

## Projet de Recherche

### Titre du projet de Recherche

Impact d'anomalies des membranes basales et de la matrice extracellulaire dans la progression de la maladie polykystique rénale.

### Résumé du projet de Recherche

La polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD) constitue la néphropathie héréditaire la plus fréquente, survenant avec une prévalence de 1 sur 800 naissances. Elle est caractérisée par le développement de kystes rénaux bilatéraux multiples et la survenue d'une insuffisance rénale terminale chez 70% des patients. Elle affecte 4 à 6 millions de personnes dans le monde et représente la cause de prise en hémodialyse chez 7 à 10% des patients hémodialysés. Des mutations des gènes *PKD1* et *PKD2*, codant pour des protéines transmembranaires localisées dans les cils primaires des cellules épithéliales tubulaires, rendent compte de la presque totalité des PKRAD. Il n'existe pas de modèle animal qui reproduise parfaitement tous les aspects de la pathogenèse de la PKRAD humaine, mais plusieurs modèles s'en rapprochent de par certains aspects ont été étudiés, dont le modèle murin *jck*, dont les souris sont porteuses d'une mutation de la protéine Nek8, exprimée dans le cil primaire. Ces souris développent une maladie polykystique phénotypiquement très semblable à la PKRAD humaine. Les mécanismes physiopathologiques de la kystogénése rénale sont complexes et multiples. Des anomalies de prolifération et de polarité des cellules épithéliales kystiques sont maintenant bien caractérisées, et impliquent diverses voies de signalisation. Parallèlement, des anomalies morphologiques et de composition moléculaire des membranes basales (MB) entourant l'épithélium des kystes sont observées, mais leur rôle dans la constitution et la croissance des kystes ainsi que dans la progression des lésions de fibrose interstitielle reste à analyser. L'existence de variants de gènes codant pour des constituants des MB pourrait participer à expliquer la grande variabilité intra-familiale dans la sévérité du phénotype kystique observée dans la PKRAD.

Nous avons généré dans le laboratoire une lignée de souris knock-in porteuses de la mutation p.G495V du gène *Col4a1*, codant pour la protéine COL4A1, constituant collagénique majoritaire des membranes basales. Nous disposons par ailleurs de souris *jck*, porteuses d'une mutation homozygote du gène *Nek8*. Notre objectif est de générer des lignées de souris doubles mutantes *jck/Col4a1<sup>G495V/G495V</sup>* afin d'analyser l'impact des anomalies moléculaires des membranes basales dans la progression des paramètres morphologiques et fonctionnels de la maladie polykystique rénale.

### Laboratoire d'accueil

Intitulé : Unité INSERM UMRS\_702 « Remodelage et Réparation du Tissu Rénal »  
Adresse : Hôpital TENON 4 Rue de la Chine 75020 PARIS

Directeur du laboratoire : Professeur RONCO Pierre

Responsable du projet de Recherche : Docteur PLAISIER Emmanuelle

## Description du projet de Recherche

### 1- JUSTIFICATION DU PROJET DE RECHERCHE

Un nombre important de maladies rénales héréditaires est associé à la présence de kystes rénaux, au premier rang desquelles la polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD) qui constitue la néphropathie héréditaire la plus fréquente, avec une prévalence de 1 sur 800 naissances. Outre la présence massive de kystes développés aux dépens des structures tubulaires, des modifications morphologiques importantes du parenchyme rénal adjacent sont observées, avec en particulier la présence d'une fibrose interstitielle et d'un épaississement des membranes basales (MB). De plus, des anomalies de composition moléculaire des MB sont observées au cours de la PKRAD, avec notamment une expression aberrante de la laminine 5 dans les MB tubulaires à l'origine d'anomalies de prolifération cellulaire des cellules tubulaires adjacentes.<sup>1,2,3</sup> La contribution des lésions interstitielles dans la dégradation de la fonction rénale au cours de la PKRAD est maintenant bien admise.<sup>4,5</sup> Le caractère primitif ou secondaire des lésions des membranes basales et leur impact dans la constitution des kystes puis l'augmentation de leur volume reste toutefois mal caractérisé.

Si les maladies rénales kystiques sont très souvent dues à des mutations de protéines exprimées par les cellules tubulaires et partiellement ou totalement impliquées dans la structure et les fonctions ciliaires, telles que les mutations de PKD1 et PKD2 dans la PKRAD, des mutations des constituants des membranes basales peuvent aussi être associées au développement de kystes. Ainsi, les souris porteuses d'une mutation hypomorphe de l'isoforme alpha-5 de laminine développent une maladie rénale multikystique.<sup>6</sup> Par ailleurs, des kystes rénaux bilatéraux sont observés chez des patients présentant le syndrome HANAC (acronyme pour Hereditary Angiopathy Nephropathy, Aneurysm and Cramps) secondaire à des mutations du gène *COL4A1*, codant pour le constituant collagénique majoritaire des MB, notamment tubulaires rénales.<sup>7,8</sup>

L'existence de variants de gènes codant pour des constituants des MB pourrait participer à expliquer la grande variabilité intra-familiale dans la sévérité du phénotype kystique observée dans la PKRAD.

L'objectif de notre travail est d'évaluer si, dans un modèle murin de maladie polykystique rénale, l'addition d'une mutation d'un constituant des MB aggrave le phénotype kystique, grâce à l'étude phénotypique de souris doubles mutantes, porteuses d'une part d'une mutation homozygote du gène *Nek8* qui code pour une protéine exprimée dans le cil primaire

dont la mutation est associée au développement d'une maladie polykystique phénotypiquement très semblable à la PKRAD humaine<sup>9</sup>, et d'autre part de la mutation homozygote p.G495V du gène *Col4a1*.

## 2. SITUATION ACTUELLE DU SUJET

Nous disposons dans le laboratoire du modèle murin *jck* (juvenile cystic kidney) de maladie multikystique rénale par mutation homozygote du gène *Nek8*. Les animaux homozygotes *jck/jck* développent une néphropathie multikystique dès les premières semaines de vie, plus sévère chez les mâles, et responsable d'une insuffisance rénale sévère, létale vers l'âge de 6 mois.<sup>9</sup> Ces animaux sont néanmoins fertiles, ne présentent pas d'anomalies phénotypiques extrarénales, et les souris hétérozygotes +/*jck* ont un phénotype rénal normal.<sup>9</sup>

Nous disposons par ailleurs d'un modèle murin de syndrome HANAC *Col4a1 G495V*. Ces animaux sont viables et fertiles. Les souris homozygotes et hétérozygotes développent à partir de 3 mois une maladie glomérulokystique, associée à des infiltrats cellulaires interstitiels periglomérulaires et périvasculaires, mais sans fibrose interstitielle associée. Une insuffisance rénale apparaît au-delà de l'âge de 6 mois chez certains animaux (*E Plaisier, manuscrit en préparation*).

## 3- PROJET DE RECHERCHE

Notre objectif est de générer des lignées de souris doubles mutantes *jck*/*Col4a1 G495V/G495V* afin d'analyser l'impact d'anomalies moléculaires des membranes basales dans la progression de la maladie multikystique rénale grâce à l'analyse : (i) de la cinétique de progression de la taille et du nombre de kystes rénaux ; (ii) du développement de la fibrose interstitielle ; (iii) de la cinétique d'aggravation de l'insuffisance rénale. Des corrélations entre ces différents paramètres seront secondairement établies. Parallèlement, une analyse systématique de la composition et de la structure des MB et du tissu interstitiel sera réalisée, et les caractéristiques phénotypiques des cellules épithéliales kystiques seront étudiées.

### 3.1 Méthodes

#### 1- Génération des lignées doubles mutantes $jck^{-/-}/Col4a1^{G495V/G495V}$

Dans une première étape, des mâles  $jck^{-/-}$  seront croisés avec des femelles  $Col4a1^{G495V/G495V}$  pour l'obtention d'animaux  $jck^{+/-}/Col4a1^{G495V/+}$ . Dans une seconde étape, ces animaux doubles mutants hétérozygotes seront croisés pour obtenir des animaux doubles mutants homozygotes.

#### 2- Etude du phénotype rénal des animaux $jck^{-/-}/Col4a1^{G495V/G495V}$

L'étude phénotypique portera sur les animaux doubles hétérozygotes et les animaux doubles homozygotes, en comparaison à des animaux  $jck^{-/-}$ , avec une comparaison distincte des mâles et femelles compte-tenu de la sévérité accrue de la maladie multikystique chez les mâles  $jck^{-/-}$ .

##### a) *Recueil des paramètres phénotypiques généraux :*

Les paramètres suivants seront enregistrés : distribution génotypique des portées, courbes de survie et courbes de poids dès la naissance, à 1, 3 et 6 mois et au sacrifice. Recherche éventuelle de causes extra-rénales à l'origine d'une surmortalité précoce (accidents vasculaires cérébraux, anomalie cardiaque.).

##### b) *Analyse des paramètres fonctionnels rénaux :*

Ces paramètres seront réalisés à 1 mois, 3 mois, 6 mois, dates à moduler en fonction de la survie des animaux.

- Paramètres sériques: Na, K, urée, créatinine, protides
- Paramètres urinaires: albumine, créatinine, Na, K, Cl, recherche d'une hématurie

##### c) *Analyse des paramètres morphologiques rénaux :*

- Mesure échographique de la taille des reins à 1, 3 et 6 mois selon la survie des animaux ;
- Poids et taille des reins après sacrifice systématique des animaux (sous groupes) à la naissance, à 1, 3 et 6 mois;
- Etude histologique des reins après sacrifice (nouveau-né, 1, 3 et 6 mois) : données histologiques rénales générales ; mesures standardisées (logiciels de morphométrie) : (i) surface kystique totale par reins ; (ii) surface moyenne des kystes, (iii) pourcentage de fibrose interstitielle (après coloration au Rouge Sirius).

d) *Etude de la structure et de la composition moléculaire des membranes basales kystiques et non kystiques et de la matrice extracellulaire rénale*

Cette étude portera sur les reins obtenus après sacrifice à 1, 3 et 6 mois :

- Etude de l'expression par immunofluorescence/immunohistochimie : collagène I et IV, isoformes de laminines, collagène III, fibronectine, décorine, protéoglycans, TGF $\beta$ ;
- Etude en zymographie des activités metalloprotéases MMP9, MMP2, et du TIMP-1 ;
- Etude en microscopie électronique de la structure des membranes basales et comparaison des MB kystiques et MB tubulaires.

e) *Etude des caractéristiques phénotypiques des cellules épithéliales kystiques*

- Mesure des index de prolifération et de l'apoptose dans l'épithélium kystique et tubulaire non kystique;
- Etude en microscopie confocale de la localisation cellulaire de la sous unité  $\alpha 1$  Na(+)-K(+)-ATPase, de la E-cadherine, des intégrines.

### **3.2 Résultats attendus**

L'analyse phénotypique des animaux doubles homozygotes  $jck^{-/-} / Col4a1^{G495V/G495V}$  doit nous renseigner sur l'effet d'anomalies combinées de la cellule tubulaire et de la MB dans la progression morphologique et fonctionnelle de la maladie multikystique rénale. Nous faisons l'hypothèse que chez ces animaux, le nombre et la taille des kystes sera plus importante ; si tel est le cas, il sera intéressant de voir s'il existe une corrélation avec la fibrose interstitielle accrue et/ou une progression plus rapide de l'insuffisance rénale. Par ailleurs, l'apparition d'un phénotype kystique chez les animaux hétérozygotes  $jck^{+/-}$  porteurs de la mutation  $Col4a1$  G495V indiquera un caractère délétère fort de l'anomalie moléculaire des membranes basales.

#### **4- RETOMBES PREVISIBLES DANS LE DOMAINE DE LA NEPHROLOGIE**

Actuellement, une part importante des recherches expérimentales sur les maladies polykystiques héréditaires se concentre sur l'étude des voies de signalisation intracellulaires et les mécanismes responsables de leur dérégulation au cours du processus de kystogenèse, impliquant notamment une dysfonction ciliaire. L'impact d'anomalies impliquant la matrice extracellulaire environnante reste mal étudié, malgré des anomalies structurales et moléculaires évidentes, en particulier des membranes basales. L'impact délétère d'une anomalie du collagène IV sur la progression de la maladie polykystique posera la question du rôle de ce gène comme facteur de susceptibilité à une sévérité accrue de la maladie et soulignera l'importance de détecter éventuellement des variants de ce gène chez les patients atteints de polykystose rénale.

#### **BIBLIOGRAPHIE**

1. Calvet JP : Polycystic kidney disease: primary extracellular matrix abnormality or defective cellular differentiation? *Kidney Int.* 1993;43:101-8
2. Joly D, Morel V, Hummel A, Ruello A, Nusbaum P, Patey N, Noël LH, Rousselle P, Knebelmann B. Beta4 integrin and laminin 5 are aberrantly expressed in polycystic kidney disease: role in increased cell adhesion and migration. *Am J Pathol.* 2003 ;163:1791-800
3. Joly D, Berissi S, Bertrand A, Strehl L, Patey N, Knebelmann B. Laminin 5 regulates polycystic kidney cell proliferation and cyst formation. *J Biol Chem.* 2006;281:29181-9.
4. Norman J. Fibrosis and progression of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Biochim Biophys Acta.* 2011 1812:1327-36.
5. Grantham JJ, Mulamalla S, Swenson-Fields KI. Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2011 ; 7 :556-566.
6. Shannon MB, Patton BL, Harvey SJ, Miner JH. A hypomorphic mutation in the mouse laminin a5 gene causes polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006 ; 17 :1913-1922.
7. Plaisier E, Gribouval O, Alamowitch S, Mougenot B, Prost C, Verpont MC, Marro B, Desmettre T, Cohen SY, Rouillet E, Dracon M, Fardeau M, Van Agtmael T, Kerjaschki D, Antignac C, Ronco P. COL4A1 mutations and hereditary angiopathy, nephropathy, aneurysms, and muscle cramps. *N Engl J Med* 2007;357:2687-95
8. Plaisier E, Chen Z, Gekeler F, Benhassine S, Dahan K, Marro B, Alamowitch S, Paques M, Ronco P. Novel COL4A1 mutations associated with HANAC syndrome: a role for the triple helical CB3[IV] domain. *Am J Med Genet A* 2010;152A:2550-5.
9. Smith LA, Bukanov NO, Husson H, Russo RJ, Barry TC, Taylor AL, Beier DR, Ibraghimov-Beskrovnyaya O : 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* 2006 ; 17 :2821-31.