, V., Gottardi, C.J., and Caplan, M.J. (2006). The nuclear localization signal of the polycystin-1 C-terminal tail binds to beta-catenin and inhibits Wnt signaling. *J Am Soc Nephrol* 17, 702A.
- Le, N.H., van der, B.P., Huls, G., van de, W.M., Loghman-Adham, M., Ong, A.C., Calvet, J.P., Clevers, H., Breuning, M.H., van Dam, H., *et al.* (2004). Aberrant polycystin-1 expression results in modification of activator protein-1 activity, whereas Wnt signaling remains unaffected. *J Biol Chem* 279, 27472-27481.

- Le, N.H., van der, W.A., van der, B.P., Lantinga-van Leeuwen, I.S., Breuning, M.H., van Dam, H., de Heer, E., and Peters, D.J. (2005). Increased activity of activator protein-1 transcription factor components ATF2, c-Jun, and c-Fos in human and mouse autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 16, 2724-2731.
- Lee, D.C., Chan, K.W., and Chan, S.Y. (1998). Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in adult polycystic kidney disease. *J Urol* 159, 291-296.
- Leheste, J.R., Melsen, F., Wellner, M., Jansen, P., Schlichting, U., Renner-Muller, I., Andreassen, T.T., Wolf, E., Bachmann, S., Nykjaer, A., *et al.* (2003). Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect. *FASEB J* 17, 247-249.
- Lehtonen, S., Ora, A., Olkkonen, V.M., Geng, L., Zerial, M., Somlo, S., and Lehtonen, E. (2000). In vivo interaction of the adapter protein CD2-associated protein with the type 2 polycystic kidney disease protein, polycystin-2. *J Biol Chem* 275, 32888-32893.
- Lelievre-Pegorier, M., Vilar, J., Ferrier, M.L., Moreau, E., Freund, N., Gilbert, T., and Merlet-Benichou, C. (1998). Mild vitamin A deficiency leads to inborn nephron deficit in the rat. *Kidney Int* 54, 1455-1462.
- Li, A., Tian, X., Sung, S.W., and Somlo, S. (2003a). Identification of two novel polycystic kidney disease-1-like genes in human and mouse genomes. *Genomics* 81, 596-608.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Li, H.P., Geng, L., Burrow, C.R., and Wilson, P.D. (1999). Identification of phosphorylation sites in the PKD1-encoded protein C-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun* 259, 356-363.
- Li, J., Chen, F., and Epstein, J.A. (2000). Neural crest expression of Cre recombinase directed by the proximal Pax3 promoter in transgenic mice. *Genesis* 26, 162-164.
- Li, K.J., Shiau, A.L., Chiou, Y.Y., Yo, Y.T., and Wu, C.L. (2005a). Transgenic overexpression of prothymosin alpha induces development of polycystic kidney disease. *Kidney Int* 67, 1710-1722.
- Li, Q., Dai, Y., Guo, L., Liu, Y., Hao, C., Wu, G., Basora, N., Michalak, M., and Chen, X.Z. (2003b). Polycystin-2 associates with tropomyosin-1, an actin microfilament component. *J Mol Biol* 325, 949-962.

- Li, Q., Montalbetti, N., Shen, P.Y., Dai, X.Q., Cheeseman, C.I., Karpinski, E., Wu, G., Cantiello, H.F., and Chen, X.Z. (2005b). Alpha-actinin associates with polycystin-2 and regulates its channel activity. *Hum Mol Genet* *14*, 1587-1603.
- Li, Q., Montalbetti, N., Wu, Y., Ramos, A., Raychowdhury, M.K., Chen, X.Z., and Cantiello, H.F. (2006). Polycystin-2 cation channel function is under the control of microtubular structures in primary cilia of renal epithelial cells. *J Biol Chem* *281*, 37566-37575.
- Li, Q., Shen, P.Y., Wu, G., and Chen, X.Z. (2003c). Polycystin-2 interacts with troponin I, an angiogenesis inhibitor. *Biochemistry (Mosc)* *42*, 450-457.
- Li, X., Luo, Y., Starremans, P.G., McNamara, C.A., Pei, Y., and Zhou, J. (2005c). Polycystin-1 and polycystin-2 regulate the cell cycle through the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature cell biology* *7*, 1202-1212.
- Li, Y., Corradetti, M.N., Inoki, K., and Guan, K.L. (2004). TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends Biochem Sci* *29*, 32-38.
- Li, Y., Wright, J.M., Qian, F., Germino, G.G., and Guggino, W.B. (2005d). Polycystin 2 interacts with type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to modulate intracellular Ca²⁺ signaling. *J Biol Chem* *280*, 41298-41306.
- Lieberman, E., Salinas-Madrigal, L., Gwinn, J.L., Brennan, L.P., Fine, R.N., and Landing, B.H. (1971). Infantile polycystic disease of the kidneys and liver: clinical, pathological and radiological correlations and comparison with congenital hepatic fibrosis. *Medicine (Baltimore)* *50*, 277-318.
- Lin, F., Hiesberger, T., Cordes, K., Sinclair, A.M., Goldstein, L.S., Somlo, S., and Igarashi, P. (2003). Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 5286-5291.
- Lin, H.H., Yang, T.P., Jiang, S.T., Yang, H.Y., and Tang, M.J. (1999). Bcl-2 overexpression prevents apoptosis-induced Madin-Darby canine kidney simple epithelial cyst formation. *Kidney Int* *55*, 168-178.
- Lin, Y., Liu, A., Zhang, S., Ruusunen, T., Kreidberg, J.A., Peltoketo, H., Drummond, I., and Vainio, S. (2001). Induction of ureter branching as a response to Wnt-2b signaling during early kidney organogenesis. *Dev Dyn* *222*, 26-39.
- Liu, H., Mohamed, O., Dufort, D., and Wallace, V.A. (2003). Characterization of Wnt signaling components and activation of the Wnt canonical pathway in the murine retina. *Dev Dyn* *227*, 323-334.

- Liu, S., Lu, W., Obara, T., Kuida, S., Lehoczky, J., Dewar, K., Drummond, I.A., and Beier, D.R. (2002). A defect in a novel Nek-family kinase causes cystic kidney disease in the mouse and in zebrafish. *Development* 129, 5839-5846.
- Liu, Z.Z., Carone, F.A., Nakumara, S., and Kanwar, Y.S. (1992). Altered synthesis of proteoglycans by cyst-derived cells from autosomal-dominant polycystic kidneys. *Am J Physiol* 263, F697-704.
- Lo, S.H., Yu, Q.C., Degenstein, L., Chen, L.B., and Fuchs, E. (1997). Progressive kidney degeneration in mice lacking tensin. *J Cell Biol* 136, 1349-1361.
- Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781-810.
- Lohning, C., Nowicka, U., and Frischauf, A.M. (1997). The mouse homolog of PKD1: sequence analysis and alternative splicing. *Mamm Genome* 8, 307-311.
- Longa, L., Scolari, F., Brusco, A., Carbonara, C., Polidoro, S., Valzorio, B., Riegler, P., Migone, N., and Maiorca, R. (1997). A large TSC2 and PKD1 gene deletion is associated with renal and extrarenal signs of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 12, 1900-1907.
- Lovisolo, J.A., Casati, B., Clerici, L., Marafante, E., Bono, A.V., Celato, N., and Salvatore, M. (2006). Gene expression profiling of renal cell carcinoma: a DNA microarray analysis. *BJU Int* 98, 205-216.
- Low, S.H., Vasanth, S., Larson, C.H., Mukherjee, S., Sharma, N., Kinter, M.T., Kane, M.E., Obara, T., and Weimbs, T. (2006). Polycystin-1, STAT6, and P100 function in a pathway that transduces ciliary mechanosensation and is activated in polycystic kidney disease. *Developmental cell* 10, 57-69.
- Lowden, D.A., Lindemann, G.W., Merlino, G., Barash, B.D., Calvet, J.P., and Gattone, V.H., 2nd (1994). Renal cysts in transgenic mice expressing transforming growth factor-alpha. *J Lab Clin Med* 124, 386-394.
- Lu, W., Fan, X., Basora, N., Babakhanlou, H., Law, T., Rifai, N., Harris, P.C., Perez-Atayde, A.R., Rennke, H.G., and Zhou, J. (1999). Late onset of renal and hepatic cysts in Pkd1-targeted heterozygotes. *Nat Genet* 21, 160-161.
- Lu, W., Peissel, B., Babakhanlou, H., Pavlova, A., Geng, L., Fan, X., Larson, C., Brent, G., and Zhou, J. (1997). Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with a targeted Pkd1 mutation. *Nat Genet* 17, 179-181.

- Lu, W., Shen, X., Pavlova, A., Lakkis, M., Ward, C.J., Pritchard, L., Harris, P.C., Genest, D.R., Perez-Atayde, A.R., and Zhou, J. (2001). Comparison of Pkd1-targeted mutants reveals that loss of polycystin-1 causes cystogenesis and bone defects. *Hum Mol Genet* 10, 2385-2396.
- Lubensky, I.A., Gnarr, J.R., Bertheau, P., Walther, M.M., Linehan, W.M., and Zhuang, Z. (1996). Allelic deletions of the VHL gene detected in multiple microscopic clear cell renal lesions in von Hippel-Lindau disease patients. *Am J Pathol* 149, 2089-2094.
- Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, A.L., Sohocki, M., Bradley, A., and Karsenty, G. (1995). BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev* 9, 2808-2820.
- Luo, Y., Vassilev, P.M., Li, X., Kawanabe, Y., and Zhou, J. (2003). Native polycystin 2 functions as a plasma membrane Ca²⁺-permeable cation channel in renal epithelia. *Mol Cell Biol* 23, 2600-2607.
- Lutz, M.S., and Burk, R.D. (2006). Primary cilium formation requires von hippel-lindau gene function in renal-derived cells. *Cancer Res* 66, 6903-6907.
- Lyons, J.P., Mueller, U.W., Ji, H., Everett, C., Fang, X., Hsieh, J.C., Barth, A.M., and McCrea, P.D. (2004). Wnt-4 activates the canonical beta-catenin-mediated Wnt pathway and binds Frizzled-6 CRD: functional implications of Wnt/beta-catenin activity in kidney epithelial cells. *Exp Cell Res* 298, 369-387.
- MacKay, K., Striker, L.J., Pinkert, C.A., Brinster, R.L., and Striker, G.E. (1987). Glomerulosclerosis and renal cysts in mice transgenic for the early region of SV40. *Kidney Int* 32, 827-837.
- Maclean, K.H., Keller, U.B., Rodriguez-Galindo, C., Nilsson, J.A., and Cleveland, J.L. (2003). c-Myc augments gamma irradiation-induced apoptosis by suppressing Bcl-XL. *Mol Cell Biol* 23, 7256-7270.
- Mah, S.P., Saueressig, H., Goulding, M., Kintner, C., and Dressler, G.R. (2000). Kidney development in cadherin-6 mutants: delayed mesenchyme-to-epithelial conversion and loss of nephrons. *Dev Biol* 223, 38-53.
- Mahjoub, M.R., Trapp, M.L., and Quarmby, L.M. (2005). NIMA-related kinases defective in murine models of polycystic kidney diseases localize to primary cilia and centrosomes. *J Am Soc Nephrol* 16, 3485-3489.
- Majumdar, A., Vainio, S., Kispert, A., McMahon, J., and McMahon, A.P. (2003). Wnt11 and Ret/Gdnf pathways cooperate in regulating ureteric branching during metanephric kidney development. *Development* 130, 3175-3185.

- Mak, B.C., Kenerson, H.L., Aicher, L.D., Barnes, E.A., and Yeung, R.S. (2005). Aberrant beta-catenin signaling in tuberous sclerosis. *Am J Pathol* 167, 107-116.
- Mak, B.C., Takemaru, K., Kenerson, H.L., Moon, R.T., and Yeung, R.S. (2003). The tuberin-hamartin complex negatively regulates beta-catenin signaling activity. *J Biol Chem* 278, 5947-5951.
- Malhas, A.N., Abuknesha, R.A., and Price, R.G. (2002). Interaction of the leucine-rich repeats of polycystin-1 with extracellular matrix proteins: possible role in cell proliferation. *J Am Soc Nephrol* 13, 19-26.
- Malynn, B.A., de Alboran, I.M., O'Hagan, R.C., Bronson, R., Davidson, L., DePinho, R.A., and Alt, F.W. (2000). N-myc can functionally replace c-myc in murine development, cellular growth, and differentiation. *Genes Dev* 14, 1390-1399.
- Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M.L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W.F., Moyer, M.P., Riecken, E.O., Buhr, H.J., *et al.* (1999). Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1603-1608.
- Manzati, E., Aguiari, G., Banzi, M., Manzati, M., Selvatici, R., Falzarano, S., Maestri, I., Pinton, P., Rizzuto, R., and del Senno, L. (2005). The cytoplasmic C-terminus of polycystin-1 increases cell proliferation in kidney epithelial cells through serum-activated and Ca(2+)-dependent pathway(s). *Exp Cell Res* 304, 391-406.
- Maretto, S., Cordenonsi, M., Dupont, S., Braghetta, P., Broccoli, V., Hassan, A.B., Volpin, D., Bressan, G.M., and Piccolo, S. (2003). Mapping Wnt/beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3299-3304.
- Marinkovic, D., Marinkovic, T., Mahr, B., Hess, J., and Wirth, T. (2004). Reversible lymphomagenesis in conditionally c-MYC expressing mice. *Int J Cancer* 110, 336-342.
- Markoff, A., Bogdanova, N., Knop, M., Ruffer, C., Kenis, H., Lux, P., Reutelingsperger, C., Todorov, V., Dworniczak, B., Horst, J., *et al.* (2007). Annexin A5 interacts with polycystin-1 and interferes with the polycystin-1 stimulated recruitment of E-cadherin into adherens junctions. *J Mol Biol* 369, 954-966.
- Markowitz, G.S., Cai, Y., Li, L., Wu, G., Ward, L.C., Somlo, S., and D'Agati, V.D. (1999). Polycystin-2 expression is developmentally regulated. *Am J Physiol* 277, F17-25.
- Martinez, G., Mishina, Y., and Bertram, J.F. (2002). BMPs and BMP receptors in mouse metanephric development: in vivo and in vitro studies. *Int J Dev Biol* 46, 525-533.

- Martinez, J.R., Cowley, B.D., Gattone, V.H., 2nd, Nagao, S., Yamaguchi, T., Kaneta, S., Takahashi, H., and Grantham, J.J. (1997). The effect of paclitaxel on the progression of polycystic kidney disease in rodents. *Am J Kidney Dis* 29, 435-444.
- McCright, B., Gao, X., Shen, L., Lozier, J., Lan, Y., Maguire, M., Herzlinger, D., Weinmaster, G., Jiang, R., and Gridley, T. (2001). Defects in development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic Notch2 mutation. *Development* 128, 491-502.
- McGrath-Morrow, S., Cho, C., Molls, R., Burne-Taney, M., Haas, M., Hicklin, D.J., Tuder, R., and Rabb, H. (2006). VEGF receptor 2 blockade leads to renal cyst formation in mice. *Kidney Int* 69, 1741-1748.
- McMahon, S.B., Van Buskirk, H.A., Dugan, K.A., Copeland, T.D., and Cole, M.D. (1998). The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* 94, 363-374.
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 16, 2794-2804.
- Mendelsohn, C., Batourina, E., Fung, S., Gilbert, T., and Dodd, J. (1999). Stromal cells mediate retinoid-dependent functions essential for renal development. *Development* 126, 1139-1148.
- Mengerink, K.J., Moy, G.W., and Vacquier, V.D. (2002). 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.
- Metcalf, D., Mifsud, S., Di Rago, L., Nicola, N.A., Hilton, D.J., and Alexander, W.S. (2002). Polycystic kidneys and chronic inflammatory lesions are the delayed consequences of loss of the suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 943-948.
- Michaud, J., Russo, P., Grignon, A., Dallaire, L., Bichet, D., Rosenblatt, D., Lamothe, E., and Lambert, M. (1994). Autosomal dominant polycystic kidney disease in the fetus. *Am J Med Genet* 51, 240-246.
- Miller, J.R., Hocking, A.M., Brown, J.D., and Moon, R.T. (1999). Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene* 18, 7860-7872.

- Miltenberger, R.J., Sukow, K.A., and Farnham, P.J. (1995). An E-box-mediated increase in cad transcription at the G1/S-phase boundary is suppressed by inhibitory c-Myc mutants. *Mol Cell Biol* *15*, 2527-2535.
- Milutinovic, J., Rust, P.F., Fialkow, P.J., Agodoa, L.Y., Phillips, L.A., Rudd, T.G., and Sutherland, S. (1992). Intrafamilial phenotypic expression of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* *19*, 465-472.
- Miner, J.H., Morello, R., Andrews, K.L., Li, C., Antignac, C., Shaw, A.S., and Lee, B. (2002). Transcriptional induction of slit diaphragm genes by Lmx1b is required in podocyte differentiation. *J Clin Invest* *109*, 1065-1072.
- Mitchell, K.O., Ricci, M.S., Miyashita, T., Dicker, D.T., Jin, Z., Reed, J.C., and El-Deiry, W.S. (2000). Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. *Cancer Res* *60*, 6318-6325.
- Miyamoto, N., Yoshida, M., Kuratani, S., Matsuo, I., and Aizawa, S. (1997). Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. *Development* *124*, 1653-1664.
- Mochizuki, T., Saijoh, Y., Tsuchiya, K., Shirayoshi, Y., Takai, S., Taya, C., Yonekawa, H., Yamada, K., Nihei, H., Nakatsuji, N., *et al.* (1998). Cloning of *inv*, a gene that controls left/right asymmetry and kidney development. *Nature* *395*, 177-181.
- Mochizuki, T., Wu, G., Hayashi, T., Xenophontos, S.L., Veldhuisen, B., Saris, J.J., Reynolds, D.M., Cai, Y., Gabow, P.A., Pierides, A., *et al.* (1996). PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* *272*, 1339-1342.
- Moeller, M.J., Sanden, S.K., Soofi, A., Wiggins, R.C., and Holzman, L.B. (2003). Podocyte-specific expression of cre recombinase in transgenic mice. *Genesis* *35*, 39-42.
- Moens, C.B., Auerbach, A.B., Conlon, R.A., Joyner, A.L., and Rossant, J. (1992). A targeted mutation reveals a role for N-myc in branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Genes Dev* *6*, 691-704.
- Moens, C.B., Stanton, B.R., Parada, L.F., and Rossant, J. (1993). Defects in heart and lung development in compound heterozygotes for two different targeted mutations at the N-myc locus. *Development* *119*, 485-499.
- Mollet, G., Salomon, R., Gribouval, O., Silbermann, F., Bacq, D., Landthaler, G., Milford, D., Nayir, A., Rizzoni, G., Antignac, C., *et al.* (2002). The gene mutated in juvenile nephronophthisis type 4 encodes a novel protein that interacts with nephrocystin. *Nat Genet* *32*, 300-305.

- Moreau, E., Vilar, J., Lelievre-Pegorier, M., Merlet-Benichou, C., and Gilbert, T. (1998). Regulation of c-ret expression by retinoic acid in rat metanephros: implication in nephron mass control. *Am J Physiol* 275, F938-945.
- Morello, D., Lavenu, A., Bandeira, A., Portnoi, D., Gaillard, J., and Babinet, C. (1989). Lymphoproliferative syndrome associated with c-myc expression driven by a class I gene promoter in transgenic mice. *Oncogene Res* 4, 111-125.
- Morello, R., Zhou, G., Dreyer, S.D., Harvey, S.J., Ninomiya, Y., Thorner, P.S., Miner, J.H., Cole, W., Winterpacht, A., Zabel, B., *et al.* (2001). Regulation of glomerular basement membrane collagen expression by LMX1B contributes to renal disease in nail patella syndrome. *Nat Genet* 27, 205-208.
- Morgenbesser, S.D., and DePinho, R.A. (1994). Use of transgenic mice to study myc family gene function in normal mammalian development and in cancer. *Semin Cancer Biol* 5, 21-36.
- Morgenbesser, S.D., Schreiber-Agus, N., Bidder, M., Mahon, K.A., Overbeek, P.A., Horner, J., and DePinho, R.A. (1995). Contrasting roles for c-Myc and L-Myc in the regulation of cellular growth and differentiation in vivo. *EMBO J* 14, 743-756.
- Morishita, Y., Matsuzaki, T., Hara-chikuma, M., Andoo, A., Shimono, M., Matsuki, A., Kobayashi, K., Ikeda, M., Yamamoto, T., Verkman, A., *et al.* (2005). Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. *Mol Cell Biol* 25, 7770-7779.
- Moser, M., Dahmen, S., Kluge, R., Grone, H., Dahmen, J., Kunz, D., Schorle, H., and Buettner, R. (2003). Terminal renal failure in mice lacking transcription factor AP-2 beta. *Lab Invest* 83, 571-578.
- Moser, M., Pscherer, A., Roth, C., Becker, J., Mucher, G., Zerres, K., Dixkens, C., Weis, J., Guay-Woodford, L., Buettner, R., *et al.* (1997). Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2beta. *Genes Dev* 11, 1938-1948.
- Moy, G.W., Mendoza, L.M., Schulz, J.R., Swanson, W.J., Glabe, C.G., and Vacquier, V.D. (1996). The sea urchin sperm receptor for egg jelly is a modular protein with extensive homology to the human polycystic kidney disease protein, PKD1. *J Cell Biol* 133, 809-817.
- Moyer, J.H., Lee-Tischler, M.J., Kwon, H.Y., Schrick, J.J., Avner, E.D., Sweeney, W.E., Godfrey, V.L., Cacheiro, N.L., Wilkinson, J.E., and Woychik, R.P. (1994). Candidate gene associated with a mutation causing recessive polycystic kidney disease in mice. *Science* 264, 1329-1333.

- Mugrauer, G., Alt, F.W., and Ekblom, P. (1988). N-myc proto-oncogene expression during organogenesis in the developing mouse as revealed by in situ hybridization. *J Cell Biol* 107, 1325-1335.
- Mugrauer, G., and Ekblom, P. (1991). Contrasting expression patterns of three members of the myc family of protooncogenes in the developing and adult mouse kidney. *J Cell Biol* 112, 13-25.
- Muller, U., Wang, D., Denda, S., Meneses, J.J., Pedersen, R.A., and Reichardt, L.F. (1997). Integrin alpha8beta1 is critically important for epithelial-mesenchymal interactions during kidney morphogenesis. *Cell* 88, 603-613.
- Muncan, V., Sansom, O.J., Tertoolen, L., Phesse, T.J., Begthel, H., Sancho, E., Cole, A.M., Gregorieff, A., de Alboran, I.M., Clevers, H., *et al.* (2006). Rapid loss of intestinal crypts upon conditional deletion of the Wnt/Tcf-4 target gene c-Myc. *Mol Cell Biol* 26, 8418-8426.
- Murakami, M., Ohba, T., Xu, F., Shida, S., Satoh, E., Ono, K., Miyoshi, I., Watanabe, H., Ito, H., and Iijima, T. (2005). Genomic organization and functional analysis of murine PKD2L1. *J Biol Chem* 280, 5626-5635.
- Murcia, N.S., Richards, W.G., Yoder, B.K., Mucenski, M.L., Dunlap, J.R., and Woychik, R.P. (2000). The Oak Ridge Polycystic Kidney (orpk) disease gene is required for left-right axis determination. *Development* 127, 2347-2355.
- Murphy, M.J., Wilson, A., and Trumpp, A. (2005). More than just proliferation: Myc function in stem cells. *Trends Cell Biol* 15, 128-137.
- Muto, S., Aiba, A., Saito, Y., Nakao, K., Nakamura, K., Tomita, K., Kitamura, T., Kurabayashi, M., Nagai, R., Higashihara, E., *et al.* (2002). Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted Pkd1 mutant. *Hum Mol Genet* 11, 1731-1742.
- Mydlo, J.H., Michaeli, J., Cordon-Cardo, C., Goldenberg, A.S., Heston, W.D., and Fair, W.R. (1989). Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA in neoplastic and nonneoplastic human kidney tissue. *Cancer Res* 49, 3407-3411.
- Nadasdy, T., Laszik, Z., Lajoie, G., Blick, K.E., Wheeler, D.E., and Silva, F.G. (1995). Proliferative activity of cyst epithelium in human renal cystic diseases. *J Am Soc Nephrol* 5, 1462-1468.

- Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Kuida, K., Sawa, H., and Loh, D.Y. (1994). Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 3700-3704.
- Nakayama, S., and Kretsinger, R.H. (1994). Evolution of the EF-hand family of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* *23*, 473-507.
- Narlis, M., Grote, D., Gaitan, Y., Boualia, S.K., and Bouchard, M. (2007). Pax2 and pax8 regulate branching morphogenesis and nephron differentiation in the developing kidney. *J Am Soc Nephrol* *18*, 1121-1129.
- Nasi, S., Ciarapica, R., Jucker, R., Rosati, J., and Soucek, L. (2001). Making decisions through Myc. *FEBS Lett* *490*, 153-162.
- Nateri, A.S., Spencer-Dene, B., and Behrens, A. (2005). Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development. *Nature* *437*, 281-285.
- Nau, M.M., Brooks, B.J., Battey, J., Sausville, E., Gazdar, A.F., Kirsch, I.R., McBride, O.W., Bertness, V., Hollis, G.F., and Minna, J.D. (1985). L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature* *318*, 69-73.
- Nauli, S.M., Alenghat, F.J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A.E., Lu, W., Brown, E.M., Quinn, S.J., *et al.* (2003). Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* *33*, 129-137.
- Nauli, S.M., and Zhou, J. (2004). Polycystins and mechanosensation in renal and nodal cilia. *Bioessays* *26*, 844-856.
- Nauta, J., Goedbloed, M.A., Herck, H.V., Hesselink, D.A., Visser, P., Willemsen, R., Dokkum, R.P., Wright, C.J., and Guay-Woodford, L.M. (2000a). New rat model that phenotypically resembles autosomal recessive polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* *11*, 2272-2284.
- Nauta, J., Goedbloed, M.A., van den Ouweland, A.M., Nellist, M., and Hoogeveen, A.T. (2000b). Immunological detection of polycystin-1 in human kidney. *Histochem Cell Biol* *113*, 303-311.
- Nechiporuk, T., Fernandez, T.E., and Vasioukhin, V. (2007). Failure of epithelial tube maintenance causes hydrocephalus and renal cysts in Dlg5^{-/-} mice. *Developmental cell* *13*, 338-350.
- Neill, A.T., Moy, G.W., and Vacquier, V.D. (2004). 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.

- Nelson, W.J., and Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303, 1483-1487.
- Newby, L.J., Streets, A.J., Zhao, Y., Harris, P.C., Ward, C.J., and Ong, A.C. (2002). Identification, characterization, and localization of a novel kidney polycystin-1-polycystin-2 complex. *J Biol Chem* 277, 20763-20773.
- Nguyen, H.Q., Danilenko, D.M., Bucay, N., DeRose, M.L., Van, G.Y., Thomason, A., and Simonet, W.S. (1996). Expression of keratinocyte growth factor in embryonic liver of transgenic mice causes changes in epithelial growth and differentiation resulting in polycystic kidneys and other organ malformations. *Oncogene* 12, 2109-2119.
- Nieminen, A.I., Partanen, J.I., Hau, A., and Klefstrom, J. (2007). c-Myc primed mitochondria determine cellular sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. *EMBO J*.
- Nims, N., Vassmer, D., and Maser, R.L. (2003). Transmembrane domain analysis of polycystin-1, the product of the polycystic kidney disease-1 (PKD1) gene: evidence for 11 membrane-spanning domains. *Biochemistry (Mosc)* 42, 13035-13048.
- Nishimura, D.Y., Swiderski, R.E., Searby, C.C., Berg, E.M., Ferguson, A.L., Hennekam, R., Merin, S., Weleber, R.G., Biesecker, L.G., Stone, E.M., *et al.* (2005). Comparative genomics and gene expression analysis identifies BBS9, a new Bardet-Biedl syndrome gene. *Am J Hum Genet* 77, 1021-1033.
- Nishinakamura, R., Matsumoto, Y., Nakao, K., Nakamura, K., Sato, A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Scully, S., Lacey, D.L., *et al.* (2001). Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development* 128, 3105-3115.
- Nomura, H., Turco, A.E., Pei, Y., Kalaydjieva, L., Schiavello, T., Weremowicz, S., Ji, W., Morton, C.C., Meisler, M., Reeders, S.T., *et al.* (1998). Identification of PKDL, a novel polycystic kidney disease 2-like gene whose murine homologue is deleted in mice with kidney and retinal defects. *J Biol Chem* 273, 25967-25973.
- Norman, J.T., Gatti, L., Wilson, P.D., and Lewis, M. (1995). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases expression by tubular epithelia and interstitial fibroblasts in the normal kidney and in fibrosis. *Exp Nephrol* 3, 88-89.
- Nouwen, E.J., Dauwe, S., van der Biest, I., and De Broe, M.E. (1993). Stage- and segment-specific expression of cell-adhesion molecules N-CAM, A-CAM, and L-CAM in the kidney. *Kidney Int* 44, 147-158.
- Nurnberger, J., Kribben, A., Opazo Saez, A., Heusch, G., Philipp, T., and Phillips, C.L. (2004). The *Invs* gene encodes a microtubule-associated protein. *J Am Soc Nephrol* 15, 1700-1710.

- Obermuller, N., Morente, N., Kranzlin, B., Gretz, N., and Witzgall, R. (2001). A possible role for metalloproteinases in renal cyst development. *Am J Physiol Renal Physiol* *280*, F540-550.
- Ogborn, M.R., Nitschmann, E., Weiler, H., Leswick, D., and Bankovic-Calic, N. (1999). Flaxseed ameliorates interstitial nephritis in rat polycystic kidney disease. *Kidney Int* *55*, 417-423.
- Ogborn, M.R., Nitschmann, E., Weiler, H.A., and Bankovic-Calic, N. (2000). Modification of polycystic kidney disease and fatty acid status by soy protein diet. *Kidney Int* *57*, 159-166.
- Ogborn, M.R., and Sareen, S. (1995). Amelioration of polycystic kidney disease by modification of dietary protein intake in the rat. *J Am Soc Nephrol* *6*, 1649-1654.
- Ohuchi, H., Hori, Y., Yamasaki, M., Harada, H., Sekine, K., Kato, S., and Itoh, N. (2000). FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem Biophys Res Commun* *277*, 643-649.
- Ohyama, T., and Groves, A.K. (2004). Generation of Pax2-Cre mice by modification of a Pax2 bacterial artificial chromosome. *Genesis* *38*, 195-199.
- Olbrich, H., Fliegau, M., Hoefele, J., Kispert, A., Otto, E., Volz, A., Wolf, M.T., Sasmaz, G., Trauer, U., Reinhardt, R., *et al.* (2003). Mutations in a novel gene, NPHP3, cause adolescent nephronophthisis, tapeto-retinal degeneration and hepatic fibrosis. *Nat Genet* *34*, 455-459.
- Oliver, J.A., Maarouf, O., Cheema, F.H., Martens, T.P., and Al-Awqati, Q. (2004). The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest* *114*, 795-804.
- Olsson, P.G., Lohning, C., Horsley, S., Kearney, L., Harris, P.C., and Frischauf, A. (1996). The mouse homologue of the polycystic kidney disease gene (Pkd1) is a single-copy gene. *Genomics* *34*, 233-235.
- Omori, S., Hida, M., Fujita, H., Takahashi, H., Tanimura, S., Kohno, M., and Awazu, M. (2006). Extracellular signal-regulated kinase inhibition slows disease progression in mice with polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* *17*, 1604-1614.
- Ong, A.C., Harris, P.C., Biddolph, S., Bowker, C., and Ward, C.J. (1999a). Characterisation and expression of the PKD-1 protein, polycystin, in renal and extrarenal tissues. *Kidney Int* *55*, 2091-2116.
- Ong, A.C., Harris, P.C., Davies, D.R., Pritchard, L., Rossetti, S., Biddolph, S., Vaux, D.J., Migone, N., and Ward, C.J. (1999b). Polycystin-1 expression in PKD1, early-onset PKD1, and TSC2/PKD1 cystic tissue. *Kidney Int* *56*, 1324-1333.

- Ong, A.C., Ward, C.J., Butler, R.J., Biddolph, S., Bowker, C., Torra, R., Pei, Y., and Harris, P.C. (1999c). Coordinate expression of the autosomal dominant polycystic kidney disease proteins, polycystin-2 and polycystin-1, in normal and cystic tissue. *Am J Pathol* *154*, 1721-1729.
- Onuchic, L.F., Furu, L., Nagasawa, Y., Hou, X., Eggermann, T., Ren, Z., Bergmann, C., Senderek, J., Esquivel, E., Zeltner, R., *et al.* (2002). PKHD1, the polycystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple immunoglobulin-like plexin-transcription-factor domains and parallel beta-helix 1 repeats. *Am J Hum Genet* *70*, 1305-1317.
- Orian, A., van Steensel, B., Delrow, J., Bussemaker, H.J., Li, L., Sawado, T., Williams, E., Loo, L.W., Cowley, S.M., Yost, C., *et al.* (2003). Genomic binding by the Drosophila Myc, Max, Mad/Mnt transcription factor network. *Genes Dev* *17*, 1101-1114.
- Oskarsson, T., and Trumpp, A. (2005). The Myc trilogy: lord of RNA polymerases. *Nature cell biology* *7*, 215-217.
- Ota, S., Zhou, Z.Q., Keene, D.R., Knoepfler, P., and Hurlin, P.J. (2007). Activities of N-Myc in the developing limb link control of skeletal size with digit separation. *Development* *134*, 1583-1592.
- Otto, E., Hoefele, J., Ruf, R., Mueller, A.M., Hiller, K.S., Wolf, M.T., Schuermann, M.J., Becker, A., Birkenhager, R., Sudbrak, R., *et al.* (2002). A gene mutated in nephronophthisis and retinitis pigmentosa encodes a novel protein, nephroretinin, conserved in evolution. *Am J Hum Genet* *71*, 1161-1167.
- Otto, E.A., Schermer, B., Obara, T., O'Toole, J.F., Hiller, K.S., Mueller, A.M., Ruf, R.G., Hoefele, J., Beekmann, F., Landau, D., *et al.* (2003). Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nat Genet* *34*, 413-420.
- Oxburgh, L., Chu, G.C., Michael, S.K., and Robertson, E.J. (2004). TGFbeta superfamily signals are required for morphogenesis of the kidney mesenchyme progenitor population. *Development* *131*, 4593-4605.
- Palsson, R., Sharma, C.P., Kim, K., McLaughlin, M., Brown, D., and Arnaout, M.A. (1996). Characterization and cell distribution of polycystin, the product of autosomal dominant polycystic kidney disease gene 1. *Mol Med* *2*, 702-711.
- Parfrey, P.S., Bear, J.C., Morgan, J., Cramer, B.C., McManamon, P.J., Gault, M.H., Churchill, D.N., Singh, M., Hewitt, R., Somlo, S., *et al.* (1990). The diagnosis and prognosis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* *323*, 1085-1090.

- Parisi, M.A., Bennett, C.L., Eckert, M.L., Dobyns, W.B., Gleeson, J.G., Shaw, D.W., McDonald, R., Eddy, A., Chance, P.F., and Glass, I.A. (2004). The NPHP1 gene deletion associated with juvenile nephronophthisis is present in a subset of individuals with Joubert syndrome. *Am J Hum Genet* 75, 82-91.
- Park, J.S., Valerius, M.T., and McMahon, A.P. (2007). Wnt/beta-catenin signaling regulates nephron induction during mouse kidney development. *Development* 134, 2533-2539.
- Parnell, S.C., Magenheimer, B.S., Maser, R.L., and Calvet, J.P. (1999). Identification of the major site of in vitro PKA phosphorylation in the polycystin-1 C-terminal cytosolic domain. *Biochem Biophys Res Commun* 259, 539-543.
- Parnell, S.C., Magenheimer, B.S., Maser, R.L., Rankin, C.A., Smine, A., Okamoto, T., and Calvet, J.P. (1998). The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin-1, binds and activates heterotrimeric G-proteins in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 251, 625-631.
- Parnell, S.C., Magenheimer, B.S., Maser, R.L., Zien, C.A., Frischauf, A.M., and Calvet, J.P. (2002). Polycystin-1 activation of c-Jun N-terminal kinase and AP-1 is mediated by heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* 277, 19566-19572.
- Patel, S.R., and Dressler, G.R. (2004). Expression of Pax2 in the intermediate mesoderm is regulated by YY1. *Dev Biol* 267, 505-516.
- Patterson, L.T., Pembaur, M., and Potter, S.S. (2001). Hoxa11 and Hoxd11 regulate branching morphogenesis of the ureteric bud in the developing kidney. *Development* 128, 2153-2161.
- Pedersen, A., Skjong, C., and Shawlot, W. (2005). Lim 1 is required for nephric duct extension and ureteric bud morphogenesis. *Dev Biol* 288, 571-581.
- Pei, Y., Paterson, A.D., Wang, K.R., He, N., Hefferton, D., Watnick, T., Germino, G.G., Parfrey, P., Somlo, S., and St George-Hyslop, P. (2001). Bilineal disease and trans-heterozygotes in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Hum Genet* 68, 355-363.
- Pei, Y., Watnick, T., He, N., Wang, K., Liang, Y., Parfrey, P., Germino, G., and St George-Hyslop, P. (1999). Somatic PKD2 mutations in individual kidney and liver cysts support a "two-hit" model of cystogenesis in type 2 autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 10, 1524-1529.
- Pekonen, F., Partanen, S., and Rutanen, E.M. (1989). 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.
- Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G. (2002a). c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2, 764-776.

- Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G.I. (2002b). Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell* *109*, 321-334.
- Pelengaris, S., Littlewood, T., Khan, M., Elia, G., and Evan, G. (1999). Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol Cell* *3*, 565-577.
- Pennekamp, P., Bogdanova, N., Wilda, M., Markoff, A., Hameister, H., Horst, J., and Dworniczak, B. (1998). Characterization of the murine polycystic kidney disease (Pkd2) gene. *Mamm Genome* *9*, 749-752.
- Pennekamp, P., Karcher, C., Fischer, A., Schweickert, A., Skryabin, B., Horst, J., Blum, M., and Dworniczak, B. (2002). The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice. *Curr Biol* *12*, 938-943.
- Penttinen, R.P., Kobayashi, S., and Bornstein, P. (1988). Transforming growth factor beta increases mRNA for matrix proteins both in the presence and in the absence of changes in mRNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 1105-1108.
- Peral, B., Ong, A.C., San Millan, J.L., Gamble, V., Rees, L., and Harris, P.C. (1996). A stable, nonsense mutation associated with a case of infantile onset polycystic kidney disease 1 (PKD1). *Hum Mol Genet* *5*, 539-542.
- Perantoni, A.O. (2003). Renal development: perspectives on a Wnt-dependent process. *Semin Cell Dev Biol* *14*, 201-208.
- Perantoni, A.O., Timofeeva, O., Naillat, F., Richman, C., Pajni-Underwood, S., Wilson, C., Vainio, S., Dove, L.F., and Lewandoski, M. (2005). Inactivation of FGF8 in early mesoderm reveals an essential role in kidney development. *Development* *132*, 3859-3871.
- Perez-Roger, I., Solomon, D.L., Sewing, A., and Land, H. (1997). Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27(Kip1) binding to newly formed complexes. *Oncogene* *14*, 2373-2381.
- Peters, D.J., Spruit, L., Klingel, R., Prins, F., Baelde, H.J., Giordano, P.C., Bernini, L.F., de Heer, E., Breuning, M.H., and Bruijn, J.A. (1996). Adult, fetal, and polycystic kidney expression of polycystin, the polycystic kidney disease-1 gene product. *Lab Invest* *75*, 221-230.
- Peters, D.J., van de Wal, A., Spruit, L., Saris, J.J., Breuning, M.H., Bruijn, J.A., and de Heer, E. (1999). Cellular localization and tissue distribution of polycystin-1. *J Pathol* *188*, 439-446.

- Phillips, C.L., Miller, K.J., Filson, A.J., Nurnberger, J., Clendenon, J.L., Cook, G.W., Dunn, K.W., Overbeek, P.A., Gattone, V.H., 2nd, and Bacallao, R.L. (2004). Renal cysts of inv/inv mice resemble early infantile nephronophthisis. *J Am Soc Nephrol* *15*, 1744-1755.
- Pichel, J.G., Shen, L., Sheng, H.Z., Granholm, A.C., Drago, J., Grinberg, A., Lee, E.J., Huang, S.P., Saarma, M., Hoffer, B.J., *et al.* (1996). Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* *382*, 73-76.
- Pilia, G., Hughes-Benzie, R.M., MacKenzie, A., Baybayan, P., Chen, E.Y., Huber, R., Neri, G., Cao, A., Forabosco, A., and Schlessinger, D. (1996). Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat Genet* *12*, 241-247.
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., and Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* *17*, 1709-1713.
- Piontek, K.B., and Germino, G.G. (1999). Murine Pkd1 introns 21 and 22 lack the extreme polypyrimidine bias present in human PKD1. *Mamm Genome* *10*, 194-196.
- Piontek, K.B., Huso, D., Garcia-Gonzalez, M., and Germino, G.G. (2006). Polycystin-1 is required for terminal differentiation in murine renal tubules. *J Am Soc Nephrol* *17*.
- Piontek, K.B., Huso, D.L., Grinberg, A., Liu, L., Bedja, D., Zhao, H., Gabrielson, K., Qian, F., Mei, C., Westphal, H., *et al.* (2004). A functional floxed allele of Pkd1 that can be conditionally inactivated in vivo. *J Am Soc Nephrol* *15*, 3035-3043.
- Pirity, M., Blanck, J.K., and Schreiber-Agus, N. (2006). Lessons learned from Myc/Max/Mad knockout mice. *Curr Top Microbiol Immunol* *302*, 205-234.
- Plisov, S., Tsang, M., Shi, G., Boyle, S., Yoshino, K., Dunwoodie, S.L., Dawid, I.B., Shioda, T., Perantoni, A.O., and de Caestecker, M.P. (2005). Cited1 is a bifunctional transcriptional cofactor that regulates early nephronic patterning. *J Am Soc Nephrol* *16*, 1632-1644.
- Plisov, S.Y., Yoshino, K., Dove, L.F., Higinbotham, K.G., Rubin, J.S., and Perantoni, A.O. (2001). TGF beta 2, LIF and FGF2 cooperate to induce nephrogenesis. *Development* *128*, 1045-1057.
- Poladia, D.P., Kish, K., Kutay, B., Hains, D., Kegg, H., Zhao, H., and Bates, C.M. (2006). Role of fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in the metanephric mesenchyme. *Dev Biol* *291*, 325-339.
- Ponting, C.P., Hofmann, K., and Bork, P. (1999). A latrophilin/CL-1-like GPS domain in polycystin-1. *Curr Biol* *9*, R585-588.

- Poortinga, G., Hannan, K.M., Snelling, H., Walkley, C.R., Jenkins, A., Sharkey, K., Wall, M., Brandenburger, Y., Palatsides, M., Pearson, R.B., *et al.* (2004). MAD1 and c-MYC regulate UBF and rDNA transcription during granulocyte differentiation. *EMBO J* 23, 3325-3335.
- Porteous, S., Torban, E., Cho, N.P., Cunliffe, H., Chua, L., McNoe, L., Ward, T., Souza, C., Gus, P., Giugliani, R., *et al.* (2000). Primary renal hypoplasia in humans and mice with PAX2 mutations: evidence of increased apoptosis in fetal kidneys of Pax2(1Neu) +/- mutant mice. *Hum Mol Genet* 9, 1-11.
- Praetorius, H.A., Praetorius, J., Nielsen, S., Frokiaer, J., and Spring, K.R. (2004). Beta1-integrins in the primary cilium of MDCK cells potentiate fibronectin-induced Ca²⁺ signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* 287, F969-978.
- Praetorius, H.A., and Spring, K.R. (2001). Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. *J Membr Biol* 184, 71-79.
- Preminger, G.M., Koch, W.E., Fried, F.A., McFarland, E., Murphy, E.D., and Mandell, J. (1982). Murine congenital polycystic kidney disease: a model for studying development of cystic disease. *J Urol* 127, 556-560.
- Pritchard, L., Sloane-Stanley, J.A., Sharpe, J.A., Aspinwall, R., Lu, W., Buckle, V., Strmecki, L., Walker, D., Ward, C.J., Alpers, C.E., *et al.* (2000). A human PKD1 transgene generates functional polycystin-1 in mice and is associated with a cystic phenotype. *Hum Mol Genet* 9, 2617-2627.
- Puri, S., Magenheimer, B.S., Maser, R.L., Ryan, E.M., Zien, C.A., Walker, D.D., Wallace, D.P., Hempson, S.J., and Calvet, J.P. (2004). Polycystin-1 activates the calcineurin/NFAT (nuclear factor of activated T-cells) signaling pathway. *J Biol Chem* 279, 55455-55464.
- Qian, C.N., Knol, J., Igarashi, P., Lin, F., Zylstra, U., Teh, B.T., and Williams, B.O. (2005). Cystic renal neoplasia following conditional inactivation of *apc* in mouse renal tubular epithelium. *J Biol Chem* 280, 3938-3945.
- Qian, F., Boletta, A., Bhunia, A.K., Xu, H., Liu, L., Ahrabi, A.K., Watnick, T.J., Zhou, F., and Germino, G.G. (2002). Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 16981-16986.
- Qian, F., Germino, F.J., Cai, Y., Zhang, X., Somlo, S., and Germino, G.G. (1997). PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet* 16, 179-183.

- Qian, F., and Germino, G.G. (1997). "Mistakes happen": somatic mutation and disease. *Am J Hum Genet* *61*, 1000-1005.
- Qian, F., Watnick, T.J., Onuchic, L.F., and Germino, G.G. (1996). The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell* *87*, 979-987.
- Qian, Q., Harris, P.C., and Torres, V.E. (2001). Treatment prospects for autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* *59*, 2005-2022.
- Qiao, J., Uzzo, R., Obara-Ishihara, T., Degenstein, L., Fuchs, E., and Herzlinger, D. (1999). FGF-7 modulates ureteric bud growth and nephron number in the developing kidney. *Development* *126*, 547-554.
- Quaggin, S.E., Schwartz, L., Cui, S., Igarashi, P., Deimling, J., Post, M., and Rossant, J. (1999). The basic-helix-loop-helix protein *pod1* is critically important for kidney and lung organogenesis. *Development* *126*, 5771-5783.
- Rankin, E.B., Tomaszewski, J.E., and Haase, V.H. (2006). Renal cyst development in mice with conditional inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer Res* *66*, 2576-2583.
- Revest, J.M., Spencer-Dene, B., Kerr, K., De Moerlooze, L., Rosewell, I., and Dickson, C. (2001). Fibroblast growth factor receptor 2-IIIb acts upstream of Shh and Fgf4 and is required for limb bud maintenance but not for the induction of Fgf8, Fgf10, Msx1, or Bmp4. *Dev Biol* *231*, 47-62.
- Ricker, J.L., Gattone, V.H., Calvet, J.P., and Rankin, C.A. (2000). Development of autosomal recessive polycystic kidney disease in BALB/c-cpk/cpk mice. *J Am Soc Nephrol* *11*, 1837-1847.
- Ricker, J.L., Mata, J.E., Iversen, P.L., and Gattone, V.H. (2002). c-myc antisense oligonucleotide treatment ameliorates murine ARPKD. *Kidney Int* *61 Suppl 1*, 125-131.
- Ritvos, O., Tuuri, T., Eramaa, M., Sainio, K., Hilden, K., Saxen, L., and Gilbert, S.F. (1995). Activin disrupts epithelial branching morphogenesis in developing glandular organs of the mouse. *Mech Dev* *50*, 229-245.
- Rodova, M., Islam, M.R., Maser, R.L., and Calvet, J.P. (2002). The polycystic kidney disease-1 promoter is a target of the beta-catenin/T-cell factor pathway. *J Biol Chem* *277*, 29577-29583.

- Rohn, J.L., Hueber, A.O., McCarthy, N.J., Lyon, D., Navarro, P., Burgering, B.M., and Evan, G.I. (1998). The opposing roles of the Akt and c-Myc signalling pathways in survival from CD95-mediated apoptosis. *Oncogene* *17*, 2811-2818.
- Roitbak, T., Surviladze, Z., Tikkanen, R., and Wandinger-Ness, A. (2005). A polycystin multiprotein complex constitutes a cholesterol-containing signalling microdomain in human kidney epithelia. *Biochem J* *392*, 29-38.
- Roitbak, T., Ward, C.J., Harris, P.C., Bacallao, R., Ness, S.A., and Wandinger-Ness, A. (2004). A polycystin-1 multiprotein complex is disrupted in polycystic kidney disease cells. *Mol Biol Cell* *15*, 1334-1346.
- Romagnolo, B., Berrebi, D., Saadi-Keddoucci, S., Porteu, A., Pichard, A.L., Peuchmaur, M., Vandewalle, A., Kahn, A., and Perret, C. (1999). Intestinal dysplasia and adenoma in transgenic mice after overexpression of an activated beta-catenin. *Cancer Res* *59*, 3875-3879.
- Romio, L., Fry, A.M., Winyard, P.J., Malcolm, S., Woolf, A.S., and Feather, S.A. (2004). OFD1 is a centrosomal/basal body protein expressed during mesenchymal-epithelial transition in human nephrogenesis. *J Am Soc Nephrol* *15*, 2556-2568.
- Rossetti, S., Burton, S., Strmecki, L., Pond, G.R., San Millan, J.L., Zerres, K., Barratt, T.M., Ozen, S., Torres, V.E., Bergstralh, E.J., *et al.* (2002a). The position of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene mutation correlates with the severity of renal disease. *J Am Soc Nephrol* *13*, 1230-1237.
- Rossetti, S., Chauveau, D., Kubly, V., Slezak, J.M., Saggar-Malik, A.K., Pei, Y., Ong, A.C., Stewart, F., Watson, M.L., Bergstralh, E.J., *et al.* (2003). Association of mutation position in polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene and development of a vascular phenotype. *Lancet* *361*, 2196-2201.
- Rossetti, S., Chauveau, D., Walker, D., Saggar-Malik, A., Winearls, C.G., Torres, V.E., and Harris, P.C. (2002b). A complete mutation screen of the ADPKD genes by DHPLC. *Kidney Int* *61*, 1588-1599.
- Rossetti, S., Strmecki, L., Gamble, V., Burton, S., Sneddon, V., Peral, B., Roy, S., Bakkaloglu, A., Komel, R., Winearls, C.G., *et al.* (2001). Mutation analysis of the entire PKD1 gene: genetic and diagnostic implications. *Am J Hum Genet* *68*, 46-63.
- Rottmann, S., Wang, Y., Nasoff, M., Deveraux, Q.L., and Quon, K.C. (2005). A TRAIL receptor-dependent synthetic lethal relationship between MYC activation and GSK3beta/FBW7 loss of function. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 15195-15200.

- Rubera, I., Loffing, J., Palmer, L.G., Frindt, G., Fowler-Jaeger, N., Sauter, D., Carroll, T., McMahon, A., Hummler, E., and Rossier, B.C. (2003). Collecting duct-specific gene inactivation of alphaENaC in the mouse kidney does not impair sodium and potassium balance. *J Clin Invest* *112*, 554-565.
- Rubera, I., Poujeol, C., Bertin, G., Hasseine, L., Counillon, L., Poujeol, P., and Tauc, M. (2004). Specific Cre/Lox recombination in the mouse proximal tubule. *J Am Soc Nephrol* *15*, 2050-2056.
- Ruf, R.G., Xu, P.X., Silvius, D., Otto, E.A., Beekmann, F., Muerb, U.T., Kumar, S., Neuhaus, T.J., Kemper, M.J., Raymond, R.M., Jr., *et al.* (2004). SIX1 mutations cause branchio-otorenal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 8090-8095.
- Ruggero, D., Montanaro, L., Ma, L., Xu, W., Londei, P., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2004). The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. *Nat Med* *10*, 484-486.
- Ruggieri, P.M., Poulos, N., Masaryk, T.J., Ross, J.S., Obuchowski, N.A., Awad, I.A., Braun, W.E., Nally, J., Lewin, J.S., and Modic, M.T. (1994). Occult intracranial aneurysms in polycystic kidney disease: screening with MR angiography. *Radiology* *191*, 33-39.
- Rundle, D.R., Gorbsky, G., and Tsiokas, L. (2004). PKD2 interacts and co-localizes with mDial to mitotic spindles of dividing cells: role of mDial IN PKD2 localization to mitotic spindles. *J Biol Chem* *279*, 29728-29739.
- Saadi-Kheddouci, S., Berrebi, D., Romagnolo, B., Cluzeaud, F., Peuchmaur, M., Kahn, A., Vandewalle, A., and Perret, C. (2001). Early development of polycystic kidney disease in transgenic mice expressing an activated mutant of the beta-catenin gene. *Oncogene* *20*, 5972-5981.
- Saifudeen, Z., Igarashi, P., and El Dahr, S.S. (2004). p53 regulates multiple steps of renal development. *J Am Soc Nephrol* *15*, 419A.
- Sajithlal, G., Zou, D., Silvius, D., and Xu, P.X. (2005). Eya 1 acts as a critical regulator for specifying the metanephric mesenchyme. *Dev Biol* *284*, 323-336.
- Sakamuro, D., Elliott, K.J., Wechsler-Reya, R., and Prendergast, G.C. (1996). BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nat Genet* *14*, 69-77.
- Sakamuro, D., Eviner, V., Elliott, K.J., Showe, L., White, E., and Prendergast, G.C. (1995). c-Myc induces apoptosis in epithelial cells by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene* *11*, 2411-2418.

- Sakurai, H., Bush, K.T., and Nigam, S.K. (2001). Identification of pleiotrophin as a mesenchymal factor involved in ureteric bud branching morphogenesis. *Development* 128, 3283-3293.
- Salonen, R., and Paavola, P. (1998). Meckel syndrome. *J Med Genet* 35, 497-501.
- Sampson, J.R., Maheshwar, M.M., Aspinwall, R., Thompson, P., Cheadle, J.P., Ravine, D., Roy, S., Haan, E., Bernstein, J., and Harris, P.C. (1997). Renal cystic disease in tuberous sclerosis: role of the polycystic kidney disease 1 gene. *Am J Hum Genet* 61, 843-851.
- Sanchez, M.P., Silos-Santiago, I., Frisen, J., He, B., Lira, S.A., and Barbacid, M. (1996). Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 382, 70-73.
- Sandford, R., Sgotto, B., Aparicio, S., Brenner, S., Vaudin, M., Wilson, R.K., Chisoe, S., Pepin, K., Bateman, A., Chothia, C., *et al.* (1997). Comparative analysis of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene reveals an integral membrane glycoprotein with multiple evolutionary conserved domains. *Hum Mol Genet* 6, 1483-1489.
- Sandford, R., Thurston, K., Boucher, C., Case, R., Needham, A., Seema, Q., Hyink, D., Li, X., Greenberg, A., Roitbak, T., *et al.* (2006). Receptor Protein Phosphatase interactions with Polycystin-1-implications for Polycystin-1 signaling and mechanotransduction. *J Am Soc Nephrol* 17, 702A.
- Sandgren, E.P., Quaife, C.J., Paulovich, A.G., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. (1991). Pancreatic tumor pathogenesis reflects the causative genetic lesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 93-97.
- Sandgren, E.P., Quaife, C.J., Pinkert, C.A., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. (1989). Oncogene-induced liver neoplasia in transgenic mice. *Oncogene* 4, 715-724.
- Sansom, O.J., Griffiths, D.F., Reed, K.R., Winton, D.J., and Clarke, A.R. (2005). Apc deficiency predisposes to renal carcinoma in the mouse. *Oncogene* 24, 8205-8210.
- Sansom, O.J., Meniel, V.S., Muncan, V., Pheese, T.J., Wilkins, J.A., Reed, K.R., Vass, J.K., Athineos, D., Clevers, H., and Clarke, A.R. (2007). Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature* 446, 676-679.
- Sansom, O.J., Reed, K.R., Hayes, A.J., Ireland, H., Brinkmann, H., Newton, I.P., Batlle, E., Simon-Assmann, P., Clevers, H., Nathke, I.S., *et al.* (2004). Loss of Apc in vivo immediately perturbs Wnt signaling, differentiation, and migration. *Genes Dev* 18, 1385-1390.

- Sanyanusin, P., Schimmenti, L.A., McNoe, L.A., Ward, T.A., Pierpont, M.E., Sullivan, M.J., Dobyns, W.B., and Eccles, M.R. (1995). Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nat Genet* *9*, 358-364.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., and Brivanlou, A.H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* *10*, 55-63.
- Saunier, S., Salomon, R., and Antignac, C. (2005). Nephronophthisis. *Curr Opin Genet Dev* *15*, 324-331.
- Sawai, S., Shimono, A., Hanaoka, K., and Kondoh, H. (1991). Embryonic lethality resulting from disruption of both N-myc alleles in mouse zygotes. *New Biol* *3*, 861-869.
- Sawai, S., Shimono, A., Wakamatsu, Y., Palmes, C., Hanaoka, K., and Kondoh, H. (1993). Defects of embryonic organogenesis resulting from targeted disruption of the N-myc gene in the mouse. *Development* *117*, 1445-1455.
- Saxen, L. (1987). *Organogenesis of the kidney* (Cambridge Cambridgeshire, Cambridge University Press).
- Sayer, J.A., Otto, E.A., O'Toole, J.F., Nurnberg, G., Kennedy, M.A., Becker, C., Hennies, H.C., Helou, J., Attanasio, M., Fausett, B.V., *et al.* (2006). The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4. *Nat Genet* *38*, 674-681.
- Schaffner, D.L., Barrios, R., Massey, C., Banez, E.I., Ou, C.N., Rajagopalan, S., Aguilar-Cordova, E., Lebovitz, R.M., Overbeek, P.A., and Lieberman, M.W. (1993). Targeting of the rasT24 oncogene to the proximal convoluted tubules in transgenic mice results in hyperplasia and polycystic kidneys. *Am J Pathol* *142*, 1051-1060.
- Scheffers, M.S., van der Bent, P., Prins, F., Spruit, L., Breuning, M.H., Litvinov, S.V., de Heer, E., and Peters, D.J. (2000). Polycystin-1, the product of the polycystic kidney disease 1 gene, co-localizes with desmosomes in MDCK cells. *Hum Mol Genet* *9*, 2743-2750.
- Schermer, B., Ghenoiu, C., Bartram, M., Muller, R.U., Kotsis, F., Hohne, M., Kuhn, W., Rapka, M., Nitschke, R., Zentgraf, H., *et al.* (2006). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein controls ciliogenesis by orienting microtubule growth. *J Cell Biol* *175*, 547-554.
- Schmid, P., Schulz, W.A., and Hameister, H. (1989). Dynamic expression pattern of the myc protooncogene in midgestation mouse embryos. *Science* *243*, 226-229.
- Schmidt-Ott, K.M., Masckauchan, T.N., Chen, X., Hirsh, B.J., Sarkar, A., Yang, J., Paragas, N., Wallace, V.A., Dufort, D., Pavlidis, P., *et al.* (2007). beta-catenin/TCF/Lef controls a

- differentiation-associated transcriptional program in renal epithelial progenitors. *Development* 134, 3177-3190.
- Schnabel, C.A., Godin, R.E., and Cleary, M.L. (2003). Pbx1 regulates nephrogenesis and ureteric branching in the developing kidney. *Dev Biol* 254, 262-276.
- Schneider, A., Guan, Y., Zhang, Y., Magnuson, M.A., Pettepher, C., Loftin, C.D., Langenbach, R., Breyer, R.M., and Breyer, M.D. (2004). Generation of a conditional allele of the mouse prostaglandin EP4 receptor. *Genesis* 40, 7-14.
- Schneider, A., Peukert, K., Eilers, M., and Hanel, F. (1997). Association of Myc with the zinc-finger protein Miz-1 defines a novel pathway for gene regulation by Myc. *Curr Top Microbiol Immunol* 224, 137-146.
- Schneider, A., Zhang, Y., Guan, Y., Davis, L.S., and Breyer, M.D. (2003). Differential, inducible gene targeting in renal epithelia, vascular endothelium, and viscera of Mx1Cre mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 284, F411-417.
- Schneider, M.C., Rodriguez, A.M., Nomura, H., Zhou, J., Morton, C.C., Reeders, S.T., and Weremowicz, S. (1996). A gene similar to PKD1 maps to chromosome 4q22: a candidate gene for PKD2. *Genomics* 38, 1-4.
- Schoenenberger, C.A., Andres, A.C., Groner, B., van der Valk, M., LeMeur, M., and Gerlinger, P. (1988). Targeted c-myc gene expression in mammary glands of transgenic mice induces mammary tumours with constitutive milk protein gene transcription. *EMBO J* 7, 169-175.
- Schonig, K., Schwenk, F., Rajewsky, K., and Bujard, H. (2002). Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase in vivo. *Nucleic Acids Res* 30, e134.
- Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F., and Pachnis, V. (1994). Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 367, 380-383.
- Schuchardt, A., D'Agati, V., Pachnis, V., and Costantini, F. (1996). Renal agenesis and hypodysplasia in ret-k- mutant mice result from defects in ureteric bud development. *Development* 122, 1919-1929.
- Schwab, K.R., Patterson, L.T., Hartman, H.A., Song, N., Lang, R.A., Lin, X., and Potter, S.S. (2007). Pygo1 and Pygo2 roles in Wnt signaling in mammalian kidney development. *BMC biology* 5, 15.
- Schwab, M., Alitalo, K., Klemptner, K.H., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Gilbert, F., Brodeur, G., Goldstein, M., and Trent, J. (1983). Amplified DNA with limited homology to myc

cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 305, 245-248.

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

Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., and Nevins, J.R. (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* 14, 2501-2514.

Sears, R., Ohtani, K., and Nevins, J.R. (1997). Identification of positively and negatively acting elements regulating expression of the E2F2 gene in response to cell growth signals. *Mol Cell Biol* 17, 5227-5235.

Self, M., Lagutin, O.V., Bowling, B., Hendrix, J., Cai, Y., Dressler, G.R., and Oliver, G. (2006). Six2 is required for suppression of nephrogenesis and progenitor renewal in the developing kidney. *EMBO J* 25, 5214-5228.

Seoane, J., Le, H.V., and Massague, J. (2002). Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 419, 729-734.

Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M., and Massague, J. (2001). TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nature cell biology* 3, 400-408.

Sequeira Lopez, M.L., Pentz, E.S., Nomasa, T., Smithies, O., and Gomez, R.A. (2004). Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened. *Developmental cell* 6, 719-728.

Sessa, A., Ghiggeri, G.M., and Turco, A.E. (1997). Autosomal dominant polycystic kidney disease: clinical and genetic aspects. *Journal of nephrology* 10, 295-310.

Shachaf, C.M., Kopelman, A.M., Arvanitis, C., Karlsson, A., Beer, S., Mandl, S., Bachmann, M.H., Borowsky, A.D., Ruebner, B., Cardiff, R.D., *et al.* (2004). MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature* 431, 1112-1117.

Shah, M.M., Sampogna, R.V., Sakurai, H., Bush, K.T., and Nigam, S.K. (2004). Branching morphogenesis and kidney disease. *Development* 131, 1449-1462.

Shao, X., Somlo, S., and Igarashi, P. (2002). Epithelial-specific Cre/lox recombination in the developing kidney and genitourinary tract. *J Am Soc Nephrol* 13, 1837-1846.

- Sharma, C., Pradeep, A., Wong, L., Rana, A., and Rana, B. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation can regulate beta-catenin levels via a proteasome-mediated and adenomatous polyposis coli-independent pathway. *J Biol Chem* *279*, 35583-35594.
- Shawlot, W., and Behringer, R.R. (1995). Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature* *374*, 425-430.
- Shchors, K., Shchors, E., Rostker, F., Lawlor, E.R., Brown-Swigart, L., and Evan, G.I. (2006). The Myc-dependent angiogenic switch in tumors is mediated by interleukin 1beta. *Genes Dev* *20*, 2527-2538.
- Sheiness, D.K., Hughes, S.H., Varmus, H.E., Stubblefield, E., and Bishop, J.M. (1980). The vertebrate homolog of the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus: characteristics of the DNA locus and its RNA transcript. *Virology* *105*, 415-424.
- Shen-Li, H., O'Hagan, R.C., Hou, H., Jr., Horner, J.W., 2nd, Lee, H.W., and DePinho, R.A. (2000). Essential role for Max in early embryonic growth and development. *Genes Dev* *14*, 17-22.
- Shi, Y., Sharma, A., Wu, H., Lichtenstein, A., and Gera, J. (2005). Cyclin D1 and c-myc internal ribosome entry site (IRES)-dependent translation is regulated by AKT activity and enhanced by rapamycin through a p38 MAPK- and ERK-dependent pathway. *J Biol Chem* *280*, 10964-10973.
- Shibazaki, S., Tian, X., Mitobe, M., Yu, Z., Thomson, B.R., Igarashi, P., and Somlo, S. (2004). A viable model of autosomal polycystic kidney disease through kidney-specific inactivation of *Pkd1*. *J Am Soc Nephrol* *15*, 217A.
- Shigehara, T., Zaragoza, C., Kitiyakara, C., Takahashi, H., Lu, H., Moeller, M., Holzman, L.B., and Kopp, J.B. (2003). Inducible podocyte-specific gene expression in transgenic mice. *J Am Soc Nephrol* *14*, 1998-2003.
- Shillingford, J.M., Murcia, N.S., Larson, C.H., Low, S.H., Hedgepeth, R., Brown, N., Flask, C.A., Novick, A.C., Goldfarb, D.A., Kramer-Zucker, A., *et al.* (2006). The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 5466-5471.
- Shim, H., Dolde, C., Lewis, B.C., Wu, C.S., Dang, G., Jungmann, R.A., Dalla-Favera, R., and Dang, C.V. (1997). c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 6658-6663.

- Sierra, J., Yoshida, T., Joazeiro, C.A., and Jones, K.A. (2006). The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes Dev* 20, 586-600.
- Silberberg, M., Charron, A.J., Bacallao, R., and Wandinger-Ness, A. (2005). Mispolarization of desmosomal proteins and altered intercellular adhesion in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 288, F1153-1163.
- Simons, M., Gloy, J., Ganner, A., Bullerkotte, A., Bashkurov, M., Kronig, C., Schermer, B., Benzing, T., Cabello, O.A., Jenny, A., *et al.* (2005). Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat Genet* 37, 537-543.
- Smith, L.A., Bukanov, N.O., Husson, H., Russo, R.J., Barry, T.C., Taylor, A.L., Beier, D.R., and Ibraghimov-Beskrovnaya, O. (2006a). Development of polycystic kidney disease in juvenile cystic kidney mice: insights into pathogenesis, ciliary abnormalities, and common features with human disease. *J Am Soc Nephrol* 17, 2821-2831.
- Smith, U.M., Consugar, M., Tee, L.J., McKee, B.M., Maina, E.N., Whelan, S., Morgan, N.V., Goranson, E., Gissen, P., Lilliquist, S., *et al.* (2006b). The transmembrane protein meckelin (MKS3) is mutated in Meckel-Gruber syndrome and the wpk rat. *Nat Genet* 38, 191-196.
- Sommardahl, C.S., Woychik, R.P., Sweeney, W.E., Avner, E.D., and Wilkinson, J.E. (1997). Efficacy of taxol in the orpk mouse model of polycystic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 11, 728-733.
- Song, X., Di Giovanni, V., Rosenblum, N.D., He, N., Wang, K., and Pei, Y. (2006). Beta-catenin signaling pathway as a therapeutic target for retarding renal cystexpansion in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD)? *J Am Soc Nephrol* 17, 703A.
- Sorenson, C.M. (1998). Life, death and kidneys: regulation of renal programmed cell death. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7, 5-12.
- Sorenson, C.M. (1999). Nuclear localization of beta-catenin and loss of apical brush border actin in cystic tubules of bcl-2 *-/-* mice. *Am J Physiol* 276, F210-217.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21, 70-71.
- Soucek, L., and Evan, G. (2002). Myc-Is this the oncogene from Hell? *Cancer cell* 1, 406-408.
- Spanopoulou, E., Early, A., Elliott, J., Crispe, N., Ladyman, H., Ritter, M., Watt, S., Grosveld, F., and Kioussis, D. (1989). Complex lymphoid and epithelial thymic tumours in Thy1-myc transgenic mice. *Nature* 342, 185-189.

- Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T., Bartek, J., Massague, J., Hanel, F., *et al.* (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nature cell biology* 3, 392-399.
- Stanger, B.Z., Tanaka, A.J., and Melton, D.A. (2007). Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver. *Nature* 445, 886-891.
- Stanton, B.R., Perkins, A.S., Tessarollo, L., Sassoon, D.A., and Parada, L.F. (1992). Loss of N-myc function results in embryonic lethality and failure of the epithelial component of the embryo to develop. *Genes Dev* 6, 2235-2247.
- Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G., and McMahon, A.P. (1994). Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* 372, 679-683.
- Stewart, T.A., Pattengale, P.K., and Leder, P. (1984). Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes. *Cell* 38, 627-637.
- Stillwell, T.J., Gomez, M.R., and Kelalis, P.P. (1987). Renal lesions in tuberous sclerosis. *J Urol* 138, 477-481.
- Stocklin, E., Botteri, F., and Groner, B. (1993). An activated allele of the c-erbB-2 oncogene impairs kidney and lung function and causes early death of transgenic mice. *J Cell Biol* 122, 199-208.
- Stoetzel, C., Laurier, V., Davis, E.E., Muller, J., Rix, S., Badano, J.L., Leitch, C.C., Salem, N., Chouery, E., Corbani, S., *et al.* (2006). BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. *Nat Genet* 38, 521-524.
- Stokely, M.E., Hwang, S.Y., Hwang, J.Y., Fan, B., King, M.A., Inokuchi, K., and Koulen, P. (2006). Polycystin-1 can interact with homer 1/Vesl-1 in postnatal hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 84, 1727-1737.
- Strasser, A., Harris, A.W., Bath, M.L., and Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 348, 331-333.
- Stricklett, P.K., Taylor, D., Nelson, R.D., and Kohan, D.E. (2003). Thick ascending limb-specific expression of Cre recombinase. *Am J Physiol Renal Physiol* 285, F33-39.
- Suleiman, H., Heudobler, D., Raschta, A.S., Zhao, Y., Zhao, Q., Hertting, I., Vitzthum, H., Moeller, M.J., Holzman, L.B., Rachel, R., *et al.* (2007). The podocyte-specific inactivation of Lmx1b, Ldb1 and E2a yields new insight into a transcriptional network in podocytes. *Dev Biol* 304, 701-712.

- Sumi, T., Tsuneyoshi, N., Nakatsuji, N., and Suemori, H. (2007). Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc. *Oncogene*.
- Sweeney, W.E., Chen, Y., Nakanishi, K., Frost, P., and Avner, E.D. (2000). Treatment of polycystic kidney disease with a novel tyrosine kinase inhibitor. *Kidney Int* 57, 33-40.
- Sweeney, W.E., Futey, L., Frost, P., and Avner, E.D. (1999). In vitro modulation of cyst formation by a novel tyrosine kinase inhibitor. *Kidney Int* 56, 406-413.
- Sweeney, W.E., Jr., and Avner, E.D. (2006). Molecular and cellular pathophysiology of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Cell Tissue Res* 326, 671-685.
- Takahashi, H., Ueyama, Y., Hibino, T., Kuwahara, Y., Suzuki, S., Hioki, K., and Tamaoki, N. (1986). A new mouse model of genetically transmitted polycystic kidney disease. *J Urol* 135, 1280-1283.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Takayama, H., LaRochelle, W.J., Sabnis, S.G., Otsuka, T., and Merlino, G. (1997). Renal tubular hyperplasia, polycystic disease, and glomerulosclerosis in transgenic mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Lab Invest* 77, 131-138.
- Tallquist, M.D., and Soriano, P. (2000). Epiblast-restricted Cre expression in MORE mice: a tool to distinguish embryonic vs. extra-embryonic gene function. *Genesis* 26, 113-115.
- Tanner, G.A., and Tanner, J.A. (2000). Citrate therapy for polycystic kidney disease in rats. *Kidney Int* 58, 1859-1869.
- Tao, Y., Kim, J., Schrier, R.W., and Edelstein, C.L. (2005a). Rapamycin markedly slows disease progression in a rat model of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 16, 46-51.
- Tao, Y., Kim, J., Stanley, M., He, Z., Faubel, S., Schrier, R.W., and Edelstein, C.L. (2005b). Pathways of caspase-mediated apoptosis in autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Kidney Int* 67, 909-919.
- Tao, Y., Zafar, I., Schrier, R.W., and Edelstein, C.L. (2006). Pathways of apoptosis in caspase-3 gene deficient cpk/cpk mice with polycystic kidney disease (PKD). *J Am Soc Nephrol* 17, 706A.
- Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., and Leder, P. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7837-7841.

- Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426.
- Thivierge, C., Kurbegovic, A., Couillard, M., Guillaume, R., Cote, O., and Trudel, M. (2006). Overexpression of PKD1 causes polycystic kidney disease. *Mol Cell Biol* 26, 1538-1548.
- Thompson, E.B. (1998). The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annu Rev Physiol* 60, 575-600.
- Threadgill, D.W., Dlugosz, A.A., Hansen, L.A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., Harris, R.C., *et al.* (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269, 230-234.
- Tian, X., Nishio, S., Mitobe, M., Geng, L., Fedeles, S., Torres, V.E., and Somlo, S. (2006). Kidney-selective inactivation of the polycystic liver disease gene PRKCSH and SEC63 result in cyst formation by a two hit mechanism. *J Am Soc Nephrol* 17, 516A.
- Tian, Y., Kolb, R., Hong, J.H., Carroll, J., Li, D., You, J., Bronson, R., Yaffe, M.B., Zhou, J., and Benjamin, T. (2007). TAZ promotes PC2 degradation through a SCFbeta-Trop E3 ligase complex. *Mol Cell Biol* 27, 6383-6395.
- Togawa, A., Miyoshi, J., Ishizaki, H., Tanaka, M., Takakura, A., Nishioka, H., Yoshida, H., Doi, T., Mizoguchi, A., Matsuura, N., *et al.* (1999). Progressive impairment of kidneys and reproductive organs in mice lacking Rho GDIalpha. *Oncogene* 18, 5373-5380.
- Tomobe, K., Philbrick, D., Aukema, H.M., Clark, W.F., Ogborn, M.R., Parbtani, A., Takahashi, H., and Holub, B.J. (1994). Early dietary protein restriction slows disease progression and lengthens survival in mice with polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 5, 1355-1360.
- Tomobe, K., Philbrick, D.J., Ogborn, M.R., Takahashi, H., and Holub, B.J. (1998). Effect of dietary soy protein and genistein on disease progression in mice with polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 31, 55-61.
- Torra, R., Badenas, C., Darnell, A., Nicolau, C., Volpini, V., Revert, L., and Estivill, X. (1996). Linkage, clinical features, and prognosis of autosomal dominant polycystic kidney disease types 1 and 2. *J Am Soc Nephrol* 7, 2142-2151.
- Torra, R., Nicolau, C., Badenas, C., Navarro, S., Perez, L., Estivill, X., and Darnell, A. (1997). Ultrasonographic study of pancreatic cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin Nephrol* 47, 19-22.
- Torres, M., Gomez-Pardo, E., Dressler, G.R., and Gruss, P. (1995). Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development* 121, 4057-4065.

- Torres, V.E. (1999). Extrarenal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 34, xlv-xlvi.
- Torres, V.E., Cowley, B.D., Jr., Branden, M.G., Yoshida, I., and Gattone, V.H. (2001). Long-term ammonium chloride or sodium bicarbonate treatment in two models of polycystic kidney disease. *Exp Nephrol* 9, 171-180.
- Torres, V.E., and Harris, P.C. (2007). Polycystic kidney disease: genes, proteins, animal models, disease mechanisms and therapeutic opportunities. *J Intern Med* 261, 17-31.
- Torres, V.E., Sweeney, W.E., Jr., Wang, X., Qian, Q., Harris, P.C., Frost, P., and Avner, E.D. (2004). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition is not protective in PCK rats. *Kidney Int* 66, 1766-1773.
- Toualbi, K., Guller, M.C., Mauriz, J.L., Labalette, C., Buendia, M.A., Mauviel, A., and Bernuau, D. (2007). Physical and functional cooperation between AP-1 and beta-catenin for the regulation of TCF-dependent genes. *Oncogene* 26, 3492-3502.
- Townsley, F.M., Cliffe, A., and Bienz, M. (2004). Pygopus and Legless target Armadillo/beta-catenin to the nucleus to enable its transcriptional co-activator function. *Nature cell biology* 6, 626-633.
- Trudel, M., Barisoni, L., Lanoix, J., and D'Agati, V. (1998). Polycystic kidney disease in SBM transgenic mice: role of c-myc in disease induction and progression. *Am J Pathol* 152, 219-229.
- Trudel, M., Chretien, N., and D'Agati, V. (1994). Disappearance of polycystic kidney disease in revertant c-myc transgenic mice. *Mamm Genome* 5, 149-152.
- Trudel, M., D'Agati, V., and Costantini, F. (1991). C-myc as an inducer of polycystic kidney disease in transgenic mice. *Kidney Int* 39, 665-671.
- Trudel, M., Lanoix, J., Barisoni, L., Blouin, M.J., Desforges, M., L'Italien, C., and D'Agati, V. (1997). C-myc-induced apoptosis in polycystic kidney disease is Bcl-2 and p53 independent. *J Exp Med* 186, 1873-1884.
- Trumpp, A., Refaeli, Y., Oskarsson, T., Gasser, S., Murphy, M., Martin, G.R., and Bishop, J.M. (2001). c-Myc regulates mammalian body size by controlling cell number but not cell size. *Nature* 414, 768-773.
- Tsang, T.E., Shawlot, W., Kinder, S.J., Kobayashi, A., Kwan, K.M., Schughart, K., Kania, A., Jessell, T.M., Behringer, R.R., and Tam, P.P. (2000). Lim1 activity is required for intermediate mesoderm differentiation in the mouse embryo. *Dev Biol* 223, 77-90.

- Tsiokas, L., Arnould, T., Zhu, C., Kim, E., Walz, G., and Sukhatme, V.P. (1999). Specific association of the gene product of PKD2 with the TRPC1 channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3934-3939.
- Tsiokas, L., Kim, E., Arnould, T., Sukhatme, V.P., and Walz, G. (1997). Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of PKD1 and PKD2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6965-6970.
- Urban, S., and Freeman, M. (2002). Intramembrane proteolysis controls diverse signalling pathways throughout evolution. *Curr Opin Genet Dev* 12, 512-518.
- Utsch, B., Sayer, J.A., Attanasio, M., Pereira, R.R., Eccles, M., Hennies, H.C., Otto, E.A., and Hildebrandt, F. (2006). Identification of the first AHI1 gene mutations in nephronophthisis-associated Joubert syndrome. *Pediatr Nephrol* 21, 32-35.
- Valente, E.M., Silhavy, J.L., Brancati, F., Barrano, G., Krishnaswami, S.R., Castori, M., Lancaster, M.A., Boltshauser, E., Boccone, L., Al-Gazali, L., *et al.* (2006). Mutations in CEP290, which encodes a centrosomal protein, cause pleiotropic forms of Joubert syndrome. *Nat Genet* 38, 623-625.
- van Adelsberg, J. (1999). Peptides from the PKD repeats of polycystin, the PKD1 gene product, modulate pattern formation in the developing kidney. *Dev Genet* 24, 299-308.
- Van Adelsberg, J., Chamberlain, S., and D'Agati, V. (1997). Polycystin expression is temporally and spatially regulated during renal development. *Am J Physiol* 272, F602-609.
- Van Bodegom, D., Saifudeen, Z., Dipp, S., Puri, S., Magenheimer, B.S., Calvet, J.P., and El Dahr, S.S. (2006). The polycystic kidney disease-1 gene is a target for p53-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem*.
- van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Battle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.P., *et al.* (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111, 241-250.
- Van Esch, H., Groenen, P., Nesbit, M.A., Schuffenhauer, S., Lichtner, P., Vanderlinden, G., Harding, B., Beetz, R., Bilous, R.W., Holdaway, I., *et al.* (2000). GATA3 haploinsufficiency causes human HDR syndrome. *Nature* 406, 419-422.
- Vassilev, P.M., Guo, L., Chen, X.Z., Segal, Y., Peng, J.B., Basora, N., Babakhanlou, H., Cruger, G., Kanazirska, M., Ye, C., *et al.* (2001). Polycystin-2 is a novel cation channel implicated in defective intracellular Ca(2+) homeostasis in polycystic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 341-350.

- Veeman, M.T., Axelrod, J.D., and Moon, R.T. (2003). A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Developmental cell* 5, 367-377.
- Veis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75, 229-240.
- Veldhuisen, B., Saris, J.J., de Haij, S., Hayashi, T., Reynolds, D.M., Mochizuki, T., Elles, R., Fossdal, R., Bogdanova, N., van Dijk, M.A., *et al.* (1997). A spectrum of mutations in the second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD2). *Am J Hum Genet* 61, 547-555.
- Veldhuisen, B., Spruit, L., Dauwerse, H.G., Breuning, M.H., and Peters, D.J. (1999). Genes homologous to the autosomal dominant polycystic kidney disease genes (PKD1 and PKD2). *Eur J Hum Genet* 7, 860-872.
- Vervoorts, J., Luscher-Firzlaff, J.M., Rottmann, S., Lilischkis, R., Walsemann, G., Dohmann, K., Austen, M., and Luscher, B. (2003). Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO reports* 4, 484-490.
- Vincent, S.D., and Robertson, E.J. (2004). Targeted insertion of an IRES Cre into the Hnf4alpha locus: Cre-mediated recombination in the liver, kidney, and gut epithelium. *Genesis* 39, 206-211.
- Wagner, K.U., Wall, R.J., St-Onge, L., Gruss, P., Wynshaw-Boris, A., Garrett, L., Li, M., Furth, P.A., and Hennighausen, L. (1997). Cre-mediated gene deletion in the mammary gland. *Nucleic Acids Res* 25, 4323-4330.
- Wahl, P.R., Serra, A.L., Le Hir, M., Molle, K.D., Hall, M.N., and Wuthrich, R.P. (2006). Inhibition of mTOR with sirolimus slows disease progression in Han:SPRD rats with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Nephrol Dial Transplant* 21, 598-604.
- Waikel, R.L., Kawachi, Y., Waikel, P.A., Wang, X.J., and Roop, D.R. (2001). Dereglated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells. *Nat Genet* 28, 165-168.
- Wallingford, J.B., Fraser, S.E., and Harland, R.M. (2002). Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Developmental cell* 2, 695-706.
- Wang, G., Seidman, M.M., and Glazer, P.M. (1996). Mutagenesis in mammalian cells induced by triple helix formation and transcription-coupled repair. *Science* 271, 802-805.

- Wang, Q., Lan, Y., Cho, E.S., Maltby, K.M., and Jiang, R. (2005a). Odd-skipped related 1 (Odd 1) is an essential regulator of heart and urogenital development. *Dev Biol* 288, 582-594.
- Wang, S., Zhang, J., Nauli, S.M., Li, X., Starremans, P.G., Luo, Y., Roberts, K.A., and Zhou, J. (2007). Fibrocystin/Polyductin, Found in the Same Protein Complex with Polycystin-2, Regulates Calcium Responses in Kidney Epithelia. *Mol Cell Biol*.
- Wang, W., Huang, X.R., Hou, C.C., Liu, F., Ju, W.J., Shao, X., Oka, K., Igarashi, P., Bottinger, E.P., and Lan, H.Y. (2004). A novel approach for generating conditional knockout mice using ultrasound-mediated-Cre-LoxP technique. *J Am Soc Nephrol* 15, 422A.
- Wang, X., Gattone, V., 2nd, Harris, P.C., and Torres, V.E. (2005b). Effectiveness of vasopressin V2 receptor antagonists OPC-31260 and OPC-41061 on polycystic kidney disease development in the PCK rat. *J Am Soc Nephrol* 16, 846-851.
- Wanke, R., Hermanns, W., Folger, S., Wolf, E., and Brem, G. (1991). Accelerated growth and visceral lesions in transgenic mice expressing foreign genes of the growth hormone family: an overview. *Pediatr Nephrol* 5, 513-521.
- Ward, C.J., Hogan, M.C., Rossetti, S., Walker, D., Sneddon, T., Wang, X., Kubly, V., Cunningham, J.M., Bacallao, R., Ishibashi, M., *et al.* (2002). The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat Genet* 30, 259-269.
- Ward, C.J., Turley, H., Ong, A.C., Comley, M., Biddolph, S., Chetty, R., Ratcliffe, P.J., Gattner, K., and Harris, P.C. (1996). Polycystin, the polycystic kidney disease 1 protein, is expressed by epithelial cells in fetal, adult, and polycystic kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 1524-1528.
- Watanabe, T., and Costantini, F. (2004). Real-time analysis of ureteric bud branching morphogenesis in vitro. *Dev Biol* 271, 98-108.
- Watnick, T.J., Gandolph, M.A., Weber, H., Neumann, H.P., and Germino, G.G. (1998a). Gene conversion is a likely cause of mutation in PKD1. *Hum Mol Genet* 7, 1239-1243.
- Watnick, T.J., Jin, Y., Matunis, E., Kernan, M.J., and Montell, C. (2003). A flagellar polycystin-2 homolog required for male fertility in *Drosophila*. *Curr Biol* 13, 2179-2184.
- Watnick, T.J., Torres, V.E., Gandolph, M.A., Qian, F., Onuchic, L.F., Klinger, K.W., Landes, G., and Germino, G.G. (1998b). Somatic mutation in individual liver cysts supports a two-hit model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol Cell* 2, 247-251.

- Wechsler-Reya, R., Elliott, K., Herlyn, M., and Prendergast, G.C. (1997). The putative tumor suppressor BIN1 is a short-lived nuclear phosphoprotein, the localization of which is altered in malignant cells. *Cancer Res* 57, 3258-3263.
- Weiss, R.H., Park, J.Y., Schutzer, W.E., and Anderson, S. (2006). p21 as a novel target for autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) therapy. *J Am Soc Nephrol* 17, 776A.
- Wellik, D.M., Hawkes, P.J., and Capecchi, M.R. (2002). Hox11 paralogous genes are essential for metanephric kidney induction. *Genes Dev* 16, 1423-1432.
- Weston, B.S., Bagneris, C., Price, R.G., and Stirling, J.L. (2001). The polycystin-1 C-type lectin domain binds carbohydrate in a calcium-dependent manner, and interacts with extracellular matrix proteins in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1536, 161-176.
- Weston, B.S., Jeffery, S., Jeffrey, I., Sharaf, S.F., Carter, N., Saggari-Malik, A., and Price, R.G. (1997). Polycystin expression during embryonic development of human kidney in adult tissues and ADPKD tissue. *Histochem J* 29, 847-856.
- Weston, C.R., Wong, A., Hall, J.P., Goad, M.E., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2003). JNK initiates a cytokine cascade that causes Pax2 expression and closure of the optic fissure. *Genes Dev* 17, 1271-1280.
- Wilson, A., Murphy, M.J., Oskarsson, T., Kaloulis, K., Bettess, M.D., Oser, G.M., Pasche, A.C., Knabenhans, C., Macdonald, H.R., and Trumpp, A. (2004). c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev* 18, 2747-2763.
- Wilson, P.D. (1991). Aberrant epithelial cell growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 17, 634-637.
- Wilson, P.D. (1997). Epithelial cell polarity and disease. *Am J Physiol* 272, F434-442.
- Wilson, P.D., and Falkenstein, D. (1995). The pathology of human renal cystic disease. *Curr Top Pathol* 88, 1-50.
- Wilson, P.D., Geng, L., Li, X., and Burrow, C.R. (1999). The PKD1 gene product, "polycystin-1," is a tyrosine-phosphorylated protein that colocalizes with alpha2beta1-integrin in focal clusters in adherent renal epithelia. *Lab Invest* 79, 1311-1323.
- Wilson, P.D., Hreniuk, D., and Gabow, P.A. (1992). Abnormal extracellular matrix and excessive growth of human adult polycystic kidney disease epithelia. *J Cell Physiol* 150, 360-369.

- Wilson, S.J., Amsler, K., Hyink, D.P., Li, X., Lu, W., Zhou, J., Burrow, C.R., and Wilson, P.D. (2006). Inhibition of HER-2(neu/ErbB2) restores normal function and structure to polycystic kidney disease (PKD) epithelia. *Biochim Biophys Acta* 1762, 647-655.
- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A., and Hogan, B.L. (1995). Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 9, 2105-2116.
- Wodarczyk, C., and Boletta, A. (2006). A novel mouse model to study polycystin-1 function. *J Am Soc Nephrol* 17, 775A.
- Woo, D. (1995). Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *N Engl J Med* 333, 18-25.
- Woo, D.D., Tabancay, A.P., Jr., and Wang, C.J. (1997). Microtubule active taxanes inhibit polycystic kidney disease progression in cpk mice. *Kidney Int* 51, 1613-1618.
- Woolf, A.S., Price, K.L., Scambler, P.J., and Winyard, P.J. (2004). Evolving concepts in human renal dysplasia. *J Am Soc Nephrol* 15, 998-1007.
- Wu, G., D'Agati, V., Cai, Y., Markowitz, G., Park, J.H., Reynolds, D.M., Maeda, Y., Le, T.C., Hou, H., Jr., Kucherlapati, R., *et al.* (1998a). Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease. *Cell* 93, 177-188.
- Wu, G., Hayashi, T., Park, J.H., Dixit, M., Reynolds, D.M., Li, L., Maeda, Y., Cai, Y., Coca-Prados, M., and Somlo, S. (1998b). Identification of PKD2L, a human PKD2-related gene: tissue-specific expression and mapping to chromosome 10q25. *Genomics* 54, 564-568.
- Wu, G., Markowitz, G.S., Li, L., D'Agati, V.D., Factor, S.M., Geng, L., Tibara, S., Tuchman, J., Cai, Y., Park, J.H., *et al.* (2000). Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in Pkd2. *Nat Genet* 24, 75-78.
- Wu, G., Mochizuki, T., Le, T.C., Cai, Y., Hayashi, T., Reynolds, D.M., and Somlo, S. (1997). Molecular cloning, cDNA sequence analysis, and chromosomal localization of mouse Pkd2. *Genomics* 45, 220-223.
- Wu, G., Tian, X., Nishimura, S., Markowitz, G.S., D'Agati, V., Park, J.H., Yao, L., Li, L., Geng, L., Zhao, H., *et al.* (2002). Trans-heterozygous Pkd1 and Pkd2 mutations modify expression of polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* 11, 1845-1854.
- Wu, K.J., Polack, A., and Dalla-Favera, R. (1999). Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by c-MYC. *Science* 283, 676-679.

- Wu, Y., Dai, X.Q., Li, Q., Chen, C.X., Mai, W., Hussain, Z., Long, W., Montalbetti, N., Li, G., Glynn, R., *et al.* (2006). Kinesin-2 mediates physical and functional interactions between polycystin-2 and fibrocystin. *Hum Mol Genet* *15*, 3280-3292.
- Xiao, Z., Zhang, S., Mahlios, J., Zhou, G., Magenheimer, B.S., Guo, D., Dallas, S.L., Maser, R., Calvet, J.P., Bonewald, L., *et al.* (2006). Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression. *J Biol Chem* *281*, 30884-30895.
- Xu, G.M., Gonzalez-Perrett, S., Essafi, M., Timpanaro, G.A., Montalbetti, N., Arnaout, M.A., and Cantiello, H.F. (2003a). Polycystin-1 activates and stabilizes the polycystin-2 channel. *J Biol Chem* *278*, 1457-1462.
- Xu, G.M., Sikaneta, T., Sullivan, B.M., Zhang, Q., Andreucci, M., Stehle, T., Drummond, I., and Arnaout, M.A. (2001). Polycystin-1 interacts with intermediate filaments. *J Biol Chem* *276*, 46544-46552.
- Xu, P.X., Adams, J., Peters, H., Brown, M.C., Heaney, S., and Maas, R. (1999). *Eya1*-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nat Genet* *23*, 113-117.
- Xu, P.X., Zheng, W., Huang, L., Maire, P., Laclef, C., and Silviu, D. (2003b). *Six1* is required for the early organogenesis of mammalian kidney. *Development* *130*, 3085-3094.
- Yamaguchi, T., Hempson, S.J., Reif, G.A., Hedge, A.M., and Wallace, D.P. (2006). Calcium restores a normal proliferation phenotype in human polycystic kidney disease epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* *17*, 178-187.
- Yamaguchi, T., Nagao, S., Wallace, D.P., Belibi, F.A., Cowley, B.D., Pelling, J.C., and Grantham, J.J. (2003). Cyclic AMP activates B-Raf and ERK in cyst epithelial cells from autosomal-dominant polycystic kidneys. *Kidney Int* *63*, 1983-1994.
- Yang, J., McDill, B.W., Liang, D., Miner, J.H., Holzman, L.B., and Chen, F. (2004). Calcineurin is not required for podocyte development but is involved in GBM deposition. *J Am Soc Nephrol* *15*, 417A.
- Yang, W., Shen, J., Wu, M., Arsur, M., FitzGerald, M., Suldan, Z., Kim, D.W., Hofmann, C.S., Pianetti, S., Romieu-Mourez, R., *et al.* (2001). Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* *20*, 1688-1702.
- Yao, M., Shuin, T., Misaki, H., and Kubota, Y. (1988). Enhanced expression of c-myc and epidermal growth factor receptor (C-erbB-1) genes in primary human renal cancer. *Cancer Res* *48*, 6753-6757.

- Ye, M., and Grantham, J.J. (1993). The secretion of fluid by renal cysts from patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 329, 310-313.
- Yeung, T.K., Germond, C., Chen, X., and Wang, Z. (1999). The mode of action of taxol: apoptosis at low concentration and necrosis at high concentration. *Biochem Biophys Res Commun* 263, 398-404.
- Yoder, B.K., Hou, X., and Guay-Woodford, L.M. (2002a). The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* 13, 2508-2516.
- Yoder, B.K., Tousson, A., Millican, L., Wu, J.H., Bugg, C.E., Jr., Schafer, J.A., and Balkovetz, D.F. (2002b). Polaris, a protein disrupted in orpk mutant mice, is required for assembly of renal cilium. *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F541-552.
- Yoo, K.H., Noh, J.Y., Sung, Y.H., Suh, Y.J., Lee, H.W., and Park, J.H. (2006). Cyst formation in the *Mxil*-deficient mouse. *J Am Soc Nephrol* 17, 777A.
- Yoo, K.H., Sung, Y.H., Yang, M.H., Jeon, J.O., Yook, Y.J., Woo, Y.M., Lee, H.W., and Park, J.H. (2007). Inactivation of *Mxil* induces II-8 secretion activation in polycystic kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 356, 85-90.
- Yoshida, N., Yano, Y., Yoshiki, A., Ueno, M., Deguchi, N., and Hirotsune, S. (2003). Identification of a new target molecule for a cascade therapy of polycystic kidney. *Hum Cell* 16, 65-72.
- You, Z., Saims, D., Chen, S., Zhang, Z., Guttridge, D.C., Guan, K.L., MacDougald, O.A., Brown, A.M., Evan, G., Kitajewski, J., *et al.* (2002). Wnt signaling promotes oncogenic transformation by inhibiting c-Myc-induced apoptosis. *J Cell Biol* 157, 429-440.
- Yu, J., Carroll, T.J., and McMahon, A.P. (2002). Sonic hedgehog regulates proliferation and differentiation of mesenchymal cells in the mouse metanephric kidney. *Development* 129, 5301-5312.
- Yu, S., He, X., Gao, J., Zuo, J., Hackmann, K., Xu, H., Germino, G.G., and Qian, F. (2006). The proteolytic cleavage of polycystin-1 is essential for kidney tubular structure. *J Am Soc Nephrol* 17, 89A.
- Yuasa, T., Takakura, A., Denker, B.M., Venugopal, B., and Zhou, J. (2004). Polycystin-1L2 is a novel G-protein-binding protein. *Genomics* 84, 126-138.
- Yuasa, T., Venugopal, B., Weremowicz, S., Morton, C.C., Guo, L., and Zhou, J. (2002). The sequence, expression, and chromosomal localization of a novel polycystic kidney disease 1-like gene, *PKD1L1*, in human. *Genomics* 79, 376-386.

- Zatti, A., Chauvet, V., Rajendran, V., Kimura, T., Pagel, P., and Caplan, M.J. (2005). The C-terminal tail of the polycystin-1 protein interacts with the Na,K-ATPase alpha-subunit. *Mol Biol Cell* 16, 5087-5093.
- Zerres, K., Rudnik-Schoneborn, S., Steinkamm, C., Becker, J., and Mucher, G. (1998). Autosomal recessive polycystic kidney disease. *J Mol Med* 76, 303-309.
- Zervos, A.S., Gyuris, J., and Brent, R. (1993). Mx11, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* 72, 223-232.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87, 619-628.
- Zhang, H., Zhang, A., Kohan, D.E., Nelson, R.D., Gonzalez, F.J., and Yang, T. (2005). Collecting duct-specific deletion of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks thiazolidinedione-induced fluid retention. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9406-9411.
- Zhang, K., Ye, C., Zhou, Q., Zheng, R., Lv, X., Chen, Y., Hu, Z., Guo, H., Zhang, Z., Wang, Y., *et al.* (2007). PKD1 inhibits cancer cells migration and invasion via Wnt signaling pathway in vitro. *Cell Biochem Funct* 25, 767-774.
- Zhao, H., Kegg, H., Grady, S., Truong, H.T., Robinson, M.L., Baum, M., and Bates, C.M. (2004). Role of fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in the ureteric bud. *Dev Biol* 276, 403-415.
- Zhou, F., Piontek, K., Germino, G.G., and Watnick, T. (2006). Does loss of endothelial cell polycystin-1 result in lethality? *J Am Soc Nephrol* 17, 704A.
- Zhou, X.J., and Kukes, G. (1998). Pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease: role of apoptosis. *Diagn Mol Pathol* 7, 65-68.
- Zhu, P., Martin, E., Mengwasser, J., Schlag, P., Janssen, K.P., and Gottlicher, M. (2004). Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer cell* 5, 455-463.
- Zimmerman, K.A., Yancopoulos, G.D., Collum, R.G., Smith, R.K., Kohl, N.E., Denis, K.A., Nau, M.M., Witte, O.N., Toran-Allerand, D., and Gee, C.E. (1986). Differential expression of myc family genes during murine development. *Nature* 319, 780-783.

IV ANNEXES

IV.1 ANNEXE 1 Délétion conditionnelle rénale

Plusieurs souris transgéniques qui expriment la *Cre* recombinase dans les différentes populations cellulaires rénales ont été générées (Tableau IV-I, page III). Les souris *Bmp7^{cre/+}* et *KspCre* ont été utilisés pour déléter l'expression rénale de *c-myc* (chapitre II.2) et de la β -caténine (chapitre II.4).

Délétion conditionnelle de *c-myc*

En plus de notre étude sur les souris *Bmp7^{cre/+}; c-myc^{fl/fl}*, une seule autre étude a rapportée la délétion conditionnelle de *c-myc* à l'aide d'une *Cre* ciblée au mésenchyme métanéphrique, soit la souris *AhCre* dont le transgène contient le promoteur du cytochrome *p450 1A1 (Cyp1A)* en amont de la *Cre* recombinase (Sansom et al., 2005; Sansom et al., 2007). Cependant, ce promoteur est inductible suite à l'injection de β -naphthoflavone induisant l'activité de la *Cre* uniquement dans le foie et l'intestin. En absence d'induction, la *Cre* est également exprimée dans le rein. Par contre, chez la souris *AhCre; c-myc^{fl/fl}*, la délétion de *c-myc* a été analysée dans l'intestin suite à l'induction au β -naphthoflavone et donc aucune donnée sur le rein n'a été rapportée (Sansom et al., 2007).

Délétion conditionnelle de la β -caténine

La β -caténine est le seul gène à avoir été délété par deux transgènes qui ciblent principalement l'épithélium du bourgeon urétéral et ses dérivés, soit *KspCre* et *Hoxb7cre*. Chez la souris *KspCre; β -cat^{fl/fl}*, aucun phénotype rénal n'est observé au cours du développement, alors que les reins des souris *Hoxb7cre; β -cat^{fl/fl}* sont aplasiques et/ou dysplasiques (Bridgewater and Rosenblum, 2006; Carroll and McMahon, 2004). Ces données démontrent une différence importante dans les niveaux d'expression spatiotemporelle entre les transgènes *KspCre* et *Hoxb7cre*. Le transgène *Hoxb7cre* cible préférentiellement le bourgeon urétéral en morphogenèse de branchement, tandis que *KspCre* est plus spécifique à l'épithélium rénal mature.

Tableau IV-I : Promoteurs *Cre* rénaux-spécifiques

Promoteurs	Expression rénale	Expression extra-rénale	Gènes délétés	Réf
<i>Bmp7</i>	Tubules; MM; BU; podocytes	Os; cartilage; yeux; myocardium; système digestif; pancréas	<i>Smad4</i>	1
<i>Ksp-cadhérine</i> (et <i>-CreER^{T2*}</i>)	Tubules matures; TC; BU; canaux de Wolff; mésonéphros	Tractus génito-urinaire en développement; canal Müllérien	<i>KIF3A; HNF-1β; APC; p53; Pkd1; Smad2</i>	2-9
<i>Hoxb7</i>	TC; BU; canaux de Wolff; uretère	Mœlle épinière; ganglions lymphatiques dorsaux	<i>Smad4; α-ENaC; Shh; β-caténine; Spry1; Lim1</i>	1, 10-14
<i>Hoxb7cre-EGFP</i>	Comme Hox-B7	Comme Hox-B7	<i>Fgfr1 et 2; β-caténine.</i>	15, 16
<i>Rarβ2</i>	MM; stroma cortical; TD; TP; capsule de Bowman, mésonéphros	Système nerveux central; mésenchymes du tractus génito-urinaire	<i>Lim1</i>	14
<i>Pax2</i>	BU; MM; Glomérules; tubules; canaux néphriques;	Oreille interne; cerveau	<i>Lim-1; Notch1 et 2; Rbp-J</i>	17-19
<i>Pax3</i>	Mésoderme intermédiaire; MM	Cellules dérivées de la crête neurale	<i>Fgfr1/2; Notch2; Clbn; Fgf8</i>	19- 23
<i>Pax8</i>	Glomérules; tubules; canaux néphriques; mésonéphros	Oreille interne; cerveau; Thyroïde; canal Müllérien		24
<i>Six2</i>	MM	ND	<i>β-caténine</i>	19, 25
<i>Sall1; (et -CreER^{T2*})</i>	MM; tubules; podocytes	ND	<i>Sall1</i>	26
<i>Brachyury T</i>	Mésoderme (rein entier)	Dérivés du mésoderme	<i>Fgf8</i>	27
<i>Cited1*</i>	MM	ND		28
<i>Aquaporine-2*</i>	TC (cellules principales)	Testicules; vas déférens	<i>ET-1; ETA; ETB; PPARγ</i>	29- 32
<i>SGLT2</i>	TP	Aucune		33
<i>γ-GT</i> (et <i>-CreER^{T2*}</i>)	Tubules corticaux (TP)	Aucune	<i>Mégaline</i>	34- 36
<i>Néphrine</i> (NPHS1)	Glomérules (podocytes)	Cerveau	<i>VEGF</i>	37, 38
<i>Podocine</i> (NPHS2)	Glomérules (podocytes)	Aucune	<i>Calcineurine; ILK; β-caténine; Ldb1, Lmx1b, E2a</i>	39-43

Promoteurs	Expression rénale	Expression extra-rénale	Gènes délétés	Réf
<i>NPHS2-rtTA*</i>	Glomérules (podocytes)	Aucune		44
<i>Rénine</i>	Cellules juxtaglomérulaires; arterioles afférentes	Surrénale; testicules; ganglions sympathiques		45
<i>THP</i>	SAAH	Testicule; cerveau		46
<i>Mx1*</i>	Glomérule; TC; SAAH	Endothélium vasculaire; foie; rate; utérus; duodenum; colon; aorte	<i>EP4</i>	47, 48
<i>ApoE</i>	Tubules corticaux (TP et TD)	ND	<i>Mégaline</i>	35
<i>KAP*</i>	TP	Épididime	<i>Mégaline</i>	49
<i>LC-1, rTA^{LAP}-1*</i>	TP; SAAH	Foie; poumon		50
<i>Hnf4a</i>	Tubules corticaux; TC	Foie; système digestif		51
<i>Cyp1A1*</i> (<i>AhCre</i>)	MM; épithélium glomérulaire et collecteur	Foie; tractus gastro-intestinal	<i>APC; c-myc; β-caténine</i>	52- 54
<i>PEPCK</i>	TP	Foie	<i>VHL</i>	55
Ultra-μbubble*	Rein entier	Aucun	<i>Smad2</i>	8

Légende: * : transgène inductible; BU: bourgeon urétéral; MM: mésenchyme métanéphrique; TP : tubules proximaux; TD : tubules distaux; TC : tubules collecteurs; SAAH : segment ascendant de l'anse de Henle; THP: *Tamm-Horsfall protein* ou uromoduline; γ -GT: *γ -glutamyl transpeptidase*; SGLT2: Na⁺/glucose cotransporteur; α -ENaC : *Epithelial Na⁺ channel*; Spryl : *Sproutyl*; Rbp-J : *recombination signal binding protein-J*; Cnb1 : *Calcineurine*; ET-1 : *Endothéline-1*; ETA et ETB : Récepteur Endothéline A et B; ILK : *Integrin-linked kinase*; EP4 : Récepteur de prostaglandine; LAP : *Liver activator protein*; Cyp1A1 : *Cytochrome p450 1A1*; PEPCK : *Phosphoenolpyruvate carboxykinase*; Ultra- μ bubble : *Ultrasound-microbubble*.

Références : 1-(Oxburgh et al., 2004); 2-(Shao et al., 2002); 3-(Lin et al., 2003); 4-(Gresh et al., 2004); 5-(Qian et al., 2005); 6-(Saifudeen et al., 2004); 7-(Shibazaki et al., 2004); 8-(Lantinga-van Leeuwen et al., 2006b); 9-(Wang et al., 2004); 10-(Rubera et al., 2003); 11-(Yu et al., 2002); 12-(Carroll and McMahon, 2004); 13-(Basson et al., 2005); 14-(Kobayashi et al., 2005); 15-(Zhao et al., 2004); 16-(Bridgewater and Rosenblum, 2006); 17-(Ohyama and Groves, 2004); 18-(Pedersen et al., 2005); 19-(Cheng et al., 2007); 20-(Li et al., 2000); 21-(Grieshammer et al., 2005); 22-(Chang et al., 2004); 23-(Poladia et al., 2006); 24-(Bouchard et al., 2004); 25-(Kuure et al., 2007); 26-(Harada and Nishinakamura, 2004); 27-(Perantoni et al., 2005); 28-(Boyle et al., 2006); 29-(Ahn et al., 2004); 30-(Ge et al., 2005); 31-(Ge et al., 2006); 32-(Zhang et al., 2005); 33-(Rubera et al., 2004); 34-(Iwano et al., 2002); 35-(Leheste et al., 2003); 36-(Dworniczak et al., 2007); 37-(Eremina et al., 2002); 38-(Eremina et al., 2003); 39-(Moeller et al., 2003); 40-(Yang et al., 2004); 41-(El-Aouni et al., 2006); 42-(Dai et al., 2006b); 43-(Suleiman et al., 2007); 44-(Shigehara et al., 2003); 45-(Sequeira Lopez et al., 2004); 46-(Stricklett et al., 2003); 47-(Schneider et al., 2003); 48-(Schneider et al., 2004); 49-(Bianco et al., 2003); 50-(Schonig et al., 2002); 51-(Vincent and Robertson, 2004); 52-(Sansom et al., 2005); 53-(Sansom et al., 2007); 54-(Ireland et al., 2004); 55-(Rankin et al., 2006).

IV.2 ANNEXE 2 Mécanisme de l'hypoplasie rénale

Chez l'homme, des mutations dans des gènes exprimés au cours du développement précoce du rein comme *PAX2* (syndrome renal-coloboma), *SALL1* (syndrome Townes-Brock) ou *EYAI* (syndrome brachio-oto-renal) développent une aplasie/hypoplasie rénale (Abdelhak et al., 1997; Kohlhase et al., 1998; Sanyanusin et al., 1995). Chez la souris, des mutations dans ces mêmes gènes résultent en un phénotype comparable à celui retrouvé chez l'humain. Toutefois, plusieurs gènes mutés causent une hypoplasie rénale chez la souris et ne sont pas associés à une maladie rénale chez l'homme (Tableau IV-II, page VI et IV-III, page VII). C'est d'ailleurs le cas pour les membres de la famille de *Myc*. Différents mutants de souris démontrant une hypoplasie (réduction de la taille des reins avec structures rénales normales) ou une hypodysplasie rénale (réduction de la taille des reins associée à une structure rénale anormale) sont listés dans les Tableau IV-II, page VI et Tableau IV-III, page VII, respectivement.

Parmi les nombreux modèles murins d'hypoplasie rénale, différents défauts morphologiques et cellulaires ont été identifiés incluant des problèmes de branchements du bourgeon urétéral, une diminution de prolifération et une augmentation d'apoptose cellulaire. En ce sens, les mutants pour *c-myc* (*Bmp7^{cre/+}*; *c-myc^{fl/fl}*) et *N-myc* (*N-myc^{H/H}*) font partie d'une classe distincte étant donné que ce sont les seuls à présenter une perte de néphrons structurellement normaux associée à une réduction de prolifération cellulaire et une apoptose stable (chapitre II.2 et (Bates et al., 2000)).

Tableau IV-II : Hypoplasie rénale chez la souris

Gènes	Mutations	Nombre de néphron	Prolifération et apoptose	Remarques	Réf
<i>c-Myc</i>	KO cond (BMP7 ^{Cre})	Diminué †	Prolifération diminuée et apoptose stable	Rein diminué de 20% à e16.5, e18.5 et adulte	1
<i>N-myc</i>	Allèle hypomorphe	Diminué	Prolifération diminuée et Apoptose stable	Rein diminué de 17% à e13.5 et 25% à e18.5	2
<i>Pax2</i>	KO hétéro	Diminué †	Prolifération stable et apoptose élevée	Rein diminué de 25 à 60% à e15.5	3
<i>p53</i>	Trans-génique	Diminué †	Prolifération stable et Apoptose élevée	Rein diminué de 50% à e17.5-e18.5. volume glomérulaire élevé	4
<i>Wnt11</i>	KO homo	Diminué †	ND	Retard de branchement BU	5
<i>Fgf7</i>	KO homo	Diminué †	Prolifération ND Apoptose stable	Rein diminué de 30% à e16.5 et 24% à 6 mois	6
<i>Fgfr2</i>	KO cond (Hoxb7Cre-EGFP)	Diminué	Prolifération stable et apoptose élevée	Rein diminué de 30% à e16.5; Hydronéphrose (20% des cas)	7
<i>Shh</i>	KO cond (Hoxb7Cre)	Diminué	Prolifération diminuée et apoptose stable	Rein diminué de 21% à e14.5 et 52% à P1; Hydrouretère	8
<i>Bmp2</i>	KO hétéro	Stable	ND	Rein diminué de 16% à P20	9
<i>Hoxa11/d11</i>	Double KO homo	Diminué	Stable	Hypoplasie sévère, mais aucune quantification; Défaut de branchement BU	10,11
<i>Lim1</i>	KO cond (Hoxb7Cre)	Diminué	ND	Rein diminué de moitié à e12.5 et P1; Hydronéphrose	12
<i>Pygo1/2</i>	Double KO	Diminué	ND	Nombre de BU diminué de 25% à e18.5	13

Légende : KO : *Knock-out*; Cond : conditionnelle (et transgène Cre utilisé); Homo : Homozygote; Hétéro : Hétérozygote; † : Diminution du nombre de néphron en corrélation avec la diminution du volume rénal; BU : bourgeon urétéral; MM : mésenchyme métanéphrique; ND : non déterminé.

Références : 1-Voir chapitre II.2; 2-(Bates et al., 2000); 3-(Porteous et al., 2000); 4-(Godley et al., 1996); 5-(Majumdar et al., 2003); 6-(Qiao et al., 1999); 7-(Zhao et al., 2004); 8-(Yu et al., 2002); 9-(Martinez et al., 2002); 10-(Patterson et al., 2001); 11-(Davis et al., 1995); 12-(Kobayashi et al., 2005); 13-(Schwab et al., 2007).

Tableau IV-III :Hypodysplasie rénale chez la souris

Gènes	Mutations	Nombre de néphron	Prolifération et apoptose	Remarques	Réf
<i>Bmp7</i>	KO homo	Diminué	Prolifération ND Apoptose élevée	Hypodysplasie bilatérale sévère; hydrouretère	1, 2
<i>Smad4</i>	KO cond (BMP7 ^{Cre})	Diminué	Prolifération stable et apoptose élevée	Rein diminué de 50%; kystes; hydrouretère; diminution des tubules collecteurs	3
<i>Intégrine $\alpha 8\beta 1$</i>	KO homo	Diminué	ND	Défaut de branchement du BU et d'induction du MM	4
<i>Intégrine $\alpha 3\beta 1$</i>	KO homo	Stable	ND	Glomérules anormaux; Nb de tubules collecteurs réduit	5
<i>Bcl-2</i>	KO homo	Diminué	Apoptose élevée	Kystes (Prolifération élevée) volume glomérulaire élevé	6, 7
<i>Bmp4</i>	KO hétéro	ND	ND	Kystes et hydrouretère	8
<i>Wnt4</i>	KO homo		ND	Mésenchyme non différencié	9
<i>Eya1</i>	Allèle hypomorphe	Diminué	ND	Défaut de branchement du BU	10
<i>Sall1</i>	KO homo	ND	Apoptose élevée dans le MM	Hypoplasie très sévère; kystes; atrophie des glomérules	11
<i>Lim1</i>	KO cond (Pax2-Cre; Rar β 2-Cre)	Diminué	ND	Mésenchyme non différencié; Absence de tubules et de glomérules; hydronéphrose	12,13
<i>Spry2</i>	Trans-génique	Diminué	Prolifération diminuée et apoptose élevée	Kystes; BU ectopique; hydrouretère	14
<i>AP-2β</i>	KO homo	ND	Prolifération stable et apoptose élevée	Petits kystes dans les tubules collecteurs et distaux	15
<i>BF2</i>	KO homo	Diminué	ND	Défaut de branchement du BU et de différenciation du MM	16
<i>RARaβ2</i>	Double KO homo	Diminué	ND	Défaut de branchement du BU absence de ZN	17
<i>Pod1</i>	KO homo	Diminué	ND	Défaut de différenciation du MM et des glomérules	18

Gènes	Mutations	Nombre de néphron	Prolifération et apoptose	Remarques	Réf
<i>Fgf8</i>	KO cond (Pax3-Cre)	Diminué	Prolifération stable et apoptose élevée	Mésenchyme non différencié	19
<i>Fgf10</i>	KO homo	Diminué	ND	Dysplasie de la médulla	20
<i>Fgfr2IIIb</i>	KO homo	Diminué	ND	Dysplasie	21
<i>Notch2</i>	Allèle hypomorphe	ND	Prolifération stable et apoptose élevée	Lésions vasculaires; défaut de glomérulogenèse	22
<i>Notch2</i>	KO cond (Pax3-Cre)	Diminué	Prolifération diminuée et apoptose stable	Lésions vasculaires; défaut de différenciation des néphrons proximaux	23
<i>Jagged1</i>	Trans-génique	Diminué	ND	Néphrons normaux, mais kystes tubulaires occasionnels	24
<i>Pax2 et Pax8</i>	Double KO hétéro	Diminué	Prolifération stable et apoptose élevée	Différenciation tubulaire réduite	25
<i>Jnk1, 2 et 3</i>	Triple KO	Stable	ND	Dilatation tubulaire	26

Légende : KO : *Knock-out*; Cond : conditionnelle (et transgène Cre utilisé); Homo : Homozygote; Hétéro : Hétérozygote; ZN : zone néphrogénique. BU : bourgeon urétéral; MM : mésenchyme métanéphrique; ND : non déterminé.

Références : 1-(Dudley et al., 1995); 2-(Luo et al., 1995); 3-(Oxburgh et al., 2004); 4-(Muller et al., 1997); 5-(Kreidberg et al., 1996); 6-(Veis et al., 1993); 7-(Nakayama et al., 1994); 8-(Dunn et al., 1997); 9-(Stark et al., 1994); 10-(Sajithlal et al., 2005); 11-(Nishinakamura et al., 2001); 12-(Pedersen et al., 2005); 13-(Kobayashi et al., 2005); 14-(Chi et al., 2004); 15-(Moser et al., 1997); 16-(Hatini et al., 1996); 17-(Mendelsohn et al., 1999); 18-(Quaggin et al., 1999); 19-(Grieshammer et al., 2005); 20-(Ohuchi et al., 2000); 21-(Revest et al., 2001); 22-(McCright et al., 2001); 23-(Cheng et al., 2007); 24-(Kuure et al., 2005); 25-(Narlis et al., 2007); 26-(Weston et al., 2003).

IV.3 ANNEXE 3 Activation de la voie canonique des Wnt dans les reins embryonnaires et adultes

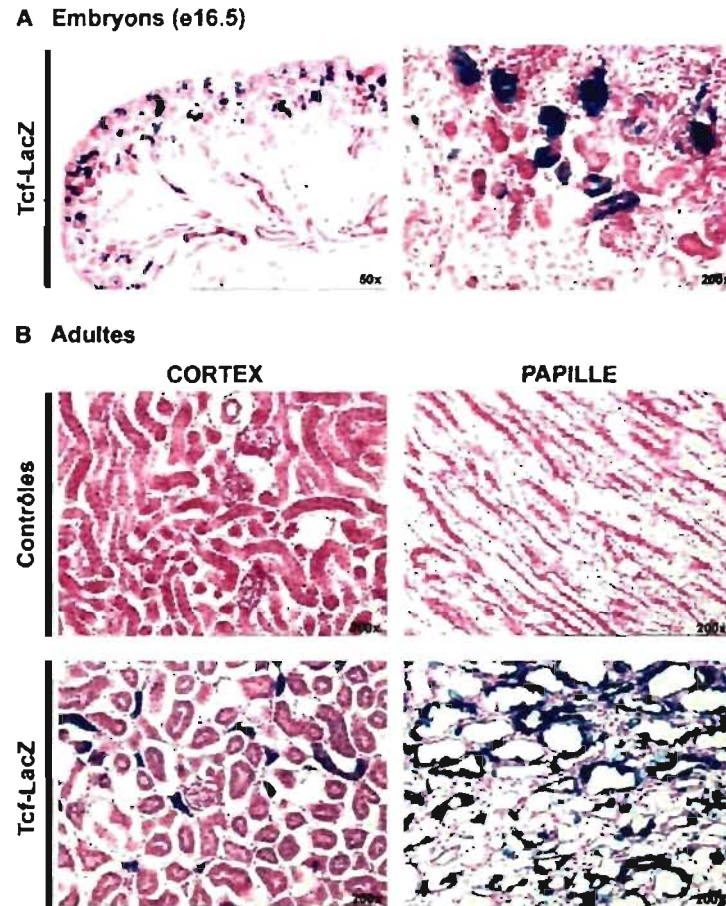


Figure IV-1 : Détection de la signalisation β -caténine dans les reins embryonnaires et adultes des souris rapporteuses Tcf-LacZ.

L'activité de la β -galactosidase a été détectée sur des sections de reins embryonnaires à e16.5 (A) et adultes (B).

À e16.5, le signal est principalement détecté dans les structures épithéliales précoces comme les corps en S et les extrémités des bourgeons urétéraux, alors qu'il diminue dans les tubules collecteurs plus matures (A). Aucune activité β -galactosidase endogène n'est détectée dans les reins adultes contrôles (B). Dans un rein adulte de souris Tcf-LacZ, le signal est détecté dans quelques tubules corticaux, mais majoritairement dans les tubules collecteurs de la papille.

IV.4 ANNEXE 4 Expression de *c-myc* et β -caténine dans un modèle de perte de fonction de *Pkd1*

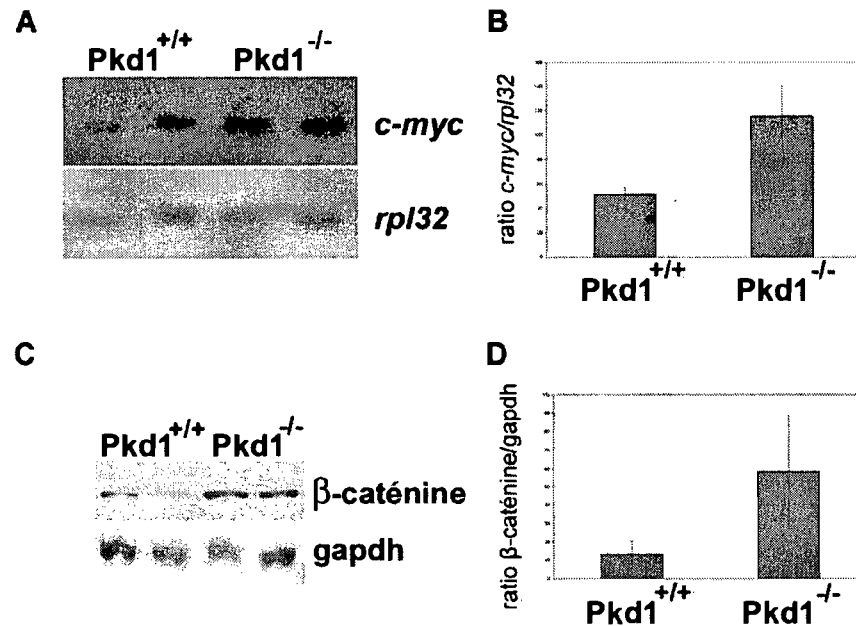


Figure IV-2 : Surexpression de *c-myc* et β -caténine dans les reins des embryons *Pkd1*^{-/-}

(A) L'expression de *c-myc* a été détectée par buvardage northern sur les reins d'embryons *Pkd1*^{-/-} et contrôles *Pkd1*^{+/+} à 16.5 jours de gestation. L'expression de *rpl32* a servi de contrôle interne. (B) Quantification de l'augmentation des niveaux d'expression rénale de la *c-myc* d'environ 2 à 3 fois dans les embryons *Pkd1*^{-/-} ($n=6$) comparativement aux embryons *Pkd1*^{+/+} ($n=4$) ($P<0.001$). (C) L'expression de la protéine β -caténine a été examinée par buvardage western sur les reins d'embryons *Pkd1*^{-/-} et contrôles *Pkd1*^{+/+} à 16.5 jours de gestation. L'expression de gapdh a servi de contrôle interne. (D) Quantification de l'augmentation des niveaux d'expression rénale de la β -caténine d'environ 4 fois dans les embryons *Pkd1*^{-/-} ($n=3$) comparativement aux embryons *Pkd1*^{+/+} ($n=3$) ($P<0.05$).

IV.5 ANNEXE 5 La souris transgénique *SBC*

La complémentation phénotypique partielle observée chez les souris SBPkd1_{TAG}; *KspCre*; *c-myc*^{f/f} peut être attribuable au manque de colocalisation parfaite entre les cellules surexprimant *Pkd1* (induit par les éléments régulateurs *SB*) et celles ayant subies la délétion de *c-myc* (contrôlée par le transgène *KspCre*). Afin de contourner ce problème, nous avons généré la souris *SBC* qui exprime la *Cre* recombinase spécifiquement aux reins à l'aide des éléments régulateurs *SB* (Figure IV-3). Ainsi, suite aux éventuels croisements pour obtenir la souris SBPkd1_{TAG}; *SBC*; *c-myc*^{f/f}, le profil d'expression de la *Cre* et celle de *Pkd1* devrait se superposer. Une complémentation phénotypique totale chez cette souris permettrait d'affirmer que la kystogenèse induite par une surexpression de *Pkd1* est dépendante de *c-myc*.

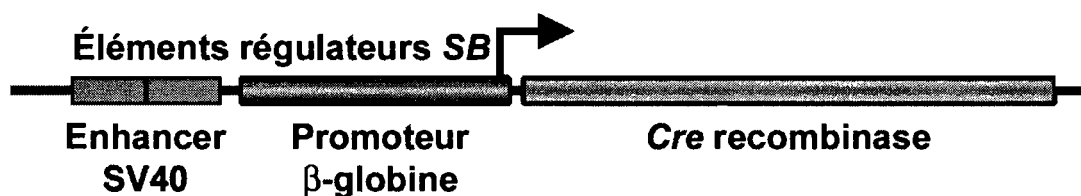


Figure IV-3 : Schématisation du transgène *SBC*

Le gène de la *Cre* recombinase est placé en aval des éléments régulateurs rénaux spécifiques *SB*, composés de 72bp de l'enhancer SV40 répétée en tandem suivie d'une portion de 700bp du promoteur de la β -globine contenant le site d'initiation de la transcription (flèche).

Nous avons généré sept lignées transgéniques *SBC* dont quatre exprimaient la *Cre* recombinase à des taux appréciables. Cependant, l'expression de la *Cre* n'était pas ciblée uniquement aux reins et une transmission germinale a été observée chez la génération F1 de toutes les lignées analysées. Afin de remédier à ce problème, il est possible de modifier le transgène *SBC* par l'ajout d'introns qui en principe augmentera la spécificité des éléments régulateurs *SB*. En effet, parmi les nombreuses lignées de souris établies suite à l'insertion des éléments régulateurs *SB*, seuls les transgènes contenant la forme génomique et non

l'ADN complémentaire du gène d'intérêt, démontrent une expression élevée et ciblée aux cellules épithéliales rénales. D'ailleurs les deux modèles de polykystose rénale, soit SBM et SBPkd1_{TAG}, contiennent la forme génomique de *c-myc* et *Pkd1* respectivement. Le gène de la *Cre* recombinase ne contenant pas d'introns, la construction du transgène *SBC* sera modifiée. Cependant, l'expression du transgène *SBC* peut également être influencée par son site d'intégration dans le génome et l'ajout de séquences insultrices de part et d'autre du transgène est envisagé.