

LES PROTÉINES NEPH ET LE NÉPHROCYTE DE LA DROSOPHILE

par

R. CAGAN*

INTRODUCTION

Le modèle de la drosophile a eu un impact important sur notre compréhension des mécanismes par lesquels les voies moléculaires exercent des fonctions biologiques cellulaires capables de diriger le développement. Au cours du temps, les chercheurs travaillant sur les mouches ont développé un ensemble d'outils impressionnant. Des gènes sont activés ou inactivés systématiquement, de façon unitaire ou en groupe, en ciblant les transgènes spécifiquement vers certaines cellules ou types de cellules. Fait important, la drosophile offre la possibilité d'explorer ces gènes in situ dans l'animal. Les méthodes de criblage génétique sont très sophistiquées chez les mouches ; ces criblages donnent la possibilité d'identifier des facteurs réellement nouveaux dans un processus donné et d'établir des relations entre molécules et entre voies d'activation, non suspectées auparavant. Un nombre remarquable d'éléments de signalisation a été découvert de cette façon chez la drosophile. Ceci explique leurs noms inhabituels : Notch (mutations entraînant une aile crantée), Delta (erreurs de nervure des ailes) Hedgehog (forme anormale de l'embryon), Wnt (contraction incluant « sans ailes »), etc. En bref, la drosophile a révolutionné les recherches sur le développement et la transduction des signaux. Ce n'est que récemment que les travaux chez les mouches ont avancé dans un effort concerté pour appliquer ces outils pour l'étude des maladies.

* Department of Developmental and Regenerative Biology Associate Dean, Graduate School of Biological Sciences, Mount Sinai School of Medicine, New York, États-Unis.

Dans cet article, j'explore les contributions récentes du modèle de la drosophile dans l'étude des podocytes. Ces contributions sont relativement modestes car la discipline est jeune. Cela va changer. Le potentiel de contributions est large : les mouches offrent l'opportunité d'explorer rapidement les relations entre les gènes et les maladies à un niveau suffisamment sophistiqué pour être utile à des fins thérapeutiques.

Pourquoi étudier le rein chez la drosophile ?

À l'aide des outils développés chez la drosophile, mon laboratoire et d'autres étudient un analogue du podocyte chez la mouche. L'étude du podocyte se développe rapidement car les chercheurs comprennent mieux son rôle dans la filtration et dans les maladies. Si elles sont utilisées judicieusement, les mouches offrent la possibilité d'explorer des voies telles que la voie Neph pour déterminer leurs rôles in situ. La nature complexe et dynamique des podocytes n'est totalement reconnue que maintenant et nous aurons besoin de mieux comprendre la capacité de ces voies à induire le développement, ainsi que la façon dynamique dont les podocytes et leurs pédicelles subissent un remodelage chez l'adulte.

Inconvénients de l'utilisation de la drosophile pour l'étude des maladies

Bien que la communauté de chercheurs travaillant sur la drosophile désigne souvent les mouches comme « des humains avec des ailes », les drosophiles ne sont pas humaines et il est important de garder leurs différences à l'esprit. Les mouches et les humains ont divergé il y a près de 300 millions d'années et des différences importantes sont apparues, en particulier dans la façon détaillée dont les protéines spécifiques agissent. Par conséquent, les mouches sont utiles comme première référence, mais non comme référence finale, du rôle d'un facteur dans le développement ou la fonction du rein. La drosophile possède la plupart des organes majeurs que l'homme possède, notamment des analogues du cœur, du poumon, du foie, du pancréas, etc. Ces organes présentent des similitudes utiles mais également des différences importantes et je vais décrire ci-dessous les différences entre le podocyte et le néphrocyte de la mouche. Enfin, la drosophile possède un système immunitaire inné qui possède des similitudes avec le nôtre, mais son système immunitaire adaptatif présente des différences importantes ; par exemple, les mouches ne possèdent pas le système d'immunoglobulines variables. Par conséquent, les mouches présentent des limitations comme modèle pour l'inflammation, qui est probablement une composante importante de nombreuses maladies rénales.

De ce fait, nous devons être judicieux dans notre façon d'utiliser les mouches pour tirer le meilleur parti de leurs avantages. Mon équipe utilise les mouches pour axer ses travaux sur deux éléments pertinents pour le rein : nous utilisons l'œil de mouche pour étudier comment les protéines de la famille Neph dirigent les mouvements cellulaires et les modifications morphologiques des cellules et nous examinons les effets d'une alimentation riche en saccharose sur la fonction des néphrocytes comme modèle de néphropathie diabétique.

Les protéines Neph jouent de nombreux rôles chez la drosophile

Les protéines de la famille Neph sont des protéines transmembranaires de type I caractérisées par des motifs *immunoglobuline-like* sur leur domaine extracellulaire. Leur domaine intracellulaire est variable et permet de définir deux sous-classes, la néphrine et Neph1 (présentées en [1, 2]). La drosophile possède deux orthologues de la néphrine (Hibris, Sns) et deux orthologues de Neph1 (Rst, Kirre). Chez les mammifères, ces protéines sont mieux connues pour leur rôle indispensable dans l'établissement et le maintien du diaphragme de fente, bien qu'elles aient d'autres rôles, incluant la régulation de l'activité de la voie de l'insuline [3].

Chez la drosophile, les protéines Neph agissent sur plusieurs aspects du développement, incluant le guidage axonal de l'œil au cerveau, la coalescence et la fusion des cellules précurseurs du muscle, la fonction du néphrocyte (présentée ci-dessous) et le guidage de la morphogenèse cellulaire dans l'œil en développement. L'élément commun à ces tissus est la nécessité d'un guidage des cellules ou des membranes cellulaires dans leurs niches correctes. Comme je le décris à la section suivante, le guidage et le remodelage cellulaires et membranaires sont une fonction majeure des protéines Neph.

ÉTUDE DES PROTÉINES NEPH EN UTILISANT L'ŒIL DE DROSOPHILE

L'œil de mouche est l'une des structures réellement remarquables de la nature. Sa morphologie simple en a fait un élément favori pour l'étude de la morphogenèse épithéliale ; par conséquent, c'est l'un des tissus en développement le plus complètement élucidé. L'œil est composé d'un assemblage précis d'unités de vision (« ommatidies ») entourées de « cellules pigmentaires » secondaires et tertiaires disposées en nid d'abeille qui soutiennent et isolent les ommatidies de l'excès de lumière (Figure 1, voir Planche couleurs p. 309). La morphologie caractéristique de ces cellules pigmentaires est due en partie à des mouvements cellulaires sélectifs dans l'épithélium. Leur positionnement précis est nécessaire pour la représentation exacte du champ visuel de la mouche.

Rôle de la famille de protéines Neph dans la morphogenèse oculaire

Le mouvement des précurseurs des cellules pigmentaires dans le champ de l'œil nécessite l'action des quatre protéines Neph. De fait, l'orthologue Rst – une contraction de « *roughest* » – de Neph1 a été nommé ainsi pour son rôle dans l'organisation de l'œil de la mouche : des mutations entraînent une organisation incorrecte des cellules et un phénotype « *rough eye* » (œil rugueux) (Figure 1, voir Planche couleurs p. 309) [4, 5].

Les mécanismes par lesquels les protéines Neph régulent le mouvement cellulaire sont potentiellement instructifs pour l'étude du rein. Ces protéines possèdent deux propriétés importantes qui sont nécessaires pour la régulation de la morphogenèse des cellules pigmentaires : leur profil d'expression dynamique et leur capacité à se

lier par des interactions hétérophiles. En ce qui concerne l'expression, les orthologues de la néphrine, Hibris et Sns, sont exprimés dans les cellules composant les ommatidies, tandis que les orthologues de Neph1, Rst et Kirre, sont exprimés dans les précurseurs des cellules pigmentaires [5, 6]. La forte affinité de liaison des protéines néphrine aux protéines Neph1 entraîne un enveloppement dynamique des ommatidies par les cellules pigmentaires. Les cellules pigmentaires se déploient de façon considérable autour des ommatidies car leurs membranes cherchent à maximiser la liaison de Rst/Kirre à Hibris/Sns dans les membranes des ommatidies intercalées. L'augmentation artificielle de la concentration de Rst dans les cellules pigmentaires entraîne un enveloppement encore plus important des cellules pigmentaires autour des ommatidies [6].

L'œil de mouche comme modèle d'apparition des pédicelles podocytaires

Sur la base de nos données, nous avons proposé un modèle « d'adhésion préférentielle » dans lequel la forte affinité des protéines néphrine et Neph1 pour la liaison hétérophile en *trans* entraîne une distorsion et une réorganisation des cellules constituant [6]. Par analogie, ce fait conduit à une hypothèse intéressante quant au rôle de la liaison néphrine/Neph1 dans la morphogenèse du podocyte chez les vertébrés. La présence obligatoire de ces deux protéines pour la formation du diaphragme de fente est bien connue. La forte adhésion de ces deux molécules en *trans* est peut-être la force motrice sous-tendant l'intercalation spectaculaire des pédicelles du podocyte. Une surexpression de la néphrine et de Neph1 associée à une désorganisation du cytosquelette pourrait entraîner la formation de membranes podocytaires adjacentes. Dans cette optique, les pédicelles apparaissent comme des membranes qui s'intercalent pour maximiser la liaison néphrine/Neph1. Fait intéressant, cette hypothèse prend en compte l'observation selon laquelle les pédicelles d'un même podocyte ne se lient pas (Figure 1, voir Planche couleurs p. 309).

Cette hypothèse met en avant la formation de complexes néphrine/Neph1 via des interactions en *trans* à travers les membranes cellulaires adjacentes, mais elle n'explique pourquoi ces protéines n'interagissent pas en *cis* au sein de la membrane. D'autres protéines de liaison transmembranaire interagissant entre elles, telles que Notch et Delta, sont inactivées lorsqu'elles interagissent en *cis*, en partie du fait du turnover protéique [7-9]. Nous avons observé récemment une telle clairance et des complexes *cis* Rst/Hibris dans l'œil en développement (données non publiées). Des mécanismes de clairance similaires pourraient jouer un rôle localement dans les pédicelles.

Effecteurs en aval des protéines Neph

Un nombre croissant de facteurs a été associé aux protéines Neph dans le podocyte, notamment CD2AP, ZO1, podocine, etc. [1, 10-14]. Un grand nombre ou la plupart de ces facteurs s'associent également aux protéines Neph au cours de la morphogenèse oculaire, ce qui constitue une opportunité d'explorer leurs fonctions plus en détail. Par exemple, l'orthologue de CD2AP, « Cindr », est nécessaire pour que les précurseurs des cellules pigmentaires migrent vers leur niche correcte. Des films réalisés en obser-

vant des cellules marquées par la GFP (*green fluorescent protein*) chez l'animal intact ont montré que les cellules présentant le génotype mutant pour *cindr* migrent dans le champ de l'œil vers leur niche correcte mais ne peuvent pas conserver la nouvelle position. Ces cellules se déplacent vers d'autres sites, ce qui entraîne des anomalies morphogéniques significatives. L'enregistrement vidéo direct de cellules mutantes pour *polychaetoid*, l'orthologue de *zol* chez la drosophile, a montré un phénotype quelque peu différent : le mouvement des cellules mutantes était presque aléatoire, et présentait peu de caractéristiques d'un mouvement directionnel. Le résultat a été un réseau de cellules pigmentaires mal organisé car les cellules *pyd* n'ont pas pu établir des jonctions correctes ou exprimer des protéines Neph stables à leur surface.

Nos travaux les plus récents ont commencé à définir les facteurs qui sont nécessaires pour les premières étapes du mouvement cellulaire directionnel dans l'épithélium. Ces facteurs incluent les protéines classiques du remodelage de l'actine et laissent espérer un modèle plus intégré pour étudier la façon dont les protéines Neph stimulent les mouvements cellulaires dirigés et corrigent la morphologie cellulaire en se liant à la surface du cytosquelette.

LE NÉPHROCYTE DE LA DROSOPHILE

Jusqu'à une époque récente, les recherches sur le développement et la fonction du rein chez la mouche étaient axées sur les *tubules de Malpighi*, qui assurent la fonction rénale, incluant l'homéostasie ionique (étudiés en [15]). Bien qu'ils aient été décrits pour la première fois il y a plus d'un siècle chez d'autres insectes [16], l'intérêt pour les *néphrocytes* homologues des podocytes n'a fait son chemin que récemment dans la communauté de chercheurs travaillant sur la drosophile, avec la publication de deux articles décisifs qui ont réintroduit ces structures [17, 18]. La mouche possède deux ensembles de néphrocytes, les cellules en guirlande et les néphrocytes péricardiques (Figure 1, voir Planche couleurs p. 309). Ces derniers sont dérivés des hémangioblastes et leur lignage est analogue à celui de leurs homologues chez les vertébrés [17].

Le néphrocyte est l'analogue du podocyte des mammifères

Les néphrocytes présentent des similitudes notables avec les podocytes, mais également des différences intéressantes. Contrairement aux podocytes, les néphrocytes ne sont pas complexés à l'appareil rénal et ils ne semblent pas former d'interactions fonctionnelles avec les néphrocytes avoisinants. Les néphrocytes péricardiques sont attachés au cœur, très à distance des tubules de Malpighi rénaux. Chaque néphrocyte contient des invaginations appelées *lacunes* qui servent à isoler et filtrer l'*hémolymphe*, l'analogue du sang chez la mouche. A la surface de chaque lacune se trouve un *diaphragme néphrocytaire* riche en protéines Neph qui agit comme le diaphragme de fente du néphrocyte. Les battements de cœur stimulent probablement le flux d'hémolymphe dans la membrane basale du néphrocyte, à travers le diaphragme néphrocytaire et vers les lacunes. Des processus d'endocytose et d'exocytose hautement dynamiques régulent ensuite la filtration de l'hémolymphe.

Comment le néphrocyte peut-il fonctionner sans connexion directe avec l'appareil rénal ? L'administration de nitrate d'argent chez la mouche entraîne une accumulation de celui-ci dans les néphrocytes ; l'argent accumulé reste dans les néphrocytes pendant une grande partie de la vie de l'insecte (données non publiées). Les mouches adultes vivant généralement environ dix semaines, les néphrocytes – qui font partie des plus grosses cellules de la mouche – semblent avoir suffisamment d'espace pour stocker les toxines pendant leur durée de vie.

Les orthologues de la néphrine et de Neph1 de la drosophile ont conservé leurs rôles

Chez l'homme, la perte de la néphrine ou de Neph1 entraîne une perte de l'intégrité du diaphragme de fente, un effacement des pédicelles et une néphropathie sévère [19]. De même, la perte de Sns ou de Kirre suffit pour la perte directe du diaphragme néphrocytaire et pour une déficience dans la capacité de filtration correcte de la mouche (données non publiées ; [18]). Cela semble indiquer une conservation remarquable des structures entre les deux espèces.

Il subsiste de nombreuses questions sur la fonction du podocyte et une exploration plus approfondie des néphrocytes pourrait apporter des idées intéressantes. Par exemple, l'expression de la néphrine est fortement diminuée chez les patients diabétiques [20, 24]. Bien que la plupart des stratégies thérapeutiques aient été ciblées sur les déficiences rénales chez ces patients et que les IEC se soient révélés des traitements utiles, certains laboratoires commencent à axer leurs recherches sur le rôle des podocytes dans la néphropathie diabétique. Mon laboratoire a collaboré avec le Docteur Thomas Baranski et son équipe pour créer un modèle de diabète induit par l'alimentation chez la drosophile (Palankar et al., article soumis). Fait intéressant, nous avons identifié des anomalies significatives dans les néphrocytes des ces animaux et nous sommes en train d'explorer les mécanismes responsables de la perte de filtration glomérulaire.

La drosophile peut-elle constituer un modèle utile de néphropathie ?

L'identification des traitements de nouvelle génération de l'insuffisance rénale reste un objectif central de la néphrologie et mon équipe partage cet objectif. Nous travaillons avec le Docteur Francis Collins, le Docteur Baranski et leurs équipes pour déterminer si la drosophile est utile pour l'analyse des études d'association pangénomiques. Notre approche consiste à utiliser la génétique de la drosophile pour tester des locus candidats qui présentent une association avec l'augmentation du risque de diabète. Ces travaux s'élargissent pour cibler des locus candidats pour les néphrocytes et nous sommes en train d'explorer des locus spécifiques pour leur potentiel à médier la dysfonction néphrocytaire induite par l'alimentation (données non publiées). De plus, mon laboratoire a développé des méthodes automatisées qui utilisent la drosophile pour cribler des banques de molécules ayant une place thérapeutique utile. Les mouches présentent un fort potentiel pour le criblage chez l'animal entier de molécules thérapeutiques utiles. Notre objectif est d'évaluer et de mettre en valeur ce potentiel en créant des modèles de plus en plus utiles de néphropathie.

Comme je l'ai expliqué précédemment dans cet article, la drosophile possède à la fois des avantages et des inconvénients en tant que système pour explorer la fonction rénale et identifier des candidats médicaments. Si nous utilisons de façon judicieuse ces insectes, ils pourront devenir un outil utile pour faire ce qu'ils font le mieux : nous permettre d'explorer des questions dans le contexte de l'animal entier et aider à étendre et approfondir nos idées sur des éléments fondamentaux du développement et des maladies.

BIBLIOGRAPHIE

1. HUBER TB, BENZING T. The slit diaphragm : a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2005, *14* : 211-216.
2. WELSH GI, SALEEM MA. Nephrin-signature molecule of the glomerular podocyte? *J Pathol*, 2010, *220* : 328-337.
3. COWARD RJ, WELSH GI, KOZIELL A et al. Nephrin is critical for the action of insulin on human glomerular podocytes. *Diabetes*, 2007, *56* : 1127-1135.
4. WOLFF T, READY DF. Cell death in normal and rough eye mutants of *Drosophila*. *Development*, 1991, *113* : 825-839.
5. REITER C, SCHIMANSKY T, NIE Z et al. Reorganization of membrane contacts prior to apoptosis in the *Drosophila* retina : the role of the IrreC-rst protein. *Development*, 1996, *122* : 1931-1940.
6. BAO S, CAGAN R. Preferential adhesion mediated by Hibris and Roughest regulates morphogenesis and patterning in the *Drosophila* eye. *Dev Cell*, 2005, *8* : 925-935.
7. JACOBSEN TL, BRENNAN K, ARIAS AM et al. Cis-interactions between Delta and Notch modulate neurogenic signalling in *Drosophila*. *Development*, 1998, *125* : 4531-4540.
8. CORDLE J, JOHNSON S, TAY JZ et al. A conserved face of the Jagged/Serrate DSL domain is involved in Notch trans-activation and cis-inhibition. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, *15* : 849-857.
9. SPRINZAK D, LAKHANPAL A, LEBON L et al. Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states. *Nature*, 2010, *465* : 86-90.
10. HUBER TB, KOTTGEN M, SCHILLING B et al. Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *J Biol Chem*, 2001, *276* : 41543-41546.
11. HUBER TB, HARTLEBEN B, KIM J et al. Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling. *Mol Cell Biol*, 2003, *23* : 4917-4928.
12. KIM JM, WU H, GREEN G et al. CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science*, 2003, *300* : 1298-1300.
13. BENZING T. Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol*, 2004, *15* : 1382-1391.
14. TOSSIDOU I, KARDINAL C, PETERS I et al. CD2AP/CIN85 balance determines receptor tyrosine kinase signaling response in podocytes. *J Biol Chem*, 2007, *282* : 7457-7464.
15. BEYENBACH KW, SKAER H, DOW JA. The developmental, molecular, and transport biology of Malpighian tubules. *Annu Rev Entomol*, 2010, *55* : 351-374.
16. KOWALEVSKY A. Ein Beitrag zur Kenntnis der Excretions-organe. *Biol Centralbl*, 1889, *9* : 74-79.
17. MANDAL L, BANERJEE U, HARTENSTEIN V. Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm. *Nat Genet*, 2004, *36* : 1019-1023.
18. WEAVERS H, PRIETO-SANCHEZ S, GRAWE F et al. The insect nephrocyte is a podocyte-like cell with a filtration slit diaphragm. *Nature*, 2008, *45* : 322-326.
19. PATRAKKA J, TRYGGVASON K. New insights into the role of podocytes in proteinuria. *Nat Rev Nephrol*, 2009, *5* : 463-468.
20. AALTONEN P, LUUMULA P, ASTROM E et al. Changes in the expression of nephrin gene and protein in experimental diabetic nephropathy. *Lab Invest*, 2001, *81* : 1185-1190.

21. KELLY DJ, AALTONEN P, COX AJ et al. Expression of the slit-diaphragm protein, nephrin, in experimental diabetic nephropathy : differing effects of anti-proteinuric therapies. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, *17* : 1327-1332.
22. DOUBLIER S, SALVIDIO G, LUPIA E et al. Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy : evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II. *Diabetes*, 2003, *52* : 1023-1030.
23. BENIGNI A, GAGLIARDINI E, TOMASONI S et al. Selective impairment of gene expression and assembly of nephrin in human diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 2004, *65* : 2193-2200.
24. TOYODA M, SUZUKI D, UMEZONO T et al. Expression of human nephrin mRNA in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, *19* : 380-385.