

ANOMALIES GÉNÉTIQUES DU PODOCYTE

par

C. ANTIGNAC*

Au cours des dernières années, est apparu le rôle clé joué par le podocyte dans la formation et le maintien de la barrière de filtration glomérulaire. Ce rôle a en particulier pu être mis en évidence par l'étude des syndromes néphrotiques héréditaires ou de modèles de souris génétiquement modifiées.

Bien que les syndromes néphrotiques idiopathiques ne soient habituellement pas considérés comme des maladies héréditaires, les composantes génétiques impliquées dans leur pathogénie sont indiscutables: des formes familiales, bien que rares, ont été rapportées à la fois dans les formes corticorésistantes et cortico-sensibles [1], et les études génétiques récentes ont permis d'identifier différents gènes impliqués dans des formes héréditaires de syndromes néphrotiques corticorésistants (SNCR) et codant pour des protéines podocytaires.

ANOMALIES IMPLIQUANT DES GÈNES DE STRUCTURE

Néphrine

La forme la plus sévère est le syndrome néphrotique congénital de type finlandais (SNF), de transmission autosomique récessive, dont le gène *NPHS1* a été localisé sur le chromosome 19, puis identifié par clonage positionnel [2]. Ce gène code pour la néphrine, protéine transmembranaire de la super-famille des immunoglobulines, exprimée spécifiquement dans le podocyte, et composant majeur du diaphragme de fente qui permet de relier les pieds des podocytes le long de la membrane basale glomérulaire [3]. Les recherches de mutations dans le gène *NPHS1* chez des enfants originaires de Finlande ou d'autres pays ont montré qu'à côté des deux mutations rencontrées habituellement en Finlande (Fin_{major} et

* Inserm U574 et Service de Génétique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Université Paris 5, Paris.

Fin_{minor}), de nombreuses autres mutations réparties sur l'ensemble du gène peuvent aussi provoquer un SNF. Il a également été montré que certaines mutations peuvent être à l'origine de formes moins sévères de la maladie [4]. Ces différences de phénotype peuvent être partiellement expliquées par des variations d'adressage cellulaire de la protéine mutée : ainsi, le groupe de K. Tryggvason a montré dans un modèle cellulaire que certaines formes mutantes de néphrine pouvaient être encore exprimées à la membrane plasmique, alors que d'autres étaient retenues dans le réticulum endoplasmique, probablement du fait d'un défaut de repliement de la protéine [5]. Un traitement par le 4-phénylbutyrate a permis de ré-orienter certaines de ces protéines mutées vers la membrane plasmique, fournissant une base rationnelle pour la recherche de nouveaux traitements [6].

Podocine

Dans le laboratoire, nous avons localisé [7], puis identifié par clonage positionnel, un nouveau gène *NPHS2*, impliqué dans une entité particulière de SNCR de transmission autosomique récessive, caractérisée par l'apparition précoce d'un syndrome néphrotique évoluant rapidement vers l'insuffisance rénale terminale et ne récidivant pas après transplantation. Ce gène code pour une protéine, que nous avons appelée podocine, du fait de son expression exclusive dans les podocytes [8], au niveau du diaphragme de fente [9, 10]. La podocine est une protéine de la famille des stomatines, protéines de structure originale, en épingle à cheveux, ayant un domaine central ancré dans la membrane plasmique et des extrémités amino- et carboxyterminales situées dans le cytoplasme, structure que nous avons pu confirmer en partie par des études en microscopie électronique après marquage des deux extrémités de la podocine avec des anticorps spécifiques [9].

Depuis l'identification du gène de la podocine, de nombreuses études ont montré que des mutations du gène *NPHS2* pouvaient également être retrouvées dans 10 à 20 p. 100 des formes sporadiques chez l'enfant [11, 12, 13] alors qu'elles semblent être à l'origine d'environ 40 p. 100 des formes familiales. Ces résultats prouvent la grande hétérogénéité génétique des SNCR et montrent la nécessité de rechercher des mutations de la podocine chez tout enfant présentant un SNCR. Des mutations du gène *NPHS2* ont également été décrites dans des formes de l'adulte, mais dans la plupart des cas, les patients sont hétérozygote-composites pour une mutation « sévère », identique à celles retrouvées chez les enfants, et pour un polymorphisme (R229Q) retrouvé à l'état hétérozygote dans 3-4 p. 100 de la population générale [14]. Il a été montré *in vitro* que ce variant diminuait la liaison de la podocine à la néphrine, ce qui pourrait expliquer son rôle pathogène associé à une mutation de la podocine. Il a par ailleurs été montré que ce variant, à l'état hétérozygote, était associé à une fréquence plus élevée de micro-albuminurie dans une étude réalisée sur une cohorte brésilienne [15]. Le point qui reste à éclaircir est celui du phénotype des individus porteurs de ce variant à l'état homozygote.

Comme pour la néphrine, il a été montré que des formes mutées de podocine (en particulier, la mutation R138Q retrouvée chez près d'un tiers des patients porteurs de mutations du gène *NPHS2*) ne sont pas adressées à la membrane plasmique et restent bloquées dans le réticulum endoplasmique [16, 17], ce qui peut affecter également l'adressage de la néphrine [18, 19]. Des résultats analogues ont été retrouvés par l'analyse des biopsies rénales de patients présentant un SNCR avec mutations de la podocine [20].

Protéine CD2AP

Il a par ailleurs été montré que l'inactivation du gène *CD2AP* chez la souris, codant pour la protéine CD2AP favorisant le recrutement du récepteur CD2 sur les lymphocytes T, provoque un syndrome néphrotique précoce, et que CD2AP est localisée au niveau du diaphragme de fente où elle se lie à la partie C-terminale de la néphrine [21]. Plus récemment, les mêmes auteurs ont montré que les souris haplo-insuffisantes pour *CD2AP* (c'est-à-dire n'ayant qu'une copie du gène *CD2AP*) développaient des lésions glomérulaires à partir de l'âge de neuf mois, et surtout présentaient une susceptibilité accrue au stress glomérulaire [22]. En parallèle, ils ont montré que deux patients présentant une hyalinose segmentaire et focale idiopathique avaient une mutation dans un site consensus d'épissage du gène *CD2AP* à l'état hétérozygote, responsable là aussi de l'inactivation d'un des deux allèles du gène. Ces résultats, qui doivent toutefois être vérifiés dans de plus grandes cohortes de patients, suggèrent un rôle de *CD2AP* dans le développement et/ou la prédisposition aux syndromes néphrotiques avec hyalinose segmentaire et focale.

α -actinine 4

Dans le cadre de formes autosomiques dominantes, souvent dénommées « hyalinose segmentaire et focale primitive – *primary (idiopathic) FSGS* », deux gènes ont été localisés, l'un en 19q13 [23] et l'autre en 11q21-22 [24]. Seul le premier a été identifié. Il s'agit du gène *ACTN4*, codant pour l' α -actinine 4, protéine se liant aux filaments d'actine [25], pour lequel trois mutations différentes dans l'exon 8 ont été décrites dans trois familles. Il est néanmoins probable que les mutations de ce gène ne rendent compte que de très peu de cas de SNCR, puisqu'aucune autre mutation n'a été décrite jusqu'à maintenant. De plus, aucune mutation dans l'exon 8 du gène *ACTN4* n'a été retrouvée dans une cohorte de 33 patients italiens atteints de hyalinose segmentaire idiopathique survenant à l'âge adulte, ni dans les quelque 20 cas de formes à transmission autosomique dominante que nous avons étudiés dans le laboratoire [26] (*résultats non publiés*).

Anomalies d'autres gènes de structure et interactions fonctionnelles

D'autre part, l'inactivation chez la souris des gènes codant pour la protéine NEPH1, protéine ayant des homologies de séquence avec la néphrine et exprimée dans le podocyte, et pour FAT1, protocadhérine géante localisée au niveau du diaphragme de fente, provoque aussi la survenue d'un syndrome néphrotique chez la souris [27, 28]. À noter toutefois qu'aucune mutation des homologues humains de ces deux gènes n'a été décrite chez l'homme.

Sur le plan fonctionnel, il a été montré récemment que la podocine est capable de former des oligomères et de s'associer dans les microdomaines membranaires (ou rafts), par son extrémité C-terminale, à la néphrine, CD2AP et NEPH1 [29]. Ces complexes interagissent eux-mêmes avec le cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de CD2AP et la néphrine (*ibid*). L'ensemble de ces résultats cliniques et expérimentaux prouve le rôle crucial des composants du diaphragme de fente dans la formation et le maintien de la fonction de filtration glomérulaire. De plus, il a été montré qu'à côté de ce rôle purement structural, les protéines du diaphragme de fente forment un complexe hautement dynamique impliqué dans la signalisation

cellulaire (*ibid*). Plus récemment encore, un rôle spécifique de CD2AP dans l'endocytose et dans l'adressage des protéines aux circuits de dégradation intracellulaire a été suggéré [21].

ANOMALIES IMPLIQUANT DES GÈNES CODANT POUR DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION

Gène *WT1*

À côté de ces anomalies impliquant des gènes de structure, il faut noter que des altérations de gènes codant pour des facteurs de transcription peuvent aboutir au développement de syndromes néphrotiques. L'exemple le mieux caractérisé est celui des mutations du gène *WT1*. Ce gène code un facteur de transcription à doigts de zinc jouant un rôle crucial dans le développement rénal et gonadique et dans la prédisposition au développement d'un néphroblastome (ou tumeur de Wilms). Des mutations germinales de *WT1* tout à fait particulières localisées dans les exons 8 et 9 du gène sont responsables du syndrome de Denys-Drash qui associe une sclérose mésangiale diffuse, survenant dans les deux premières années de la vie et évoluant rapidement vers l'insuffisance rénale terminale, une prédisposition au néphroblastome et, chez les patients de caryotype XY, un pseudo-hermaphrodisme masculin [30]. De même, des mutations introniques modifiant le site d'épissage alternatif de l'intron 9 ont été constamment décrites dans le syndrome de Frasier (associant hyalinose segmentaire et focale, pseudo-hermaphrodisme masculin et prédisposition au gonadoblastome) [31]. De ce fait, des mutations de type Frasier peuvent être retrouvées chez des femmes (avec caryotype XX) présentant une hyalinose segmentaire et focale [32], ce qui justifie la recherche de mutations dans les exons 8 et 9 du gène *WT1* chez tous les enfants de sexe féminin présentant un SNCR avec hyalinose segmentaire et focale chez lesquels aucune mutation de la podocine n'a été détectée (en plus, bien sûr, de la recherche de ces mutations chez les patients présentant une sclérose mésangiale diffuse). Ainsi, dans une étude récente, il a été montré que des mutations de *WT1* pouvaient être retrouvées dans 5 p. 100 des cas (6/115) [33]. La découverte récente de la régulation de l'expression de la néphrine par *WT1* permet d'expliquer le lien entre ces différentes pathologies [34, 35]. De la même façon, certaines des anomalies glomérulaires observées dans le syndrome Nail-Patella, lié à des mutations du gène codant le facteur de transcription *Lmx1b* [36], pourraient être en relation avec la régulation de l'expression de la podocine par ce facteur de transcription [37, 38].

Gène *SMARCAL1*

Certains syndromes associent un SNCR à des anomalies extrarénales, suggérant l'implication de certaines protéines dans des processus physiopathologiques communs à différents organes ou types cellulaires. Ainsi, des mutations du gène *SMARCAL1* sont responsables du syndrome de Schimke [39] qui associe au syndrome néphrotique, une dysplasie spondylo-épiphysaire, un déficit immunitaire et des accidents vasculaires cérébraux. Le gène *SMARCAL1* code une protéine de la

famille SNF2, impliquée dans les remaniements de la chromatine survenant lors de la réplication de l'ADN et la régulation de l'expression des gènes. Une hypothèse séduisante pour expliquer l'atteinte rénale dans le syndrome de Schimke est donc l'implication de *SMARCAL1* dans la régulation de l'expression de protéines podocytaires.

CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats montre le rôle fondamental du podocyte dans le maintien de la barrière de filtration glomérulaire. Ils montrent également le rôle important des facteurs génétiques dans le développement des syndromes néphrotiques corticorésistants et permettent d'expliquer la physiopathologie d'une partie d'entre eux par l'existence d'anomalies intrinsèques de la structure du podocyte [ou éventuellement de la membrane basale glomérulaire, ainsi que le montre l'identification récente de mutations du gène *LAMB2* codant pour la laminine $\beta 2$ dans le syndrome de Pierson qui associe sclérose mésangiale diffuse et anomalies oculaires avec myosis congénital [40]. Néanmoins, ils montrent également l'extrême hétérogénéité génétique des SNCR, soulignant la nécessité d'identifier d'autres gènes impliqués dans ces pathologies, ce qui permettra un diagnostic précis de la maladie chez les patients et une meilleure compréhension de la physiopathologie particulièrement complexe de cette cellule tout à fait exceptionnelle qu'est le podocyte.

BIBLIOGRAPHIE

1. FUCHSHUBER A, GRIBOUVAL O, RONNER V et al. Clinical and genetic evaluation of familial steroid-responsive nephrotic syndrome in childhood. *J Am Soc Nephrol*, 2001, **12**, 374-378.
2. KESTILA M, LENKKERI U, MANNIKKO M et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein – nephrin – is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*, 1998, **1**, 575-582.
3. RUOTSALAINEN V, LJUNGBERG P, WARTIOVAARA J et al. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**, 7962-7967.
4. KOZIELL A, GRECH V, HUSSAIN S et al. Genotype/phenotype correlations of NPHS1 and NPHS2 mutations in nephrotic syndrome advocate a functional inter-relationship in glomerular filtration. *Hum Mol Genet*, 2002, **11**, 379-388.
5. LIU L, COTTA DONÉ S, KHOSHNOODI J et al. Defective nephrin trafficking caused by missense mutations in the NPHS1 gene : insight into the mechanisms of congenital nephrotic syndrome. *Hum Mol Genet*, 2001, **23**, 2637-2644.
6. LIU XL, DONE SC, YAN K et al. Defective trafficking of nephrin missense mutants rescued by a chemical chaperone. *J Am Soc Nephrol*, 2004, **15**, 1731-1738.
7. FUCHSHUBER A, JEAN G, GRIBOUVAL O et al. Mapping a gene (SRN1) to chromosome 1q25-q31 in idiopathic nephrotic syndrome confirms a distinct entity of autosomal recessive nephrosis. *Hum Mol Genet*, 1995, **4**, 2155-2158.
8. BOUTE N, GRIBOUVAL O, ROSELLI S et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet*, 2000, **24**, 349-354.
9. ROSELLI S, GRIBOUVAL O, BOUTE N et al. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol*, 2002, **160**, 131-139.
10. RUF RG, LICHTENBERGER A, KARLE SM et al. Patients with mutations in *NPHS2* (podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 2004, **15**, 722-732.

11. SCHWARZ K, SIMONS M, REISER J et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest*, 2001, **108**, 1621-1629.
12. CARIDI G, BERTELLI R, DI DUCA M et al. Broadening the spectrum of diseases related to podocin mutations. *J Am Soc Nephrol*, 2003, **14**, 1278-1286.
13. WEBER S, GRIBOUVAL O, ESQUIVEL EL et al. *NPHS2* mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence. *Kidney Int*, 2004, **66**, 571-579.
14. TSUKAGUCHI H, SUDHAKAR A, LE TC et al. *NPHS2* mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis : R229Q is a common disease-associated allele. *J Clin Invest*, 2002, **110**, 1659-1666.
15. PEREIRA AC, PEREIRA AB, MOTA GF et al. *NPHS2* R229Q functional variant is associated with microalbuminuria in the general population. *Kidney Int*, 2004, **65**, 1026-1030.
16. OHASHI T, UCHIDA K, UCHIDA S et al. Intracellular mislocalization of mutant podocin and correction by chemical chaperones. *Histochem Cell Biol*, 2003, **119**, 257-264.
17. ROSELLI S, MOUTKINE I, GRIBOUVAL O et al. Plasma membrane targeting of podocin through the classical exocytic pathway : effect of *NPHS2* mutations. *Traffic*, 2004, **5**, 37-44.
18. HUBER TB, SIMONS M, HARTLEBEN B et al. Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex : mutations in the *NPHS2* gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. *Hum Mol Genet*, 2003, **12**, 3397-3405.
19. NISHIBORI Y, LIU L, HOSOYAMADA M et al. Disease-causing missense mutations in *NPHS2* gene alter normal nephrin trafficking to the plasma membrane. *Kidney Int*, 2004, **66**, 1755-1765.
20. ZHANG S-Y, MARLIER A, GRIBOUVAL O et al. In vivo expression of podocyte slit diaphragm-associated proteins in nephrotic patients with *NPHS2* mutation. *Kidney Int*, 2004, **66**, 945-954.
21. SHIH NY, LI J, KARPITSKII V et al. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science*, 1999, **286**, 312-315.
22. KIM JM, WU H, GREEN G et al. CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science*, 2003, **300**, 1298-1300.
23. MATHIS BJ, KIM SH, CALABRESE K et al. A locus for inherited focal segmental glomerulosclerosis maps to chromosome 19q13. *Kidney Int*, 1998, **53**, 282-286.
24. WINN MP, LONLON PJ, LYNN KL et al. Linkage of a gene causing familial focal segmental glomerulosclerosis to chromosome 11 and further evidence of genetic heterogeneity. *Genomics*, 1999, **58**, 113-120.
25. KAPLAN JM, KIM SH, NORTH KN et al. Mutations in *ACTN4*, encoding α -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet*, 2000, **24**, 251-256.
26. AUCELLA F, DE BONIS P, GATTA G et al. Molecular analysis of *NPHS2* and *ACTN4* genes in a series of 33 Italian patients affected by adult-onset non familial segmental glomerulosclerosis. *Nephron Clin Pract*, 2005, **99**, c31-c36.
27. DONOVIEL DB, FREED DD, VOGEL H et al. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**, 4829-4836.
28. CIANI L, PATEL A, ALLEN ND et al. Mice lacking the giant protocadherin mFAT1 exhibit renal slit junction abnormalities and a partially penetrant cyclopia and anophthalmia phenotype. *Mol Cell Biol*, 2003, **23**, 3575-3582.
29. BENZING T. Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol*, 2004, **15**, 1382-1384.
30. JEANPIERRE C, DENAMUR E, HENRY I et al. Identification of constitutional WT1 mutations in patients with isolated diffuse mesangial sclerosis and analysis of genotype/phenotype correlations by use of a computerized mutation database. *Am J Hum Genet*, 1998, **62**, 824-833.
31. BARBAUX S, NIAUDET P, GUBLER MC et al. Donor splice-site mutations in *WT1* are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet*, 1997, **17**, 467-470.
32. DENAMUR E, BOCQUET N, MOUGENOT B et al. Mother-to-child transmitted WT1 splice-site mutation is responsible for distinct glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol*, 1999, **10**, 2219-2223.
33. RUF RG, SCHULTHEISS M, LICHTENBERGER A et al. Prevalence of WT1 mutations in a large cohort of patients with steroid-resistant and steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Kidney Int*, 2004, **66**, 564-570.
34. GUO G, MORRISSON DJ, LICHT JD et al. WT1 activates a glomerule-specific enhancer identified in the human nephtys gene. *J Am Soc Nephrol*, 2004, **15**, 2851-2856.

35. WAGNER N, WAGNER KD, XING Y et al. The major podocyte protein nephrin is transcriptionnally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1. *J Am Soc Nephrol*, 2004, **15**, 3044-3051.
36. DREYER SD, Zhou G, BALDINI A et al. Mutations in LMX1B cause anormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. *Nat Genet*, 1998, **19**, 47-50.
37. MINER JH, MORELLO R, ANDREWS KL et al. Transcriptional induction of slit diaphramgm genes by Lmx1bis required in prodocyte differentiation. *J Clin Invest*, 2002, **109**, 1065-1072.
38. ROHR C, PRESTEL J, HEIDET I et al. The LIM-homeodomain transcription factor Lmx1b plays a curcial role in podocytes. *J Clin Invest*, 2002, **109**, 1073-1082.
39. BOERKOEL CF, TAKASHIMA H, JOHN J et al. Mutant chromatin remodeling protein SMARCAL1 causes Schimke immuno-osseous dysplasia. *Nat Genet*, 2002, **30**, 215-220.
40. ZENKER M, AIGNER T, WENDLER O et al. Human laminin β 2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Hum Mol Genet*, 2004, **13**, 2625-2632.