



HAL
open science

Étude du rôle de REST dans les podocytes au cours du vieillissement et du stress cellulaire

Sato Magassa

► **To cite this version:**

Sato Magassa. Étude du rôle de REST dans les podocytes au cours du vieillissement et du stress cellulaire. Biologie cellulaire. Université Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019UNIP5042 . tel-03971358

HAL Id: tel-03971358

<https://theses.hal.science/tel-03971358>

Submitted on 3 Feb 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Paris
Spécialité : Biologie Cellulaire

Étude du rôle de REST dans les podocytes au cours du vieillessement et du stress cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Sato MAGASSA

Le 26 novembre 2019

Devant le jury composé de :

| | |
|---|--------------------|
| Madame Fabiola TERZI, DR à Université Paris Descartes | Présidente |
| Monsieur Mario OLLERO, PU à Université Paris Est de Créteil | Rapporteur |
| Monsieur Alexandre HERTIG, PU-PH à l'Université Pierre et Marie Curie | Rapporteur |
| Monsieur Vincent AUDARD, PU-PH à Université Paris Est de Créteil | Examineur |
| Monsieur Guillaume CANAUD, PU-PH à Université Paris Descartes | Directeur de thèse |

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord rendre gloire à Dieu. Je tiens à saluer la mémoire de mon père, parti très tôt nous laissant, mes frères et moi, dans un vide profond et un chagrin persistant. Tu resteras ma principale force et ma source de motivation.

Je remercie ensuite ma mère qui depuis 20 ans, le jour du décès de mon père, joue parfaitement son rôle de père et de mère. Maman, merci pour tout le combat que tu mènes depuis 20ans pour nous, merci pour cette éducation irréprochable dont nous avons bénéficié. Tu es mon exemple, je te dédie cette réussite.

Après Dieu et mes parents, je tiens à remercier solennellement tous les membres du jury qui ont accepté de juger mon travail : Madame le Docteur Fabiola TERZI qui a bien voulu présider ce jury de thèse, Monsieur le Professeur Mario OLLERO et Monsieur le Professeur Alexandre HERTIG qui ont accepté d'en être les rapporteurs et Monsieur le professeur Vincent AUDARD qui a bien voulu en être l'examineur.

Je remercie Guillaume CAUNAUD, le chef extraordinaire, exemplaire et irréprochable, de m'avoir accepté dans son équipe et d'avoir fait de moi le chercheur que je suis aujourd'hui.

Merci à toute l'équipe CANAUD : Madame Quitterie VENOT, Madame Sophia LADRAA, Madame Junna YAMAGUCHI, Monsieur Charles BAYARD, Monsieur Gabriel MORIN et Monsieur CLÉMENT HOGUIN pour votre soutien et pour les bons moments passés ensemble.

Merci à toute l'équipe TERZI pour votre amitié et votre sympathie.

Je ne peux finir sans remercier toute ma famille, mon frère Bamoussa MAGASSA, mes enfants Lamine et Ismaël, ainsi tous mes amis ou proches que je ne peux citer de peur d'en oublier. Sachez que les oreilles grandissent mais jamais plus haut que la tête, merci à vous d'avoir été là pour moi.

<< Cela semble toujours impossible, jusqu'à ce qu'on le fasse >>

Nelson MANDELA

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-----------|
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | 6 |
| RÉSUMÉ | 11 |
| INTRODUCTION | 13 |
| PRÉMIÈRE PARTIE : LE REIN ET MALADIES RÉNALES | 14 |
| I. LE REIN | 14 |
| Les différentes fonctions rénales | 14 |
| L'élimination des déchets | 14 |
| Réabsorption de nutriments | 14 |
| Maintien du pH | 14 |
| La régulation de l'osmolalité | 15 |
| La régulation de la pression sanguine..... | 15 |
| La sécrétion de composés actifs | 15 |
| La gluconéogenèse | 15 |
| Homéostasie extracellulaire..... | 15 |
| Maintien de l'équilibre hydrique | 16 |
| Physiologie du rein..... | 16 |
| Structure du rein | 16 |
| Le néphron..... | 17 |
| Le glomérule et la barrière de filtration glomérulaire..... | 19 |
| Cellules mésangiales : | 20 |
| Cellules endothéliales..... | 21 |
| La membrane basale..... | 22 |
| Les podocytes | 23 |
| Les cellules épithéliales pariétales | 30 |
| Le tube proximal | 30 |
| L'anse de Henlé..... | 31 |
| Le tube distal | 32 |
| II. LES MALADIES RÉNALES | 33 |
| Généralité | 33 |
| Maladies rénale congénitale et héréditaire | 33 |
| Kystes rénaux | 33 |
| Le syndrome d'Alport | 33 |
| Les calculs rénaux | 34 |
| Néphropathies interstitielles..... | 34 |
| Pyélonéphrites | 34 |
| Néphroangiosclérose | 34 |
| Néphropathie due à l'âge..... | 35 |
| Néphropathies glomérulaires ou glomérulopathies..... | 35 |
| Le syndrome néphrotique à lésions glomérulaires minimales (LGM)..... | 36 |
| Glomérulopathie extra-membraneuse (GEM)..... | 36 |
| Glomérulonéphrite à dépôts mésangiaux d'IgA..... | 36 |
| Glomérulonéphrites rapidement progressives (GNRP)..... | 37 |

| | |
|--|----|
| GNRP de type 1 ou à dépôts linéaire d'IgG : la maladie de Goodpasture..... | 37 |
| GNRP de type 2 ou GNRP à dépôt de complexes immuns | 37 |
| GNRP de type 3 ou GNRP pauci-immunes..... | 38 |
| GNRP de type 4 | 38 |
| Autres néphropathies glomérulaires | 38 |
| Néphropathie diabétique (ND)..... | 38 |
| Néphropathie lupique..... | 39 |
| Néphropathie du myélome..... | 39 |
| Néphropathie glomérulaire aigue post-infectieuse | 39 |
| Les amyloses..... | 39 |
| La hyalinose segmentaire et focale (HSF) | 40 |
| DEUXIEME PARTIE : L'INSUFFISANCE RENALE CHRONIQUE | 41 |
| I. GENERALITES | 41 |
| II. EPIDEMIOLOGIE | 42 |
| Prévalence | 43 |
| Facteurs de risques | 43 |
| Traitement de remplacement du rein..... | 44 |
| La mortalité | 45 |
| III. PROGRESSION | 46 |
| Altération du compartiment tubulointerstitielle | 47 |
| Atteintes du compartiment glomérulaire..... | 49 |
| TROISIEME PARTIE : RE1 SILENCING TRANSCRIPTIONS FACTOR (REST) | 52 |
| I. HISTORIQUE | 52 |
| II. GÈNE <i>Rest</i> | 52 |
| III. PROTEINE REST | 53 |
| Isoformes :..... | 53 |
| Localisation | 54 |
| Structure et fonctions | 54 |
| Structure..... | 54 |
| Fonctions | 55 |
| IV. MECANISME D'ACTION | 58 |
| V. RÔLE CELLULAIRE DE REST | 61 |
| Rôle de REST dans les cellules souches embryonnaire | 61 |
| Rôle de REST dans les neurones différenciés..... | 62 |
| Rôle de REST en condition pathologique | 62 |
| REST et Cancers..... | 63 |
| REST et cancers neuronaux | 63 |
| Médulloblastome | 63 |
| Glioblastome | 63 |
| Neuroblastome | 63 |
| REST et cancers non neuronaux | 64 |
| Cancer du côlon..... | 64 |
| Cancer pulmonaire à petites cellules (SCLC) | 64 |
| Cancer pulmonaire non à petites cellules (non-SCLC)..... | 64 |
| Cancer du sein | 64 |
| Cancer de la prostate | 65 |
| REST et les maladies neurodégénératives..... | 65 |

| | |
|--|-----------|
| REST et Ischémie | 66 |
| REST et la maladie d'Alzheimer | 67 |
| Rôle de REST dans le rein | 68 |
| Table 1 : Les grandes fonctions cellulaires connues sur REST | 70 |
| QUATRIEME PARTIE : SIMILARITES ENTRE NEURONES ET PODOCYTES | 71 |
| OBJECTIF | 73 |
| PRESENTATION DES RESULTATS | 75 |
| REST EST EXPRIMÉ ET LOCALISÉ DANS LE NOYAU DES PODOCYTES AU COURS DU VIEILLISSEMENT ET DE LA REDUCTION NÉPHRONIQUE | 76 |
| REST JOUE UN ROLE IMPORTANT DANS LA FONCTION ET DANS L' APOPTOSE DES PODOCYTES AU COURS DU VIEILLISSEMENT | 78 |
| L' EXPRESION DE REST EST INDUIT AVEC LE STRESS OXYDANT ET JOUE UN RÔLE IMPORTANT CONTRE L' APOPTOSE DES CELLULES HEK EN CONDITION DE STRESS | 79 |
| L' EXPRESION DE REST EST INDUIT AVEC LE STRESS OXYDANT ET JOUE UN RÔLE IMPORTANT DANS L' APOPTOSE ET LA MIGRATION DES PODOCYTES EN CONDITION DE STRESS | 80 |
| REST JOUE UN RÔLE IMPORTANT DANS L' ADAPTATION DES PODOCYTES DE SOURIS À LA NEPHROPATHIE CHRONIQUE ET PROGRESSIVE INDUITE PAR L' ADR | 82 |
| REGULATION DE L' EXPRESSION DES MARQUEURS DE DIFFÉRENCIATION PODOCYTAIRE ET DE REST PAR LES LIGNÉES DE PODOCYTES MURINS EN CONDITION DE STRESS INDUIT PAR LE SYSTÈME EMULATE | 84 |
| DISCUSSION ET PERSPECTIVES | 85 |
| ROLE DE REST DANS L' ADAPTATION DES PODOCYTES AU STRESS DU VIEILLISSEMENT | 87 |
| ROLE DE REST ET SA REGULATION DANS LES PODOCYTES | 89 |
| I. REGULATION DE REST DANS LES PODOCYTES | 89 |
| II. ROLE DE REST DANS L' ADHÉSION ET LA MIGRATION DES PODOCYTES | 90 |
| ROLE DE REST DANS L' APOPTOSE DES PODOCYTES INDUIT PAR L' ADR | 91 |
| CONCLUSION | 93 |
| BIBLIOGRAPHIE | 95 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4E-BP1 *eIF4E-binding protein 1*

ADH *antidiuretic hormone*

ADN *acide désoxyribonucléique*

ADR *adriamycine*

AF1q *ALL1-fused gene from chromosome 1q*

AKT2 *AKT serine/threonine kinase 2*

AMPARs *alpha amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*

Amylose AL *amylose des chaînes légères d'immunoglobuline*

Amyloses AA *amylose amyloïde associée*

ANCA *anti-neutrophil cytoplasmic antibody*

aPKC *atypical protein kinase C*

APOL1 *apolipoprotein L1*

ARN *acide ribonucléique*

ATM/ATR *ataxia telangiectasia mutated*

ATP *adenosine triphosphate*

BAX *BCL2 associated X apoptosis regulator*

BHC complex *BRAF-HDAC complex*

BID *BH3 interacting domain death agonist*

BRG1 *Brahma-related gene 1*

CAST protein *cytomatrix associated structural protein*

CD2AP *CD2 associated protein*

CDYL *chromodomain Y-like protein*

Chip-seq *chromatin immuno-precipitation and sequence*

CK1 *casein kinase 1*

COL4A (3, 4, 5) *collagen type IV alpha (3, 4, or 5) chain*

CSE *cellules souches embryonnaires*

DCTN1 *Dynactin subunit 1*

DFG *débit de filtration glomérulaire*

DFNA24 *deafness autosomal dominant 24*

EGF *epidermal growth factor*

ESRD *end stage renal disease*

EZH2 *enhancer of zeste homolog 2*

FADD *Fas-associated protein with death domain*

Foxc2 *forkhead box protein c 2*

GABA *gamma-aminobutyric acid*

GEM *glomérulopathie extra- membraneuse*

GFP *green fluorescence protein*

GINGF5 *gingival fibromatosis-5*

GLUT *glucose transporter*

GMRP *glomérulonéphrites rapidement progressives*

GRIN2B *glutamate receptor NMDA subunit 2B*

GSK3 *glycogen synthase kinase 3*

H₂O₂ *peroxyde d'hydrogène*

H3k27me3 *histon 3 lysine 27 trimethylated*

H3k9me3 *histon 3 lysine 9 trimethylated*

HDAC *histone désacétylase*

HEK *human embryonic kidney cell*

HES1 *Hes family BHLH transcription factor 1*

HOTAIR *hox transcript antisense RNA*

HSF *hyalinose segmentaire et focale*

HTT *Huntingtin*

IB1/JIP-1 *islet-brain/c-jun amino-terminal kinase interacting protein-1*

IEC *inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine*

Ig(A, G, M) *immunoglobuline (A, G, M)*

IQGAP1 *IQ motif containing GTPase-activating protein 1*

IRC *insuffisance rénale chronique*

JNK *c-jun N-terminal kinases*

KCC2 *potassium chloride co-transporter*

LAMB2 *laminin subunit beta 2*

LDL *low density lipoprotein*

LGM *syndrome néphrotique à lésions glomérulaires minimes*

Lmx1b *LIM homeobox transcription factor 1 beta*

lncRNA *long non-coding RNA*

LRP *low density lipoprotein receptor-related proteins*

LSD1 *lysine specific histone demethylase 1*

MAD2 *mitotic arrest deficient 2*

MafB *maf bzip transcription factor B*

MAGI-(1, 2) *membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing (1, 2) protein2*

MAPK *mitogen activated protein kinase*

MBG *membrane basale glomérulaire*

MeCP2 *methyl CpG binding protein 2*

MED12 *mediator complex subunit 12*

MPO *myelo-péroxydase*

MRC *maladie rénale chronique*

mTORC2 *mtor complex 2*

MYH9 *myosin heavy chain 9*

Myo1(c, e) *myosin-1(c, e)*

Nck *non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein-1*

ND *néphropathie diabétique*

NDS3 *nuclear receptor-binding SET domain protein 3*

NF-κB *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NHE3 *sodium-hydrogen antiporter3*

NKCC2 *sodium potassium chloride co-transporter*

NLS *nuclear localization signal*

NMDA *N-methyl-D-aspartate receptor*

Nphs (1, 2, 3) *nephrotic syndrome type (1, 2 or 3)*

NRP1 *neuropiline 1*

NRSE *neuron restrictive silencer element*

NRSF *neuron restrictive silencing factor*

ORL *oto-rhino-laryngologie*

PARP *poly(ADP-ribose) polymerase*

PAS *periodic acid-Schiff*

PcG *polycomb group proteins*

PEC *parietal epithelial cells*

PI3K *phosphoinositide 3-kinase*

PLA2R1 *phospholipase A2 receptor 1*

PML *promyelocytic leukemia protein*

PR3 *protéinase 3*

PRC *polycomb repressive complex*

PTPN12 *tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 12*

PUMA *p53 upregulated modulator of apoptosis*

PV-1 *plasmalemmal vesicle associated protein-1*

Rab3A *Ras-related protein Rab-3A*

RAGE *receptor for advanced glycation endproducts*

RCOR1 *REST corepressor 1*

RD (1,2) *repressor domain (1,2)*

RE1 *repressor element 1*

REST *RE1 silencing transcription factor*

RT-qPCR *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*

SCG3 *secretogranin 3*

SCLC *small cell lung carcinoma*

Scp1 *small C-terminal domain phosphatase*

SGLT2 *sodium glucose cotransporter 2*

SH (2, 3) *Src homology (2 or 3)*

shRNA *short or small hairpin RNA*

siRNA *small interfering ribonucleic acid*

SNAI2 *snail family transcriptional repressor 2*

SNAP25 *synaptosome associated protein 25*

SNARE *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor activating protein receptor*

SWI/SNF *switch/sucrose non-fermentable*

SYN1 *synapsin*

TAC1 *tachykinin precursor 1*

TCF21 *transcription factor 21*

TET3 *ten-eleven translocation protein 3*

TGF- β *transforming growth factor beta*

THSD7 *thrombospondin type-1 domain –containing 7A*

TP *tubular pole*

TRADD *tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*

TRF2 *telomeric repeat binding factor 2*

TRPV1 *transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*

TSA *trichostatin A*

UCHL1 *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1*

USP37 *ubiquitin specific peptide 37*

VEGF *vascular endothelial growth factor*

VP *vascular pole*

WNK *with no lysine(K) kinase*

WT1 *Wilms' tumor 1*

WT6 *wilms' tumor 6*

ZNF407 *zinc finger protein 407*

ZO-1 *zona occludens-1*

β -TrCP *beta-transducin repeats-containing proteins*

RÉSUMÉ

REST est un facteur de transcription identifié en 1995 et connu comme étant exprimé dans plusieurs types cellulaires au cours du développement embryonnaire et du vieillissement. Son niveau d'expression et son rôle varient d'une cellule à une autre. Il peut être régulé par transcription différentielle, par épissage ou par dégradation par le protéasome. Il joue un rôle essentiel au cours de l'embryogenèse, car l'extinction ubiquitaire de son expression chez la souris est responsable de la mort de l'embryon au jour embryonnaire 11,5. En absence de REST, les embryons montrent une apoptose cellulaire responsable d'anomalies dans le système nerveux et d'un arrêt de croissance. Dans les cellules non neuronales, il agit comme un répresseur transcriptionnel qui régule l'expression des gènes neuronaux et celle d'autres gènes impliqués dans d'autres processus importants pour la cellule. Dans les neurones, c'est un régulateur principal de la neurogénèse et un facteur important des cellules neuronales. Il est impliqué dans plusieurs processus biologiques et dans plusieurs voies de signalisation, où il pourrait réguler la prolifération, la survie et la migration cellulaire. Cependant sa présence peut être bénéfique ou délétère, cette dualité fonctionnelle et les approches thérapeutiques impliquées sont de nos jours très étudiés.

La dérégulation de l'expression de REST semble être impliquée dans toutes les maladies du système nerveux. Il est quiescent dans les neurones différenciés, mais peut s'activer en réponse à une agression neuronale. Une étude récente a montré que REST devient fortement exprimé et localiser dans le noyau des cellules neuronales au cours du vieillissement. L'expression de REST dans les neurones âgés semble avoir un rôle neuroprotecteur et son absence est associée à l'apparition des maladies neurodégénératives¹. En effet, au cours du vieillissement des cellules neuronales, il régule l'expression des gènes apoptotiques, de migration et de résistance au stress oxydant¹.

Cependant, le rôle de REST a été démontré dans le développement et la physiopathologie de certaines maladies associées à la maladie rénale chronique, telles que les maladies cardiovasculaires et le diabète de type 1^{2,3}. Cependant son rôle dans le rein n'est pas connu, néanmoins une étude a montré qu'il est important dans les cellules HEK lors de l'hypoxie, une autre a montré que des mutations dans le gène qui code pour REST favoriseraient le développement de tumeur de Wilms chez les enfants^{4,5}. Il pourrait très probablement jouer un rôle important dans d'autres maladies rénales, notamment dans les podocytopathies. Les podocytes sont des cellules importantes de la barrière de filtration glomérulaire, connues pour leur similarité structurale et biologique impressionnantes avec les neurones.

L'objectif de ce travail consistait d'identifier le rôle du facteur de transcription REST dans les podocytes au cours du vieillissement et de la progression de la maladie rénale chronique. Pour ce faire, des études *in vivo* sur des modèles de souris et *in vitro* sur des modèles cellulaires ont été menées. *In vivo*, nous avons montré que l'expression de REST est induite et localisée dans le noyau des podocytes de souris C57BL/6 au cours du vieillissement. Nous avons observé le

même résultat dans les podocytes de souris ayant subies une néphrectomie subtotale. Ces données suggèrent que REST pourrait jouer un rôle dans les podocytes au cours du vieillissement et de la réduction néphronique. Pour vérifier cela, nous avons développé des souris qui n'expriment pas REST dans les podocytes, puis nous avons montré que la suppression de REST dans les podocytes de souris est responsable d'une baisse du nombre de podocytes par glomérule, d'une augmentation de l'apoptose podocytaire associées à l'apparition de lésions glomérulaire et de la protéinurie. Ces résultats très intéressants nous mènent à regarder sa régulation et son rôle dans l'apoptose *in vitro*. Nous avons montré que dans les cellules HEK et dans les podocytes, son expression est augmentée pendant le stress oxydatif et qu'il joue un rôle protecteur et adaptateur de ces cellules en condition de stress apoptotique. Ainsi, REST semble protéger les cellules HEK et les podocytes contre l'apoptose et favoriserait leur attachement. En fin nous avons confirmé *in vivo* son rôle bénéfique dans l'adaptation des podocytes au cours de l'apoptose. L'utilisation d'un modèle de souris initialement résistantes à la néphrotoxicité de l'adriamycine montre que REST joue un rôle important dans l'adaptation et la résistance des podocytes à la toxicité de cette molécule.

L'ensemble de ces résultats montrent que REST est important dans l'adaptation des podocytes au vieillissement et aux stress cellulaires.

INTRODUCTION

PRÉMIÈRE PARTIE : LE REIN ET MALADIES RÉNALES

I. LE REIN

Les reins, au nombre de deux, sont situés de part et d'autre de la colonne vertébrale dans l'espace rétro péritonéal situé entre le péritoine pariétal et la paroi abdominale postérieure (Figure 1).

Les différentes fonctions rénales

Pour maintenir l'homéostasie, les reins ont plusieurs fonctions, incluant entre autre la production hormonale, la régulation du niveau de molécules importantes dans le sang et l'excrétion de toxine. Après le foie, les reins sont les plus importants dans l'élimination des toxines. Cependant, environ 20 à 25% du débit cardiaque passe par les reins, leur permettant de filtrer, en 60 fois, environ 180 litres de sang par jour.

L'élimination des déchets

Les reins débarrassent l'organisme des produits indésirables de son métabolisme tels que l'ammoniac, l'urée, l'acide urique, la créatinine, les restes du métabolisme de l'hémoglobine et des métabolites hormonaux. Ils excrètent également les toxines industrielles comme les métaux lourds et de nombreuses autres molécules mais aussi des nutriments ou des composants de nourriture consommés en excès tels que le sel et les vitamines B et C, etc.

Réabsorption de nutriments

Les reins réabsorbent les nutriments, le glucose, les acides aminés, le bicarbonate, le sodium, l'eau, le phosphate et les ions chlorures, sodium, magnésium et potassium contenus dans le sang.

Maintien du pH

Chez l'homme, le pH est compris entre 7,38 et 7,42. En dessous ou au-dessus de cette limite, on parle respectivement d'acidémie et d'alcaliémie et on assiste à la destruction des protéines et des enzymes pouvant avoir de grave conséquences. Les reins et les poumons sont connus pour leur rôle dans le maintien stable du pH. Les poumons interviennent en modulant la concentration de CO₂ et les reins agissent à travers deux processus différents : Pour neutraliser le pH, les reins peuvent éliminer le bicarbonate si le pH est correcte, ou le réabsorbé si le pH est acide. Ils sont aussi capable d'excréter les ions H⁺ et les acides non volatils.

La régulation de l'osmolalité

L'osmolalité est la mesure de l'équilibre électrolyte-eau. La déshydratation est l'une des principales causes du déséquilibre électrolytique. Lorsque l'osmolalité augmente dans le plasma sanguin, l'hypothalamus du cerveau répond en transmettant un message à l'hypophyse, qui à son tour libère l'hormone antidiurétique (ADH). En réponse à la sécrétion de l'ADH, le rein adopte certains changements, tels que l'augmentation de la concentration de l'urine, l'augmentation de l'absorption d'eau, le maintien de l'urée dans la médulla pour aspirer l'eau et l'ouverture des tubes collecteurs dans lesquelles l'eau ne peut normalement pas pénétrer, permettant ainsi le retour de l'eau dans le corps.

La régulation de la pression sanguine

Les reins régulent la pression sanguine quand c'est nécessaire, mais ils sont responsables de faibles ajustements de celle-ci. Ils ajustent la pression artérielle en modifiant la nature du fluide extracellulaire par sécrétion d'un vasoconstricteur, angiotensine II. Ils peuvent aussi augmenter l'absorption de chlorure de sodium ou de sel qui sont impliqués dans l'augmentation de la pression sanguine. Il est important de savoir que tout ce qui altère la pression sanguine peut induire des dommages aux reins à long terme, comme exemple on peut citer la consommation d'alcool, de cigarette et l'obésité.

La sécrétion de composés actifs

Les reins sécrètent de l'érythropoïétine qui régule la production de globule rouge par la moelle osseuse. Ils sécrètent la rénine qui est un constituant important du système rénine-angiotensine-aldostérone. Les reins sont également nécessaires pour la production de la forme active de la vitamine D (calcitriol) et des prostaglandines.

La gluconéogenèse

Chez l'homme, les reins sont capables de produire du glucose à partir de lactate, du glycérol et de la glutamine. Chez un homme à jeun, 20 à 25% de glucose circulant proviennent de la gluconéogenèse rénal. Après l'ingestion de glucose, la gluconéogenèse rénale augmente et représente environ 60% de glucose endogène⁶. La régulation de la production de glucose se fait par l'action de l'insuline, des catécholamines et d'autres hormones⁷. La gluconéogenèse rénale s'effectue uniquement dans le cortex car la médulla n'exprime pas les enzymes nécessaires⁸.

Homéostasie extracellulaire

Les reins filtrent en moyenne 180 g de glucose par jours, réabsorbés grâce au sodium glucose co-transporter 2 (SGLT2) et GLUT exprimés dans les tubules proximaux. Cependant, la capacité du SGLT2 à réabsorber le glucose des tubules rénaux est limitée, le glucose apparaît

donc dans les urines lorsque la concentration de glucose dans le plasma sanguin dépasse 1,8 g/l. Ce phénomène est appelé glycosurie⁶.

Maintien de l'équilibre hydrique

Les reins contribuent au maintien de l'équilibre hydrique de l'organisme en éliminant, dans les urines, une partie de l'eau absorbée dans la boisson ou dans la nourriture. Pour permettre à l'organisme de maintenir une quantité d'eau qui lui est nécessaire, l'évacuation de l'excès d'eau se fait également par les selles, la sueur et la respiration. Les reins sont essentiels au maintien à un niveau constant des minéraux nécessaires à l'organisme tels que le sodium et le potassium provenant des aliments. Leur carence ou leur excès peut être à l'origine de plusieurs complications graves. Grâce aux reins, les excédents des minéraux sont éliminés dans les urines.

Physiologie du rein

Structure du rein

Les reins mesurent chacun environ 11 à 14 cm de longueur, 6 cm et 4 cm d'épaisseur. Un rein pèse chez l'homme de 125 à 175 grammes et de 115 à 155 grammes chez la femme. Une capsule rénale fibreuse et dure entoure chaque rein. Deux couches de graisse les servent de protection. Sur la partie supérieure de chaque rein, se trouve une couche de glandes surrénaliennes. Ces glandes surrénaliennes servent à produire des hormones.

Une coupe frontale du rein montre une région externe appelée cortex et une région interne appelée médulla (Figure 1). Les colonnes rénales sont des extensions médullaires du cortex situées entre les lobes, appelés pyramides rénales. Elles assurent l'ancrage du cortex rénal, servent à diviser le rein en 6 à 8 pyramides et constituent un cadre de soutien pour les vaisseaux du cortex.

Les vaisseaux sanguins, les nerfs, les lymphatiques et l'uretère passent à travers une ouverture en forme de fente située au milieu du bord médian concave du cortex rénal, appelé hile rénal. Le pelvis rénal, émergeant du hile, est formé de calix majeur et mineur du rein. Le muscle lisse du pelvis dirige l'urine par péristaltisme dans l'uretère. Les artères rénales se forment directement à partir de l'aorte descendante, tandis que les veines rénales renvoient le sang filtré vers la veine cave inférieure. L'artère, la veine et le bassinet du rein sont disposés dans un ordre antéro-postérieur.

L'artère rénale se divise en plusieurs segments, puis se ramifie pour former les artères interlobaires qui traversent les colonnes rénales pour atteindre le cortex. Les artères interlobaires

se ramifient à leur tour en artères arquées, les artères corticales irradiées, puis en artérioles afférentes. Les artérioles afférentes desservent les néphrons.

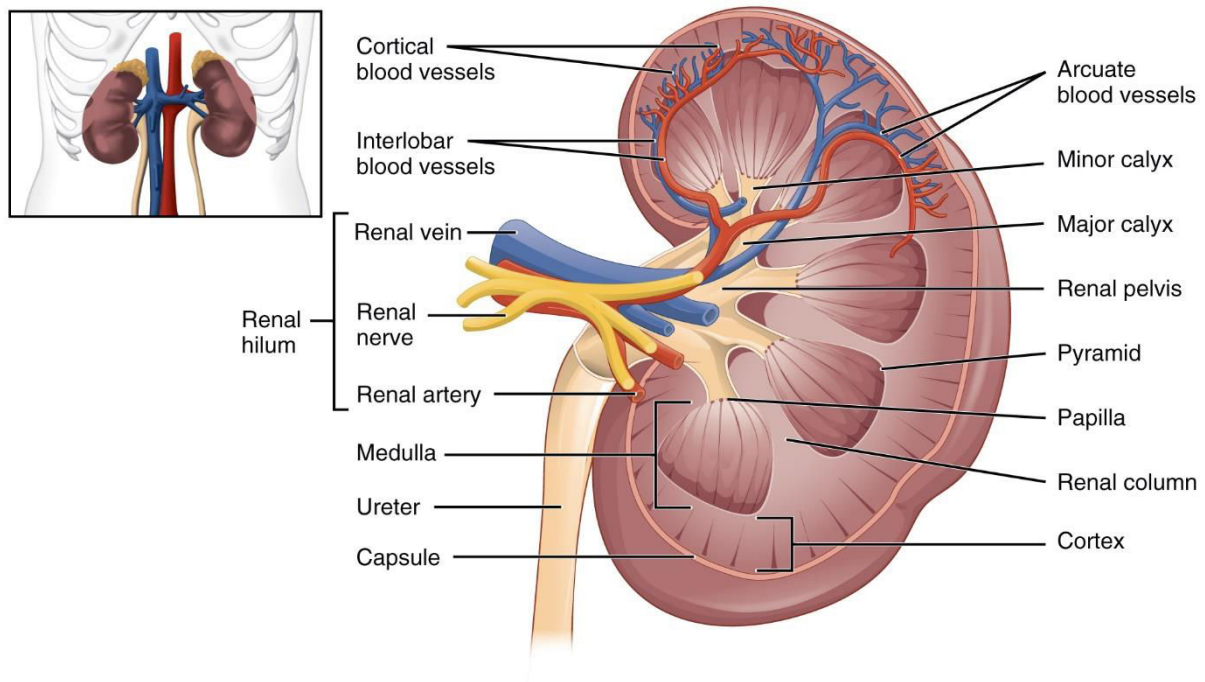


Figure 1 : anatomie externe et interne du rein. A gauche : représentation schématique des deux reins en condition physiologique normale. A droite : coupe frontale du rein gauche. D'après⁹.

Le néphron

Le cortex et la médulla s'unissent en formant l'unité fonctionnelle du rein, appelée le néphron. Dans un rein il y a approximativement un million de néphrons. Un néphron est constitué d'un glomérule associé à un tubule. La partie proximale du tubule se divise en segment contourné proximal au quel fait suite un segment droit qui rentre dans la médullaire externe. Le tubule proximal se jette dans la branche descendante de l'anse de Henlé au niveau de la jonction de la médullaire externe superficielle et de la médullaire externe profonde. La branche ascendante d'abord fine, puis épaisse succède à cette branche descendante et pénètre dans le cortex. A proximité du glomérule, cette branche large donne le tube contourné distal qui draine le système collecteur via le tubule connecteur. L'anse de Henlé peut être de taille réduite dans les néphrons courts ou peut pénétrer en profondeur dans la médullaire des néphrons longs.

Le néphron assure la filtration du sang, l'élimination des déchets et l'excès d'eau par les urines. Lorsque le sang entre dans le glomérule, il est filtré par le glomérule et le liquide restant passe ensuite dans le tubule bordé d'une couche unique de cellules spécialisées et entourées de capillaires. Ces cellules permettent la réabsorption vers le sang de l'eau et d'autres molécules,

ou la sécrétion des déchets et l'excès d'eau vers l'urine. La production d'urine implique des étapes très complexes d'excrétion et de réabsorption.

Le sang arrive au néphron par l'artériole afférente, une branche de l'artère interlobulaire. Il en ressort filtré par la veinule qui draine la veine interlobulaire (Figure 2). L'urine résultant de cette filtration est évacuée et stockée dans la vessie avant d'être éliminée par miction à travers l'urètre.

Une fonction rénale correcte implique la réception et le filtrage adéquat du sang. Ce rôle est assuré au niveau microscopique par plusieurs centaines de milliers d'unité de filtration composée d'un glomérule et d'une capsule de Bowman. La fonction rénale est généralement établie en fonction du débit de filtration glomérulaire.

Le glomérule est la première partie du néphron, où les artérioles afférentes forment un réseau de capillaires à haute pression d'environ 200µm. Il est soutenu par des cellules mésangiales intra glomérulaire. Comme mentionné précédemment, les capillaires glomérulaires filtrent le sang en fonction de la taille des particules. Après son passage dans le corpuscule rénal, les capillaires sanguins forment une seconde artériole, appelée artériole efférente. Celles-ci vont ensuite former un réseau de capillaire péri-tubulaire autour des parties distales du tubule (Figure 2). La résistance des artérioles efférentes provoque une pression hydrostatique suffisante dans le glomérule pour fournir la force nécessaire à l'ultrafiltration. La vitesse à laquelle le sang est filtré à travers les glomérules ou la mesure de la fonction rénale globale est appelée débit de filtration glomérulaire (DFG).

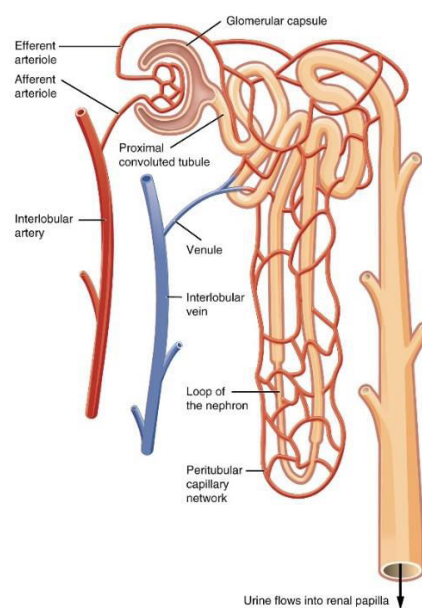


Figure 2 : Représentation schématique du néphron associé aux vaisseaux. L'artère rénale en rouge et la veine rénale en bleu sont bien visibles. Les artérioles efférentes sont visibles au niveau du glomérule et sur le tubule. D'après⁹.

Le glomérule et la barrière de filtration glomérulaire

La barrière de filtration glomérulaire est essentiellement composée de trois types de cellules : les cellules mésangiales, l'endothélium fenestré et les podocytes¹⁰. Ces cellules fonctionnent collectivement pour filtrer le plasma sanguin. La membrane basale constitue le principal support structurel du glomérule. Les cellules endothéliales et les cellules mésangiales sont situées à l'intérieur de la membrane basale, tandis que les podocytes sont attachés à la surface externe de la membrane basale¹¹. Cette structure à trois couches (endothélium, membrane basale et podocytes) facilite le passage de l'eau et des petites molécules vers la chambre urinaire tout en empêchant le passage des protéines volumineuses du plasma telles que l'albumine (Figure 3). Les cellules épithéliales pariétales tapissent la surface de la capsule de Bowman. La présence d'une quantité élevée d'albumine dans les urines indique un défaut dans un ou plusieurs éléments de la barrière de filtration glomérulaire.

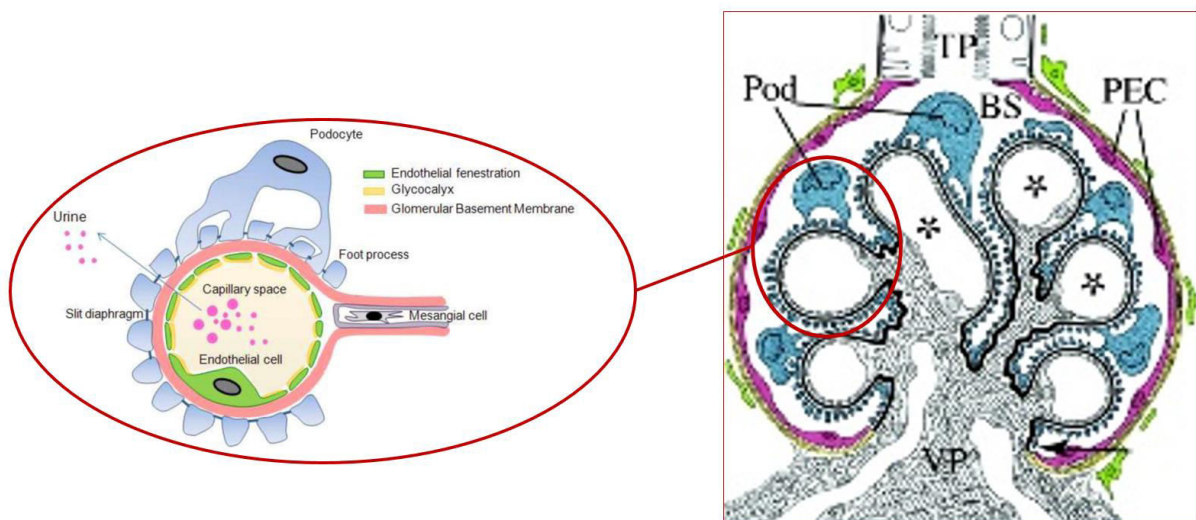


Figure 3 : représentation schématique du glomérule et de la barrière de filtration glomérulaire. L'épithélium glomérulaire est constitué de cellules épithéliales pariétales PEC (en rouge) et de podocytes Pod (en bleu). Les deux sont directement adjacents au pôle vasculaire VP (flèche). Au pôle tubulaire TP, l'épithélium pariétal est relié au tubule proximal. La membrane basale glomérulaire (en noire) forme une barrière continue entre l'épithélium et le compartiment endocapillaire contenant les cellules mésangiales (grisées) et les cellules endothéliales glomérulaires (en *). L'urine primitive (petits points rose) est filtrée dans l'espace de Bowman BS à travers la barrière de filtration à trois couches : cellules endothéliales fenestrées, la membrane basale glomérulaire et les podocytes. Adapté de^{12,13}.

Cellules mésangiales :

Les cellules mésangiales interagissent très étroitement avec les cellules endothéliales et les podocytes. L'altération de l'une de ces trois types cellulaires peut provoquer des modifications dans les autres. Les cellules mésangiales génèrent et contrôlent la production de matrice mésangiale. Elles contribuent à la régulation du flux capillaire glomérulaire, à la régulation de la surface d'ultrafiltration et donc à la filtration glomérulaire. Elles servent de sources et de cibles des facteurs de croissances, assurent un rôle central pour les capillaires glomérulaires et sont impliquées dans la physiopathologie de plusieurs maladies glomérulaires.

La composition de la matrice mésangiale est différente de celle de la membrane basale. Elle est composée de collagène type IV $\alpha 2$ et $\alpha 2$; de collagène de type V ; de laminine α , $\beta 1$ et $\beta 2$; de fibronectine ; d'héparane sulfate ; de chondroïtine sulfate protéoglycane ; et de nidogène. Cependant, elle peut contenir une faible quantité de protéoglycanes décorine et de biglycane. La composition et la quantité de matrice mésangiale sont régulées en condition physiologique normale mais sont dérégulées en conditions pathologique^{14,15}. Les composants de la matrice mésangiale, à travers leur capacité liaison aux facteurs de croissance, influencent directement ou indirectement la croissance et la prolifération des cellules mésangiales. Par exemple, la métalloprotéine de matrice active et libère du TGF- β qui contribue à la glomérulosclérose^{15,16}.

Les cellules mésangiales ont des propriétés contractiles générées par des filaments d'encrage à la membrane basale glomérulaire, facilitant ainsi le maintien de l'organisation capillaire et de la convolution glomérulaire. Dans la lumière des capillaires glomérulaires, les cellules mésangiales sont en contact direct avec les cellules endothéliales sans l'intervention de la membrane basale.

Ce sont probablement des péricytes spécialisés, car elles sont en contact direct avec les cellules endothéliales dans la région paramésangiale des capillaires glomérulaires. Cependant elles peuvent communiquer avec les cellules endothéliales à travers les jonctions intercellulaires. Ainsi des informations peuvent être transmises d'une cellule à une autre.

La production du facteur de croissance éphrine B2 par les cellules mésangiales est importante dans le développement du capillaire glomérulaire. L'élimination des cellules mésangiales entraîne une formation de glomérules avec un nombre réduit de boucles capillaires¹⁷. Dans d'autres déficiences congénitales causées par des mutations dans les gènes de podocytes, tels que dans le gène Pod-1, phospholipase c ϵ , $\alpha 3$ intégrine, laminine $\alpha 5$ ou l'antigène Wilms'tumor, il y a un défaut de migration des cellules mésangiales dans les glomérules en

développement¹⁸⁻²⁰. Il en résulte de la formation de capillaires glomérulaire anormale ou absente et de sclérose mésangiale congénitale diffuse.

Cellules endothéliales

Elles tapissent la surface interne de tout système vasculaire et forment une barrière anticoagulante entre le sang et les tissus. La caractéristique morphologique majeure des cellules endothéliales glomérulaire est leur fenestration qui apparait sous la forme de trous transcytoplasmiques²¹. L'endothélium systémique forme une muqueuse dans tous les vaisseaux sanguins et représente le principal régulateur de la perméabilité vasculaire. Il existe trois types d'endothélium : l'endothélium continu sans fenestration, l'endothélium fenestré et l'endothélium discontinu²². Ces cellules sont localisées dans les organes où des échanges importants sont mis en place entre le compartiment intra et extra vasculaire. Les fenestrations endothéliales sont classées en trois catégories selon l'endothélium et la présence ou l'absence de diaphragme. Le premier type, le plus courant, se trouve dans des organes tels que les tissus endocriniens, les muqueuses gastro-intestinales et les capillaires rénaux périrubulaires²¹. Les endothéliums de type I sont caractérisés par une fenestration d'environ 60 à 70nm de diamètre, par la présence de protéines PV-1 et de glycoprotéines transmembranaire de type II^{21,23,24}. Le second type de fenestration des cellules endothéliales est discontinu, il manque de membrane basale et il est rencontré majoritairement dans les cellules endothéliales de la rate, de la moelle osseuse ou du foie. La taille des fenestrations varie entre 100 et 170nm^{21,25}. Le troisième type de fenestration, qui a un diamètre qui varie entre 60 et 80nm, est similaire au premier, cependant, comme le second type, ils n'ont pas de protéines PV-1 et de diaphragme. Les fenestrations des cellules glomérulaires endothéliales sont principalement localisées dans les parties du cytoplasme opposées aux pédicelles des podocytes et la fente de filtration à travers la membrane basale²⁶. Ces cellules possèdent également un revêtement superficiel gélatineux appelé glycocalyx, composé de protéoglycane et de sialoprotéines, qui jouent un rôle important dans la régulation de la perméabilité ainsi que dans la modification des interactions cellulaires et ligand-récepteur²⁷. Une composition spécifique du glycocalyx dans la fenestration est importante pour sa perméabilité²⁸. Des études ont montré que la taille de ces fenestrations est beaucoup trop grande pour exclure l'albumine et d'autres protéines de grande taille du filtrat glomérulaire. Le glycocalyx contribue à environ 50% de la résistance hydraulique globale de la barrière de filtration glomérulaire et tout changement dans sa composition affecte le débit de filtration glomérulaire²⁹. Le développement et la fenestration normale de la cellule endothéliale glomérulaire sont particulièrement dépendants de la signalisation VEGF et TGF β 1.

L'inhibition de ces facteurs de croissance conduit à la ré-différenciation des cellules endothéliales du glomérule²¹.

La membrane basale

La membrane basale est un composant sélectivement perméable de la matrice extracellulaire de la barrière de filtration glomérulaire qui sépare le système vasculaire de l'espace urinaire. Les composants de cette membrane sont synthétisés par les cellules endothéliales glomérulaire et les podocytes³⁰. La membrane basale glomérulaire, comme d'autres membranes basales, est une matrice extracellulaire qui contient quatre macromolécules :

La laminine est un composant ubiquitaire de la membrane basale ayant différents isoformes, elle est sécrétée comme un hétérotrimère $\alpha\beta\gamma$ avec une structure stabilisée par des ponts disulfures. La nomenclature de cet hétérotrimère est basée sur la composition spécifique de la chaîne $\alpha\beta\gamma$. La membrane basale glomérulaire a des propriétés physiologiques importantes qui empêchent le passage des protéines plasmatiques, telles que l'albumine, dans la chambre urinaire. L'endothélium fenestré permet le passage du plasma dans les capillaires vers la membrane basale. Cependant des études ont montré que les fenestrations peuvent être obstruées par des matériaux semblable au glycocalyx, pouvant donc impacter les propriétés de la barrière de filtration^{30,31}. Chez la souris et chez l'homme, une mutation de la laminine $\beta 2$ peut être responsable de l'apparition du syndrome néphrotique congénital associé à des atteintes oculaire et neurologique appelé syndrome de Pierson^{32,33}. Des données suggèrent qu'une déficience en laminine 521 entraîne un défaut de perméabilité de la barrière de filtration, entraînant le passage des molécules d'albumine dans la chambre urinaire³⁴. Récemment, il a été montré que la surexpression de la laminine $\beta 1$ dans les podocytes de souris n'exprimant pas Lamb2, un modèle animal du syndrome de Pierson, permet de protéger l'animal contre la maladie³⁵.

Le second composant de la membrane basale glomérulaire est le collagène de type IV, une protéine trimérique de la matrice extracellulaire qui contient des répétitions de triplet d'acide aminé Gly-X-Y. Trois chaînes α s'enroulent pour former la triple hélice de collagène. Six chaînes α interagissent les unes avec les autres dans une stœchiométrie spécifique pour former un réseau de protomères $(\alpha 1)2\alpha 2$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ et $(\alpha 5)2\alpha 6$. La protomère $(\alpha 1)2\alpha 2$ est principalement exprimé pendant le développement glomérulaire. Les mutations touchant la chaîne $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ conduisent à une atteinte de la membrane basale dont la sévérité dépend du type de mutation. Les mutations homozygotes touchant les gènes COL4A3 ou COL4A4, codant respectivement pour le collagène de type IV $\alpha 3$ et $\alpha 4$, sont responsables de l'apparition du syndrome autosomal récessif d'Alport, une atteinte de la membrane basale responsable de la perte de fonction rénale,

de la surdité et des problèmes de vision. La forme du syndrome d'Alport associée au chromosome X est due à des mutations dans COL4A5^{30,36}. Il est important de noter que l'absence totale de l'une ou toutes les chaînes $\alpha3\alpha4\alpha5$ du collagène de type IV peut entraîner des anomalies plus graves de la membrane basale glomérulaire. Il est également connu que, comparé aux réseaux $(\alpha1)2\alpha2$, les chaînes $\alpha3\alpha4\alpha5$ sont plus résistantes aux protéases et s'attachent plus efficacement, leur conférant un statut d'acteur principal de la stabilité de l'architecture de la membrane basale glomérulaire³⁰.

Les troisièmes composants de cette membrane sont les protéines nidogènes qui existent sous deux formes, les nidogènes-1 et les nidogènes-2. Ce sont des protéines ubiquitaires de membrane basale permettant d'associer les laminines et les collagènes de type IV, ils jouent donc un rôle important dans la formation de la membrane basale glomérulaire³⁷. Une mutation individuelle des nidogènes-1 ou 2 n'affectent ni l'intégrité de la membrane basale, ni sa formation^{38,39}. Cependant une délétion combinée des deux gènes induit la mort prénatale chez la souris mais de manière intéressante, la membrane basale ne semble pas affectée⁴⁰.

L'héparine sulfate protéoglycane, agrine, est le quatrième composant de la membrane basale. Une forme sécrétée à partir de ses multiples formes d'épissages est présente dans la membrane basale glomérulaire. L'agrine est chargée négativement à cause de la présence de glycosaminoglycane sulfatés, ce qui confère donc une charge globale négative à la membrane basale glomérulaire⁴¹. Cette charge négative de la membrane basale est importante pour la barrière de filtration glomérulaire car l'albumine, également chargée négativement, est repoussée par la membrane basale glomérulaire. Cependant, les petites molécules chargées positivement traversent plus facilement la barrière de filtration glomérulaire que les molécules neutres qui à leur tour traversent plus rapidement que celles de charge négative⁴². Ce concept de sélectivité en fonction des charges reste conflictuel. L'extinction de l'expression de l'agrine par les podocytes induit une diminution de charge anionique, mais elle est sans effet sur la barrière de filtration⁴³. La réduction de la charge anionique de la membrane basale *in vivo* par perfusion d'héparanase ne semble pas entraîner de la protéinurie⁴⁴. Globalement la composition structurelle de la membrane basale joue un rôle important dans le développement et le maintien de la barrière de filtration glomérulaire. Le troisième et très important constituant de la barrière de filtration glomérulaire est le podocyte.

Les podocytes

Les podocytes sont des cellules épithéliales spécialisées et hautement différenciées, avec une organisation complexe qui tapisse l'extérieur des capillaires glomérulaires. Ils font face à la

capsule de Bowman et l'urine primitive. Ils ont un grand corps cellulaire central à partir duquel des processus primaires et secondaires sont dirigés vers les capillaires glomérulaires. Ces processus sont divisés en de nombreux prolongements terminaux, appelés pédicelles, reposant sur la membrane basale glomérulaire⁴⁵⁻⁴⁷. Les processus primaires sont composés de microtubules et des filaments intermédiaires tandis que les pédicelles contiennent un cytosquelette à base d'actine^{48,49}. Les podocytes sont des cellules épithéliales polarisées avec un domaine membranaire apical ou luminal et un domaine membranaire basal. Le pôle basal, qui contient les pédicelles, est apposé sur la membrane basale glomérulaire. Le domaine membranaire apical est constitué de sialoglycoprotéines telles que la podocalyxine, podoendine, etc, qui maintiennent la surface chargée négativement⁵⁰. La composition en lipide des pôles apicaux et basaux sont hétérogène⁵¹. Les pédicelles s'interpénètrent d'une cellule à une autre et l'espace entre les pédicelles adjacents est occupée par une structure fine membraneuse de 40 nm de largeur, communément appelé fente de filtration ou diaphragme de fente^{45,52}. Plusieurs protéines localisées sur le diaphragme de fente sont connues pour leur rôle essentiel dans la maintenance de la structure et la fonction des podocytes (Figure 4)^{45,47,52}. Elles sont pour la plupart transmembranaires et associent le diaphragme de fente au cytosquelette d'actine des podocytes. Elles participent cependant aux processus de signalisation qui régulent l'organisation structurale et fonctionnelle des podocytes⁵².

Le cytosquelette d'actine forme le cadre structural des podocytes et contribue à leur morphologie unique et à leur fonction. Il est essentiel pour contre balancer le stress mécanique, empêcher la croissance du vaisseau et préserver l'architecture normale du glomérule⁵³. Les podocytes contiennent morphologiquement et fonctionnellement 3 segments différents, qui sont le corps cellulaire, les processus primaires et les pédicelles. Les processus primaires proviennent du corps cellulaire et se divisent en pédicelles. Les protéines du cytosquelette peuvent être classées en 3 groupes : les microtubules, les filaments intermédiaires et les microfilaments. Des études ont montré que certaines protéines du microfilament d'actine, telles que l' α -actinine-4, sont principalement localisées dans les pédicelles des podocytes et que leur expression est importante pour la formation de la barrière de filtration glomérulaire⁵⁴. Les protéines du microtubule, principalement localisées dans le corps cellulaire et dans les processus primaires, participent à la formation des pédicelles podocytaires⁵⁵. Les protéines des filaments intermédiaires telles que la vimentine et la desmine sont détectées dans le corps cellulaire et les processus primaire du podocyte^{56,57}. Le cytosquelette sert entre autre de support structurel à la cellule, il lui confère les capacités de contraction, d'expansion et permet l'ancrage

des molécules intracellulaires. Les pédicelles contiennent un cytosquelette d'actine qui assure leur association à la membrane basale glomérulaire via des contacts focaux. Ils sont caractérisés par un réseau de courts filaments d'actine cortical et par la présence de faisceaux de filaments d'actine très ordonné, parallèle et contractile qui servent à moduler la perméabilité de la barrière de filtration en modifiant la morphologie des pédicelles^{11,47,58}. Le filament d'actine est également impliqué dans la signalisation cellulaire et le transport des molécules des pédicelles au corps cellulaire. Il permet un ancrage des protéines transmembranaires et il est important pour la signalisation transmembranaire. Les protéines associées à l'actine, telles que l'actinin-4 et la synaptopodine, jouent un rôle important dans la régulation et la dynamique du cytosquelette d'actine. L' α -Actinin-4 est une protéine associée au filament d'actine, elle co-localise avec l'actine dans les podocytes (Figure 4). Une mutation dans l' α -actinin-4 conduit à l'apparition de la protéinurie chez l'homme⁵⁹. De plus une suppression de l'expression ou une surexpression de l' α -actinine-4 induit la protéinurie et l'effacement des pieds podocytaires^{60,61}. La synaptopodine est une protéine associée à l'actine qui module l'expression de l' α -actinine, elle agit en élongeant le filament d'actine. Plusieurs études ont montré l'importance de la synaptopodine dans la maintenance de la structure et de la fonction des podocytes⁶².

Le diaphragme de fente des podocytes est une fine membrane extracellulaire servant de liaison entre deux pédicelles adjacents. Il est perméable à l'eau et aux solutés de petite taille et constitue une barrière de sélectivité pour les molécules de grande taille^{63,64}. La néphrine, NEPH1, podocine, zona occludens-1 (ZO-1), protéine adaptateur de CD2 (CD2AP), FAT et P-cadhérine, etc, sont des protéines podocytaires qui contribuent dans le cadre structurel du diaphragme de fente et sont essentielles à la fonction de la barrière de filtration glomérulaire (Figure 4). Ces protéines forment un réseau de signalisation cellulaire qui connecte le diaphragme de fente au cytosquelette d'actine intracellulaire et participe à la régulation de la structure et de la fonction des podocytes^{52,65,66}. Des mutations génétiques ou une inactivation de ces gènes conduisent à la protéinurie massive suivie de l'insuffisance rénale terminale chez l'homme^{31,52,54}.

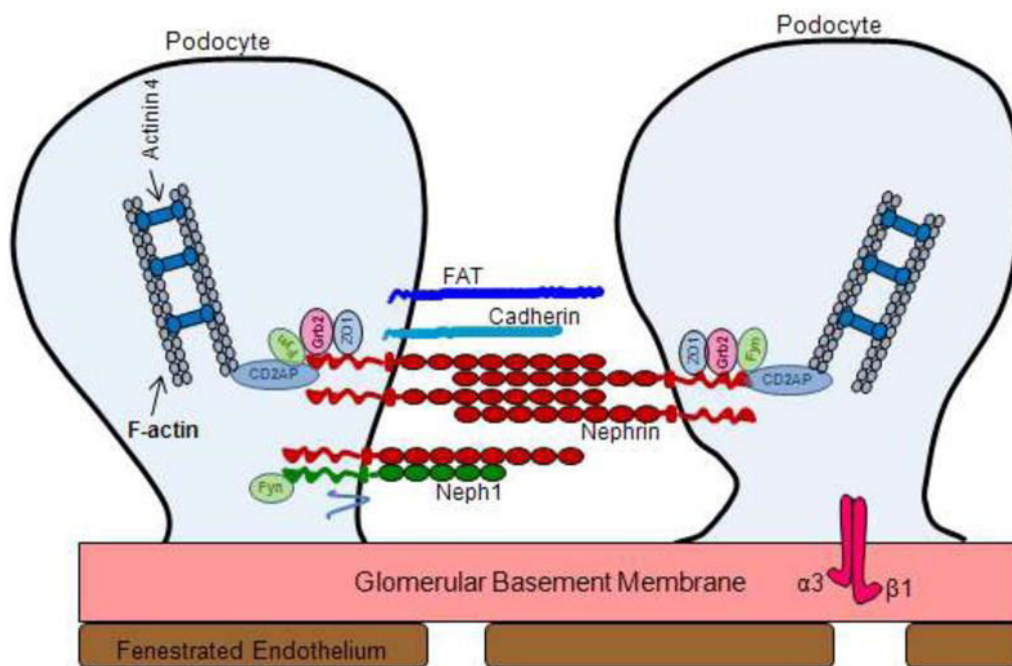


Figure 4 : Représentation schématique du diaphragme de fente. Organisation des protéines impliquées dans la formation du diaphragme de fente glomérulaire. D'après¹²

Des études chez l'homme et dans des modèles animaux ont révélé qu'un grand nombre de protéines sont impliquées dans la différenciation et dans la fonction des podocytes :

La néphrine est un composant central du filtre glomérulaire, elle est exprimée dans les podocytes en tant que protéine transmembranaire. Elle a un court domaine intracellulaire, un domaine transmembranaire, un domaine extracellulaire avec ses huit motifs IgG-like distal et un motif fibronectine de type III-like proximal^{52,65}. La taille du domaine extracellulaire de la néphrine est d'environ 35 nm, au niveau des pédicelles adjacents, elle interagit avec le diaphragme de fente formant le filtre moléculaire. Le domaine intracellulaire de la Néphrine est associé au cytosquelette d'actine et à d'autres protéines telles que le CD2AP et la protéine Nck. Il a plusieurs sites de phosphorylation potentielle de la tyrosine, dont certains sont des cibles de kinases contenant un domaine SH2 et des protéines adaptateurs⁶⁷. Des études ont montré que la phosphorylation tyrosine de la néphrine régule la morphologie des podocytes via la protéine adaptateur de Nck^{65,68}. Les deux protéines adaptateurs de la famille de Nck, Nck1 et Nck2 sont impliquées dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine. Ces deux protéines ont un domaine SH2 et trois domaines SH3. Le domaine SH2 interagit avec les phosphotyrosines et recrute Nck, tandis que le domaine SH3 recrute plusieurs autres protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine²². Il est connu que la néphrine est phosphorylée de manière transitoire pendant l'effacement des pieds dans un modèle de

protéinurie, mais aussi après la formation des pédicelles lors du développement glomérulaire. Ce qui suggère une augmentation de la phosphorylation de la néphrine pendant la polymérisation rapide de l'actine et pendant le processus de réorganisation du cytosquelette conduisant au recrutement de Nck et les effecteurs cytoplasmique de la néphrine. Plusieurs expériences biochimiques et génétiques ont confirmé l'importance de la néphrine dans le maintien de l'intégrité structurale du diaphragme de fente et dans la fonction de la barrière de filtration^{67,69}. Des mutations dans la néphrine sont associées à l'apparition de syndrome néphrotique congénital.

Wt1 est un facteur de transcription contenant 4 motifs en doigt de zinc à l'extrémité C-terminal et un domaine de liaison à l'ADN riche en proline / glutamine à son extrémité N-terminale. Il joue un rôle essentiel dans le développement du système urogénital et il est muté dans un sous-groupe de patients atteint de tumeur de Wilms d'où l'acronyme Wt1 pour Wilms tumor 1. Une mutation de Wt1 conduit à l'arrêt du développement ou de la maintenance des podocytes associés à des glomérulopathies. Wt1 se lie sur le promoteur proximal de plusieurs gènes codant pour les protéines localisées au niveau du diaphragme de fente des podocytes telles que Nphs1, Nphs2, Magi2, Nck2, etc et régule leur expression^{70,71} Une délétion spécifique de Wt1 dans les podocytes de souris provoque un défaut de différenciation de ces podocytes suivie d'une perte de fonction rénale et de la mort en seulement 24h après la naissance⁷⁰. La suppression de l'expression de Wt1 chez les souris adulte provoque l'effacement des pédicelles, de la protéinurie et de la glomérulosclérose. Il régule donc la maturation et l'homéostasie des podocytes. Il est aussi capable de réguler la polarité et l'organisation du cytosquelette des podocytes en se liant d'une part aux éléments cis-régulateurs des gènes codants pour les protéines de cytosquelette telles que l'actinine-4, la synaptopodine et le MYH9, et d'autres part aux éléments cis-régulateurs codant pour les protéines de polarité telles que aPKC^{70,71}. Wt1 contrôle l'adhésion des podocytes à la matrice de la membrane basale car les régions régulatrices des gènes codant pour des protéines d'adhésion telles que l'intégrine $\alpha3\beta1$ et laminine 521 contiennent un site de liaison à Wt1^{70,71}. Il régule aussi l'expression des gènes *MafB*, *Lmx1b*, *Foxc2* et *Pod-1*, qui sont des facteurs de transcriptions spécifiques des podocytes. Il travaille également avec des protéines codées par ces gènes permettant ainsi de définir l'identité des podocytes.

La synaptopodine est une protéine du cytosquelette des podocytes codée par le gène *Synpo*. Elle a été identifiée à l'origine en tant que protéine associée à l'actine dans les podocytes différenciés, où il joue un rôle important dans l'appareil contractile notamment dans les

pédicelles⁷². Elle est également exprimée dans le cerveau, où elle se trouve à la densité post-synaptique et au niveau de l'appareil rachidien d'un sous-ensemble de neurones télencéphaliques^{73,74}. L'expression de la synaptopodine dans le rein, dans le cerveau et dans les neurones de l'hippocampe, est importante pour la modulation de la forme et la mobilité liée au cytosquelette d'actine des épines dendritiques de neurones et des pédicelles de podocytes⁷³. Des études ont montré *in vivo* et *in vitro* que lorsque l'expression de la synaptopodine est supprimée dans les podocytes, il y a une réformation retardée des filaments d'actine podocytaire⁶². Cependant, la synaptopodine est très importante pour la plasticité des podocytes.

La nestine est une protéine du filament intermédiaire de classe IV associée au cytosquelette. Elle a été initialement identifiée dans les cellules souches et progénitrices du système nerveux central, ainsi que dans les organes périphériques⁷⁵⁻⁸¹. Elle est également exprimée dans les podocytes⁸². Contrairement à son expression dans les cellules progénitrices, où elle disparaît une fois les cellules différenciées, la nestine est exprimée dans les podocytes totalement différenciés. Elle interagit avec les classes de protéines du cytosquelette, elle est impliquée dans l'organisation du cytosquelette podocytaire et joue un rôle important dans le maintien de la fonction des podocytes^{76,83}.

La protéine associée à CD2 (CD2AP) est une autre protéine intracellulaire localisée dans les podocytes où il peut interagir avec le domaine C-terminal de la néphrine⁶⁶. CD2AP agit comme un agent de liaison entre les récepteurs membranaires et les protéines modifiant l'actine, par conséquent, elle pourrait être impliquée dans l'interaction entre la néphrine et le cytosquelette d'actine dans les podocytes⁸⁴. Il est suggéré que l'interaction entre la néphrine et CD2AP pourrait être importante en condition physiologique, cependant l'interaction Nck-néphrine joue un rôle dans la réorganisation cytoplasmique lors d'une atteinte glomérulaire⁸⁵. Le domaine N-terminal de CD2AP se lie à une protéine intermédiaire p85 et facilite l'activation de la signalisation AKT par la néphrine et ainsi protège les podocytes de l'apoptose. La phosphorylation des tyrosines du domaine cytoplasmique de la néphrine par les Src kinases initie la cascade de signalisation anti apoptotique⁸⁶.

Neph1 est une protéine transmembranaire structurellement liée à la néphrine avec cinq motifs extracellulaire IgG-like. Les protéines transmembranaire de la famille Neph comportent trois homologues (Neph1, Neph2 et Neph3), également appelées filtrines, elles sont largement exprimées dans les tissus de mammifères⁸⁷. Neph1 et Neph2 sont localisées au niveau du diaphragme de fente et les données *in vitro* suggèrent que la néphrine peut former des

hétérodimères avec Neph1 ou Neph2 à travers leur domaine extracellulaire, mais Neph1 et Neph2 n'interagissent pas entre elles⁸⁸. Il a été montré que les souris qui n'expriment pas Neph1 présentent de la protéinurie et une atteinte rénale mais le rôle exact de ces protéines n'est pas connu⁸⁹.

La podocine est une protéine de 42 kDa membranaire en forme d'épingle à cheveux, codée par le gène *NPHS2*. Similaire à la néphrine et à Neph1, elle est localisée au diaphragme de fente des podocytes⁹⁰. Cependant, contrairement à ces deux protéines, les extrémités N et C-terminal sont dirigées vers l'espace intracellulaire⁹¹. Elle sert d'échafaudage et contribue à l'organisation structurelle du diaphragme de fente. Elle interagit avec le domaine intracellulaire de la néphrine, de Neph1 et avec CD2AP^{51,92}. Les souris déficientes en podocine développent une protéinurie sévère et meurent quelques jours après la naissance⁹⁰. Son inactivation dans le rein mature de souris provoque une glomérulosclérose segmentaire focale et un syndrome néphrotique⁹³.

FAT1 et FAT2 sont des protéines transmembranaires larges contenant 34 sites de répétition en tandem cadherin-like et sont localisées au niveau du diaphragme de fente des podocytes⁹⁴. Les souris n'exprimant pas FAT1 et FAT2 développent de la protéinurie, mais leur rôle exacte dans la biologie des podocytes n'est pas très bien connu⁹⁵.

Des protéines de la superfamille des myosines qui se lient à l'actine et fonctionnant comme protéine motrice sont aussi des actrices importantes de la maintenance morphologique et fonctionnelle des podocytes. Parmi les myosines non conventionnelles, Myo1e est la première myosine identifiée pour son rôle dans le développement des podocytes. L'analyse des mutations génétiques chez l'homme dans les souris n'exprimant pas Myo1e a montré l'importance de cette protéine dans la biologie des podocytes. Par ailleurs, l'absence de Myo1e dans les podocytes provoque l'effacement des pédicelles et la protéinurie^{96,97}. D'autres études ont aussi montré que Myo1e est importante pour l'endocytose des protéines du diaphragme de fente, cependant les mécanismes impliqués dans cette fonction ne sont pas connus. Myh9 est une autre myosine identifiée pour son rôle dans les maladies rénales⁹⁸. L'absence de l'expression du gène Myh9 a été démontrée chez l'homme et l'animal comme responsable de symptômes ressemblant à la glomérulosclérose segmentaire et focale⁹⁹. Des études récentes ont montré que la délétion de l'expression de Myh9 peut induire l'effacement des pieds de podocytes et la rupture du diaphragme de fente chez le zebrafish¹⁰⁰. La myosine Myo1c est aussi connue comme étant un partenaire d'interaction du diaphragme de fente, elle est aussi impliquée dans la translocation de la néphrine et de Neph1 du cytoplasme à la membrane des podocytes.

Plusieurs autres protéines ont été identifiées dans les podocytes et participent au maintien de l'intégrité structurelle du diaphragme de fente. Parmi ces dernières nous pouvons citer IQGAP1, MAGI-2, CAST, α -actinine, α II spectrine, β II spectrine, catenines, ZO-1, MAGI-1, densine, etc⁸⁵. Plusieurs laboratoires s'impliquent activement dans la découverte de nouveaux gènes candidats impliqués dans la fonction de la barrière de filtration glomérulaire. Par exemple APOL1 a été montré en 2012 comme étant associée au développement de la glomérulosclérose segmentaire et focale chez l'homme¹⁰¹. L'identification de nouveaux gènes ainsi que la compréhension de leur rôle dans le maintien de la fonction de filtration glomérulaire feront progresser de manière significative notre compréhension des différentes maladies rénale en générales et glomérulaires en particulier, dans l'objectif d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les cellules épithéliales pariétales

L'espace urinaire du glomérule est tapissé par la capsule de Bowman, sur laquelle se fixe une monocouche de cellules épithéliales pariétales glomérulaires. Ces cellules sont similaires aux podocytes et aux cellules épithéliales tubulaires. Elles ont sur leurs surfaces des microvillosités et des cils dont la fonction n'est pas très clairement établie. Elles constituent environ 14,8% des cellules glomérulaires. Malgré leur petite taille, elles forment des jonctions adjacentes intercellulaires serrées avec une structure complexe qualifiée de labyrinthe¹⁰². Certaines de ces cellules ressemblent aux podocytes tant sur le plan structural qu'au niveau des marqueurs de différenciation qu'elles expriment¹⁰³. Elles sont par conséquent appelées podocytes pariétaux et sont généralement retrouvées au niveau de la transition entre l'épithélium viscéral et pariétal du pôle vasculaire. Le rôle joué par ces cellules n'est pas très bien connu. Néanmoins, elles sont connues pour leur rôle de barrière s'opposant au passage des éléments de l'urine primitive à travers la capsule de Bowman¹⁰⁴. Des études ont montré qu'un sous-ensemble de ces cellules pourrait être des progénitrices de cellules podocytaires, elles sont capables de migrer sur la MBG, où elles se différencient en podocytes^{13,105}. Elles sont aussi capables de se différencier en cellules tubulaires proximales. L'importance physiologique et physiopathologique de ces observations reste à être déterminée.

Le tube proximal

C'est la partie du néphron compris entre la capsule de Bowman et l'anse de Henlé. Il est constitué de deux parties, le tube contourné proximal et tube droit proximal. Le tube proximal est facilement reconnaissable par sa couverture de microvillosités densément tassées, formant une bordure en brosse. Ces microvillosités augmentent considérablement la surface cellulaire

pour faciliter l'absorption ou la sécrétion de solutés Na^+ , Cl^- et du glucose présent dans le filtrat ainsi que la détection de flux d'urine primitive¹⁰⁶. Ces cellules transportent activement des ions au niveau de leur membrane, donc elles ont besoin de beaucoup d'énergie. Elles possèdent ainsi une concentration importante de mitochondrie qui leur permet de produire suffisamment d'ATP.

Le tube contourné proximal régule le pH du filtrat en échangeant des ions H^+ avec des ions bicarbonates du filtrat. Il est aussi responsable de la sécrétion des acides organiques tels que la créatinine et d'autres bases dans le filtrat. Le transport de sodium dans le sang par le Na^+/K^+ ATPase au niveau de la membrane basolatérale des cellules épithéliales tubulaires permet la réabsorption du liquide contenu dans le filtrat au niveau des capillaires péri tubulaires. La réabsorption du sodium est principalement induite par l'ATPase de type P. Cependant 60 à 70% de sodium filtré sont réabsorbés dans le tube proximal à travers le transport actif et l'électro diffusion para cellulaire. Le transport actif se fait par l'anti porteur sodium/hydrogène NHE3 ¹⁰⁷. Le transport para cellulaire augmente l'efficacité du transport, tel que déterminé par la consommation d'oxygène par unité de Na^+ réabsorbée, contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie rénale de l'oxygène¹⁰⁸.

L'anse de Henlé

L'anse de Henlé transporte le filtrat du proximal dans le cortex vers la médullaire rénale puis retourne au cortex. Elle est constituée de trois parties : une fine branche descendante, une fine branche ascendante et une épaisse branche ascendante.

La fine branche descendante contient des jonctions étroites qui permettent à l'eau de passer par diffusion passive lorsque le segment tubulaire pénètre dans la médullaire rénale hypertonique. De plus l'urée et le Na^+ diffusent dans la lumière tubulaire à partir du liquide interstitiel médullaire.

La fine branche ascendante de l'anse de Henlé se distingue de la branche descendante par le fait que les jonctions serrées sont étanches et imperméables à l'eau. Comme son nom l'indique, au niveau de la transition de la branche descendante et de la branche ascendante, le segment tubulaire fait un tour de 180 degrés. Ce qui permet au filtrat de pouvoir retourner dans le cortex.

Les épithéliums de la branche épaisse ascendante de l'anse de Henlé contiennent également des jonctions serrées. La protéine de transport la plus importante dans ce segment est le transporteur apical de $\text{Na}^+/\text{K}^+/2 \text{Cl}^-$, qui peut être bloqué par le furosémide ou le bumétanide. Le passage des ions K^+ à travers un canal de la surface apicale provoque un potentiel transluminal positif. Ce

potentiel permet ensuite l'absorption para cellulaire du calcium et du magnésium. Le transport de soluté sans mouvement de l'eau entraîne une chute de l'osmolarité du filtrat, de sorte que la branche ascendante est parfois appelée le segment de dilution. Le transport de soluté dans l'espace interstitiel sans mouvement d'eau est aussi un des deux mécanismes responsable de l'hypertonicité du fluide interstitiel de la médulla rénale.

Le tube distal

Le tube contourné distal est la partie du néphron qui se trouve dans le cortex en amont de la macula densa entre l'anse de Henlé et le tube collecteur. Bien qu'il soit le plus court segment du néphron, ne dépassant pas 5 mm de longueur chez l'homme, il joue un rôle essentiel dans la réabsorption du chlorure de sodium, dans la sécrétion de potassium et dans la prise en charge du calcium et du magnésium¹⁰⁹. Il a une capacité unique d'adaptation aux variations de stimuli hormonaux et du contenu de la lumière tubulaire, contribuant à la physiopathologie de la résistance diurétique de l'anse et l'hyperaldostéronisme.

Les cellules du tube contourné distal ont une morphologie unique qui correspond à leur physiologie très active¹¹⁰. Leur noyau est localisé au côté apical de la cellule en raison d'une membrane basolatérale étendue comportant de nombreux replis profonds. De plus, le cytosol, situé à l'extrémité basale de la cellule contient beaucoup de mitochondries¹¹¹. Cette présence abondante de mitochondries indique que le tube distal est engagé dans des processus nécessitant une consommation importante d'ATP et un transport actif d'électrolytes effectué par le Na⁺-K⁺-ATPase basolateral.

Ces cellules régulent le pH en absorbant le bicarbonate et en sécrétant des protons H⁺ dans le filtrat ou en absorbant des protons et en sécrétant du bicarbonate. Elles contrôlent le niveau de sodium et de potassium en absorbant du Na⁺ et en sécrétant du bicarbonate. Cette absorption de sodium par le tube distal est provoquée par l'hormone aldostérone. L'aldostérone augmente la réabsorption de sodium, qui peut aussi être induit par des kinases WNK. Les tubes distales participent également à la régulation des ions calcium en réponse à l'hormone parathyroïde et expriment le récepteur de l'arginine vasopressine 2. Le tube distal est connecté au canal collecteur par l'intermédiaire de tube connecteur qui participe également à la régulation d'eau et d'électrolytes sodium ou chlorure.

II. LES MALADIES RÉNALES

Généralité

La majorité des maladies rénales conduit à une diminution du nombre de néphrons fonctionnels dans le rein. Les néphrons restant développent une hyperplasie compensatrice pour essayer de maintenir une fonction de filtration plus ou moins normale. Chez certains patients, ces néphrons restants sont capables de maintenir une fonction rénale normale le long de la vie du patient, mais chez d'autres patients ils sont progressivement détruits. Cette destruction progressive pourrait conduire à l'incapacité des reins à assurer leur fonction de filtration du sang et d'élimination de déchet.

Les causes d'une atteinte rénale sont multiples, parmi elles, nous pouvons citer les facteurs génétiques, certains produits chimiques contenus dans les médicaments et les atteintes du tissu rénal. Le diabète, l'âge, les facteurs génétiques, l'hypertension artérielle et les syndromes métaboliques sont les principaux facteurs de risque pour le développement d'une maladie rénale. Les problèmes rénaux incluent la mise en place de kystes rénaux, l'apparition de calculs rénaux, les infections rénales et les lésions rénales aiguës. Un fonctionnement anormal du rein pourrait conduire aux maladies cardiovasculaires, à l'insuffisance rénale chronique, à la diminution de la qualité de vie et au décès¹¹².

Maladies rénale congénitale et héréditaire

Kystes rénaux

La présence de kystes peut être acquise : la kystose acquise, ou héréditaire : la polykystose. Les mécanismes communs associés à la formation de kystes rénaux comprennent l'augmentation de la prolifération cellulaire, l'augmentation de la sécrétion de fluide épithéliale et le remodelage de la matrice extracellulaire¹¹³.

Le syndrome d'Alport

C'est une maladie héréditaire entraînant un défaut de filtration glomérulaire associé à des anomalies dans la composition biochimiques de la membrane basale glomérulaire. C'est l'association d'une néphropathie glomérulaire avec hématurie évoluant vers l'insuffisance rénale chronique terminale avec des troubles auditifs voir oculaires. La prévalence de cette maladie est estimée à 1 sur 50 000 naissances¹¹⁴.

Les calculs rénaux

Egalement connus sous le nom de néphrolithiase, les calculs rénaux se produisent lorsqu'un morceau de matériel solide se développe dans les voies urinaires. Ils sont favorisés par une présence en grande quantité de certains minéraux dans les urines. Ils causent rarement des lésions rénales s'ils sont bien traités. Leur taille et leur forme varient, ils peuvent être plus petits qu'un grain de sable ou aussi gros qu'un pois. Rarement, certains calculs rénaux atteignent la taille d'une balle de golf. Ils peuvent être lisses ou irréguliers et sont généralement jaunes ou bruns. Les petits calculs peuvent être transportés par l'urine et excrétés en causant plus ou moins de douleurs. Quand la taille du calcul est supérieure à 5 millimètres, il peut bloquer l'uretère provoquant des douleurs et la présence de sang dans les urines¹¹⁵. Les facteurs de risque sont la présence d'une concentration élevée de calcium dans les urines, l'obésité, certaines nourritures, des médicaments, l'acidose tubulaire rénale, l'hyperparathyroïdie et l'absence de consommation suffisante d'eau¹¹⁶. Les calculs rénaux, lorsqu'ils ne sont pas traités, ils peuvent causer des douleurs atroces, l'hématurie, les infections rénales et la perte de la fonction rénale.

Néphropathies interstitielles

Pyélonéphrites

Lorsque les bactéries pénètrent dans les reins, elles peuvent provoquer des infections, on parle de pyélonéphrite. Les pyélonéphrites sont des infections urinaires très fréquentes, surtout chez la femme. Les bactéries responsables de pyélonéphrite viennent souvent des parties inférieures du système urinaire telles que l'uretère, la vessie et l'urètre. La pyélonéphrite affecte un seul ou les deux reins en même temps. Les infections rénales sont majoritairement liées à une infection à l'*Escherichia Coli* et l'*enterococcus faecalis*. D'autres bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* et les espèces de la famille de *Klebsiella* peuvent également induire des infections rénales. La pyélonéphrite peut être aiguë ou chronique.

Néphroangiosclérose

La néphroangiosclérose est très généralement causée par l'hypertension artérielle qui touche 10% de la population mondiale. Elle apparaît sans causes dans 90% des cas, cependant elle est considérée comme une conséquence des maladies rénales. Lorsqu'elle n'est pas traitée, elle altère la paroi des vaisseaux, notamment les vaisseaux du cœur, du cerveau et des reins au bout de plusieurs années. Elle est par conséquent capable d'entraîner l'insuffisance rénale chronique

(IRC). De manière importante, elle explique au moins 10% des IRC chez les sujets âgés. En traitant l'hypertension artérielle, on arrive à stopper l'évolution de la néphroangiosclérose.

Néphropathie due à l'âge

La fonction rénale chez l'homme et chez l'animal est progressivement altérée au cours du vieillissement, avec une baisse fonctionnelle estimée à 10% par décennie¹¹⁷. Celle-ci correspond à une perte de 0,4 ml/min à 1,02ml/min par année¹¹⁸⁻¹²⁰. Cette perte de la fonction rénale est la conséquence d'une baisse du nombre de néphrons, en particulier du nombre de glomérules fonctionnels, associée à une augmentation du nombre de glomérules scléreux¹²¹. Ces affirmations restent moins élucidées chez l'homme, mais elles sont mieux caractérisées dans les modèles murins. Par exemple, chez les rats Sprague Dawley, il est connu qu'une baisse progressive du nombre de néphrons fonctionnels peut survenir au cours du vieillissement¹²². Cette baisse pourrait induire des lésions glomérulaires associées à une baisse du nombre de podocytes, à une expansion mésangiale, à un épaississement de la capsule de Bowman, puis à l'apparition des lésions de type hyalinose segmentaire et focale. La diminution progressive de néphrons fonctionnels pourrait également s'accompagner de la mise en place progressive de nombreuses lésions tubulointerstitielles. Cependant, l'évolution progressive de la réduction néphronique au cours du vieillissement ne semble pas être systématique, mais dépend du fond génétique, du sexe, du type d'alimentation, et de l'environnement¹²².

Néphropathies glomérulaires ou glomérulopathies

Les néphropathies glomérulaires sont des maladies rénales impliquant une dysfonction de la première barrière de filtration rénale, le glomérule. Cette barrière est essentielle pour la filtration rénale du sang en urine primitive, elle est composée de cellule endothéliale, de la membrane basale et de podocytes. Les glomérulopathies ont une présentation clinique et une évolution aiguë et/ou chronique. Elles représentent environ 40% des causes d'insuffisance rénale terminale. Il existe différentes formes de glomérulopathies qui se différencient à la fois sur le plan d'évolution de la pathologie, sur leur présentation clinique ainsi que sur leur physiopathologie. Souvent elles s'accompagnent d'un syndrome inflammatoire associé à une infection bactérienne et prennent donc appellation glomérulonéphrites ou glomérulites. Les causes de l'apparition de cette maladie sont variées mais peuvent être classées en deux groupes qui sont les glomérulopathies secondaires connues comme étant associées à une maladie bien identifiée telle qu'une infection, une maladie métabolique, une maladie auto-immune, et les

glomérulopathies isolées sans aucune cause connue, dites primitive. Elles sont évoquées lorsque le patient présente une protéinurie, un hématurie, une hypertension artérielle, des œdèmes et une insuffisance rénale aiguë ou chronique.

Le syndrome néphrotique à lésions glomérulaires minimes (LGM)

Le LGM, anciennement appelé néphrose lipoïdique constitue, avec la hyalinose segmentaire et focale primitive le groupe du syndrome néphrotique idiopathique. Il représente 90% des causes du syndrome néphrotique chez les enfants moins de 8ans et seulement 10% des cause de néphropathie idiopathiques de l'adulte. C'est une pathologie à prédominance masculine avec un début brutal après un épisode infectieux ou allergénique. L'absence d'hématurie, d'hypertension et d'insuffisance rénale fait de lui un syndrome néphrotique pur. La présence de douleurs abdominale chez l'enfant et des complications associées, telles que la thrombose et les infections, sont récurrentes chez les patients du LGM.

Glomérulopathie extra-membraneuse (GEM)

La GEM représente 40% des syndromes néphrotiques chez l'adulte. En dehors de la néphropathie diabétique, elle est la première cause de syndrome néphrotique chez l'adulte. Elle se caractérise par des lésions spécifiques et une manifestation pouvant suggérer un syndrome néphrotique impur. Une GEM est dite primitive ou idiopathique car son origine est le plus souvent indéterminée, néanmoins il existe environ 10 à 15% de formes secondaires associées à une maladie sous-jacente telle que les maladies auto-immunes, les infections et les médicaments. Au cours de la maladie on observe, sur les biopsies rénales, une membrane basale épaissie souvent recouverte à sa face urinaire de dépôts d'immunoglobulines ciblant un antigène podocytaire et des fragments du complément C₃. Ces lésions de la membrane basale sont responsables de la protéinurie et de l'hématurie. Les formes idiopathiques peuvent avoir un pronostic favorable à une rémission spontanée, mais elles peuvent également évoluer vers une aggravation et l'apparition de l'insuffisance rénale chronique terminale¹²³. La présence d'anticorps circulants anti-PLA2-R et d'anticorps anti-THSD7 est un diagnostic formel de GEM.

Glomérulonéphrite à dépôts mésangiaux d'IgA

La glomérulonéphrite à dépôts mésangiaux d'IgA, encore appelée maladie de Berger ou néphropathie à IgA, est la plus fréquente des glomérulonéphrites primitives connues à travers le monde. Sa prévalence est d'environ 1,5 pour 1000 habitants pour les formes symptomatiques et touche essentiellement les jeunes adultes avec une prédominance masculine. La physiopathologie de cette maladie est mal connue, néanmoins la moitié des patients présentent

un taux d'IgA sérique élevé et des IgA hypoglycosylées chez la plupart des patients. Ces IgA forment des dépôts de complexes immuns dans les glomérules. La présentation clinique est dominée par l'hématurie macro et microscopique, l'hypertension artérielle et l'insuffisance rénale chronique. Le diagnostic repose sur la mise en évidence des lésions mésangiales associées à la prolifération endo et extra capillaire et des dépôts mésangiaux d'IgA et de C₃.

Glomérulonéphrites rapidement progressives (GNRP)

Les GNRP sont des insuffisances rénales rapidement progressives caractérisées par une baisse du débit de filtration glomérulaire de plus de 50% en moins de trois mois associée à une hématurie, une protéinurie et une hypertension artérielle. Elles représentent une pathologie rare de moins de 1% des insuffisances rénales aiguës pouvant conduire à une destruction rapide des reins. L'absence de diagnostic et la mise en place tardive de traitement spécifique peuvent conduire à l'insuffisance rénale chronique. Sa prévalence est d'environ 17 cas par millions d'habitants par an¹²⁴. Les GNRP représentent 35% des glomérulopathies et 40 à 60% des patients GNRP sont dépendants de la dialyse au moment du diagnostic. Elles sont caractérisées par une prolifération de cellules épithéliales dans la chambre urinaire de la capsule de Bowman (croissants extra capillaires). Ces croissants cellulaires vont devenir fibreux au cours du temps, témoignant l'irréversibilité des lésions rénales mises en place. Elles peuvent être causées par diverses maladies glomérulaires primaires ou systémiques. Les GNRP sont divisées en quatre types distincts¹²⁵.

GNRP de type 1 ou à dépôts linéaire d'IgG : la maladie de Goodpasture

C'est une forme rare constituant un prototype du syndrome pneumo-rénal. Il se définit par une glomérulonéphrite rapidement progressive et une hémorragie intra-alvéolaire. La maladie de Goodpasture est due à la présence d'anticorps anti-Membrane basale glomérulaire circulants et fixés de manière linéaire sur la chaîne $\alpha 3$ du collagène IV le long de la membrane basale glomérulaire (MBG)¹²⁶. Ces anticorps activent le complément et favorisent la mise en place d'une cascade inflammatoire, responsable *in fine* de la destruction de la MBG et de la prolifération extra capillaire. L'atteinte respiratoire s'explique par une forte expression de la chaîne $\alpha 3$ du collagène IV au niveau des capillaires des alvéoles pulmonaires. Son incidence représente 6 à 20% des GNRP¹²⁴.

GNRP de type 2 ou GNRP à dépôt de complexes immuns

Elle est caractérisée par des dépôts glomérulaires endomembraneux abondants de complexes immuns et de complément. C'est une forme rare associée à un groupe hétérogène de pathologies rénales comme le lupus érythémateux disséminé, la maladie de Berger, la cryoglobulinémie

mixte et le purpura rhumatoïde. Son incidence est très variable, elle représente entre 2 et 20% de GNRP.

GNRP de type 3 ou GNRP pauci-immunes

Le type 3 des GNRP apparaît suite à des lésions inflammatoires au niveau des artérioles glomérulaires. Les maladies de ce type ont en commun l'absence de dépôts d'immun dans les glomérules. Elles sont généralement accompagnées par la présence d'anticorps anticytoplasme des polynucléaires (ANCA) et associées à des vascularites à tropisme rénal. Ces ANCA, dirigés contre des enzymes intracellulaires des neutrophiles, provoquent l'activation des cellules polynucléaires neutrophiles qui à leur tour seront impliquées dans la mise en place de la cascade inflammatoire et dans la nécrose de la paroi des petits vaisseaux sanguins. Ils sont souvent associés à une atteinte pulmonaire, ORL ou neurologique. Les ANCA peuvent être cytoplasmique (c-ANCA), dirigés contre la protéinase 3 (anti-PR3) et associés à la granulomatose avec polyangéïte, ou périmucléaires (p-ANCA) dirigés contre la myéloperoxydase (anti-MPO) et associés aux polyangéïtes microscopiques. Dans 80% des cas, on trouve dans le sérum des auto-anticorps anticytoplasme c-ANCA. Elles ont une prévalence supérieure à 50%.

GNRP de type 4

Les GNRP de type 4 se distinguent par l'association de la présence d'anticorps anti MBG et d'ANCA. C'est une forme avec un impact clinique limité et représente 10 à 30% des GNRP de type 1 et 3.

Autres néphropathies glomérulaires

Il existe d'autres types de néphropathies glomérulaires bien connues telles que celles rencontrées dans des maladies générales comme dans le diabète, le lupus érythémateux ou dans le myélome, les glomérulonéphrites infectieuses, l'atteinte rénale des amyloses et la hyalinose segmentaire et focale.

Néphropathie diabétique (ND)

La ND est la première cause d'insuffisance rénale terminale dans les pays développés, elle y représente 25 à 50% des insuffisances rénales terminales. Elle peut être associée aux deux types de diabète, cependant la forme la plus fréquente est celle liée au diabète de type 2 car cette dernière représente 90% des diabètes. L'augmentation de l'incidence du diabète et l'allongement de la survie des patients diabétiques, à cause de l'amélioration progressive des prises en charge des atteintes cardiovasculaires des patients, sont les principales raisons de l'augmentation de l'incidence des néphropathies diabétiques.

Néphropathie lupique

Le lupus érythémateux systémique est une maladie auto-immune caractérisée par la production d'anticorps anti-nucléaire dirigé contre l'ADN cellulaire. L'atteinte rénale associée au lupus survient en général dans les 2 premières années de la maladie chez 40% des patients. Souvent associée à une poussée extra-rénale, elle touche simultanément les deux reins. Ses signes cliniques reposent sur la protéinurie, l'hypertension artérielle, l'hématurie microscopique et l'insuffisance rénale.

Néphropathie du myélome

Le myélome est une pathologie associée à une prolifération monoclonale des plasmocytes. Elle repose sur une infiltration plasmocytaire de la moelle osseuse responsable de la production d'immunoglobuline monoclonale. L'apparition d'une insuffisance rénale, qui représente 30 à 40% des malades au diagnostic, est une complication fréquente au cours de l'évolution de cette maladie. On distingue deux formes de néphropathie du myélome qui sont : l'atteinte des transports tubulaires ou syndrome de Fanconi et l'atteinte glomérulaire appelée amylose AL. L'amylose AL se caractérise par des dépôts de chaînes d'immunoglobulines monoclonales d'aspect granuleux dans les glomérules. Des dépôts monotypiques sous forme de fibrilles non amyloïdes ou de microtubules peuvent se faire au cours des glomérulopathies à dépôts organisés monotypiques non amyloïdes. Le tableau clinique est dominé par l'apparition rapide d'insuffisance rénale terminale.

Néphropathie glomérulaire aigue post-infectieuse

C'est une atteinte glomérulaire qui survient généralement suite à une infection streptococcique. L'insuffisance rénale survient environ 15 jours après un épisode infectieux ORL ou cutané non traité par antibiotique. Elle se manifeste par un début brutal, une insuffisance rénale aigue, une protéinurie glomérulaire, une hématurie macroscopique et une hypertension artérielle. La biopsie rénale met en évidence une prolifération endocapillaire avec afflux de cellules pro-inflammatoires. Selon la sévérité, il est possible de voir une prolifération extra capillaire avec des dépôts de C₃ mésangiaux dans les capillaires glomérulaires et parfois des dépôts volumineux granuleux de C₃ en position extra membraneuse. Les traitements efficaces sont exclusivement symptomatiques, avec une guérison sans séquelles chez 90% des enfants et 80% des adultes.

Les amyloses

C'est un groupe de maladies caractérisé par un dépôt rénal ou diffus d'une substance amorphe constituée de protéines fibrillaire insolubles. On distingue des amyloses AA, facteur de complication de maladies inflammatoires chroniques, des amyloses AL, montrant un dépôt

d'immunoglobulines monoclonales isolées ou d'origine des myélomes, et des amyloses héréditaires. Ces maladies sont généralement révélées lors d'un syndrome néphrotique intense sans hématurie et sans hypertension mais parfois avec la présence de deux reins de volume important. Le syndrome néphrotique est souvent associé à d'autres maladies comme les maladies cardiaques, l'hépatomégalie, la macroglossie, etc.

La hyalinose segmentaire et focale (HSF)

Elle correspond à une lésion histologique glomérulaire et non à une maladie. Sur la biopsie rénale, on observe des dépôts hyalins et des scléroses sur seulement une partie de certains glomérules. On note également la présence de quelques dépôts d'IgM et de C₃ dans les lésions. Lorsque la lésion HSF est isolée et associée à un syndrome néphrotique, elle est appelée syndrome néphrotique idiopathique. Elle représente environ 15% et 20% des syndromes néphrotique de l'enfant et de jeune adulte respectivement. Cette forme de syndrome néphrotique volontiers impur se manifeste par une hématurie, une hypertension artérielle et parfois une insuffisance rénale progressive. Les lésions d'HSF et une moins bonne réponse au traitement par corticoïdes traduisent la sévérité de la maladie. Des mutations dans les gènes codant pour les protéines podocytaires, podocine et néphrine, permettent de diagnostiquer la maladie. L'évolution vers l'insuffisance rénale terminale est très probable en 5 à 20ans. Dans les formes idiopathiques, il y a un risque élevé de récurrence de la maladie et de perte du greffon sur le transplant rénal. Il est important de savoir que les lésions de HSF peuvent apparaître dans la plupart des néphropathies, pas seulement dans le syndrome néphrotique idiopathique, et c'est un phénomène d'aggravation des lésions rénales.

DEUXIEME PARTIE : L'INSUFFISANCE RENALE CHRONIQUE

I. GENERALITES

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est un problème de santé publique mondial, sa prévalence continue d'augmenter à travers le temps. Elle résulte de l'évolution lente et progressive des maladies conduisant à la destruction complète de la structure et des fonctions rénales. En Europe, 40% de la population de plus 70 ans ont IRC. En France, 82000 patients insuffisants rénaux nécessitent un recours à la dialyse ou à la transplantation rénale.

Depuis l'an 2005, elle est considérée comme une priorité globale par l'organisation mondiale de la santé, car toutes les interventions pour essayer d'arrêter sa progression n'ont pas abouti à des résultats satisfaisants. Par conséquent, la compréhension et l'amélioration de la physiopathologie de cette maladie sont essentielles pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

C'est une maladie définie par des altérations persistantes dans la structure et/ou dans la fonction du rein, responsables d'autres complications pour la santé¹²⁷. Une atteinte de la structure ou de la fonction rénale est appelée IRC lorsque celle-ci persiste pendant plus de 3 mois. Elle résulte d'une évolution de maladie rénale chronique ou de l'absence de récupération après une agression rénale aiguë. Les structures anormales du rein incluent la présence de kystes, des tumeurs, des malformations et de l'atrophie. L'altération des fonctions rénales se manifeste par l'hypertension, l'œdème, des modifications de la qualité des urines et un retard de croissance chez les enfants. Ces dysfonctions sont très souvent détectées par des analyses mettant en évidence une augmentation du niveau de créatinine et de cystatine C dans le sérum, de l'albumine dans les urines ou de l'urée sanguin. Les stades de progression de la maladie sont définis sur la base du débit de filtration glomérulaire (DFG) estimé (DFGe) ou mesuré (DFGm) et l'étendu de l'albuminurie¹²⁸. Le DFG et l'albuminurie sont utilisés pour classer l'IRC car le premier est le marqueur de la fonction excrétoire du rein et le second est un indicateur de la dysfonction de la barrière de filtration glomérulaire. Le rein contenant plusieurs unités fonctionnelles, le DFG total correspond au produit du DFG d'un seul néphron multiplié par le nombre total de néphrons. Il est par conséquent important de savoir que l'IRC se définit par une diminution du nombre de néphrons fonctionnels.

Il existe plusieurs causes responsables de l'IRC. Parmi celles-ci nous pouvons citer les maladies génétiques et non génétiques d'origine rénale telles que la polykystose rénale autosomique

dominante, les glomérulonéphrites primitives dont la plus fréquente est celle à dépôt mésangiaux d'IgA, certaines pyélonéphrites et néphrotoxines et d'autres pathologies telles que l'hypertension artérielle ou le diabète sucré.

L'hypertension artérielle et le diabète sont les causes les plus répandues, ils sont responsables d'environ 50% des maladies rénales chroniques qui conduisent à l'IRC en France. Cependant, la polykystose rénale et les glomérulonéphrites primitives, quant à eux, représentent respectivement 8% et 16% des cas¹²⁹.

Les patients IRC ont un risque élevé de progression vers une perte totale des fonctions rénales, appelée phase terminale de la maladie rénale, qui nécessite une thérapie de substitution telle que la dialyse péritonéale, l'hémodialyse ou la transplantation rénale. L'insuffisance rénale chronique pourrait avoir comme conséquence l'apparition d'un certains nombres d'effets indésirables, qui incluent les maladies cardiovasculaire, les lésions rénales aigue, l'invalidité, la diminution de la qualité de vie, les infections et le décès.

Il est utile de classer les IRC par le DFG et l'albuminurie, mais l'identification des facteurs de risques ou des causes sous-jacentes de la maladie est essentielle pour une gestion optimale de la pathologie. L'insuffisance rénale chronique est associée à plusieurs facteurs de complications, tels que l'anémie, l'acidose métabolique et les maladies cardiovasculaires, qui amplifient la complexité de la prise en charge des patients.

II. EPIDEMIOLOGIE

L'insuffisance rénale chronique est considérée comme la maladie chronique la plus négligée, mais il est important de savoir qu'environ 7 à 12 % de la population mondiale sont concernées par cette maladie¹³⁰. En effet, 5 à 10% de la population française seraient atteintes d'une maladie rénale pouvant évoluer vers une insuffisance rénale chronique. C'est une crise majeure de santé publique mondiale. La prévalence des maladies rénales continue d'augmenter dramatiquement et les coûts des traitements représentent une grande partie du budget global mondial alloué à la santé.

Prévalence

La prévalence dans les pays développés se situe entre 1,7 et 6,7%, elle est mal caractérisée dans les pays à revenu faible ou intermédiaire en raison d'une absence d'étude et d'évaluation standardisées^{131,132}. Néanmoins, en Asie du Sud-Est, dans certains pays d'Amérique latine et en Afrique subsaharienne, la prévalence est estimée entre 10 et 16% de la population¹³²⁻¹³⁴.

Il existe très peu de connaissance épidémiologique sur l'insuffisance rénale chronique des enfants à cause de l'absence de registre et le fait que les enfants ne sont pas souvent inclus dans les études cliniques. En Europe, l'incidence pédiatrique des maladies rénales au stade terminal en 2016 était de 5,6 par millions chez les enfants de 0 à 14 ans¹³⁵. Dans les pays développés, les maladies congénitales des voies urinaires sont majoritairement responsables des IRC pédiatriques, contrairement aux pays en voies de développement où les infections et les maladies glomérulaires sont les principales causes¹³⁶.

Facteurs de risques

L'insuffisance rénale chronique est fréquente chez les personnes de plus de 65 ans mais la probabilité de progression au stade terminal est plus élevée chez les moins de 65 ans vivant avec l'IRC¹³⁰. Bien que la prévalence de l'IRC soit plus élevée chez les femmes que chez les hommes, les hommes sont plus susceptibles de progresser vers le stade terminal¹³⁰. Le diabète sucré et l'hypertension artérielle sont des pathologies le plus couramment associées à l'IRC, en particulier dans les pays en voie de développement. La prévalence de l'apparition d'IRC chez les diabétiques est estimée entre 30 et 40%. Il est établi que dans les pays en voie de développement, l'IRC est souvent associée aux maladies infectieuses, aux glomérulonéphrites et à l'utilisation de médicaments néphrotoxiques^{137,138}. Dans ces pays, les tendances en matière de statut socio-économique et le vieillissement de la population vont dans le futur augmenter la prévalence de l'IRC, le diabète et l'obésité pourraient éventuellement devenir la cause principale de cette augmentation.

Les accouchements prématurés ou les problèmes de croissance intra-utérine sont associés à l'apparition de l'IRC plus tard. Le risque de développer une IRC suite à une naissance prématurée ou à une insuffisance pondérale néonatale sont respectivement 10% et 15%. Cependant, ces données suggèrent que des millions d'enfants naissent avec un risque élevé de développer une insuffisance rénale plus tard, ce risque s'explique par un nombre insuffisant de néphrons^{139,140}.

Parmi les populations à risque de IRC, on trouve les autochtones Australiens, les africains, les afro-américains, les hispaniques du continent américain, les autochtones du Canada, les populations du sud et de l'est de l'Asie et les personnes vivants dans les îles de l'océan pacifique. Ces populations sont à risque en raison de facteurs génétiques ou en raison de la combinaison de facteurs génétiques et environnementaux¹⁴¹.

Les néphropathies endémiques de l'IRC suggèrent l'implication de facteurs régionaux qui incluent les infections, les toxines, les comportements et le climat¹⁴².

Traitement de remplacement du rein

La plupart des pays ne connaissent pas le nombre exact de leurs patients vivant avec l'IRC, seules les informations provenant des traitements de remplacement des reins sont utilisées pour estimer le nombre de patients¹⁴³.

La dialyse est la thérapie de remplacement la plus utilisée à cause du manque de rein de donneur disponible pour la transplantation. À l'échelle mondiale, l'hémodialyse est le traitement le plus courant, à l'exception de Hong Kong, où la dialyse péritonéale est le traitement préféré^{144,145}.

Le taux de transplantation rénale varie énormément d'un pays à un autre. En Europe, plus de 50% des patients sous dialyse reçoivent des reins par transplantation¹⁴⁶. Contrairement à certains pays asiatiques tels que le Japon, le Taiwan et les Philippines, où la transplantation est rarement pratiquée¹⁴⁴. La transplantation rénale est rarement effectuée dans ces pays pour des raisons culturelles, des facteurs socio-économiques, le manque de centre de biopsies ou l'insuffisance de structures de recherche sur la transplantation. Les estimations montrent que l'insuffisance générale des traitements de substitutions concerne entre 2 et 7 millions de personnes par an¹⁴⁷. De plus même lorsque les services sont disponibles, l'accès peut être limité à cause des coûts, du nombre élevé de demande et des politiques spécifiques.

Il faut savoir que les maladies rénales chroniques augmentent l'incidence d'autres pathologies, telles que les maladies cardiovasculaires (crise cardiaque et accident vasculaire cérébral), capables d'entraîner la mort prématurée ou l'invalidité. La prise en charge de ces effets secondaires en même temps que le traitement de substitution de la fonction rénale proposé, est une raison de la nécessité d'un budget conséquent pour soigner un patient insuffisant rénal chronique.

Dans les pays développés, la dialyse et la transplantation rénale au cours de l'insuffisance rénale terminale représentent un coût financier colossal pour les patients, leurs familles et pour l'État. De ce fait, l'IRC représente une part non négligeable du budget mondial dédié à la santé. Selon un rapport du NHS, en Angleterre, les maladies du rein coûtent plus cher que l'ensemble des coûts liés aux cancers du sein, du poumon, du colon et de la peau. Aux États-Unis, le traitement de l'IRC coûte plus de 48 milliards de dollars par an et le programme ESRD (End Stage Renal Disease) consomme 6,7% du budget total alloué à la santé pour couvrir moins de 1% des personnes concernées. En Chine plus de 558 milliards de dollars seront nécessaires au cours de la prochaine décennie pour essayer de maîtriser les handicaps et les décès dus à cette maladie. Dans les pays en voie de développement, l'accès aux soins général augmente progressivement mais les soins de substitution des reins restent inabordables pour la majorité des patients. Par conséquent, de nombreuses personnes ne reçoivent pas de traitements de remplacement du rein bien qu'elles soient atteintes d'insuffisance rénale chronique. Cependant les estimations actuelles sur l'incidence et sur la prévalence de la maladie, basées sur les données de dialyses, ne sont pas précises en raison de l'accessibilité limitée pour certains patients.

La mortalité

Les personnes atteintes d'IRC ont un risque de mortalité considérablement accru par rapport à la population générale. Le risque de décès est beaucoup plus élevé que le risque de progression de la maladie vers le stade terminal. Une grande partie des décès liés à cette maladie est due aux événements cardiovasculaires qui lui sont associés.

Les études récentes indiquent que l'IRC a connu une croissance continue au cours de ces 20 dernières années, et le diabète semble y avoir une contribution non négligeable¹⁴⁸. La mortalité liée à la maladie a également progressé ces 25 dernières années. Les invalidités représentent 1,35% des invalidités de toutes causes et connaissent une progression d'environ 1% par an^{148,149}. Ces données sont en grande partie basées sur le premier système de classification de l'IRC dans lequel l'albuminurie était exclue de la définition de la maladie. La mortalité augmente avec la diminution du DFGe et l'augmentation de l'albuminurie, elle est plus élevée chez les patients dialysés¹⁵⁰. Il est important de noter que la survie après 5 ans en hémodialyse ou en dialyse péritonéale est de 40 à 50%^{144,146}. L'espérance de vie des patients dialysés est environ le tiers de celle de la population générale du même sexe et du même âge. Elle est de 45 à 85% de celle de la population transplantée. Cependant les patients transplantés depuis 5 ans

avec un rein provenant de donneur décédé ont un taux de survie de 86% et pour ceux ayant reçu un rein de donneur vivant est de 93%^{144,146}.

III. PROGRESSION

Les maladies rénales chroniques sont caractérisées par une diminution progressive du nombre d'unité fonctionnelle du rein aboutissant à l'apparition du stade terminal de l'IRC. Ce déclin progressif de la fonction rénale n'est observé que chez certains patients, mais dévient plus évident lorsque les fonctions du rein sont affectées avec une baisse du DFG¹⁵¹. Cette altération fonctionnelle progressive est associée à la destruction structurale du parenchyme rénal qui peut initialement être glomérulaire (glomérulosclérose, hyalinose segmentaire et focale), l'interstitiel (fibrose interstitielle et infiltrat inflammatoire), tubulaire (atrophie ou dilatation tubulaire) ou mixte. Ces lésions, indépendamment de leur cause initiale, vont détruire progressivement les néphrons restants pour à long terme aboutir à l'insuffisance rénale chronique, qui requiert un traitement de substitution.

Les mécanismes complexes et multifactoriels impliqués dans cette altération fonctionnelle du rein ont été très étudiés. Il est connu que l'hypertension artérielle systémique est souvent diagnostiquée chez les patients souffrants d'une IRC avancée, mais celle-ci est considérée comme une conséquence et non une cause de la néphropathie évolutive.

Le développement de modèles animaux de réduction néphronique a joué un rôle essentiel dans l'avancé des connaissances sur les mécanismes de progression des maladies rénales chroniques. Notamment, l'utilisation de la technique de néphrectomie subtotale chirurgicale (Nx) chez le rat dans les années 1930 a permis l'identification d'importantes observations physiopathologiques de la progression des maladies rénales. L'introduction des techniques de microponctions glomérulaire et tubulaire chez les rats Munich-Whistar avec des glomérules superficiels, en 1970, a permis la mesure de la pression intra glomérulaire et du DFG des néphrons restant après la néphrectomie subtotale. Les modifications hémodynamiques rénales, accompagnées d'une augmentation de la pression intra glomérulaires, d'une hyperfiltration et d'une hypertrophie glomérulaire aboutissent à la sclérose et à la destruction progressive de la barrière de filtration glomérulaire¹⁵². Ces problèmes hémodynamiques induisent aussi l'augmentation du volume des néphrons restants, qui est maximale vers le 14^{ème} jour après la néphrectomie. La prolifération et l'hypertrophie cellulaires sont les principales causes de cette

augmentation du volume des néphrons¹⁵³. La protéinurie et l'IRC s'aggravent progressivement et conduisent à la mort de l'animal. Les lésions observées dans ce modèle sont superposables à celles des maladies rénales chroniques (MRC) chez l'homme. Il a été ensuite montré que l'utilisation des inhibiteurs du système rénine angiotensine était associée au ralentissement de la progression des lésions rénales¹⁵³.

Ces données jouèrent un rôle important dans la mise en place d'une théorie générale de la progression des MRC. Elles permettent ainsi d'élaborer la théorie de la surcharge des néphrons restants en tant que centre névralgique de la progression des maladies rénales¹⁵⁴. Selon cette théorie, les mécanismes d'adaptation mise en jeu suite à la réduction néphronique auront pour conséquence l'augmentation du stress mécanique et métabolique sur les néphrons restants, provoquant ainsi leur destruction progressive par des mécanismes cellulaires et moléculaires qui ne sont que partiellement connue et l'efficacité thérapeutique est actuellement absente.

Altération du compartiment tubulointerstitielle

En plus de l'hypertrophie glomérulaire adaptative avec le risque de développement de lésions glomérulosclérose, la réduction néphronique résulte aussi d'une altération du compartiment tubulointerstitielle.

Les mécanismes d'induction de la fibrose sont complexes et constituent un élément d'aggravation des lésions rénales. La fibrose est le résultat d'une augmentation quantitative et qualitative de la matrice extracellulaire rénale¹⁵⁵. Plusieurs études ont montré qu'au cours des néphropathies chroniques, les fibroblastes interstitiels étaient les principales cellules productrices de la matrice extracellulaire^{156,157}. Ces fibroblastes responsables de la fibrose interstitielle ont une origine très débattue, cependant ils pourraient provenir des cellules tubulaires¹⁵⁸, des cellules endothéliales¹⁵⁹ ou de péricytes¹⁶⁰. La transition épithélio-mésenchymateuse des cellules rénales fait l'objet d'important débat depuis quelques années¹⁶¹.

Les cellules tubulaires s'adaptent à la réduction néphronique en augmentant leur masse cellulaire. L'altération progressive de la fonction rénale s'associe quant à lui à une raréfaction, une atrophie, une dédifférenciation ou une augmentation de la prolifération des cellules tubulaires^{154,162,163}. Monsieur *J.V Bonventre* et son équipe ont montré qu'il existe un lien direct entre la prolifération des cellules tubulaires et la fibrose rénale¹⁶⁴. Ils ont établi que, dans différents modèles de néphropathies chroniques, la sécrétion des molécules favorisant la progression de la fibrose rénale était assurée par des cellules tubulaires bloquées en phase de

transition G2/M du cycle cellulaire. Ce blocage en phase G2/M est dépendant de la voie ATM/ATR. Cependant, le rôle de la desquamation, de la prolifération et de la mort des cellules tubulaires au cours de la progression des MRC n'est pas très bien connu.

La réduction néphronique, comme nous l'avons vu, va induire des lésions de hyalinose segmentaire et focale associées à une protéinurie. De nombreuses études chez l'homme ont démontré une forte association entre le débit de protéinurie et le risque de progression des maladies rénales¹⁶⁵. De plus, le contrôle de la pression artérielle et le blocage du système rénine-angiotensine-aldostérone réduisent la protéinurie et ralentissent la progression des néphropathies chroniques¹⁶⁶. Lorsque les cellules tubulaires proximales en culture sont exposées à de fortes concentrations de protéines du plasma, incluant l'albumine, les protéines du complément, les immunoglobulines ou la transferrine, elles sécrètent des molécules pro-fibrosantes et pro-inflammatoires, associées à la prolifération ou à l'apoptose¹⁶⁷. Si l'albumine est la protéine plasmatique dont les effets délétères sur le tubule ont été très étudiés, certaines observations conduisent à requalifier sa fonction dans la progression des lésions rénales. En effet, il a été montré dans les années 1990 que les rats spontanément analbuminémique soumis à différentes néphropathies chroniques développeraient des lésions aussi marquées que des rats normo-albuminémique, en dépit d'une baisse importante de la protéinurie et d'une absence d'albuminurie^{168,169}. Ces rats présentent cependant une hypertriglycémie ainsi qu'une augmentation des globulines circulantes qui pourraient avoir un rôle néfaste dans la progression des lésions du rein. Il a été montré dans un modèle de néphropathie protéinurique, que l'inhibition de l'endocytose protéique des cellules tubulaires proximales ne modifiait pas la progression des lésions tubulo-interstitielles¹⁷⁰. Enfin, il est important de savoir que la majorité des études suggérant que la protéinurie pouvait avoir des effets délétères dans la progression des lésions rénales chroniques était basée sur l'effet spectaculaire des inhibiteurs du système rénine-angiotensine sur la protéinurie et sur la progression des lésions rénales. Cependant, dans des modèles de néphropathies non protéinuriques chez le rongeur, il a été montré que le blocage de ce système semble avoir un effet protecteur sur le parenchyme rénal^{171,172}, de ce fait la protéinurie en pourrait être qu'un facteur confondant. Ainsi, si la protéinurie et l'albuminurie constituent des biomarqueurs cliniques précieux, le lien causal direct entre protéinurie et progression de maladies rénales chronique n'est pas clairement établi.

Atteintes du compartiment glomérulaire

La réduction néphronique favorise l'augmentation du stress hémodynamique et métabolique sur les néphrons restants. La première partie du néphron, constituée par le glomérule, subit directement les contraintes mécaniques et métaboliques associées à la réduction néphronique. Ainsi, l'un des premiers changements morphologiques suite à la réduction néphronique est l'augmentation du volume glomérulaire¹⁷³⁻¹⁷⁶. Le volume des glomérules augmente progressivement en même temps que l'hypertrophie de l'ensemble du rein et apparaît précocement dès le 2^{ème} jour après la Nx¹⁷⁷. Cette augmentation du volume implique de la même manière l'ensemble des glomérules qu'il s'agisse de glomérules superficiels ou profonds juxta-médullaire. L'hypertrophie glomérulaire a été montrée grâce à la mesure de son volume en microscopie électronique et par l'augmentation des ratios ARN/ADN et protéines/ADN glomérulaire¹⁷⁷. Elle est le résultat d'une triple association incluant l'expansion de la matrice mésangiale, l'augmentation de la pression intracapillaire et l'hypertrophie podocytaire.

L'augmentation du volume du glomérule est un mécanisme adaptatif à l'hyperfiltration qui peut s'avérer délétère, avec le développement progressif de lésions de type hyalinose segmentaire et focale puis de la glomérulosclérose. Ainsi l'hypertrophie glomérulaire, rencontrée sur les biopsies préimplantatoire de certains donneurs de reins, est corrélée avec une mauvaise fonction rénale à long terme chez les receveurs¹⁷⁸. De même une hypertrophie glomérulaire, une réduction du nombre de néphron et une grande prévalence de MRC sont fréquemment observées sur les biopsies rénales d'Aborigènes Australiens, une population caractérisée par leur petit poids à la naissance¹⁷⁹⁻¹⁸¹. S'il est très probable que tous les compartiments cellulaires du glomérule pourraient être touchés par le développement des lésions, plusieurs données expérimentales ont permis l'identification des podocytes au centre du processus responsable de la progression des lésions glomérulaires au cours des néphropathies chroniques^{182,183}.

En effet, l'analyse des déficits génétiques de protéines podocytaires est le premier groupe d'arguments suggérant un rôle des podocytes dans le développement des lésions glomérulaires au cours de la MRC. Chez le modèle murin comme chez l'homme, les altérations des gènes codants pour des protéines importantes du podocyte sont responsables des lésions glomérulaires et tubulo-interstitielles superposables à celles observées au cours de la progression des néphropathies chroniques¹⁸⁴.

De plus une baisse du nombre de podocytes est rencontrée dans différentes MRC humaines ou expérimentales¹⁸⁵⁻¹⁸⁸. Le niveau de raréfaction podocytaire et l'importance des lésions glomérulaires partagent également une corrélation significative.

Le lien de causalité entre perte podocytaire et lésion glomérulaire a été démontré ces dernières années. En effet, un groupe a produit des modèles de rats transgéniques exprimant spécifiquement à la surface des podocytes le récepteur humain de la toxine diphtérique. Ce modèle, qui a permis une déplétion podocytaire dépendante de la dose de toxine diphtérique injectée, a montré que la perte de podocytes induit des lésions glomérulaires dont la gravité était en fonction du nombre de podocytes perdu¹⁸⁹. Il apparaît ainsi qu'une perte d'environ 20% du nombre total de podocyte était associée au développement d'une protéinurie modérée et des changements histologiques associant l'expansion mésangiale et quelques synéchies flocculo-capsulaires. Cependant, la fonction rénale reste conservée. Une hypothèse pour expliquer cette protéinurie transitoire est la capacité des podocytes restants à couvrir rapidement les parties de la membrane basale dépourvue de podocytes. Ce qui permettrait d'éviter la protéinurie mais aussi le développement des lésions. Une déplétion podocytaire de 21 à 40% provoque une protéinurie modérée mais persistante, avec une expansion mésangiale, la formation de synéchies et de lésions glomérulaires de type hyalinose segmentaire et focale. Les podocytes survivants seraient incapables de compenser, expliquant l'apparition des lésions. Lorsque la perte podocytaire dépasse 40% du total des podocytes, on constate l'apparition d'une protéinurie abondante, des lésions de glomérulosclérose et l'altération des fonctions rénales. Ces résultats sont superposables à ceux obtenus chez le rat traité avec des doses croissantes d'adriamycine ou en corrélant perte podocytaire et débit de protéinurie chez les patients diabétiques^{187,190}.

De nombreux mécanismes pourraient expliquer la diminution du nombre de podocytes au cours de la progression des MRC. Cependant, l'apoptose¹⁹¹, la dédifférenciation ou le détachement des podocytes et leur éliminations dans les urines¹⁹² participent probablement, à des degrés divers, à la disparition des podocytes.

La perte des podocytes est certainement aggravée en raison de leur incapacité d'expansion. En effet, contrairement aux autres cellules du glomérule, les podocytes, sauf dans certaines pathologies particulières¹⁹³, ont une faible capacité de prolifération^{13,194}. Cette particularité des podocytes et d'autres cellules très spécialisées, comme les neurones, est en partie due à une expression importante des inhibiteurs, tels que p21, p27 et p57, qui empêchent l'entrée en cycle cellulaire¹⁹⁵.

Le potentiel d'auto-renouvellement des podocytes étant considérablement réduit, la possibilité d'un remplacement des cellules perdues par des cellules initialement non podocytaires est très

débatte actuellement. Certaines données expérimentales suggèrent que les cellules hématopoïétiques^{196,197} ou certaines cellules de la capsule de Bowman¹⁹⁸ étaient capables de se différencier en podocytes. L'existence de ces phénomènes et leur contribution à l'apparition des lésions glomérulaires restent inconnues¹⁹⁹.

Ainsi, il reste admis que dans l'hypertrophie glomérulaire associée à la réduction néphronique, la perte podocytaire provoque un déséquilibre entre un faible nombre de podocytes et une augmentation de la surface de la MBG à couvrir. Ce déséquilibre est proportionnel au développement des lésions hyalinose segmentaire et focale qui sont à leur tour associées au détachement des pieds de podocytes de la MBG^{183,186}.

Récemment *Canaud G et al* ont montré que la voie de signalisation AKT2 et mTORC2 joue un rôle important dans les mécanismes d'adaptation des podocytes pour faire face à la réduction néphronique²⁰⁰. Cependant, afin d'identifier d'autres molécules ou d'autres voies de signalisation qui pourraient également être impliquées, nous nous sommes intéressés à REST (Rel Silencing Transcription Factor).

TROISIEME PARTIE : RE1 SILENCING TRANSCRIPTIONS FACTOR (REST)

I. HISTORIQUE

Après la découverte du rôle fondamental de la voie signalisation Notch et du facteur de transcription HES1 dans la répression de la différenciation neuronale au début de l'embryogenèse, il était difficile de déterminer comment cette répression de l'expression des gènes neuronaux était maintenue de manière permanente tout au long de la vie des cellules non neurales différenciées. L'identification sur le promoteur de certains gènes neuronaux d'une séquence de 23 paires de base cible pour la répression, appelée Repressor Element 1 (RE1) a permis aux équipes de recherche dirigées par Gail Mandel et par David Anderson de découvrir indépendamment un répresseur transcriptionnel qui se lie à cette séquence RE1. Ils l'ont nommé respectivement REST (RE1 Silencing Transcription factor) et NRSF (Neuron Restrictive Silencing Factor)^{201,202}.

Depuis sa découverte, REST fait l'objet de plusieurs sujets de recherche dans plusieurs domaines de la biologie du développement, de la transcription ainsi que dans plusieurs pathologies. L'identification de plusieurs cibles endogènes contenant RE1 a permis de mettre en évidence la polyvalence de REST et de donner une ouverture pour explorer les mécanismes de transcription basiques, y compris les mécanismes épigénétiques impliquant l'activation transcriptionnelle par acétylation des histones et la répression transcriptionnelle par désacétylation des histones^{203,204}.

II. GÈNE *Rest*

Le gène *Rest*, encore appelé DFNA24, GINGF5, HGF5, NRSF, WT6 ou XBR, est localisé sur le chromosome 4 à la position 12 et couvre 24 kb du génome humain. Il est composé de trois exons alternatifs 5' non-codant capable de s'associer à différents promoteurs de gènes, trois exons codants et un exon alternatif interne qui sont épissés en transcrit neuronal et associé à des transcrits impliqués dans des maladies (figure 5).

Le gène *Rest* code pour un ARN messager de référence de 3663 paire de base composé de 4 exons. Cependant, Les données actuelles indiquent qu'il existe au moins six différents variant d'épissage (figure 5) associés à l'expression de gènes neuronaux et à certaines pathologies.

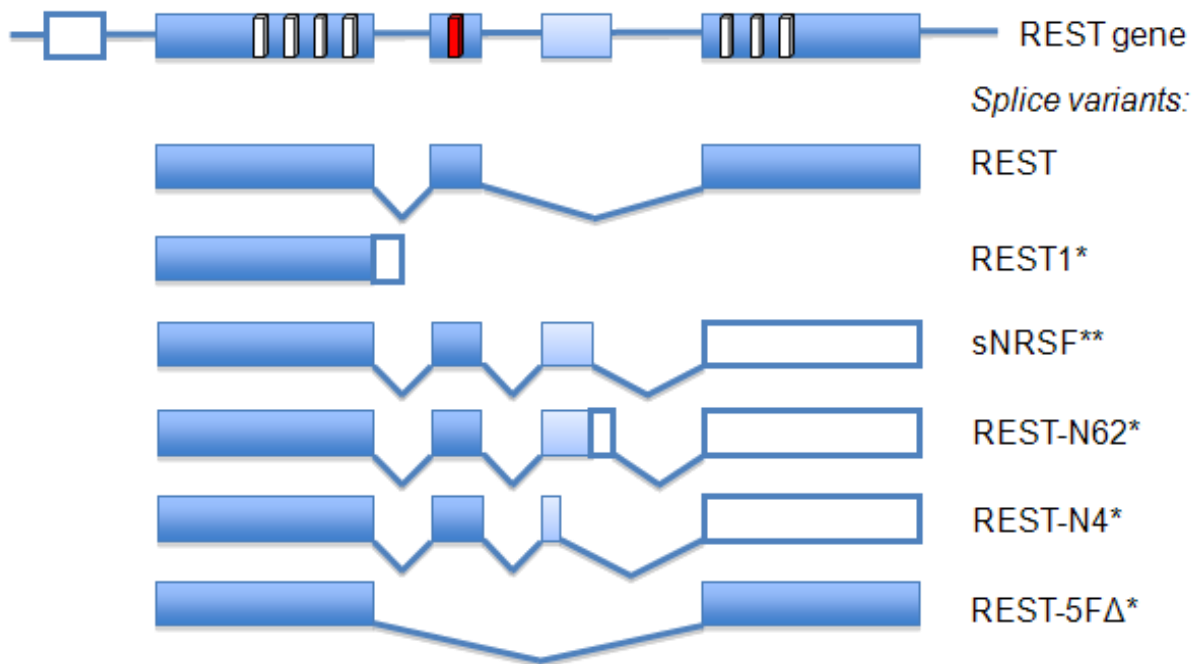


Figure 5 : Représentation schématique de l'ARN messager de REST et ses variant d'épissage alternatif. En haut, REST humain avec ses 3 principaux exons (en bleu foncé), son exon alternatif (en bleu clair) et l'un des trois exons alternatifs 5' non-codant (en blanc). Les positions approximatives de la séquence codant huit doigts de zinc sont illustrées par des cases, associées à une liaison à l'ADN (en blanc) ou à une translocation nucléaire (en rouge). En bas, les 6 variant d'épissage. D'après²⁰⁵, adapté de ²⁰⁶(*) et de ²⁰⁷(**).

III. PROTEINE REST

Isoformes :

L'ARN messager code pour une protéine REST membre de la famille des facteurs de transcription Kruppel-type zinc finger. L'ARNm de référence code pour l'isoforme 1, REST 1 et REST-5FΔ codent pour l'isoforme 2 ou 4. L'exon alternatif dans REST-N62, REST-N4 et sNRSF(N50) introduit un codon stop et tous les trois ARNm codent pour l'isoforme 3.

Les différents isoformes sont:

- Isoforme 1 : protéine de 122kDa constituée de 1097 acides aminés, c'est la séquence canonique ; il comprend deux domaines de répression (RD1 et RD2), un domaine lysine (400-603), un domaine proline (595-815), un domaine de liaison à l'ADN (159-412) de huit zinc finger, deux domaines de localisation nucléaire, un phosphodégron (E1009/S1013 ou S1027/S1030) et zinc finger C-terminal (1006-1082) (figure6).

- Isoforme 2 : protéine de 35 kDa (Δ 314-1097), 313 acides aminés, elle est tronquée, contient seulement 1 à 4 zinc finger et est localisée dans le cytoplasme.
- Isoforme 3 : protéine de 37 kDa (Δ 330-1097) constituée de 329 acides aminés, appelé aussi REST4 ou sNRSF, il est exprimé uniquement dans les neuroblastomes et dans les SCLC (small cell lung carcinoma). Il n'a pas de domaine RD2, il a un domaine tronqué de liaison à l'ADN avec 1 à 5 zinc finger et un domaine de localisation nucléaire.
- Isoforme 4 : protéine de 119 kDa (Δ 304-1326), 1074 acides aminés, possède une délétion sélective au niveau du zinc finger 5.

Localisation

REST est normalement localisé dans le noyau, cependant certains de ses isoformes peuvent avoir une localisation différente. Sa translocation nucléaire dépend d'un signal de localisation nucléaire (NLS) et peut être influencée par l'association à d'autres protéines telles que PRINCKLE1 (RILP), HTT et DCTN1²⁰⁸. Il peut également être recruté par TRF2 au sein des corps nucléaire PML.

Structure et fonctions

Structure

Le paralogue le plus proche de REST est ZNF407. REST réprime la transcription en se fixant sur la séquence d'ADN appelée neuron-restrictive silencer element (NRSE) et recrute différents corépresseurs, tels que HDAC, G9a, MeCP2, Sin3a, Sin3b, BRG1, LSD1 et CoREST (figure 6). Le domaine N-terminal (RD1) recrute HDACs et Sin3 pour initier la répression de l'expression du gène cible et le domaine C-terminal (RD2) recrute le plus grand complexe contenant BRG1, HDAC, MeCP2, LSD1 et G9a via CoRest (figure 6). Ce Complexe répresseur est responsable de la désacétylation des protéines d'histones et donc de l'inhibition de l'expression du gène cible²⁰⁹.

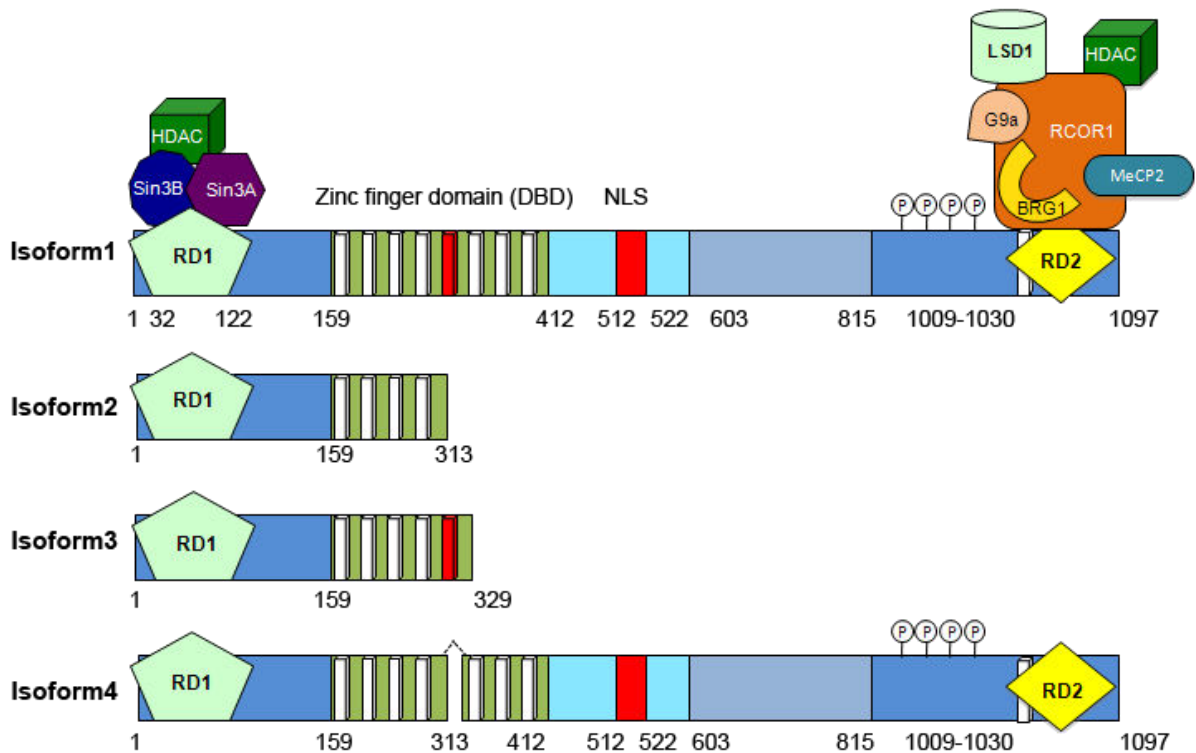


Figure 6 : illustration schématique de la protéine REST et ses isoformes alternatives. D'après²⁰⁵ et adaptée de^{206,207,210}.

Fonctions

REST est exprimé au cours du développement et présente un niveau d'expression dépendant du tissu, du cycle cellulaire ou de l'état pathologique. Son expression, contexte dépendant, est régulée par la transcription différentielle, l'épissage et la dégradation induite par le protéasome. Il est peu exprimé dans les tissus neuronaux différenciés, cependant, il joue un rôle essentiel au cours de l'embryogenèse, car les souris dépourvues de REST meurent au jour embryonnaire 11,5. Bien que ces souris paraissent normales jusqu'au jour embryonnaire 9,5, la mort par apoptose des cellules résulte de l'apparition des malformations dans le système nerveux au cours du développement associée à une croissance limitée²¹¹. Dans les tissus adultes, REST est exprimé de manière ubiquitaire et montre une accumulation préférentielle dans les tissus lymphocytaires, tels que la rate, le thymus, les lymphocytes périphérique du sang et dans les ovaires²¹².

C'est un répresseur transcriptionnel identifié en 1995, son rôle consiste à réguler l'expression des gènes cibles. Il est recruté sur le motif RE1 ou NRSE localisé sur le promoteur des gènes neuronaux. Il fut identifié comme un répresseur de la transcription des gènes neuronaux dans les tissus non neuronaux et dans les cellules souches^{213,211}. Son rôle de régulateur principal de la neurogénèse et de facteur important dans les cellules neuronales et non neuronales a été

démontré²¹². Il orchestre la différenciation neuronale et préserve le phénotype unique neuronal. Il est impliqué dans plusieurs processus biologiques et dans plusieurs voies de signalisation (Figure 7). Il régule par exemple les canaux ioniques, les facteurs de croissances, les hormones, les protéines du cytosquelette et d'autres facteurs de transcriptions²⁰⁴. Comme exemples précis de régulation d'expression de gènes, nous pouvons citer celle de MAD2 qui joue un rôle important dans la mitose, dans la recombinaison de l'ADN et régule plusieurs protéines neurosécrétoires qui affectent le bon fonctionnement de la vésicule présynaptique et l'exocytose des facteurs sécrétés²¹⁴⁻²¹⁶. REST joue aussi un rôle dans la régulation de l'enzyme de désubiquitination UCHL1 qui affecte l'ubiquitination et la stabilité induit par le protéasome. Il affecte également la stabilité du récepteur VEGF, NRP1 qui influence la migration cellulaire et l'angiogenèse^{217,218}. L'ablation de REST inhibe la production des composants de matrice extracellulaire de laminine et joue le rôle de régulateur de l'expression des canaux potassiques²¹⁹. Il interagit avec plusieurs signaux des cascades de transduction intracellulaire, tels que la voie PI3K, WNT et Hedgehog²²⁰⁻²²³. En plus de son rôle de régulateur transcriptionnel, REST contrôle aussi l'expression d'une famille de micro-ARN qui à leur tour régule d'autres ARNm cibles²²⁴. Par exemple, il réprime l'expression des micro-ARN impliqués dans la régulation des complexes de la chromatine, essentiels pour la transition des neurones post-mitotiques²²⁵.

Il joue un rôle important dans la prolifération, la survie et la migration cellulaire (Figure 7). Cependant son effet est contexte dépendant. REST est impliqué dans différents cancers, où il est souvent exprimé de manière aberrante (Figure 7). Il agit comme un oncogène dans les cellules neuronales et dans certaines tumeurs telles que les médulloblastomes, les neuroblastomes et les glioblastomes (Figure 7). Mais de façon contradictoire, il a un effet anti tumoral dans les cellules épithéliales impliquées dans le carcinome pulmonaire, dans le cancer du sein et du colon (Figure 7)^{220,226}. Les mécanismes expliquant cette différence et les approches thérapeutiques impliquées ne sont pas bien connus. Il a été montré que REST et ses cofacteurs sont impliqués dans plusieurs maladies telles que l'hypertrophie cardiaque, l'ischémie, l'épilepsie, la trisomie 21, la maladie de Huntington ou le retard mental lié au chromosome X²²⁷⁻²³³.

Pendant l'embryogénèse REST est essentiel pour la survie des neurones, car il réprime les gènes impliqués dans le guidage axonal, la synaptogénèse et la plasticité synaptique^{213,234}. Dans les neurones mature, le niveau de REST est diminué, il se trouve généralement séquestré dans le

cytoplasme^{208,234-236}. Cependant il a été montré que l'expression de REST est augmentée et localisée dans le noyau au cours du vieillissement¹.

Dans le cerveau adulte REST régule l'excitabilité neuronale et la libération des neurotransmetteurs en contrôlant l'expression des protéines pré et post-synaptiques ainsi que celle des gènes codant pour les canaux et les transporteurs. Par exemple, il régule l'expression des protéines essentielles aux récepteurs des neurotransmetteurs, il régule aussi celle des protéines SNARE impliquées dans le trafic vésiculaire synaptique et dans signalisation par la neurotrophine²³⁷. Bien que REST soit important pour le développement neuronal et le maintien de la physiologie des neurones, une activation aberrante de REST conduit aux dysfonctionnements neurologiques. Plusieurs études ont clairement montré l'implication de REST dans plusieurs troubles neurodégénératifs tels que dans l'épilepsie, dans la maladie d'Alzheimer, dans la maladie de Huntington et dans la maladie de Parkinson(Figure 7)^{1,209,227,236,238}.

Dans les cellules souches pluripotentes et les progéniteurs neuronaux, REST agit en effectuant un remodelage épigénétique. Il réprime activement plusieurs gènes neuronaux codants ou non codants impliqués dans la synaptogenèse, le repérage axonal, la plasticité synaptique et dans le remodelage structurel impliquant les protéines vésiculaires synaptiques, les canaux, les récepteurs, les transporteurs ainsi que les microRNAs spécifiques des neurones qui régulent les réseaux de gènes non neuronaux²³⁹⁻²⁴². Des études *In silico* ont permis d'identifier environ 2000 gènes cibles putatives codant ou non codant de REST dans le génome de mammifère^{204,243}. Pendant la phase finale de la différenciation neuronale, la perte d'expression de REST est essentielle pour l'acquisition du phénotype neuronal.

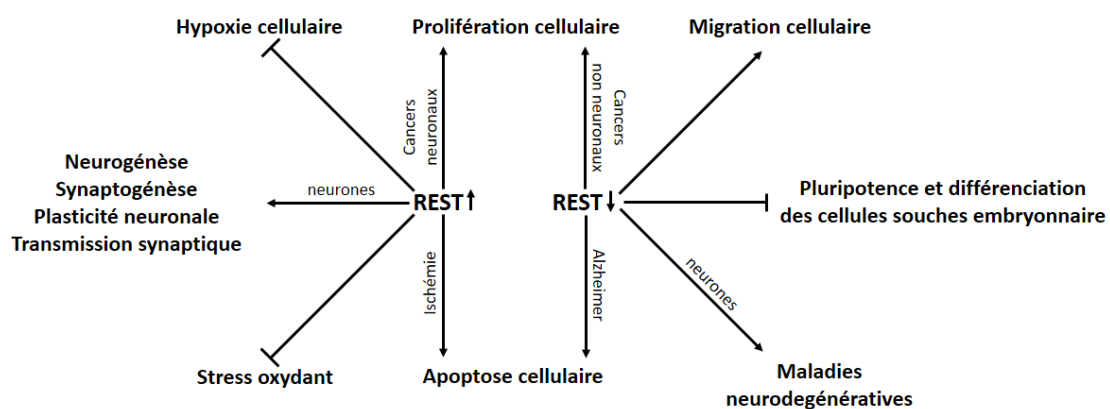


Figure 7 : schéma récapitulatif des fonctions cellulaires connues de REST. D'après^{1,4,211,237,244-248}

IV. MECANISME D'ACTION

REST interagit avec un large répertoire de protéines capables de modifier la chromatine. Parmi celles-ci, nous pouvons citer le répresseur transcriptionnel SIN3A/SIN3B qui interagi avec le domaine RD1, la méthyle-CpG binding protein 2 (MeCP2) et avec plusieurs autres protéines capables de se lier sur le domaine RD2²⁴⁹. Notamment, BRG1, BAF170 et BAF57, qui sont des composants du complexe de remodelage de la chromatine ATP dépendant SWI/SNF, sont recrutés sur le domaine RD2²⁵⁰. RCOR1 (coREST) et G9a sont aussi recrutés sur RE1 par REST pour coordonner l'assemblage du complexe BHC, BHC80, HDAC1/HDAC2 et LSD1. Le recrutement de G9a est dépendant de MED12 et CDYL²⁵¹. Ensemble, ces complexes induisent la répression transcriptionnelle en remodelant la chromatine rendant l'ADN inaccessible à la machinerie transcriptionnelle²⁰⁹.

REST régule donc ses gènes cibles par remodelage épigénétique^{213,229,243,248,252,253}. Les modifications épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN, l'hydroxyméthylation et les modifications d'histone proviennent des influences environnementales qui ne sont pas liées à la séquence de l'ADN. Elles représentent un mécanisme par lequel les signaux environnementaux, les facteurs à effet inhibiteur ou enrichissant et les altérations neuronales comme l'ischémie ou les convulsions peuvent modifier les connexions synaptiques, l'efficacité des synapses ainsi le remodelage synaptique^{254,255}. Il est connu que les modifications épigénétiques induites par REST sont importantes pour la reprogrammation du génome lors du développement du cerveau (Figure 8), pour l'expression génique spécifique des tissus, pour l'augmentation des fonctions cognitives d'apprentissage, de mémorisation et pour la survie des neurones au cours du vieillissement^{254,256}. Ces modifications de l'épigénome pourraient être un mécanisme important pour des modifications durables de la transcription dans les neurones adultes.

Dans les progéniteurs neuronaux, les neurones différenciés lors du développement postnatal et dans les neurones adultes altérés, REST se lie au site RE1/NRSE sur le gène cible et recrute ses corécepteurs CoREST et mSin3A, cette plateforme de corécepteurs recrute à son tour les histones deacétylases (HDACs)-1 et 2^{213,243,248,252,257-260}. Les HDACs éliminent les fragments acétyle des protéines d'histones et par conséquent induisent une répression dynamique et réversible de l'expression des gènes cibles par condensation de la chromatine, réprimant ainsi l'activation transcriptionnelle du promoteur en empêchant l'accès de la machinerie de transcription^{242,254,256,261}. REST assure une répression à long terme des gènes en s'associant au

site spécifique d'histone deméthyltransférase G9a qui induit la triméthylation de l'histone 3 sur sa lysine 9 (H3k9me3) par un mécanisme CoREST dépendant ou indépendant et au site spécifique d'histone deméthylase LSD1 qui supprime le groupe méthyle de H3 à K4 (H3K4)^{251,262,263}. De plus, REST s'associe avec le MeCP2, un répresseur de la transcription qui se lie aux marqueurs épigénétiques avant d'être recruté sur le CpGs méthylé²⁶⁴. L'acétylation et la méthylation des histones sont des signes d'une dynamique d'expression de gènes. Bien que ces signes paraissent comme étant à l'origine d'une inhibition durable de l'expression géniques, il est connu que les changements dans la méthylation de l'ADN sont susceptibles d'être rapides et réversibles^{265,266}.

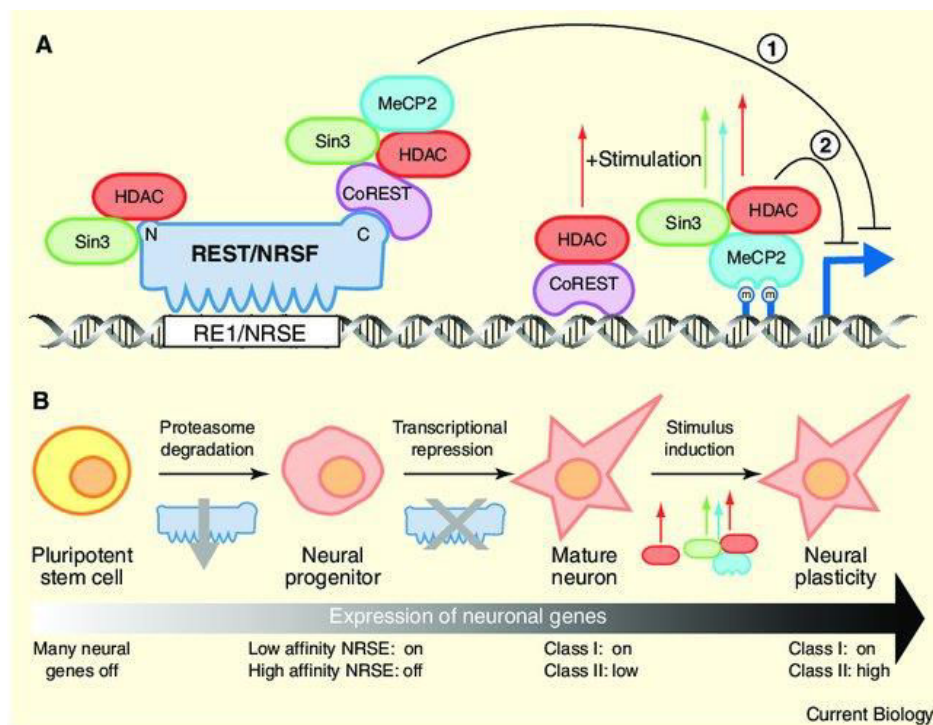


Figure 8 : la régulation de la transcription des gènes neuronaux par REST et ses cofacteurs pendant le développement et la plasticité. (A) Assemblage de REST et ses cofacteurs sur le gène cible. Mécanisme 1, Les complexes de corépresseurs se lient à REST et réprime la transcription des gènes cibles ; mécanisme 2, les corépresseurs dirigés par REST se lient directement à l'ADN méthylé en réponse à une stimulation responsable de l'activation de la transcription. (B) titrage de la quantité de REST produit lors de la neurogénèse pour contrôler l'expression de sous-ensembles de gènes neuronaux qui ont initialement une faible affinité pour les motifs de RE1, ensuite ceux de la classe I qui utilisent seulement le mécanisme 1 pour la répression de la transcription. D'après²²⁶

Il est important de savoir que REST ne peut pas réprimer l'expression d'un gène tout seul mais il a besoin de s'associer à d'autres protéines dont l'ensemble forme un complexe qui se lie au promoteur du gène cible. Cependant, comme exemple, des études récentes ont montré que REST pourrait activer la transcription de gènes en recrutant deux protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine, TET3 hydroxylase et NSD3. En outre, REST lie directement le variant court d'épissage de TET3 (l'isoforme prédominant dans les neurones) et le dirige vers le promoteur des gènes cibles, où TET3 favorise la conversion de la méthyle cytosine en 5-hydroxyméthylcytosine, résultant d'une transcription spécifique des gènes dans un contexte donné²⁶⁷. Le complexe REST-TET3 recrute des méthyltransférases NDS3 qui confèrent le fragment triméthyle à la protéine d'histone H3 sur le résidu lysine 36 pour générer H3K36me3, un marqueur fort et durable de l'activation de gènes²⁶⁸. Le variant court d'épissage de REST, REST4, contenant l'extrémité N-terminal mais pas le domaine répresseur en C-terminal, peut activer les gènes cibles de REST en coordonnant avec le récepteur glucocorticoïde pour recruter Brahma (Brm), une protéine importante du remodelage de la chromatine qui active aussi la transcription du gène²⁶⁹.

Dans le génome de mammifère, des études *in-silico* ont mis en évidence environ 2000 gènes cibles putatives contenant des éléments de réponse canonique ou non canonique de REST^{204,270,271}. Mais ce qui détermine la spécificité de l'interaction entre REST et ses cibles n'est pas assez connu. Plusieurs données indiquent que l'action de REST sur l'ensemble de ses cibles transcriptionnelles est type cellulaire et contexte dépendant. Les sous-ensembles cibles de REST dont l'expression est altérée dans l'hippocampe CA1 en réponse à l'ischémie sont différentes de celles dans l'hippocampe CA3 en réponse aux crises d'épilepsie et celles dans le cortex préfrontal des patients âgés en bonne santé ou atteints de la maladie de Huntington^{1,227,252,272}. De plus, les cibles transcriptionnelles de REST identifiées par des approches non biaisées et des études métagénomiques impliquant l'immunoprécipitation de chromatine et séquençage (Chip-seq) dans les lignés de cellules neuroblastomes diffèrent de celles identifiées par Chip-seq dans les cellules Jurkat et par Chip-on-Chip dans les cellules neuronales de souris^{1,234,271}. Ces données suggèrent que, dans différents types cellulaires, à différents âges et en fonction du stade de la maladie, REST régule l'expression de différents gènes. Le profil épigénétique, qui varie en fonction du stade de développement, du type cellulaire, de la région du cerveau et du stade de la maladie, détermine le niveau de recrutement de REST sur le promoteur du gène cible.

D'autres groupes de protéines peuvent intervenir pour favoriser le recrutement de REST sur le promoteur, comme exemple nous pouvons citer les protéines du groupe polycomb (PcG)²⁷³. Les PcG régulent l'expression des gènes en modifiant la structure de la chromatine. Il est clairement établi que l'absence de composant du PcG impacte de nombreux processus biologiques tels que la prolifération, la pluripotence et la différenciation. Elles sont constituées de 2 complexes, appelés complexes de répression (PRC) 1 et 2. Le PRC2 a une activité méthyltransférase et joue un rôle essentiel dans la triméthylation de l'histone H3 sur sa lysine 27, induisant l'extinction de la transcription du gène, tandis que le PRC1 est recruté en aval et sert de stabilisateur à l'extinction. PRC2 est recruté via le long ARN non codant (lncRNA) HOTAIR au niveau de l'élément RE1/NRSE sur le promoteur des gènes cible de REST. HOTAIR se lie ainsi au complexe PRC2 par son domaine 50 et au complexe LSD1/CoREST/REST, ce qui montre que les lncRNA servent d'intermédiaire pour la mise en place des plateformes protéiques nécessaire au remodelage de la chromatine ainsi qu'à la régulation de la transcription²⁷⁴. Les études récentes montrent que le marqueur épigénétique H3K27me3, induit par la protéine polycomb EZH2, est augmenté sur le gène *grin2b* (codant pour la sous-unité GluN2B de NMDA) pendant le développement postnatal²⁴³.

V. RÔLE CELLULAIRE DE REST

Rôle de REST dans les cellules souches embryonnaire

REST est abondamment exprimé dans les cellules souches embryonnaire (CSE) et se trouve associé au réseau de gènes oct3/4-Sox2-Nanog, impliqués dans l'auto-renouvellement et dans le maintien de la pluripotence⁵⁴. Des études ont montré que les CSE hétérozygotes pour REST ayant une suppression de l'expression de REST par un siRNA n'arrivent pas à maintenir leur pluripotence même ayant oct3/4-Sox2-Nanog⁵⁵. Ces travaux ont permis de démontrer que REST se lie au promoteur de Nanog contenant l'élément RE1 et que la baisse de son expression augmente la régulation des gènes impliqués dans la pluripotence, tels que *Lin28*²⁷⁵.

Cependant, les embryons de souris double KO (homozygote^{-/-}) survivent jusqu'au stade de blastocyste et meurent entre les jours embryonnaires 9,5 et 11,5, suggérant ainsi un rôle indispensable de REST dans la régulation de l'auto-renouvellement et dans la pluripotence des cellules formant la masse cellulaire interne²¹¹. La déplétion génétique de *Rest* empêche la différenciation des CSE en endoderme primitif²⁴⁴.

Rôle de REST dans les neurones différenciés

En plus de son rôle de régulateur incontournable de la neurogénèse, REST joue un rôle très important dans la formation des synapses des neurones adultes. Pendant le développement post-natal, il orchestre la régulation de plusieurs protéines synaptiques et extra synaptiques essentielles, notamment le récepteur NMDA (NMDAR) et le co-transporteur KCC2 du K-Cl. Les NMDARs sont nécessaires pour la synaptogénèse et pour la mise en place du circuit neuronal avec son flux d'information. REST se fixe et remodèle épigénétiquement le promoteur de *grin2b* (gène qui code pour la sous unité GluN2B de NMDAR) et ainsi régule l'expression de GluN2B. Cela permet le changement du phénotype de NMDAR immature (contenant principalement du GluN2B) en mature (contenant principalement du GluN2A) au niveau des synapses hippocampe²⁴³. Cette fonction est significative du fait que l'expression de GluN2B limite l'incorporation synaptique des récepteurs AMPA (AMPARs), réduit le seuil et augmente le niveau de potentialisation à long terme (LTP). Ce qui favorise l'apprentissage dépendant de l'hippocampe, la plasticité responsable de la croissance de la colonne vertébrale et les structures dendritiques essentielles pour le traitement de l'information²⁷⁶.

Il régule également la conductance des chlorures dans les neurones pendant le développement postnatal. Dans les neurones de nouveau-né, le transporteur de chlorure NKCC1 est fortement exprimé et le co-transporteur KCC2 se trouve réprimer par sa liaison avec REST à deux sites distincts au niveau du promoteur *kcc2b*²⁴⁵. Ceci est important car NKCC1 favorise l'augmentation intracellulaire des ions chlorures Cl⁻, et entraîne donc un flux sortant de Cl⁻ responsable de la dépolarisation des courants d'acide γ -aminobutyrique (GABA). Au début du développement postnatal, la diminution de l'expression de NKCC1 et l'absence de recrutement de REST sur le promoteur de *kcc2b* induit l'augmentation de KCC2. Ce qui permet au K-Cl, le cotransporteur de KCC2, de maintenir les chlorures intracellulaire à un niveau bas, nécessaire pour les actions hyperpolarisantes des neurotransmetteurs inhibiteurs GABA et glycine dans les neurones matures²⁴⁵. Ainsi REST régule le marqueur de la transmission synaptique GABA

Rôle de REST en condition pathologique

Des études ont montré que REST joue un rôle important dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes. Par conséquent, une activité anormale ou une mutation de REST est associée à plusieurs types de maladies, notamment aux cancers et aux maladies neurodégénératives (Table 1).

REST et Cancers

REST est un facteur de transcription important dans plusieurs cancers (Table 1). Il a des rôles contradictoires entre les cancers non neuronaux et les tumeurs du système nerveux central.

REST et cancers neuronaux

Il agit comme un oncogène dans les tumeurs du système nerveux central.

Médulloblastome

Rencontré généralement chez les enfants, il est la plus commune et la plus agressive des tumeurs du cerveau. 50% des médulloblastomes humains impliquent une augmentation de l'expression de REST pour la croissance des cellules cancéreuses²⁷⁷. Récemment, la répression induite par REST sur le gène codant pour USP37, une protéine deubiquitinase, a été montrée comme jouant un rôle clé dans l'apparition du médulloblastome. La répression de USP37 provoquerait une diminution de p27 (kip1), qui est un inhibiteur de kinases cycline dépendant, connu pour sa capacité d'inhiber la prolifération cellulaire. Lorsque USP37 est exprimée dans les cellules de médulloblastome, p27 est stabilisée et la prolifération diminue²⁷⁸.

Glioblastome

C'est une des principales tumeurs du cerveau chez les adultes. Il peut avoir une origine mixte non neuronale et neuronale. Dans 30% des glioblastomes humains, l'augmentation de l'expression de REST via son effecteur miRNA miR-124a est essentielle pour la croissance cellulaire et pour leur capacité invasive²⁷⁹⁻²⁸¹. REST réprime l'expression du gène miR-124a et miR-124a augmente le turnover de REST²²⁴. L'expression de REST étant élevée chez les patients atteints de glioblastomes, le niveau de miR-124a se trouve par conséquent diminué. Ce qui stimule la prolifération cellulaire via l'expression des gènes cibles de miRNA, tels que le facteur de transcription SNAI2, impliqués dans l'invasion, dans la métastase et dans la régulation des phosphatases Scp1 et PTPN12^{280,282-284}. L'expression de REST et RCOR1 est aussi responsable de la diminution de SYN1 favorisant le développement des gliomes²⁸⁵.

Neuroblastome

Le rôle de certains variant d'épissages de REST a été rapporté dans le neuroblastome de la souris et de l'homme. Il a été montré que certaines modifications dans la structure ou dans la régulation du gène *Rest* pourraient conduire au développement et à la progression des tumeurs neuroblastomes²⁰⁶. Une étude bio-informatique s'intéressant à la signature de REST dans le neuroblastome, montre qu'il est significativement associé au stade clinique des patients²⁸⁶.

REST et cancers non neuronaux

REST a un rôle anti tumoral dans les cancers qui touchent les cellules épithéliales. L'inhibition fonctionnelle de REST dans les cellules épithéliales augmente leur capacité de transformation oncogénique (Table 1).

Cancer du côlon

Une délétion génétique de REST est retrouvée fréquemment chez les patients atteints de cancer du côlon. Il est connu que les cellules dérivées de l'adénocarcinome colorectal expriment un variant tronqué avec huit zinc finger REST-FS (absence de l'extrémité C-terminal)²²⁰.

Cancer pulmonaire à petites cellules (SCLC)

Les cellules épithéliales bronchiques normales ont un taux d'expression de REST élevé, ce qui leur permet de bloquer l'expression des gènes neuroendocriniens. Cependant, chez certains patients atteints de cette maladie, on y trouve des marqueurs épithéliaux et neuronaux. Un nouveau variant d'épissage avec un mutant de REST tronqué sur 50 paires de bases a également été identifié chez ces malades. Il agit comme un dominant négatif inhibiteur de REST sauvage et induit une augmentation de l'expression des marqueurs neuronaux.²⁰⁷ Cette mutation, similaire au mutant REST-FS est responsable d'une expression inappropriée de gènes comme l'arginine vasopressine et le récepteur alpha de la glycine^{287,288}. Des études récentes suggèrent que le profil transcriptionnel de SCG3 (un gène cible de REST) pourrait être utilisé comme un biomarqueur dans le cancer du poumon neuroendocrine²⁸⁹.

Cancer pulmonaire non à petites cellules (non-SCLC)

Contrairement au SCLC, dans le non-SCLC, il n'y a pas de modification de quantité d'ARN et de protéines REST. Cependant, environ 10% de non-SCLC montrent une perte de fonction du complexe SWI/SNF, qui est un cofacteur nécessaire pour l'activité de REST, conduisant à une augmentation de l'expression de certains gènes neuronaux.

Cancer du sein

La fonction tumo-suppresseur de REST a été identifiée à travers la dérégulation de la cascade de signalisation du phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt. Le traitement des cellules ayant une faible expression de REST avec le facteur de croissance épidermique (EGF) conduit à une hyper phosphorylation de PI3K et de Akt, associée à une prolifération accrue. Ces deux effets de l'EGF disparaissent lorsque les cellules sont transfectées avec un dominant négatif de PI3K mutant. Ce qui suggère que l'augmentation de l'expression de REST dans les cellules non neuronales diminue la croissance tumorale via la diminution de l'activation de la cascade de signalisation PI3K-Akt²²⁰. Récemment une expérience similaire a été effectuée dans une lignée de SCLC, dans laquelle une faible expression de REST est accompagnée d'une augmentation

de l'expression et d'une forte phosphorylation de Akt2 en réponse à l'EGF²⁹⁰. On y voit également une hyper activation de mTORC1, connu comme étant un complexe gouvernant de nombreux processus anabolique y compris la prolifération²⁹¹. Il a été montré que REST et NFκB répriment ensemble l'expression de TAC1 dans les cellules souches mésenchymateuses. TAC1 est un gène impliqué dans le développement du cancer du sein et d'autres types cancers via la production de peptides incluant les substances P, qui confèrent aux cellules cancéreuses la résistance à l'apoptose et à la radiothérapie. Cependant, une diminution de l'expression de REST dans les cellules de cancer du sein est inversement corrélée avec la production de substances P et au phénotype agressif de ces cellules²⁹².

Cancer de la prostate

Les tumeurs de la prostate avec une composante neuroendocrine sont généralement indépendantes des androgènes et très agressives. Dans les cellules cancéreuses de la prostate, l'acquisition du phénotype neuroendocrine est associée à la progression de la tumeur et à la diminution du niveau de REST. Ce qui induit directement la transcription de IB1/JIP-1, qui a son tour régule la voie de signalisation JNK²⁹³.

REST est un régulateur majeur de la prolifération et de la migration des cellules dans le cancer du sein et les glioblastomes^{294,295}. Dans le sarcome d'Edwin, l'inhibition de REST empêche la prolifération des cellules cancéreuses en augmentant leur hypoxie et leur apoptose²⁹⁶. L'expression de REST est augmentée dans les cellules cancéreuses de la cavité buccale. La diminution de son expression induit l'apoptose et des dommages à l'ADN de ces cellules. Il joue un rôle dans la survie de ces cellules en régulant la voie de signalisation mTOR²⁹⁷.

REST et les maladies neurodégénératives

La dérégulation de REST est impliquée dans toutes les maladies du système nerveux. Une modification de son expression pendant l'embryogénèse peut induire l'apoptose cellulaire, une différenciation aberrante et la mort embryonnaire (Table 1)^{211,235}. Dans les neurone différenciés, REST est quiescent, mais peut s'activer en réponse à une agression neuronale telle que l'ischémie et lors des crises associées aux neurones^{248,298}. Dans ces maladies, une augmentation de l'expression de REST et son remodelage épigénétique sont associés à la mort des cellules neuronales. Une augmentation de l'expression de REST en réponse à une agression est susceptible de réprimer les récepteurs postsynaptiques, les transporteurs et les protéines des vésicules présynaptiques telles que la synapsine I, la synaptophysine, la synaptotagmine II, IV, VI, VII, la synaptobrevine II et la protéine SNARE SNAP25²³⁷. Une faible expression de REST

n'affecte pas seulement la neurotransmission des neurones adultes mais impacte également l'exocytose induit par les stimuli dans les cellules PC12 et les cellules β du pancréas²³⁷. A l'inverse, dans les neurones âgés, l'expression de REST est neuroprotectrice et son absence est associée à la maladie d'Alzheimer¹. La dérégulation de REST et ses gènes cibles est également impliquée dans la pathogénèse de l'épilepsie, la maladie de Huntington, la maladie de Parkinson et la retardation mentale liée à X^{208,233,272,299}. Son rôle est, cependant, très important dans l'ischémie et la maladie d'Alzheimer.

REST et Ischémie

Les données récentes suggèrent que l'expression de REST est augmentée dans les neurones matures et différenciés en réponse à une agression. Entre 16 heures et 24 heures après l'ischémie globale, le niveau de CK1 et de β -TrCP diminue et la quantité de la protéine REST augmente (Figure 9, Table 1). Cette augmentation de REST est due à la stabilité accrue dans les neurones vulnérable de l'hippocampe CA1^{248,300}. Dans la couche pyramidale des cellules CA1, REST est recruté sur le promoteur proximal de certains gènes cibles, où il s'associe avec son complexe corépresseur pour orchestrer le remodelage épigénétique. Ce qui suggère une implication de la dérégulation épigénétique dans la neurodégénérescence²⁴². L'inhibiteur du HDAC, TSA permet une protection substantielle contre la mort cellulaire provoquée par l'ischémie, indiquant une relation cause à effet entre le remodelage épigénétique et la mort cellulaire dans l'ischémie²⁵². L'inhibition de l'expression de REST ou l'expression de son dominant négatif dans le cerveau d'un animal permet de protéger ses neurones CA1. Ces résultats sont des preuves que l'activation de REST dans les neurones de l'hippocampe est étroitement liée à la mort cellulaire (Figure 9). Le profilage ChIP-on-ChIP et des analyses bio-informatiques montrent que dans les neurones post-ischémiques, REST orchestre la répression d'un ensemble de cible transcriptionnel. Ces cibles incluent entre autre la sous unité GluA2 des récepteurs AMPA, la sous unité NR1 des NMDAR, la sous unité β 2 du récepteur neuronal d'acétylcholine, le récepteur M4 d'acétylcholine muscarinique, la sous unité 2 de NF- κ B, TRPV1 et la protéine synaptotagmine 6 des SNARE. Ceci est autant important que la sous unité GluA2 est essentiel pour le flux ionique à travers les récepteurs AMPA³⁰¹. Cependant, la présence de GluA2 influence la cinétique, la conductance et le ciblage des sites synaptiques³⁰¹. Ceci est important dans la mesure où, au cours de l'ischémie, les récepteurs perméables aux ions Ca^{2+} sont liés à la mort de cellules neuronales²⁴⁸.

REST et la maladie d'Alzheimer

Monsieur Yankner et son équipe ont montré que REST joue un rôle neuroprotecteur dans le cerveau au cours du vieillissement¹. Ils ont montré que l'expression de REST, activée par la voie Wnt, est une caractéristique importante et normale du vieillissement, que son absence est associée à une déficience légère ou sévère des capacités cognitives et à la maladie d'Alzheimer (Table 1). Des analyses effectuées sur des tissus humains de sujets âgés sains montrent une augmentation de l'expression nucléaire de REST dans les neurones du cortex préfrontal et dans l'hippocampe CA1 et CA3. Cependant cette expression est absente chez les sujets avec une déficience cognitive légère ou sévère causée par la maladie d'Alzheimer. Des expériences de ChIP-seq dans les cellules SH-SY5Y montrent que REST régule l'expression des gènes impliqués dans la mort des cellules neuronales (p38 MAPK, FAS, FADD, TRADD, BAX, BID, PUMA, protéines des pores de transition de perméabilité mitochondriale et cytochrome C) et celle des marqueurs de la maladie d'Alzheimer (γ -sécrétase, préséniline 2, préséniline enhancer-2 et CDK5R1). Les souris âgées avec une expression de REST réduite sont plus sensibles aux stress oxydants¹. De ce fait, une augmentation de l'expression de REST protège contre l'atrophie de l'hippocampe associée à la maladie d'Alzheimer et à la neurodégénérescence (figure 9) chez les patients avec une légère déficience cognitive³⁰². La neuroprotection induit par REST dans le cerveau au cours du vieillissement, absente chez les malades d'Alzheimer est aussi absente dans les tissus de patients atteints de démence fronto-temporale et de démence à corps de Lewy¹. L'expression élevée de REST dans les neurones de la substance noire est aussi protectrice dans un modèle animal de la maladie de Parkinson³⁰³. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'expression de REST dans les neurones âgés est nécessaire pour la préservation des capacités cognitives et constitue une cible thérapeutique potentielle.

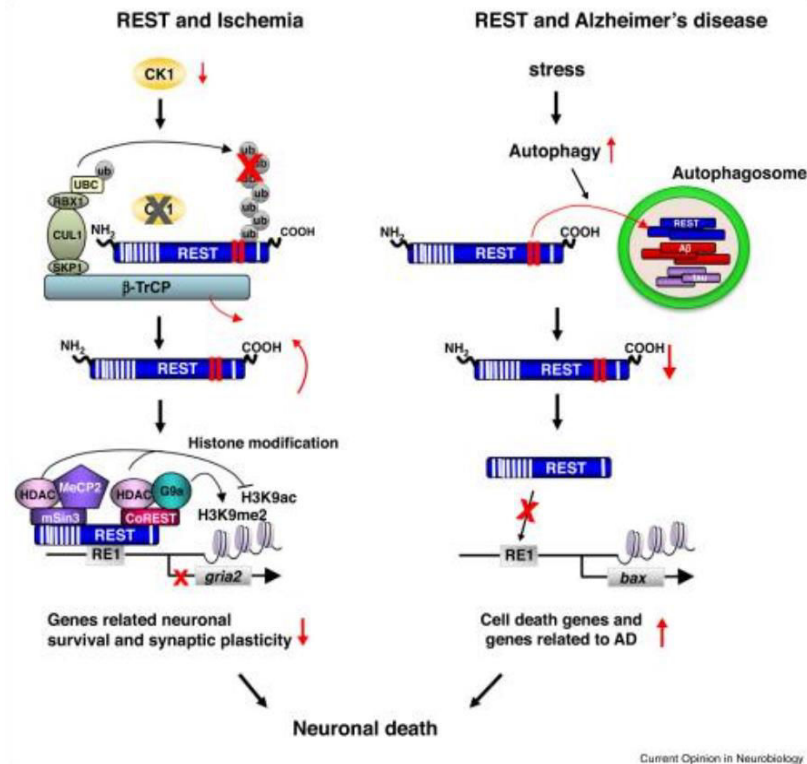


Figure 9 : La régulation de REST dans l'ischémie et dans la maladie d'Alzheimer. *A gauche*: l'ischémie globale réduit l'abondance de CK1 et du E3 ligase β -TrCP, responsable de l'augmentation de REST dans l'hippocampe CA1. REST se lie à RE1 sur le promoteur des gènes cibles et orchestre l'assemblage du complexe mSin3A, CoREST, HDACs 1 et 2, G9a et MeCP2. Ce complexe de corépresseur permet le remodelage épigénétique du corps d'histone sur le promoteur des gènes cibles et réprime la transcription de ces gènes importants pour la plasticité synaptique et la survie des neurones. *A droite* : dans le cerveau de patient d'Alzheimer, le stress oxydatif active l'autophagie et la formation des autophagosomes. REST est piégé dans les autophagosomes avec d'autres protéines mal repliées tel qu'A β et tau, diminuant l'abondance de REST et sa translocation nucléaire. La perte de translocation nucléaire de REST permet l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose des cellules neuronales et dans la maladie d'Alzheimer. D'après³⁰⁴

Rôle de REST dans le rein

Le gène *Rest* est connu pour être plus ou moins exprimé dans presque tous les tissus de l'organisme y compris dans le rein³⁰⁵. Son expression semble jouer un rôle essentiel dans la survie et la fonction de plusieurs types cellulaires (Table 1)³⁰⁶. Même s'il joue un rôle important dans le développement et la physiopathologie de plusieurs maladies, son rôle dans le rein n'est pas connu. Cependant il a été montré que REST est important dans l'adaptation des cellules HEK à l'hypoxie⁴. Il a été également montré que des mutations dans le gène qui code pour la protéine REST pourraient être un facteur de prédisposition pour le développement de la tumeur de Wilms, qui est le plus commun des cancers rénaux chez les enfants⁵. REST pourrait très

probablement jouer d'autres rôles importants dans d'autres maladies rénales, notamment dans les podocytes. C'est ainsi que l'objectif de ce travail consiste à étudier l'éventuel rôle que pourrait avoir ce facteur de transcription dans les podocytes, qui sont des cellules post mitotique très importantes pour la barrière de filtration glomérulaire et pour le maintien des fonctions rénales.

Le rôle de REST a été largement étudié dans les neurones ces dix dernières années. En 2014, Lu et al ont montré que REST n'est pas ou semble être très peu exprimé dans les neurones de d'individu jeune en bonne santé mais que son expression est augmentée et localisée dans le noyau des cellules neuronales au cours du vieillissement¹. Ils ont montré que le niveau de REST était très diminué dans les neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Pour étudier sa fonction, ils ont laissé vieillir des souris n'exprimant pas REST dans les neurones, issues du croisement de souris REST^{flox/flox} et des souris Nestine-Cre. Ils montrent que REST régule l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose et la migration des cellules neuronales au cours du vieillissement. En fin, ils ont établi que REST joue un rôle neuroprotecteur au cours du vieillissement et que l'absence de son expression favoriserait l'apparition de maladies neurodégénératives.

Cependant il est connu que les neurones et les podocytes sont deux types cellulaire assez similaire tant sur le plan structurale que morphologique. De plus ils se trouvent tous les deux impliqués ensemble dans certaines pathologies. En considérant cette similarité, nous pensons que le facteur de transcription, REST pourrait jouer un rôle dans l'adaptation des podocytes aux stress provoqués par le vieillissement et la réduction néphronique.

Table 1 : Les grandes fonctions cellulaires connues sur REST

| VARIATION | TYPE CELLULAIRE | ESPÈCE | MECANISME | EFFET | REFERENCE |
|-----------|--------------------------------|---------------------|--|------------|---------------------------|
| - | Neurone | humain/Souris | apoptose/migration | activation | Lu T et al 2014 |
| - | Neurone | humain/Souris | neurodégénérescence | activation | Lu T et al., 2014 |
| + | HEK | humain | Hypoxie | inhibition | Cavadas et al., 2016 |
| - | Cancer ovarien | humain | prolifération | inhibition | Deng et al., 2018 |
| - | Embryon | souris/Poulet | malformation, apoptose et décès | activation | Chen et al., 1998 |
| + | Médulloblastome | souris | apoptose | inhibition | Lawinger et al., 2000 |
| + | Neurone | souris | neurogénèse/plasticité | activation | Ballas et al., 2005 |
| + | Cellule souche embryonnaire | souris | pluripotence | activation | Abrajano et al., 2010 |
| + | Neurone | rat | Ishémie, apoptose | activation | Calderone et al., 2003 |
| + | Neurone | rat | épileptogénèse | activation | Spencer et al., 2006 |
| + | Neurone | rat | excitabilité neuronale | activation | McClelland et al., 2014 |
| - | Neurone | souris | parkinson | activation | Yu et al., 2013 |
| - | Cellule souche embryonnaire | souris | différenciation neuronale | activation | Kumar Gupta et al., 2009 |
| - | Cellule souche embryonnaire | humain | survie, différenciation, signalisation | inhibition | Thakore-Shah et al., 2015 |
| - | SH-SY5Y | human | apoptose | activation | Yu et al., 2009 |
| + | PC12 | rat | homéostasie du calcium | activation | Ariano et al., 2010 |
| + | Astrocyte | rat | gliosécrétion | activation | Prada et al., 2011 |
| + | Neuroblastome | souris, rat, humain | apoptose | inhibition | Palm et al., 1999 |
| - | SCLC | human | oncogénèse | activation | Kreisler et al., 2010 |
| + | Cellule souche glioblastome | souris | oncogénèse | activation | Kamal et al., 2012 |
| + | Glioblastome | humain | oncogénèse | activation | Conti et al., 2012 |
| - | Carcinome du colon | humain | oncogénèse | activation | Westbrook et al., 2005 |
| - | Cancer du sein | humain | oncogénèse | activation | Wagoner et al., 2010 |
| - | SCLC | human | expression de marqueurs neuronaux | activation | Gurrola-Diaz et al., 2003 |
| - | Embryon | zebrafish | signalisation hedgehog | activation | Gates et al., 2010 |
| + | PC12 | rat | traduction du récepteur mu opioïde | activation | Kim et al., 2008 |
| - | Cellule souche mésenchymateuse | humain | différenciation | activation | Yang et al., 2008 |
| + | Myocyte fœtal | rat | structure et fonction normale | activation | Kuwahara et al., 2003 |
| - | A549, PC3, U2OS | humain | signalisation TGFβ | activation | Epping et al., 2015 |
| + | Cellule ciliée de l'oreille | humain/Souris | surdité | inhibition | Nakano et al., 2018 |
| + | HEK | humain | activité HSV | inhibition | Pinnoji et al., 2007 |
| - | Cellules photoréceptrices | drosophile | développement des yeux | inhibition | Tsuda et al., 2006 |
| - | Tumeur de Wilms | humain | gènes anti tumoraux | activation | Mahamdallie et al., 2015 |

Table 1 : Les principales grandes fonctions cellulaires de REST. D'après^{1,3-5,206,211,212,220,223,234,239,248,272,279,280,290,303,307-321}

QUATRIEME PARTIE : SIMILARITES ENTRE NEURONES ET PODOCYTES

Plusieurs études ont montré qu'il existe de nombreuses caractéristiques biologiques et structurales extraordinaires communes aux neurones et aux podocytes. Naoto Kobayashi et al ont montré que les podocytes présentent plusieurs similarités avec les neurones³²². Ce sont des cellules post mitotiques hautement différenciées avec une capacité de renouvellement limitée. Elles présentent de longs et courts prolongements cellulaires équipés d'un cytosquelette très organisé. Les deux types cellulaires partagent l'expression de plusieurs protéines structurales et régulatrices telles que la néphrine, Neph1 et Neph2, la nestine, la synaptopodine, la Drebine, etc^{74,323-325}.

La synaptopodine, qui est le composant majeur du cytosquelette podocytaire, est exprimée au niveau de la partie terminale du cytosquelette. De manière intéressante, cette protéine peut également être exprimée dans les dendrites neuronales³²⁶. Plusieurs données montrent que les pédicelles des podocytes partagent l'expression de certaines protéines avec les dendrites neuronales^{324,327}. De plus certaines molécules sont anormalement exprimées dans les pathologies cérébrales et rénales. Par exemple l'ubiquitine hydrolase carboxyterminale L1 (UCH-L1), membre de la famille des enzymes de deubiquitination, est spécifiquement exprimée dans le cerveau, les testicules et le rein en condition physiologique normale^{328,329}. Une expression anormale d'UCH-L1 dans les neurones est souvent associée au développement des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson dans laquelle la dopamine et d'autres protéines sont déposées dans les corps de Lewy suite à des troubles d'ubiquitination³³⁰. Dans plusieurs types de néphrites, l'expression d'UCH-L1 est augmentée dans les podocytes, le niveau de son expression est proportionnel à la sévérité de la néphropathie et à la protéinurie³³¹. Certaines données suggèrent que les lésions podocytaires induites par la surexpression d'UCH-L1 est similaire à celles dans les neurones³³².

Il a été également montré que, dans les podocytes et dans les neurones, Rab3A, une petite GTPase principalement présent dans les vésicules synaptiques car module l'exocytose via d'autres molécules effectrices, s'associe aux vésicules contenant du glutamate pendant tout le processus cellulaire et que les podocytes sont équipés d'un système de signalisation glutaminergique comme celui des neurones^{333,334}.

Certaines pathologies neurodégénératives, comme la maladie de Charcot-Marie-Tooth, provoquent également des lésions dans les glomérules rénaux, notamment dans les podocytes³³⁵.

OBJECTIF

REST est connu pour son rôle de régulateur principal de gènes impliqués dans la survie et la migration cellulaire. Ces fonctions ont été largement explorées dans les neurones où il exerce des fonctions très variables qui dépendent du contexte physiopathologique. Il a été notamment montré comme étant un facteur clé dans la neurogénèse et dans l'adaptation de la cellule au vieillissement et au développement des pathologies neurodégénératives.

Considérant l'importance de REST dans plusieurs types de cellules et la similarité particulièrement intéressante entre les podocytes et les neurones, l'étude de REST dans les podocytes pourrait certainement fournir des pistes pour comprendre le mécanisme physiopathologique de la podocytopathie et de la néphropathie permettant ainsi de proposer de nouvelles approches thérapeutiques.

L'objectif de ce travail de thèse consistait cependant d'identifier une nouvelle voie ou cible thérapeutique impliquée dans l'adaptation des podocytes au stress. En particulier, nous envisagions de :

- 1) Étudier le rôle de l'expression et la localisation de REST dans les podocytes au cours du vieillissement et de la réduction néphronique.
- 2) Examiner et Etudier le rôle de l'expression de REST dans les podocytes en condition de stress.
- 3) Etudier le rôle de REST dans la migration et dans l'adhésion focale des podocytes à la MBG.
- 4) Explorer l'adaptation des podocytes *in vitro* au stress mécaniques en utilisant une technologie innovante de micro-ingénierie.

PRESENTATION DES RESULTATS

(Article en cours de soumission)

REST EST EXPRIMÉ ET LOCALISÉ DANS LE NOYAU DES PODOCYTES AU COURS DU VIEILLISSEMENT ET DE LA REDUCTION NÉPHRONIQUE

La réduction néphronique entraîne des modifications adaptatives des néphrons restants permettant à ces unités fonctionnelles d'assumer l'augmentation de la charge de travail fourni. La conséquence de la réduction néphronique est l'augmentation des contraintes mécaniques et métaboliques imposées aux cellules du rein. Considérant leur localisation, leur fonction et leur faible potentiel d'auto-renouvellement, les podocytes sont directement exposés à ces conditions de stress défavorable. Malgré la récente découverte de *Canaud et al* sur l'implication de la voie AKT2/mTORC2 dans un mécanisme d'adaptation des podocytes aux contraintes et à la charge de travail supplémentaire, d'autres voies ou cibles, comme REST, pourraient également y contribuer.

REST est un facteur de transcription présent dans plusieurs tissus et organes, il est connu pour son rôle de régulateur de l'expression des gènes neuronaux dans les cellules non neuronales. Cependant plusieurs études ont montré qu'il est important dans la régulation de l'expression des gènes apoptotiques mais aussi dans celle des gènes anti-apoptotiques en fonction du contexte physiopathologique. *Yankner et al* ont montré récemment que REST n'est pas ou ne serait que très faiblement exprimé dans les neurones de jeune patients en bonne santé, mais qu'au cours du vieillissement, son expression est induite et localisée dans le noyau. Ils ont montré que cet augmentation au cours du vieillissement avait pour rôle de protéger les neurones contre les maladies neurodégénératives¹. Plusieurs autres études ont montré l'importance de REST dans d'autres pathologies, mais jusqu'ici la seule étude effectuée dans le rein s'était focalisée sur son rôle dans le développement des tumeurs de Wilms chez les enfants⁵.

Dans l'objectif de mettre en évidence d'éventuelles implications de REST dans la physiopathologie podocytaire, nous avons montré qu'il y'a une augmentation de son expression nucléaire dans les podocyte au cours du vieillissement. Le vieillissement étant un processus responsable de la diminution du nombre de néphrons du rein, nous avons voulu confirmer ce résultat en regardant l'expression de REST dans un autre modèle de réduction néphronique, qui est la néphrectomie subtotale. Dans ce modèle nous avons montré que, comme au cours du vieillissement, l'expression de REST était augmentée et localisée dans le noyau après néphrectomie.

Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression de REST et sa translocation nucléaire dans les podocytes lors du vieillissement ou après la néphrectomie pourraient jouer un rôle important dans l'adaptation de ces cellules aux stress.

REST JOUE UN ROLE IMPORTANT DANS LA FONCTION ET DANS L' APOPTOSE DES PODOCYTES AU COURS DU VIEILLISSEMENT

Le vieillissement est un processus qui détruit progressivement la fonction de filtration rénale. Cette altération est causée par la réduction du nombre de néphron fonctionnel du rein. Afin de démontrer que le facteur de transcription REST joue un rôle dans l'adaptation des podocytes au cours du vieillissement nous avons supprimé son expression podocytaire ($REST^{\Delta pod}$) à l'aide d'un croisement entre souris $REST^{flox/flox}$ et souris Nestine-Cre. La Nestine étant un gène commun aux podocytes et aux neurones. Les souris $REST^{\Delta pod}$ sont viable et ont été précédemment utilisées par Yankner et son équipe pour une extinction de l'expression de REST dans les neurones dans le but d'élucider son rôle dans ces cellules¹. Nous avons ainsi laissé vieillir les souris $REST^{\Delta pod}$ et $REST^{flox/flox}$ (pendant 12 à 24 mois). Nos résultats montrent que la Nestine-Cre est bien capable d'éteindre l'expression de REST dans les souris $REST^{\Delta pod}$, que la délétion de REST dans les podocytes est responsable de l'apparition de l'albuminurie, des lésions glomérulaires de type gloméruloscléroses et de la fibrose rénale chez la souris.

Ainsi, nous établissons que le développement de ces anomalies fonctionnelles du rein est le résultat d'une atteinte podocytaire. Afin de confirmer cela, nous avons montré qu'en absence de REST dans les podocytes de souris $REST^{\Delta pod}$ âgées, celles-ci présentent une diminution du nombre de podocytes dans le glomérule.

Dans les cellules neuronales, REST est connu pour son rôle de régulateur de l'expression de plusieurs gènes, notamment celui des gènes impliqués dans l'apoptose. Nous avons montré, cependant, que la diminution du nombre de podocytes résultant de l'absence de REST était associée à une augmentation de l'apoptose podocytaire.

L'ensemble de ces résultats montrent clairement l'importance de l'expression de REST au cours du vieillissement dans le maintien des fonctions rénales et dans la survie des cellules podocytaires essentielles au niveau de la barrière de filtration glomérulaire.

L'EXPRESION DE REST EST INDUIT AVEC LE STRESS OXYDANT ET JOUE UN RÔLE IMPORTANT CONTRE L'APOPTOSE DES CELLULES HEK EN CONDITION DE STRESS

Pour comprendre la régulation et le rôle de REST *in vitro*, nous avons utilisé des cellules HEK. Ce sont des cellules dérivées de rein embryonnaire humain très utilisées dans la recherche en biologie cellulaire depuis plusieurs années à cause de leur capacité de croissance et leur facilité de transfection.

Il est connu que le stress oxydant est capable de réguler positivement l'expression de REST dans les cellules neuronales. Cette augmentation de l'expression a pour rôle d'induire les gènes de résistance au stress¹. Dans un contexte rénal, nous avons montré que REST était induit dans les cellules HEK ayant subi un stress oxydant provoqué par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Cette augmentation pourrait avoir un rôle dans la régulation de gènes apoptotiques afin d'aider les cellules à mieux s'adapter aux contraintes du stress. Nous voulions ensuite comprendre le rôle joué par REST au cours d'un stress apoptotique tel qu'après un traitement avec l'adriamycine (ADR). L'ADR est utilisé pour induire le stress et l'apoptose dans les cellules, notamment dans les podocytes. Les conséquences podocytaires incluent l'effacement massive des pédicelles précédant une glomérulosclérose³³⁶⁻³⁴⁰. Après le traitement des HEK avec l'ADR, nous avons confirmé l'apoptose dans ces cellules avec l'augmentation de la forme clivée de PARP et l'induction des dommages à l'ADN à travers la phosphorylation de H2AX. Puis nous avons montré que le traitement des cellules HEK avec l'ADR est responsable l'augmentation de l'expression d'ARN messager de REST associée à une baisse de son niveau protéique. Enfin, pour comprendre le rôle de REST durant l'apoptose, nous avons utilisé un ARN interférent (siREST) afin d'inhiber son expression. Après confirmation de l'efficacité de la transfection, nous avons observé une augmentation de l'apoptose dans les cellules traitées avec l'ADR. Inversement, en surexprimant REST dans les cellules HEK avec un plasmide REST (pREST), nous montrons que REST semble protéger ces cellules contre l'apoptose.

Ces résultats montrent donc que REST joue un rôle important dans l'adaptation des cellules HEK à l'apoptose.

L'EXPRESSION DE REST EST INDUIT AVEC LE STRESS OXYDANT ET JOUE UN RÔLE IMPORTANT DANS L'APOPTOSE ET LA MIGRATION DES PODOCYTES EN CONDITION DE STRESS

Pour étudier le rôle de REST dans les podocytes *in vitro*, nous avons isolé des cellules primaires de podocytes à partir de souris provenant d'un croisement entre des souris tomato-GFP et des souris podocine-Cre. Les souris tomato-GFP ont la particularité d'exprimer la tomato (rouge) de manière ubiquitaire avant son excision médiée par une Cre-GFP³⁴¹. Après avoir isolé les podocytes GFP+ à l'aide d'un cytomètre en flux, les cellules ont été caractérisées. Elles expriment REST et les marqueurs de différenciation podocytaire tels que Wt1, la nestine, la synaptopodine et la podocine.

Pour comprendre le rôle de REST, nous avons montré qu'il y a une augmentation de son expression après un traitement avec de l'H₂O₂. Cette augmentation de REST pourrait suggérer un rôle pendant le stress podocytaire. Pour déchiffrer ce rôle, nous avons traité les cellules avec l'ADR, et nous avons constaté une augmentation de l'apoptose associée à une diminution de l'ARN messager de Wt1. Le stress apoptotique induit par l'ADR provoque une baisse de l'expression protéique de REST. Pour étudier le rôle de REST, ces podocytes primaires étant très difficile à transfecter, nous avons donc utilisé une lignée de podocytes immortalisés de souris produite par Peter Mundel. Nous avons ainsi augmenté ou inhibé l'expression de REST dans ces cellules à l'aide d'un pREST ou d'un siREST respectivement. Le traitement des cellules dans lesquelles l'expression de REST est inhibée avec l'ADR induit aussitôt l'apoptose de celles-ci. Tandis que les cellules surexprimant REST et traitées avec l'ADR semblent développer une résistance à l'apoptose.

Dans les podocytopathies glomérulaires, telles que la glomérulosclérose segmentaire et focale, les podocytes perdent leur capacité d'adhésion à la MBG et présentent moins de sites d'attache focale qui contribuent à leur perte de fonction et leur détachement complète de la MBG³⁴². Avec les résultats encourageants montrant l'importance de REST dans l'adaptation des podocytes pendant l'apoptose, nous avons voulu savoir si, au-delà de son rôle anti apoptotique, REST régulait l'attachement des podocytes à la MBG et leur migration. En effet nous avons montré que les cellules surexprimant REST avaient une augmentation de sites d'adhésions focale et un renforcement plus important du cytosquelette d'actine, mise en évidence grâce au co-marquage de la phalloïdine et de la paxilline. La paxilline est une protéine d'échafaudage à l'adhésion focale qui a un rôle très important dans l'ancrage des intégrines au cytosquelette d'actine, ce

dernier étant marqué par la phalloïdine^{343,344}. Inversement l'inhibition de l'expression de REST dans ces cellules diminue significativement le nombre de site d'adhésion focale et l'expression de F-actine.

Les podocytes fonctionnels s'appuient sur leurs cytosquelettes d'actine et de microtubule pour assurer leur fonction d'ultrafiltration au sein de la barrière de filtration glomérulaire via des interactions avec des protéines de jonction cellule-cellule et matrice-cellule. Des études récentes ont montré que, pour assurer leurs fonctions, les podocytes sont relativement stationnaires dans les conditions normales³⁴⁵. Cependant, nous avons montré que l'inhibition de l'expression de REST avec un siREST est capable d'augmenter significativement la vitesse de migration des podocytes.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'expression de REST est importante pour l'adaptation et la survie des podocytes au cours d'un stress apoptotique induit par l'ADR, ils montrent également un rôle non négligeable de REST dans l'adhésion focale des podocytes à la MBG et dans la régulation de leur migration.

REST JOUE UN RÔLE IMPORTANT DANS L'ADAPTATION DES PODOCYTES DE SOURIS À LA NEPHROPATHIE CHRONIQUE ET PROGRESSIVE INDUITE PAR L'ADR

Le modèle de néphropathie induit par l'ADR est considéré comme l'analogie du syndrome néphrotique à lésion minimale et de la glomérulosclérose segmentaire et focale humaine^{346,347}. Plusieurs études menées chez le rat ont montré que ce modèle peut induire des dommages sévères aux reins, caractéristiques des maladies rénales chroniques progressives chez l'homme³⁴⁷. Chez la souris l'ADR est utilisé dans la souche BALB/c comme un modèle d'induction de la néphropathie chronique et progressive avec une protéinurie significative et persistante³³⁷. Cependant, les autres souches de souris se montrent plus ou moins résistantes à la néphrotoxicité de cette molécule. Afin de déchiffrer le rôle joué par REST dans l'adaptation des podocytes au cours de la néphropathie induite par l'ADR, nous avons dans un premier temps effectué une injection veineuse en rétro-orbitaire de 17µg/g d'ADR dans des souris BALB/c. Nous avons ainsi confirmé que la protéinurie devient importante à partir du 3^{ème} jour après l'injection. Les souris traitées avec l'ADR développent progressivement des lésions glomérulaires et meurent entre le 5^{ème} et le 10^{ème} jour après injection. Cependant, l'expression en ARNm de REST, montre une augmentation significative dans le cortex rénal des souris injectées avec l'ADR. Comme attendu, les ARNm des marqueurs podocytaires, néphrine et Wt1 sont également diminués par l'ADR. Cependant, nous avons observé une diminution de l'expression protéique de REST dans les souris traitées avec l'ADR contrairement à l'expression de son ARNm. L'expression protéique de la néphrine est également diminuée dans les souris injectées avec l'ADR.

Nos premières données établies *in vitro* montraient que REST joue un rôle important dans l'adaptation des podocytes au stress apoptotique, par conséquent, nous avons vérifié la pertinence de ces résultats dans un modèle animal initialement résistant à la néphrotoxicité de l'ADR. Le protocole consiste à effectuer une injection veineuse unique en rétro-orbitaire (17µg/g de souris) d'ADR ou du sérum physiologique (véhicule) dans des souris C57BL/6 REST^{flox/flox} et REST^{Δpod} adultes. Trois mois plus tard, les souris sont sacrifiées. L'étude histologique de ces souris montre une morphologie normale chez les souris REST^{flox/flox} et les REST^{Δpod} traitées avec du véhicule. Néanmoins, les souris REST^{flox/flox} traitées avec l'ADR développent quelques lésions glomérulaires avec quelques tubules sous forme de vacuole comparées aux souris REST^{flox/flox} traitées avec du véhicule. Mais de manière très surprenante, les souris REST^{Δpod} traitées avec l'ADR présentent des podocytes parfois scléreux avec des

pédicelles collapsés, elles montrent également plus de lésions glomérulaires que les souris $REST^{flox/flox}$ traitées avec du véhicule d'une part, et les souris $REST^{flox/flox}$ traitées avec l'ADR d'autres part. Les expressions protéiques, de la synaptopodine (la protéine majoritaire du cytosquelette podocytaire), de la néphrine (l'élément majeur du diaphragme de fente) sont significativement diminuées dans les souris $REST^{\Delta pod}$ traitées avec l'ADR comparé aux $REST^{flox/flox}$ traitées avec du véhicule mais aussi à celles traitées avec de l'ADR. L'expression protéique de la podocine est également diminuée dans les souris $REST^{\Delta pod}$ traitées avec l'ADR comparée aux souris $REST^{flox/flox}$ véhicule, mais cette baisse est non significative entre les groupes de souris $REST^{flox/flox}$ et $REST^{\Delta pod}$ traitées avec l'ADR.

L'ensemble de ces résultats montre que l'expression de REST dans les podocytes joue un rôle important dans leur adaptation et leur résistance aux glomérulopathies chronique et progressive associées à la néphrotoxicité de l'adriamycine. Ce rôle podocytaire au cours de la néphropathie chronique induit par l'adriamycine semble être lié au maintien du cytosquelette actine et au renforcement du diaphragme de fente.

REGULATION DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS DE DIFFÉRENCIATION PODOCYTAIRE ET DE REST PAR LES LIGNÉES DE PODOCYTES MURINS EN CONDITION DE STRESS INDUIT PAR LE SYSTÈME EMULATE

Les podocytes sont des cellules épithéliales glomérulaire post-mitotique et hautement spécialisées avec une capacité de croissance limitée. La culture de podocytes *in vitro* s'est avérée difficile. En effet, en culture, les podocytes se dédifférencient, ce qui s'explique par l'effacement des pédicelles et la perte de l'expression de ces marqueurs de différenciation^{348,349}. Mundel et ses collègues ont développé une lignée de podocytes de souris conditionnellement immortalisée, dans lesquelles ils ont établie des conditions de culture qui favorisent leurs différenciations, proliférations et l'expression protéiques de certains marqueurs³⁵⁰. Ces cellules, avec une structure un peu fibroblastique, n'expriment pas tous marqueurs podocytaires, mais sont très utilisées dans les études de la biologie du podocyte.

Nous souhaitons vérifier si REST joue un rôle dans l'expression des marqueurs de différenciations podocytaire. Pour cela, nous avons d'optimiser les conditions de culture classique des podocytes de Mundel afin de leur créer un environnement plus proche des conditions physiologique *in vivo*. Cependant, nous les avons co-cultivés avec des cellules endothéliales dans une chip ayant deux canaux séparés par une fine membrane qui mime la MBG. Les cellules dans la chip sont ensuite mise sous un flux continu dans un système organ-on-chips de la société Emulate³⁵¹. Nous avons montré qu'à partir de 4 jours sous un flux continu de 60 μ l/heure à 80 μ l/heure, les podocytes de Mundel expriment progressivement plus de podocine, de néphrine et de WT1 comparé aux conditions de cultures classiques sans flux. L'expression de REST est aussi augmentée dans les podocytes en condition de flux. L'ensemble de ces résultats pourrait suggérer un rôle de REST dans l'expression des marqueurs de différenciations podocytaires.

REST plays a role in podocyte adaptation to stress

Sato Magassa^{1,2}, Liviu Aaron³, Clément Hoguein^{1,2}, Bruce A. Yankner³ and Guillaume Canaud^{1,2,3,†}

1 Université de Paris, Paris, France.

2 INSERM U1151, Institut Necker Enfants Malades, Paris, France.

3 Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

4 Service de Néphrologie Transplantation Adultes, Hôpital Necker-Enfants Malades, AP-HP, Paris, France.

† Corresponding author:

Dr. Guillaume Canaud

Université de Paris

Service de Néphrologie Transplantation Adultes, Hôpital Necker Enfants Malade – Assistance Publique Hôpitaux de Paris

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1151

149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France.

Email: guillaume.canaud@inserm.fr

Abstract

Chronic kidney disease (CKD) is associated with the loss of functional nephrons that results in the overload of work for the remaining ones and particularly for the cells constituting the filtration barrier such as the podocytes. These cells are indeed exposed to metabolic stress and mechanical constraints that, in turn generate further nephron loss. The molecular pathways engaged to counteract these stresses are still unknown. Here, by combining *in vivo*, *in vitro* and organ-on-chip experiments, we have identified RE1-silencing transcription factor (REST), a repressor of neuronal genes during embryonic development, as an important player in podocyte adaptation to injury. Indeed, mouse with specific *Rest* deletion in podocytes demonstrated an accelerated development of albuminuria and glomerulosclerosis with aging. Mechanistically, we found that, such as in neurons, REST regulates cell cytoskeleton organization, cell survival and resistance to toxic. Finally, we observed that these data were relevant to Human with increased REST expression in podocytes with aging. In conclusion, our results disclose a novel function played by REST in podocyte adaptation to stress and identify a potential therapeutic target for preserving glomerular function in CKD.

Introduction

Chronic kidney disease (CKD) represents a worldwide health concern. In the US, 37 million people are estimated to have kidney dysfunction¹. The prevalence is not well known since it is a ‘silent’ disease but reaches up to 38% of the population over 65 years old². In addition, CKD is recognized as an important risk factor for death and cardiovascular diseases³. In 2005, the World Health Organization emphasized that chronic diseases are a global priority (Preventing chronic diseases: a vital investment: WHO global report, 2005, Geneva). Understanding the pathophysiology of CKD progression is, therefore, a key challenge for medical planning.

The renal glomerulus is a specialized vascular bed that functions as a barrier between the blood and urinary spaces. It allows the passage of small molecules and water freely into the urine, while preventing the loss of large serum proteins such as albumin. The barrier itself is composed of only two cell types, podocytes and fenestrated endothelial cells, separated by the glomerular basement membrane. Podocytes are differentiated cells whose foot processes expansion function as vasculature-supporting cells, producing basement membrane components and a number of vascular growth factors⁴. Morphologically podocytes consist of three distinct segments: a cell body, major processes, and foot processes. From the cell body, microtubule-rich major processes split into foot processes containing an actin-based cytoskeleton. Podocyte foot processes elaborate into a highly branched interdigitating network with foot processes of neighboring podocytes.

The podocyte is a post-mitotic cell supposed to almost never divide; is exposed to a huge arterial pulse pressure; is able to resist during the entire life but also to adapt to the increase of work during nephron reduction; and share many properties and pathways with other very specialized cell such as neurons. This cell acts as a central player in the progression of chronic kidney disease⁵. In fact, the podocyte can be either affected directly (i.e. diabetes, genetic disorders, toxics...) or secondary when it has to face with an increase of work such as during nephron

reduction and ageing. Whatever the type of the injury, the cytoskeleton of the podocyte is reorganized, with foot process effacement, proteinuria, podocyte detachment and apoptosis⁵. The loss of podocytes can only be compensated by hypertrophy of the remaining podocytes with a progressive decrease in the number of cells able to cover a given filtration area and the constitution of synechia leading to focal and segmental glomerulosclerosis⁵⁻⁷. The cellular mechanisms that are involved during podocyte injuries are only partially known and efficient therapeutics are dramatically lacking.

RE1-silencing transcription factor (REST) is a repressor of neuronal genes during embryonic development that is downregulated once terminal neuronal differentiation has occurred⁸. However, REST is induced in the ageing human brain and regulates a network of genes that mediate cell death and stress resistance⁹. It has been recently demonstrated that this gene network becomes dysregulated at early stages of Alzheimer's disease when REST is lost from the nucleus⁹. Conditional *REST* knockout mice and *C. elegans* models showed that REST protects neurons from age-related toxic insults by regulating a neuroprotective stress response that is central to cognitive preservation during ageing⁹. Interestingly, podocytes and neurons are post-mitotic cells that have similar morphological properties¹⁰. These cells share also comparable structural organization with highly tissue-specific proteins such as nephrin, ion channels (i.e. BKCa) or axonal guidance factors¹⁰. Furthermore, many cytoskeleton proteins that regulate the actin dynamics of foot processes in podocytes, such as synaptopodin, nestin, dendrin and INF2, are also expressed in neurons and several genetic diseases are affecting both, podocytes and neurons¹⁰.

Indeed, we decided to investigate if REST was playing a role in podocyte adaptation to stressful condition.

Methods

Animals

Mice models used in these studies housed and fed according to the regulation directed by the institutional animal Care and Use Committee of Harvard Medical School, the Departmental Director of Services Vétérinaires de la Prefecture de Police de Paris and by the Ethical Committee of Paris Descartes University.

Mice carrying floxed alleles of *REST* flanking exon 2 (previously described⁹) were crossed with *Nestin-Cre* transgenic mice (strain No. 003771 from Jackson laboratory) to made *REST* conditional knock out in podocyte (*REST^{Δpod}*). The *Nestin-Cre* transgene are in the C57BL/6J background and *REST^{lox/lox}* alleles were in hybrid C57BL/6J and 129Sv/Ev background. *REST^{Δpod}* mice (hybrid C57BL/6J and 129Sv/Ev background) born, at expected Mendelian ratios, from *Nestin-Cre:REST^{lox/lox}* were viable, fertile and did not display any visible phenotypes. The *REST^{lox/lox}* control group and *Nestin-Cre* mice were identified in mouse genotyping by PCR using primers to amplify *REST* gene flanking exon 2. These primers were: 5'-CATGCGAGTACTGCCATACCCAAC-3', 5'-GTGATGGGGCAGTCTTCTGGAGG-3' et 5'-GGGCACACCTTTAATCCTAGCTTC-3'. These primers allow to identify WT, floxed and recombined *REST* alleles respectively at 220 bp, 264 bp and 375 bp. Both male and female in the same littermate were used in experimental groups and were randomly selected for aging, retro-orbital injection of 17 μg/g of adriamycin or subtotal nephrectomy experiment at 4 months of age. The urine was regularly collected. Then mice were euthanized at 12 to 24 months of age for aging phenotype or 8 months of age for adriamycin treated and nephrectomized mice. Kidneys and blood are collected for molecular and histological processing.

Tomato-GFP C57BL/6 mice¹¹ which express tomato ubiquitously (red fluorescence) were crossed with C57BL/6 *Podocin-Cre* mice to induce the excision of tomato gene and GFP expression in podocin expressing cells like podocytes. Before 2 weeks of age, *GFP-Cre⁺* and

WT mice euthanized, kidneys were harvested and digested by collagenase. Then GFP⁺ podocytes were isolated using flow cytometer (Sony SH800).

BALB/C mice from Charles River were also used for adriamycin treatment. The mice at 2 months of age were injected with one dose of 17 µg/g of adriamycin and euthanized 3 to 6 days later. At time of euthanasia, kidneys were collected for RNA, protein, and morphological studies.

Plasma and Urine analyses

Coomassie gel were used to follow urinary albuminuria progression. Ten milliliters of urine were run by SDS-PAGE, followed by Coomassie blue staining. Mouse blood and urinary albumin or creatinine concentration were measured precisely using Olympus multiparametric analyzer (Instrumentation Laboratory).

Cell culture

Human Embryonic Kidney cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, gibco, Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (sigma ref No. F7524), 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (Pen Strep gibco, Life Technologies) at 37°C, 5% CO₂ in cell culture incubator.

GFP⁺ primary podocytes were isolated by flow cytometry then centrifuge 5 min 20 °C at 500G. Pellet were suspended in culture medium containing RPMI 1640 (1X) + GlutaMAX™ (gibco® Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (sigma ref No. F7524), 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (Pen Strep gibco® Life Technologies). Then cells were seeded on dish or plate coated before by type I collagen (Corning, ref No. 354236) at 50 µg/mL during 1 hour at room temperature or overnight at 4 °C and put in cell culture incubator à 37°C and 5% CO₂. After cell attachment, they were observed at 488 nm emission wavelength under fluorescent microscopy. Cells could be used for experiment at passage 1 to passage 6.

Mouse immortalized podocytes were cultured as previously described³. Briefly; podocyte were cultured in RPMI 1640 (1X) + GlutaMAXTM (gibco[®] Life Technologies) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (sigma ref No. F7524), 50 U ml⁻¹ penicillin and 50 µg/ml streptomycin (Pen Strep gibco[®] Life Technologies). To induce cell proliferation, podocytes were cultivated under permissive condition at 33 °C, 5% CO₂ on type I collagen (Corning, ref No. 354236) at 50 µg/mL as matrix, in cell culture medium supplemented with 100 U ml⁻¹ recombinant mouse interferon-γ (mIFN-γ). Cells were maintained under this condition for 1 week. Then, they were put in differentiation and non-permissive conditions at 37 °C, 5% CO₂ on type I collagen as matrix and without mIFN-γ.

Medium for each cell type were change every 48 to 72 hours. When cells become 70% to 100% confluent, they were harvested using 0.5% trypsin-EDTA (1X) (gibco[®] Life Technologies) and centrifuge 5 min 20 °C at 500G. Then the needed number was seeded on dish, plate with or without coverslip in complete medium for culture.

Cell Transfection and Adriamycin or H₂O₂ treatment

For overexpression experiments, cells were transiently transfected by addgene LCP-flag-REST-WT (addgene plasmid ref No. 41903). An Empty Vector plasmid was used as negative control. Briefly, plasmid was sent from addgene in DH5alpha bacteria as agar stab strain. The stab bacteria was streaked on LB agar plate with appropriate antibiotic, one single colonies was selected for inoculating an overnight liquid culture. Then the plasmid DNA was isolated from the bacterial culture using a plasmid DNA purification kit NucleoBond[®] Xtra (Macherey-Nagel), following the manufacturer instructions. InvitrogenTM LipofectamineTM 2000 (ThermoFisher scientific, ref No. 11668500) or the jetPRIME[®] DNA/siRNA (Polyplus transfection[®], ref No. 114-07) were used as transfection reagents. A day before transfection, the recommended cells number were seeded and put in culture. At the transfection day, cells were respectively cultured at least 30 minutes with opti-MEM Reduced serum media

(ThermoFisher scientific, ref No. 31985070) supplemented with 10% of fetal bovine serum for lipofectamine 2000 reagent transfection and overnight in the complete media for polyplus reagent transfection. The transfection reagents and 1 to 4 μ g of REST or Empty Vector plasmid were separately diluted in Opti-MEM Reduced serum media (ThermoFisher scientific, ref No. 31985070) following the manufacturer instructions. The plasmid solution were mix to reagents dilution and incubate 10 to 30min respectively for polyplus and lipofectamine 2000 reagents. Then transfection mix is add to the cell culture and incubate 6 hours to 48 hours. Then cells were left to rest in complete medium without transfection solution during 24h before be used for others experiment or lysis.

For inhibition of expression experiments, cells were transiently transfected using TriFECTa DsiRNA kit (mm.Ri.Rest.13 and hs.Ri.REST.13). HEK cells/podocytes were transfected with human/mouse DsiREST RNA or with human/mouse Negative Control DsiRNA at 20nM using INTERFERin[®] *in vitro* siRNA/miRNA (Polyplus transfection[®], ref No. 409-10) transfection reagent. Conforming to the manufacturer instruction, a day before transfection, cells were counted and seeded in complete media. 20 nM of negative Control and REST DsiRNA were diluted in Opti-MEM then the dilution was mix to the needed INTERFERin reagent and add to the cell culture conforming to manufacturer instruction. For RNA and protein experiments, cells are maintained in transfection solution respectively 24 hours and 48 hours.

After transfection and before lysis with 1X RIPA buffer, cells were treated or not with 1 μ M of Adriamycin (Doxorubicin hydrochloride, SIGMA-ALDRICH, ref No. D1515) or with 1 to 100 μ M of hydrogen peroxide (SIGMA-ALDRICH, ref No. H1009) during 24 hours.

Histological analysis

Freshly dissected kidney tissues were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) overnight at room temperature, 50% ethanol dehydrated, and paraffin embedded. Four- μ m sections were stained with Masson's trichrome, picosirius red, H&E and periodic acid-Schiff (PAS). Glomerular

lesions and fibrosis level was blindly examined using Nikon eclipse E800 microscope relied on nikon digital camera FDX35. The lesions and fibrosis were quantified using a semi-quantitative score methodology, as previously described⁶.

Immunochemistry and immunofluorescence

Four- μ m paraffin embedded kidneys sections were deparaffinized in Bio Clear solution (Bio Optica ref No. 061782Q), rehydrated and heated to mediate antigen retrieval. Endogenous peroxidase activities were blocked by incubating sections in 3% H₂O₂ followed by endogen avidin-biotin blocking and serum non-specific sites blocking. Then sections were incubated with antibodies to REST (Millipore, ref No. 07579, 1:50), nephrin (progen, ref No. GP-N2, 1:100), podocin (Sigma-Aldrich, ref No. P0372, 1:50), Wt1 (Dako, ref No. M3561, clone 6F-H2, 1:50), Nestin (Santa Cruz, ref No. SC-58813, 1:50) and cleaved caspase 3 (Cell Signaling technology, ref No. 9664, 1:50). The cell nucleus were stain by the Hoechst solution (Thermo Fisher, 33342). Glomerular Wt1 or cleaved caspase 3 positive cells was counted.

HEK cells or mouse Mundel podocyte or mouse primary GFP⁺ podocytes was fixed in 4% PFA 15 min, blocked in PBS – 5% NGS – 1% BSA – 0,3% triton 100X 30 min and then incubated with antibodies to REST (Millipore, ref No. 07579, 1:50), nephrin (progen, ref No. GP-N2, 1:100), podocin (Sigma-Aldrich, ref No. P0372, 1:50), Wt1 (Dako, ref No. M3561, clone 6F-H2, 1:50), Nestin (Santa Cruz, ref No. SC-58813, 1:50) and cleaved caspase 3 (Cell Signaling technology, ref No. 9664, 1:50), synaptopodin (abcam, ref No. ab109560), 1:50), or paxillin (abcam, ref No. ab32084, 1:100) and phalloidin-tetramethylrhodamine (TRITC) (Sigma-Aldrich). The cell nucleus were stain by the 4',6-diamidino-2-phenylindole,dihydrochloride (Dapi) (life technologies, ref No. 103670, 300nM).

The confocal Zeiss LSM 700 confocal microscope (magnification x400) were used to analyze immunofluorescence studies and ImageJ software were used to perform quantifications.

Isolation of Glomeruli by laser-capture microdissection assay:

Kidney sections (30 μm) were fixed in absolute ethanol and stained with eosin Y as previously described⁶. The Palm Microbeam laser microdissection microscope (ZEISS) were used to selectively microdissected glomeruli. A sufficient number of glomeruli were dissected from each mouse, then the appropriate buffers were used for proteins extraction.

β -galactosidase staining

Mouse primary GFP⁺ podocytes or human HEK cells were fixed with 4% PFA 3 min at room temperature, incubated with SA- β gal staining solution overnight at 37°C, as previously described⁵. Nucleus of cells were stained with the 4',6-diamidino-2-phenyllindole, dihydrochloride (Dapi) (life technologies, ref No. 103670, 300nM). The coverslips were mounted on slides and SA- β gal positive cells were counted using Nikon eclipse E800 microscope relied on nikon digital camera FDX35 (magnification x200).

TUNEL-induced apoptosis assay

Four μm paraffin-embedded kidney sections were deparaffinized and rehydrated as previously described, treated 15 min at 37°C with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteinase K enzyme solution (Roche), and incubated 1 hour at 37°C with TUNEL solution (*In situ Cell Death Detection Kit*, Roche, ref No. 1684795). Then, Nucleus of cells were stained with the 4',6-diamidino-2-phenyllindole, dihydrochloride (Dapi) (life technologies, ref No. 103670, 300nM). The number of apoptotic podocytes was determined as the number of TUNEL-positive nuclei per glomeruli and counted using ZEISS LSM700 confocal microscope (magnification x400).

Quantitative real-time PCR

RNA total extract were obtained from kidneys cortex, whole kidneys or cells using the NucleoSpin[®] RNA kit (Macherey-Nagel, ref No. 740955), quantified by using NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) and reverse-transcribed using egradient S MasterCycler (Eppendorf, ref No.5345). qRT-PCR was performed on a CFX96[™] Real-Time System (BIORAD) according

to the manufacturer's instructions. The primers used in the experiments was: *huGapdh* (fwd: 5'-CAACCCATGGCAAATTCC-3', rev: 5'-TGATGGGATTTCATTGATGAC-3'), *mGapdh* (fwd: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3', rev: 5'-TGGATGCAGGGATGATGTT-3'), *huRpl13* (fwd: 5'-CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA-3', rev: 5'-TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA-3'), *mRPL13* (fwd: 5'-CTCATCCTGTTCCCCAGGAA-3', rev: 5'-GGGTGGCCAGCTTAAGTTCTT-3'), *huhprt* (fwd: 5'-TGGGAGGCCATCACATTGTA-3', rev: 5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAA-3'), *mhpert* (fwd: 5'-GGCCAGACTTTGTTGGATTTG-3', rev: 5'-CGCTCATCTTAGGCTTTGTATTTG-3'), *mppia* (fwd: 5'-GGCTATAAGGGTTCCTCCTTTC-3', rev: 5'-TTTCTCTCCGTAGATGGACCT-3'), *huCdkn2a* or *p16* (fwd: 5'-CAAGATCACGCAAAAACCTCTG-3', rev: 5'-CGACCCTATACAGTTGAACTG-3'), *mCdkn2a* or *p16* (fwd: 5'-GGCCAATCCCAAGAGCAGAG-3', rev: 5'-GCCACATGCTAGACACGCTA-3'), *huCdkn1a* or *p21* (fwd: 5'-TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA-3', rev: 5'-AAGATCAGCCGGCGTTTG-3'), *mCdkn1a* or *p21* (fwd: 5'-GGAACATCTCAGGGCCGAAA-3', rev: 5'-CTGACCCACAGCAGAAGAGG-3'), *huREST* (fwd: 5'-CGGTTGGGGATAACAACCTTTTCA-3', rev: 5'-TCTACGCTGAGTTCCAAA-3'), *mREST* (fwd: 5'-GAGACAGCAAGCTTCTGAAG-3', rev: 5'-CAGAGTATCTGTCTTCTGCTC-3'), *mNephrin* (fwd: 5'-AGGTGTCATATCGCCAAGCC-3', rev: 5'-CAGCGAAGGTCATAGGGGTC-3'), *mWt1* (fwd: 5'-CACGGCACAGGGTATGAGAG-3', rev: 5'-GTTGGGGCCACTCCAGATAC-3'). *Gapdh*, *Rpl13*, *Ppia* and *Hprt* was used as normalization controls.

Western blot

Western blot analysis were performed as previously described⁸. Tissues or cells lysate were centrifuged 15 min at 14000 rpm, 4°C and protein content was determined with Pierce™ BCA Protein Assay kit (Thermo scientific, ref No.23228) and Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific, ref No. 1410101). Equal amount of proteins were denatured by heating 5 min at 95°C in Laemmli containing 7% of β-mercaptoethanol buffer, resolved on 4-15% Mini-PROTEAN TGX™ Gel (Bio-Rad), SDS-PAGE using the Bio-Rad Mini PROTEAN® Tetra System. After electrophoresis, gel proteins were transferred on nitrocellulose membrane using the Bio-Rad Trans-Blot® Turbo system. Membrane was blocked in Tris Buffered Saline with 1% Tween (TBS-T) and 3% BSA for 30 min, then incubated 2 hours at room temperature or overnight with antibodies to REST (Millipore, ref No. 07-579, 1:500), β-actin (Sigma Aldrich, ref No. A5316, 1:5000), cleaved-caspase 3 (Asp175) (5A1E) (Cell Signaling, ref No. 9664, 1:1000), PARP (Cell Signaling, ref No. 9542S, 1/1000), phosphor-H2A.X (Ser139) (20E3) (Cell Signaling, ref No. 9718, 1:1000), nephrin (progen, ref No. GP-N2, 1:500), podocin (Sigma-Aldrich, ref No. P0372, 1:1000), Wt1 (Thermo Scientific, ref No. PA5-16879, 1:500), α-Tubulin (Sigma-Aldrich, ref No. T5168, 1:5000), and lamin AC (4C11) (Cell Signaling, ref No. 4777, 1:1000), followed by the appropriate peroxidase-conjugated or fluorescence secondary antibodies (1:5000). Secondary coupled chemiluminescence or fluorescence was acquired using a Fusion FXR camera (Vilbert Lourmat). Band density was calculated and normalized using Image Lab 5.0 software (Bio-Rad).

Data analysis and statistics

The statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 software. Data Were expressed as mean ± SEM. To compare two experimental groups Mann-Whitney or Student's *t* test was used. ANOVA and Turkey-Kramer test was used to compare more experimental groups. The difference between groups was significant if $P < 0.05$.

Results

Podocyte specific *Rest* deletion accelerates podocyte injury and proteinuria

We first examined REST expression in the total kidney. We observed at the mRNA level that *REST* expression was increasing with ageing (**Fig. 1A**). Colocalization experiments revealed that, in young mice (8 weeks), REST expression was detected in the cytoplasm of podocytes but also in tubular cells (**Fig. 1B**). However, in older mice (52 weeks), with ageing, we observed that REST was expressed in the nucleus of podocytes whereas no changes were detected in the tubular compartment (**Fig. 1B**). We then explored REST expression in subtotal nephrectomy (subtotal Nx), a second model of accelerated nephron loss. Interestingly, we observed that *REST* mRNA expression increased after subtotal Nx (**Fig. 1C**). Furthermore, at the protein level, while sham operated mice had barely detectable REST expression, REST was detectable in the nucleus of podocytes after subtotal Nx (**Fig. 1D**). To demonstrate that REST was expressed in podocytes with ageing, we decided to isolate primary podocytes from old mice (52 weeks). To this aim, we created *GFP^{Apod}* mice by breeding Tomato/GFP mice with *Nphs2.Cre* mice and selectively isolated GFP-podocytes using flow cytometry. Strikingly, these podocytes were expressing several important differentiation markers including WT1, podocin, synaptopodin, nephrin and nestin (**Supplementary Fig.1A**). Interestingly, immunofluorescence studies revealed REST expression in the nucleus of podocytes (**Fig. 1E**). Furthermore, cellular sub fractioning experiment demonstrated that REST was mainly expressed in the nucleus (**Fig. 1F**). In order to better understand the role played by REST in the aging podocytes, we generated podocyte-specific *Rest* mutant mice (*Rest^{Apod}*) by crossing mice bearing floxed *Rest* alleles (*Rest^{lox}*) with *Nestin.Cre* mice. Immunofluorescence analysis and glomerular isolation using laser capture microdissection confirmed the marked reduction ($90 \pm 2\%$) of REST protein expression in podocytes of mutant mice (**Fig. 1G, 1H and Supplementary Fig.1B**). *Rest^{Apod}* mice born in an expected Mendelian ratio and were indistinguishable from *Rest^{Apod}* littermates

at least up to six months after birth under physiological conditions (data not shown). However, whereas urinary albumin excretion remained stable in *Rest*^{WT} mice throughout the 2- to 12-month follow-up, it progressively increased in *Rest*^{Apod} mice (**Fig. 1I**). Morphological analysis showed more severe glomerular lesions in 12-month old *Rest*^{Apod} mice than in wild-type littermates (**Fig. 1J**). In addition, we observed that the severity of both, tubular dilations and interstitial fibrosis (**Fig. 1K and 1L**), was significantly increased in *Rest*^{Apod} mice 12 months after birth, confirming the role played by REST in podocytes adaptation to ageing. Previous studies have shown that REST pathway activation may stimulate cell proliferation, inhibits apoptosis and controls the ability of cells to migrate. We therefore monitored the functional impact of *REST* deletion in podocytes during ageing. As expected, the rate of cell proliferation was very low and undistinguishable, in both, *Rest*^{WT} and *Rest*^{Apod} mice (not shown). Conversely, whereas the percentage of glomeruli with apoptotic cells stained for Cleaved Caspase 3 and TUNEL was modestly enhanced in wild-type mice with ageing, it dramatically increased in *Rest*^{Apod} mice (**Fig. 1M, 1N AND 1O**). Glomerular apoptosis was further confirmed by western blot analysis of glomerular extract. The increased apoptosis correlated with podocyte rarefaction as assessed by the significant reduction of WT1-positive cells in *Rest*^{Apod} mice compared to *Rest*^{WT} (**Fig. 1P**). Indeed, REST plays a role in podocyte surviving during the ageing process.

REST is regulated by stressful condition

To gain further insights the regulation of REST, we moved *in vitro*. We first exposed HEK cells to increasing concentration of hydrogen peroxide in order to induce replicative senescence phenotype. Interestingly, cells exposed to 100nM of hydrogen peroxide demonstrated β -galactosidase staining (**Fig. 2A**), *p16* and *p21* mRNA expression but also REST expression (**Fig. 2B and 2C**). We then decided to use primary culture of GFP-mouse podocytes. Such as HEK cells, cultured podocytes exposed to hydrogen peroxide demonstrated evidence of

replicative senescence (**Fig. 2D and 2E**) as well as an increase in REST expression with nuclear translocation (**Fig. 2F**). We therefore conclude that REST is induced with oxidative stress.

We then explored the role played by REST in apoptosis. We first exposed HEK cells to increasing concentration of adriamycin. Adriamycin induced DNA damaged and cell apoptosis (**Fig. 2G**) with a decrease of REST expression (**Fig. 2H**). Next, we exposed primary culture of podocytes to adriamycin. Following adriamycin exposure, we observed a loss of podocyte markers (**Fig. 2I**) as well as a reduction of REST expression with apoptosis (**Fig. 2J**). To identify a potential protective role played by REST we transfected HEK cells with plasmids containing REST sequences. Importantly, HEK cells overexpressing REST exposed to adriamycin showed fewer apoptotic markers compared to cells transfected with the empty vector (**Fig. 3A and 3B**). Immortalized podocytes transfected with plasmids containing REST sequences exposed to adriamycin showed a modest reduction in apoptotic markers when exposed to adriamycin (**Fig. 3C**). On the other hand, HEK cells and immortalized podocytes transfected using shRNA lentivirus targeting *REST* and exposed to adriamycin were significantly more prone to apoptosis (**Fig. 3D and 3E**).

To further characterize the function played by REST in podocyte cytoskeleton maintenance, immortalized podocyte cell line staining with Paxillin and Phalloidin showed that *REST* knockdown resulted in a completed reorganization of F-actin cytoskeleton with a reduction in the number of focal adhesion processes, as judged by the decrease in the number of paxillin patches (**Fig. 4A**). Such modifications correlated with an increase in motility as revealed by the higher rate of wound closure of *Rest*^{-/-} podocytes compared to controls (**Fig. 4B**). Conversely, overexpression of REST in immortalized podocytes led to an increase in the number of paxillin patches (**Fig. 4C**) and a reduction in motility (**Fig. 4D**). To more specifically mimics the *in vivo* condition of hemodynamic stress, we took advantage of a new device that allows organ-on-chip exploration (**Supplementary Fig. 2**). Immortalized mouse podocytes were co-cultured with

immortalized mouse endothelial cells in the chip. The cells were separated by a PDMS membrane containing micropores. Podocytes were exposed to mechanical stress and flow. After 8 days, podocytes we observed a dramatic increase expression of differentiation markers such as nephrin, podocin, WT1 as well as REST expression compared to podocytes in static condition (**Fig. 4E, 4F ad 4G**). *REST* deleted podocytes exposed to mechanical stress detached from the membrane compared to controls.

In order to confirm these data *in vivo*, we used at toxic model to induce podocyte injury. Balb/c mice, received a single dose of intravenous adriamycin 17ug/g. As expected, compared to vehicle, the adriamycin treated mice developed a huge amount of albuminuria (**Fig. 5A**). Consistently, adriamycin injected mice had severe glomerular damage with podocyte dedifferentiation, apoptosis as well as a reduction in REST expression (**Fig. 5B, 5C and 5D**). Next, we decided to inject C57b6 *Rest*^{WT} and *Rest*^{Apod} mice with adriamycin. This strain is reputed for its resistance to adriamycin toxicity. Mice received a single injection of adriamycin 17ug/g. Compared to vehicle treated, *Rest*^{WT} mice did not develop significant increase of proteinuria. However, *Rest*^{Apod} mice developed albuminuria kidney lesion. Indeed, glomerular lesion score was more pronounced in *Rest*^{Apod} mice (**Fig. 5E**) with dedifferentiated podocytes and an increase in the rate of apoptosis (**Fig. 5F**). Collectively, these data support a stress responsive role played by REST in podocyte.

REST is expressed in human podocyte during ageing

Finally, we wondered if REST was expressed in human kidney cells. To this aim, we stained pre-implant biopsies from young and old adult donors. Interestingly, whereas REST staining was not detectable in the kidney of young donors, its expression was detectable in podocytes of aged donors, supporting our findings (data not shown).

Discussion

The molecular pathways that counteract the stress following podocyte injuries are largely unknown. By combining experimental models of podocyte diseases with *Rest^{Apod}* mutant mice, we have uncovered a novel function for REST protein in podocytes. We showed that REST plays an important role in podocyte adaptation to stress, whose inactivation resulted in podocyte apoptosis, proteinuria and glomerulosclerosis after both, experimental and aging-induced nephron reduction. Furthermore, such as in neuron cells, we have identified that REST was involved in cytoskeleton maintenance. These results unveil a novel molecular pathway of podocyte adaptation to stress.

Although many studies have been conducted to elucidate the molecular mechanisms leading to podocyte injury during CKD, the signaling pathways that allow podocytes to compensate and survive after nephron loss, the hallmark of all CKD, are still unknown. Our study points to REST that prevents podocyte dedifferentiation and loss in this setting. In fact, we observed that REST is activated in podocytes with nuclear translocation in response to age related nephron reduction but also after subtotal nephrectomy. Interestingly, these observations are consistent with reports from neuron reduction models⁹. We also showed that replicative senescence induces REST expression in podocytes while conversely, drug toxic models using Adriamycin led to a striking reduction of REST podocyte expression. Importantly, we found that overexpression of REST was sufficient to improve the survival of different cell lines including podocytes. On the contrary, REST deletion either *in vitro* or *in vivo* was associated with spontaneous apoptosis that was worsened after Adriamycin exposure. Finally, *Rest^{Apod}* mutant mice exposed to Adriamycin demonstrated a higher amount of proteinuria, glomerular lesions with a higher rate of apoptotic cells confirming the role played by REST in podocytes survival during toxic injury.

One of the most prominent features of podocytes is the very specific organization of the cytoskeleton that appears crucial for their proper function⁴. Indeed, a strong correlation has been recently shown between podocyte cytoskeleton modifications and podocyte-enhanced migratory properties and the development of albuminuria and glomerulosclerosis. Interestingly, we observed that the ability to regulate cytoskeleton organization and migration diverge according to the level of REST expression. Indeed, cell lines, including immortalized podocytes, with a reduced *REST* expression demonstrated enhanced migratory properties with decreased formation of focal adhesion.

Interestingly, using a microfluidic organ-on-a-chip device we were able to improve the differentiation state of an immortalized podocyte cell line, such as other groups^{12,13}. Importantly, we confirmed that the mechanical constraints increased the level of REST expression, and podocytes with REST deletion detached with stress. Finally, we described in pre-implant biopsies that REST is also observed in podocytes of aged donors compared to younger. In the future, we will have to understand how to increase REST expression to counteract with podocyte injury.

In conclusion, this work has established REST as a stress-responsive axis in podocyte biology that prevents cytoskeleton alteration and apoptosis after podocyte injury or during aging. Disruption of this adaptive pathway leads to glomerular lesions and albuminuria. Therefore, REST in podocytes may be a therapeutic target for the maintenance of glomerular functions to prolong renal survival during chronic renal disease.

Figure 1: Podocyte specific *Rest* deletion accelerates podocyte injury and proteinuria. (A) RT-qPCR of REST mRNA in kidney extracts from young 8 weeks ($n=6$) and aging 52 weeks ($n=5$) C57BL/6 mice. (B) Coimmunostaining of REST and Nestin in young ($n=6$) and aged ($n=5$) C57BL/6 mice. Scale bar, 10 μm . Insets show higher-magnification images of representative podocytes. (C) REST mRNA in kidney extracts of Sham-operated (Sh) ($n=6$) and 75% nephrectomized (Nx) ($n=10$) C57BL/6 mice, 2 months after surgery. (D) Immunostaining of REST in Sh ($n=6$) and Nx ($n=10$) C57BL/6 mice 2 months after surgery. Insets show higher-magnification images of representative podocytes. (E) Coimmunostaining showing REST and GFP in primary isolated GFP-podocytes from old 52 weeks C57BL/6 mice. (F) Western blot of REST on cytoplasmic ($n=4$) and nuclear fractions ($n=4$) of primary isolated GFP-podocytes from 52 weeks old C57BL/6 mice. (G) Immunofluorescence of REST and Nestin in podocyte-specific *Rest* mutant ($REST^{\Delta\text{pod}}$) ($n=5$) and *Rest* floxed ($REST^{\text{lox}/\text{lox}}$) ($n=5$) 52 weeks old C57BL/6 mice. Scale bar, 10 μm . Insets show higher-magnification image of representative podocytes. (H) Western blot of REST on laser microdissected glomerular extracts from kidneys of $REST^{\text{lox}/\text{lox}}$ ($n=4$) and $REST^{\Delta\text{pod}}$ ($n=4$) 52 weeks old C57BL/6 mice. (I) Albumin to creatinine ratio (mg/mmol) in urine from C57BL/6 $REST^{\text{lox}/\text{lox}}$ and $REST^{\Delta\text{pod}}$ 52 weeks old mice ($n= 5$ for both conditions). (J - L) morphology and lesion scores of kidneys from $REST^{\text{lox}/\text{lox}}$ ($n=4$) and $REST^{\Delta\text{pod}}$ ($n=4$) 52 weeks old C57BL/6 mice. Scale bar, 10 μm . (M - O) cleaved caspase 3 immunostaining (M), TUNEL assay (N), and WT1 immunostaining and quantification (lower panel) of kidneys from $REST^{\text{lox}/\text{lox}}$ and $REST^{\Delta\text{pod}}$ 52 weeks old C57BL/6 mice. Scale bar, 10 μm . (P) Western blot and quantification of CC3 in kidney extracts from $REST^{\text{lox}/\text{lox}}$ ($n=4$) and $REST^{\Delta\text{pod}}$ ($n=4$) 52 weeks old C57BL/6 mice. Scale bar, 10 μm . All data are shown as the mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ between groups, Mann-Whitney or t test.

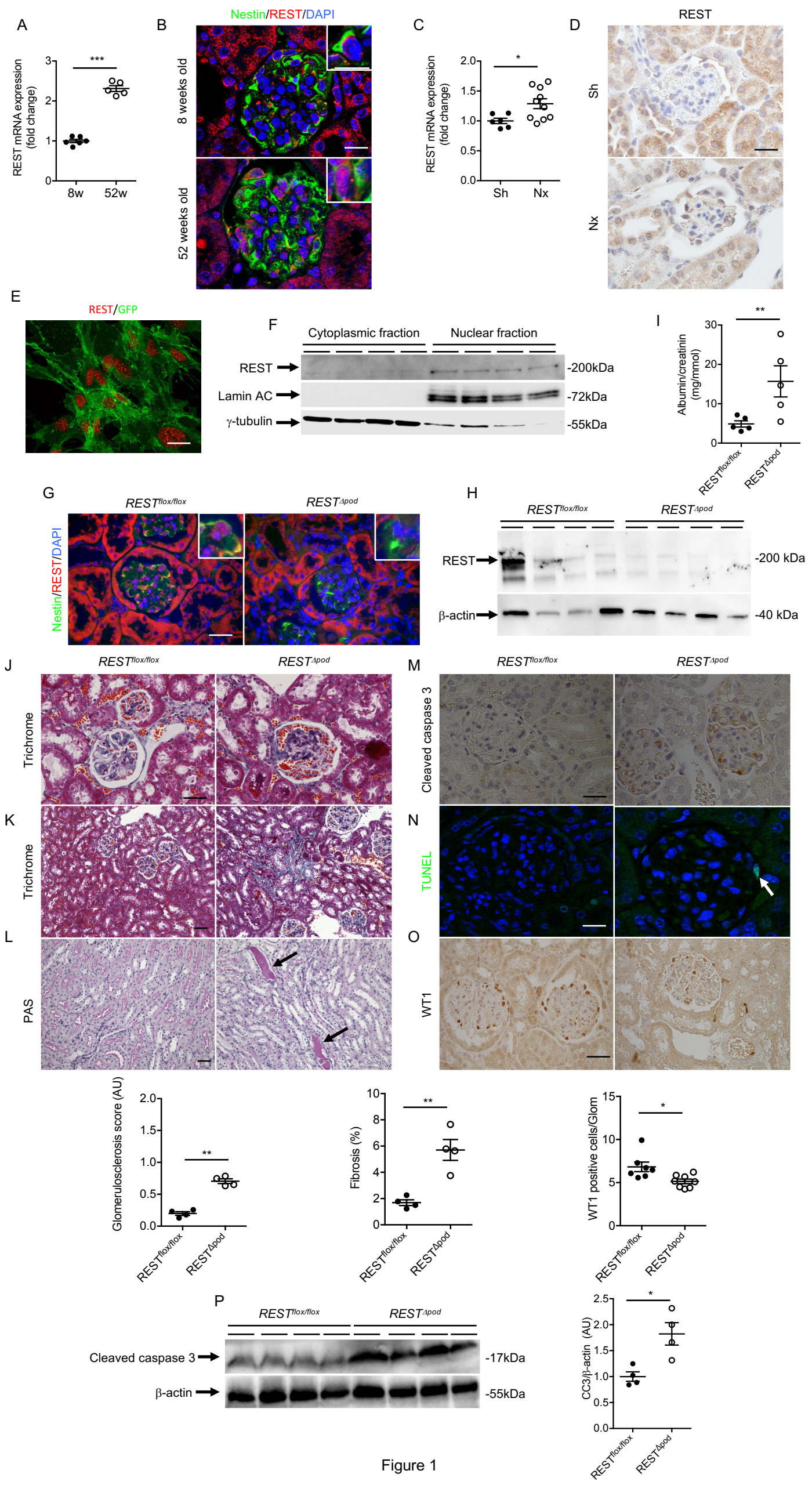


Figure 1

Figure 2: REST is regulated by stressful condition. (A) β -galactosidase staining of 0, 10 and 100 μ M H₂O₂ treated HEK cells ($n=3$ experiments). Scale bar, 5 μ m. (B) RT-qPCR of P16, P21 and REST in HEK cells treated with 0, 50 and 100 μ M of H₂O₂ ($n=3$ different experiments). (C) Western blot of REST in 0, 10 and 100 μ M H₂O₂ treated HEK cells. (D) β -galactosidase staining and quantification of primary culture of GFP-podocytes exposed to either 0 or 100 μ M H₂O₂ ($n=4$ experiments). Scale bar, 5 μ m. (E) RT-qPCR of *P16*, *P21* and *REST* in primary culture of isolated GFP-podocytes exposed to 0 and 100 μ M of H₂O₂ ($n=3$ experiments). (F) Western blot showing REST expression primary culture of isolated GFP-podocytes exposed to 0 and 100 μ M of H₂O₂. (G) Western blot showing cleaved PARP and γ H2AX expression in HEK cells treated with either 0 or 1 μ M of Adriamycin ($n=4$ experiments). (H) Western blot of REST in HEK cells exposed to 0, 0.1 and 1 μ M of Adriamycin. (I) *WT1* mRNA expression of primary culture of isolated GFP-podocytes exposed to 1 μ M of Adriamycin ($n=3$ experiments). (J) Western blot and quantification of REST, cleaved PARP and γ H2AX in primary culture of isolated GFP-podocytes exposed to 1 μ M of Adriamycin ($n=4$ experiments). All data are shown as the mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ between groups, Mann-Whitney or t test.

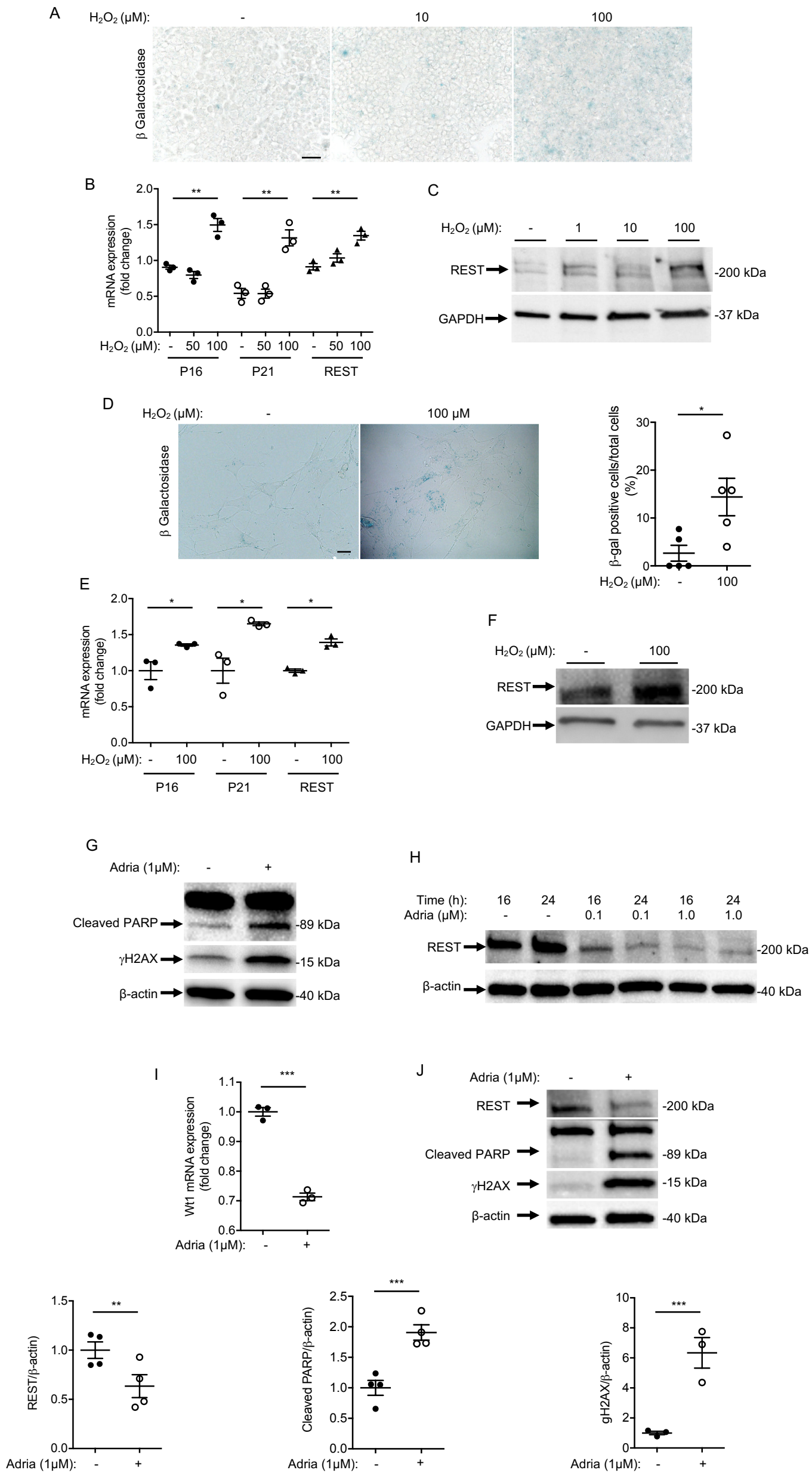


Figure 2

Figure 3: REST regulate podocyte apoptosis in stressful condition. (A) Western blot of REST, cleaved PARP and γ H2AX in HEK cells transfected with REST overexpression plasmid (pREST) or with empty vector (pEV) and treated with 0 or 1 μ M of Adriamycin. (B) Immunofluorescence (left) and quantification (right) of cleaved caspase 3 (CC3) in pREST and pEV HEK cells exposed to either 0 or 1 μ M of Adriamycin treated pREST and pEV HEK cells ($n=3$ experiments). Scale bar, 5 μ m. (C) Western blot (left) and quantifications (right) of REST, cleaved PARP and CC3 in pREST or pEV transfected immortalized mouse podocyte cell line exposed to either to 0 or 1 μ M of Adriamycin ($n=3$ experiments). (D) Western blot and quantification of REST, cleaved PARP and CC3 in HEK transfected cells with siREST or siCtrl- and treated with 0 or 1 μ M of Adriamycin ($n=4$ experiments). (E) Western blot (left) and quantifications (right) of REST, cleaved PARP and CC3 in immortalized mouse podocyte transfected with siREST or siCtrl- and treated with 0 or 1 μ M of Adriamycin ($n=4$ to 6 experiments). All data are shown as the mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ between groups, Mann-Whitney or t test.

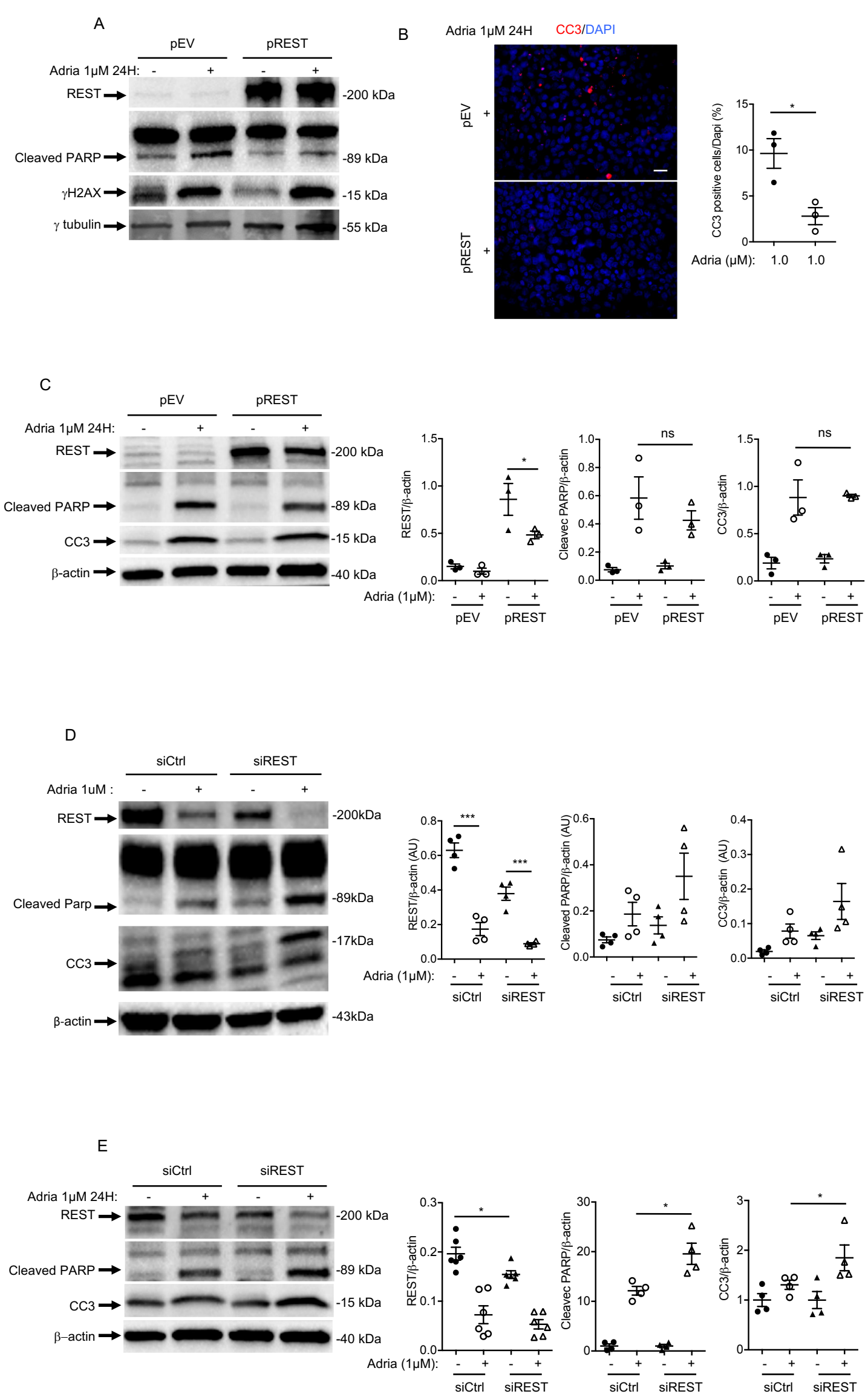


Figure 3

Figure 4: REST regulate podocyte migration and attachment to the basement membrane.

(A) Coimmunostaining using phalloidin, an F-actin marker, and paxillin-specific antibodies and quantification in immortalized mouse podocyte transfected with siREST or siCtrl- ($n=3$ experiments). Scale bars, 10 μm . The insets show higher magnification image of podocyte structures with stress fibers and focal adhesion. (B) Wound healing assay (upper left) and percentage of wound closure quantifications at 2h, 6h and 24h (in the bottom) in immortalized mouse podocytes transfected with either siREST or siCtrl- ($n=3$ experiments). Scale bars, 5 μm . (C) Coimmunostaining using phalloidin, an F-actin marker, and paxillin-specific antibodies in immortalized mouse podocytes transfected with either pREST or pEV ($n=3$ experiments). Scale bars, 10 μm . The insets show higher magnification image of podocyte structures with stress fibers and focal adhesion in pREST transfected mouse podocyte. (D) Wound healing assay (upper right) and percentage of wound closure quantifications (lower) at 2h, 6h and 24h using immortalized mouse podocytes transfected with either pREST or pEV ($n=3$ experiments). Scale bars, 5 μm . (E, G) Western blot and quantification of Nephtrin, podocin (E) and REST (G) in immortalized mouse podocytes exposed to mechanical stress and flow during 8 days (ZOE organ-on-a-chip) or maintained under normal static culture condition (Ctrl). (F) WT1 immunostaining in immortalized mouse podocytes exposed to mechanical stress and flow during 8 days (ZOE) or maintained under normal static culture condition (Ctrl). Scale bar, 5 μm . All data are shown as the mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ between groups, Mann-Whitney or t test.

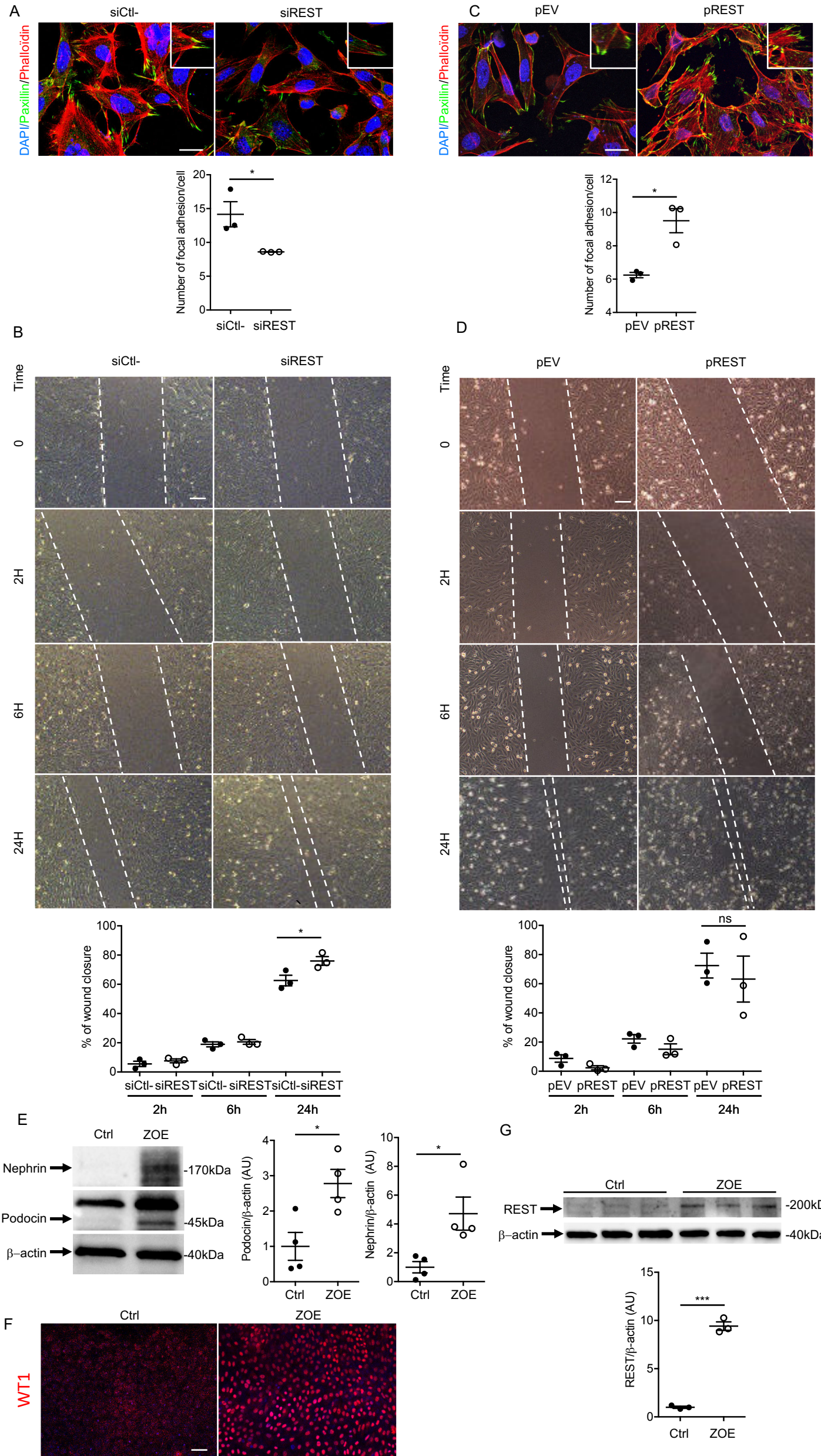


Figure 4

Figure 5: REST is regulated and play a role in Adriamycin induced nephropathy. (A) Representative urine Coomassie blue staining, 7 days after venous retro-orbital injection of either vehicle ($n=6$) or a single dose of 17 $\mu\text{g/g}$ of Adriamycin ($n=6$) into BALB/c wild-type (WT) mice. BSA served as the positive control. (B) Trichrome staining of the kidneys 7 days after retro-orbital injection of either vehicle ($n=6$) or a single dose of 17 $\mu\text{g/g}$ of Adriamycin ($n=6$) into BALB/c wild-type (WT) mice. Scale bar, 10 μm . (C) *Nephrin* and *WT1* mRNA in the kidneys of mice injected with either vehicle ($n=6$) or a single dose of 17 $\mu\text{g/g}$ of Adriamycin ($n=6$). (D) Western blot (left) and quantification (right) of REST cleaved PARP, cleaved caspase 3 (CC3) (top blot) and Nephrin (bottom blot) 7 days following injection of either vehicle or a single dose of 17 $\mu\text{g/g}$ of Adriamycin. (E) PAS staining (left) and glomerular lesion scores quantification (right) in kidneys of C57BL/6 *REST^{lox/lox}* and *REST^{Δpod}* mice, 3 months after injection of either vehicle or a single dose of Adriamycin (17 $\mu\text{g/g}$). $n=3$ for vehicle treated *REST^{lox/lox}* and *REST^{Δpod}* mice, $n=6$ for Adriamycin treated *REST^{lox/lox}* mice, $n=12$ for *REST^{Δpod}* mice. At the time of sacrifice, the kidneys of either the vehicle injected mice or the *REST^{lox/lox}* mice injected with Adriamycin had no obvious abnormal histology while *REST^{Δpod}* mice injected with Adriamycin had glomerular lesions with glomerulosclerosis, tubular vacuolization and intratubular casts. Scale bar, 10 μm (F) Western blot (up) and quantifications (bottom) of Nephrin and Synaptopodin in C57BL/6 *REST^{lox/lox}* and *REST^{Δpod}* mice, injected with either vehicle or a single dose Adriamycin (17 $\mu\text{g/g}$). All data are shown as the mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ between groups, Mann-Whitney, t test, ANOVA and Turkey-Kramer test were used.

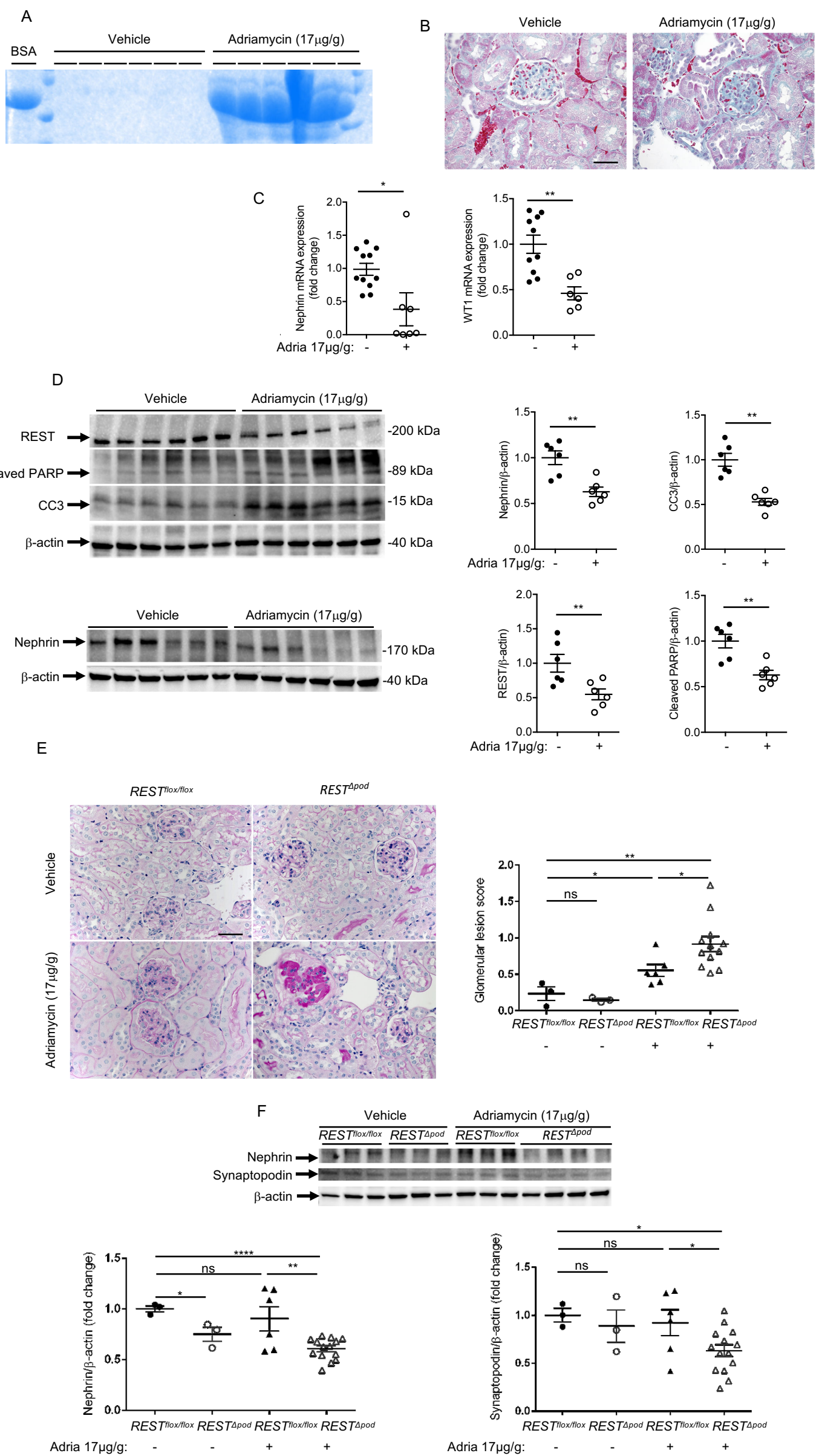
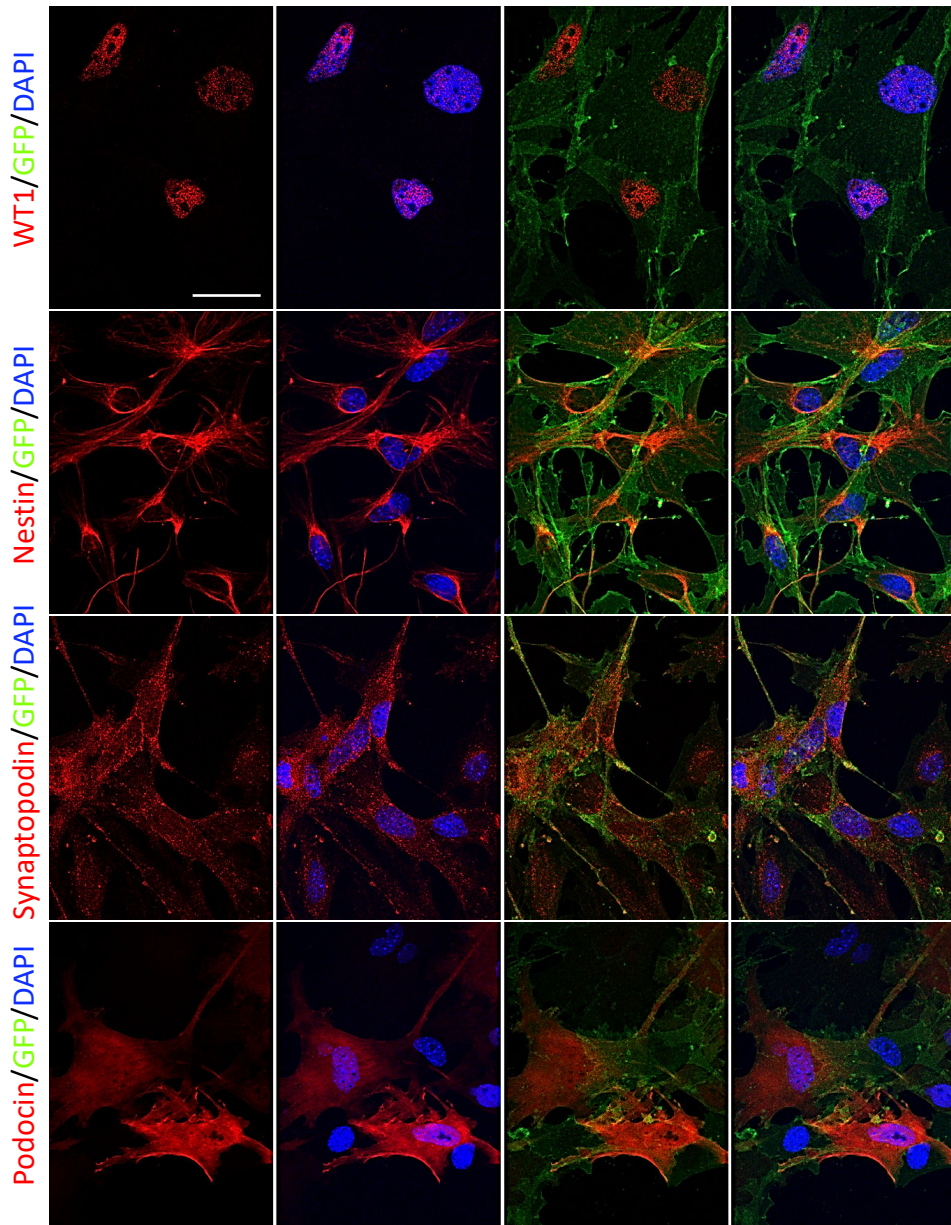


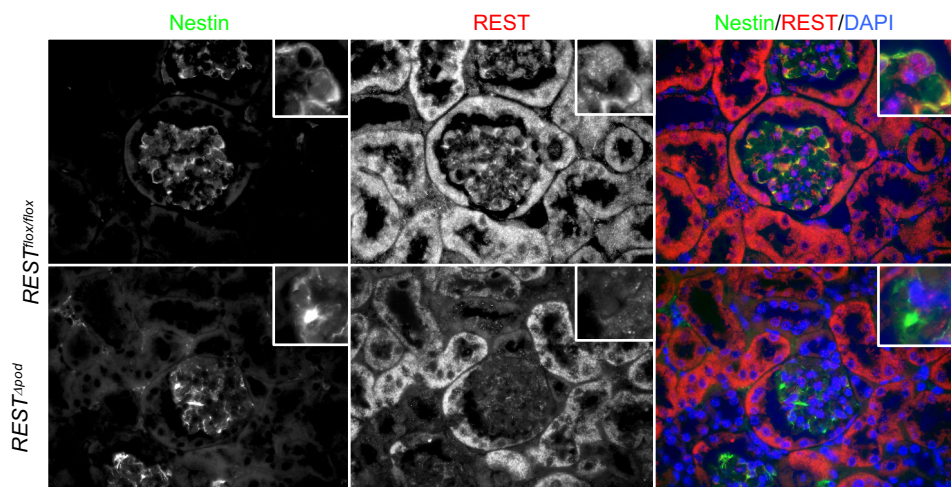
Figure 5

Supplementary Figure 1: Primary culture of podocytes characterization and REST mouse model characterization. (A) Primary culture of GFP-podocytes in old mice (52 weeks old). These cells demonstrated morphological features of podocytes as well as podocyte specific markers. REST was expressed and translocated into the nucleus. (B) Coimmunostaining of REST and Nestin in young ($n=6$) and aged ($n=5$) C57BL/6 mice. Scale bar, 10 μm .

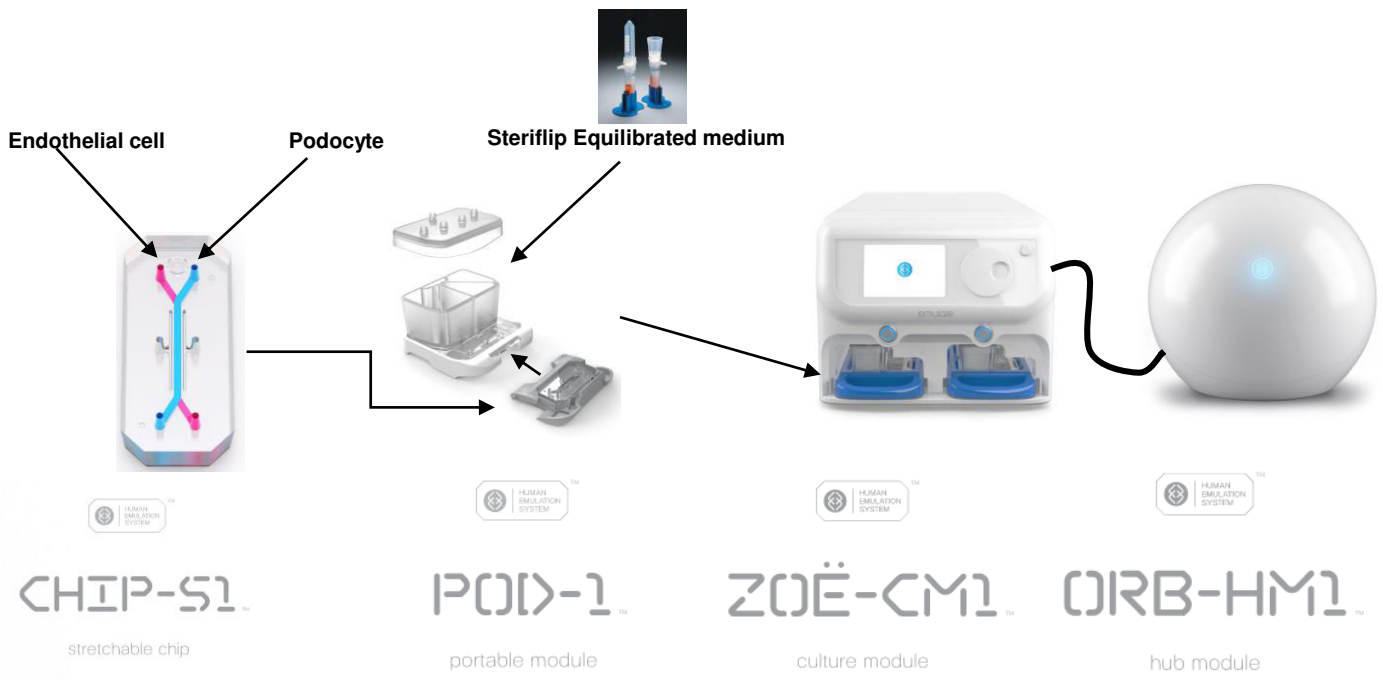
A



B



Supplementary Figure 2: Emulate organ-on-chip system. The CHIP-S1 is the micro-engineered environment that recreates the natural physiology and mechanical forces that cells experience within the human body. The POD-1 houses the chip supplies media and enables compatibility with microscopes or other analysis equipment. The ZOË-CM1 is a culture module automates cell culture, providing the environment cells need to live. ORB-HM1 hub module allows to connect up to Zoë culture module and provide vacuum.



Supplementary Figure 2

References

1. Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. *JAMA* 2019;322:1294-304.
2. Mallappallil M, Friedman EA, Delano BG, McFarlane SI, Salifu MO. Chronic kidney disease in the elderly: evaluation and management. *Clin Pract (Lond)* 2014;11:525-35.
3. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2003;108:2154-69.
4. Greka A, Mundel P. Cell biology and pathology of podocytes. *Annu Rev Physiol* 2012;74:299-323.
5. Hostetter TH. Progression of renal disease and renal hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 1995;57:263-78.
6. Canaud G, Bienaimé F, Viau A, et al. AKT2 is essential to maintain podocyte viability and function during chronic kidney disease. *Nat Med* 2013;19:1288-96.
7. Kriz W, Lemley KV. Potential relevance of shear stress for slit diaphragm and podocyte function. *Kidney Int* 2017;91:1283-6.
8. Chen ZF, Paquette AJ, Anderson DJ. NRSF/REST is required in vivo for repression of multiple neuronal target genes during embryogenesis. *Nat Genet* 1998;20:136-42.
9. Lu T, Aron L, Zullo J, et al. REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. *Nature* 2014;507:448-54.
10. Weide T, Huber TB. Signaling at the slit: podocytes chat by synaptic transmission. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:1862-4.
11. Muzumdar MD1, Tasic B, Miyamichi K, et al. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis*. 2007 Sep;45(9):593-605.

12. Musah S, Dimitrakakis N, Camacho DM, et al. Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells into mature kidney podocytes and establishment of a Glomerulus Chip. *Nat Protoc.* 2018 Jul;13(7):1662-1685.
13. Homan KA, Gupta N, Kroll KT, et al. Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro. *Nat Methods.* 2019 Mar;16(3):255-262.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail de thèse consistait à étudier le rôle de REST dans les podocytes au cours du vieillissement et de la réduction néphronique. Les dysfonctions podocytaires peuvent avoir des origines idiopathique, génétique ou induite. La dernière catégorie implique différentes causes, y compris le stress mécanique, les médicaments, les toxines, les infections ou les protéines circulantes. L'atteinte podocytaire se caractérise par un remaniement du cytosquelette, leur détachement de la membrane basale glomérulaire et enfin leur apoptose. Les podocytes restants vont s'hypertrophier pour couvrir la surface dénudée. Malheureusement, au bout d'un certain temps les mécanismes d'adaptation s'épuisent aboutissant à la création d'une synéchie capsulo-floculaire avec une atteinte de la barrière de filtration glomérulaire. L'altération de la barrière de filtration glomérulaire conditionne le passage de l'albumine dans les urines ayant ensuite un retentissement sur le compartiment tubulaire participant à l'inflammation intrarénale et la progression de la fibrose. Le podocyte joue donc un rôle central dans la progression de la maladie rénale chronique. Les mécanismes moléculaires participants à l'adaptation podocytaire sont mal connus, la protéine REST pourrait jouer un rôle important. La seule étude de REST dans le rein était focalisée sur son rôle dans le développement de tumeur de Wilms chez les enfants⁵.

REST a été initialement découvert dans les neurones comme un régulateur de la survie cellulaire, avec notamment une régulation négative de l'apoptose et du cytosquelette avec une diminution de la motilité des cellules au cours du vieillissement¹. En partant du principe que les neurones et les podocytes partagent plusieurs similarités, nous avons voulu regarder le rôle de ce facteur de transcription dans les podocytes en conditions de stress telles que le vieillissement, la néphrectomie subtotale ou un traitement néphrotoxique. En combinant différentes types d'approches expérimentales sur des souris génétiquement modifiées, pour lesquelles le gène REST avait été invalidé dans les podocytes, nous avons montré l'importance de cette protéine dans la survie et la migration. En effet, la perte d'expression de REST s'accompagne de phénomènes résultant du stress cellulaire tels que le remaniement spontané du cytosquelette ainsi que l'apoptose. Nos travaux permettent ainsi d'identifier un nouvel acteur de l'adaptation podocytaire à différents types d'agressions. Si ces travaux permettent de mieux comprendre le rôle du facteur de transcription REST dans la physiopathologie des maladies rénales impliquant le podocyte, de nombreuses questions subsistent.

ROLE DE REST DANS L'ADAPTATION DES PODOCYTES AU STRESS DU VIEILLISSEMENT

Le vieillissement est un processus qui favorise la perte de néphrons fonctionnels du rein, appelé réduction néphronique. Le stress mécanique et hémodynamique induit par la réduction néphronique a pour conséquence une augmentation significative de la charge de travail imposée aux cellules du néphron renal¹⁵³. Le glomérule du néphron se trouve particulièrement exposé à ce stress. L'endothélium, la MBG et les podocytes sont les 3 éléments du capillaire glomérulaire exposé à la pression provoquée par l'augmentation de la charge de travail imposée. Cependant, l'augmentation de la pression de filtration et de la taille du glomérule, aggrave la tension pariétale à laquelle les cellules glomérulaires sont exposées. Elles doivent aussi faire face à l'exposition importante aux facteurs circulants et aux forces mécaniques et corollaires de l'augmentation du débit sanguin ou de filtration glomérulaire. Du fait de leur emplacement géographique, leur fonction et leur sensibilité à chaque variation de flux, les podocytes se trouvent particulièrement exposés aux contraintes mécaniques et métaboliques associées à la réduction néphronique. Le podocyte mature a une capacité de division cellulaire limitée, ainsi dès qu'un nombre important de ces cellules est perdu, elles sont rarement remplacées^{45,352-354}. Plusieurs données ont montré clairement chez l'homme et dans les modèles animaux qu'une altération podocytaire est directement associée et pourrait causer de la glomérulosclérose^{185,193,355-357}. Il est connu que les atteintes glomérulaires constituent la majorité des néphropathies terminales lié au vieillissement³⁵⁸. Par conséquent l'adaptation des podocytes au stress induit par le vieillissement est un processus incontournable pour la préservation de la fonction rénale.

Après la découverte du rôle délétère du stress hémodynamique au cours de la réduction néphronique³⁵⁹, plusieurs groupes se sont focalisés sur l'identification des cibles impliquées dans la progression des lésions rénales. Les travaux récents de notre laboratoire ont montré que la voie de signalisation AKT2/mTORC2 est un acteur important dans l'adaptation des podocytes à la réduction néphronique²⁰⁰. En revanche, Les voies de signalisation et les cibles moléculaires impliquées dans ce processus ne sont pas toutes connues. Cependant, d'autres voies ou cibles moléculaires seraient forcément impliquées. Afin de déchiffrer d'autres acteurs, nous nous sommes intéressés à REST. Nous avons trouvé que les expressions de son ARN messager rénal et de sa protéine étaient augmentées dans les podocytes de souris vieilles (12-24mois). Cependant, la protéine est majoritairement localisée dans le noyau au cours du vieillissement. L'inactivation de l'expression podocytaire de REST, combinée au stress du

vieillesse montre qu'il joue un rôle important dans leur adaptation. Ce rôle, dans un contexte physiopathologique, consiste à protéger les podocytes contre l'apoptose et la progression des lésions glomérulaire qui favoriserait la protéinurie sévère et la glomérulosclérose. L'apoptose des podocytes est responsable de la baisse du nombre de podocytes. Les cellules podocytaires étant post mitotique avec une capacité de multiplication limitée, une diminution de leur nombre crée des espaces intercellulaire qui impactent leur fonction de filtration. Nous montrons que le vieillissement induit une activation de l'expression de REST dans les podocytes et que l'inhibition de cette activation, par délétion du gène *Rest*, entraîne la mort podocytaire favorisant la progression des lésions. Ces résultats nécessitent bien sûr une confirmation chez les patients âgés insuffisants rénaux, néanmoins ils ouvrent la voie sur une potentielle utilisation de REST en tant que cible thérapeutique contre l'insuffisance rénale due à l'âge. Au cours de cette étude nous avons simplement montré le rôle joué par l'expression de REST dans les podocytes au cours du vieillissement, nous n'avons pas déterminé les raisons ou les mécanismes qui impliquent l'augmentation de son expression. De plus nous avons montré le profil apoptotique des podocytes en absence de l'expression de REST, sans montrer les mécanismes de régulation en amont. Cependant, plusieurs molécules podocytaires capables de réguler ou d'être la cible transcriptionnelle de REST seraient impliquées et constitueraient, de ce fait, des candidats potentiels.

Les protéines du diaphragme de fente ou du cytosquelette pourraient jouer un rôle d'intermédiaire dans l'activation de l'expression de REST en réponse aux stress induits par les contraintes mécaniques impliquant les podocytes. Le complexe protéique du diaphragme de fente est étroitement associé et régule la polymérisation du cytosquelette d'actine des pédicelles podocytaires³⁶⁰. Il est connu que l'activation de la phosphorylation des tyrosines cytoplasmiques de la néphrine par les Src kinases initie l'activation de la signalisation AKT et la cascade de signalisation anti apoptotique⁸⁶. Il se pourrait que REST joue un rôle dans la régulation de l'expression des Src kinases. En partant de cette hypothèse nous pouvons estimer qu'une baisse de l'expression de REST induit une baisse de l'expression des Src kinases associée à une baisse de la phosphorylation de la néphrine résultant d'une augmentation de l'apoptose. Par conséquent pour démontrer cette hypothèse, nous devons étudier une possible régulation du promoteur des Src kinases par REST.

Plusieurs études ont mis en évidence que l'activation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine impacte l'intégrité et la fonction des podocytes, contribuant ainsi à la pathogénèse de la protéinurie^{361,362}. Sachant qu'il a été montré par *Lu et al* que l'augmentation progressive du

niveau d'expression de REST dans les neurones au cours du vieillissement serait probablement liée à l'augmentation de l'activité de la voie de signalisation Wnt¹, il pourrait se produire le même scénario dans les podocytes. De ce fait, pour comprendre l'activation de l'expression de REST au cours du vieillissement, nous proposons de regarder le lien entre REST et cette voie dans les podocytes en utilisant des souris génétiquement modifiées dans lesquelles il faudrait activer ou réprimer la signalisation Wnt/ β -caténine et regarder l'expression de REST. Si celle-ci montre une variation, par une technique d'immunoprecipitation de chromatine, nous pourrions chercher une éventuelle régulation de l'expression du gène *Rest* par le facteur de transcription β -caténine. En effet lorsque Wnt est recrutée à la membrane, elle permet l'assemblage de la protéine transmembranaire Fz (Frizzled) et de la protéine apparentée aux récepteurs LDL (LRP). Une fois assemblée, LRP et Fz recrutent Dishevelled (Dsh) qui à son tour recrute la protéine kinase GSK3 qui va d'une part phosphoryler l'extrémité intracellulaire de LRP et cesser la phosphorylation de la β -caténine d'autre part. L'inhibition de la phosphorylation de la β -caténine lui permet de ne plus être associée à l'ubiquitine et de ne plus être dégradée par le protéasome. Ce facteur de transcription peut ainsi entrer dans le noyau de la cellule et stimuler l'expression des gènes spécifiques, probablement celle du gène *Rest*.

ROLE DE REST ET SA REGULATION DANS LES PODOCYTES

I. REGULATION DE REST DANS LES PODOCYTES

Pour affronter les contraintes liées aux stress, les podocytes peuvent subir plusieurs actions en fonction de la nature du problème, qui vont de l'hypertrophie, autophagie, dédifférenciation, transition mésenchymateuse, le détachement, à l'apoptose. Nos résultats *in vitro* ont mis en évidence que dans un contexte rénal en général (cellule HEK) et dans les podocytes en particulier, l'expression de REST est également induite par un stress oxydant. Mais elle est diminuée lors de la podocytopathie induite avec l'adriamycine. Une étude très récente a montré que l'inhibition de Wnt par klotho ou celle de la β -caténine avec un shRNA dans les podocytes permet d'abolir l'activation de la β -caténine ainsi que la surexpression de la fibronectine, de la desmine, de la métalloprotéinase-9 matricielle et de Snail1 déclenchée par des produits protéiques d'oxydations avancés³⁶³. Pour être plus explicite, ils montrent que la β -caténine est un intermédiaire entre le stress oxydant et les atteintes podocytaires. Nous pensons, cependant, que REST pourrait être activé pour empêcher l'expression des gènes délétères induits par la β -

catenine et ainsi protéger les podocytes, comme c'est le cas dans les neurones¹. Il serait donc intéressant de regarder l'expression des différents gènes cibles de la β -catenine en présence ou en absence de REST dans les podocytes en condition de stress oxydant. En parallèle il serait important de regarder la régulation des gènes podocytaires importants pour son intégrité et sa fonction.

II. ROLE DE REST DANS L'ADHÉSION ET LA MIGRATION DES PODOCYTES

Les podocytes sont des cellules épithéliales viscérales hautement différenciées qui recouvrent les capillaires glomérulaires avec ses pédicelles, constituant ainsi, un composant essentiel pour la structure et la fonction du rein^{11,45,364}. Il est connu que le cytosquelette à base de F-actine stabilise les pédicelles des podocytes et est également lié aux récepteurs d'adhésions, tels que les intégrines $\alpha3\beta1$ et $\alpha\beta3$, par des contacts focaux qui permettent son adhésion forte la membrane basale glomérulaire³⁶⁵. L'effacement des pédicelles est un diagnostic précoce dans de nombreuses glomérulopathies, elle s'accompagne d'une perte du diaphragme de fente des podocytes et de l'apparition de la protéinurie. L'effacement progressive des pieds de podocytes conduit à la migration et à la perte des podocytes, responsable finalement de la glomérulosclérose³⁶⁶. En effet, il a été démontré que de nombreux traitements néphroprotecteurs actuellement utilisés, tels que les glucocorticoïdes et les médicaments contre la perte du greffon, ont une efficacité *in vivo*, en partie en ciblant directement les voies de signalisations dans les podocytes³⁶⁷. Ce pendant l'identification et le développement de nouvelles cibles thérapeutiques contre la perte des podocytes est un atout majeur pour la prise en charge des patients. Dans ce travail, nous avons montré que REST est important pour l'adhésion focale des podocytes à la membrane basale et leur migration. Par conséquent, REST pourrait être une cible thérapeutique directe dans les podocytes contre les glomérulopathies. Néanmoins, il faudrait d'autres investigations telles que l'étude de l'expression des intégrines des pédicelles et la production des substances de la membrane basale par les podocytes en absence de REST pour établir la pertinence *in vivo* de son rôle régulateur de la migration et de l'adhésion des podocytes à la membrane basale. Enfin, il serait intéressant d'identifier, par la technique ChiP-seq, les gènes cibles régulés par REST dans les podocytes et investiguer au cas par cas le rôle de chaque gène régulé pour la biologie du podocyte.

ROLE DE REST DANS L'APOPTOSE DES PODOCYTES INDUIT PAR L'ADR

La néphropathie progressive et chronique induite par l'ADR a été établie et longtemps utilisée comme un modèle expérimental des maladies rénales telles que la glomérulosclérose³⁶⁸. Afin d'étudier le rôle joué par REST dans les podocytes au cours de cette néphropathie apoptotique, nous avons traité les cellules podocytaires dont l'expression de REST est inhibée ou augmentée et les souris exprimant ou non le gène *Rest* dans les podocytes avec de l'ADR. Nous avons observé une diminution de l'expression protéique de REST lorsque les cellules ou les souris contrôles sont traitées avec l'adriamycine. Cette baisse de la protéine REST corrèle avec une baisse de la néphrine et une augmentation de l'apoptose. Par ailleurs, le traitement par l'ADR des souris C57BL/6 génétiquement modifiées, *Rest cKo* podocytaire, initialement résistantes à cette molécule néphrotoxique, nous montre clairement que REST joue un rôle important dans l'adaptation des podocytes au cours du processus apoptotique résultant du traitement à l'ADR.

Les podocytes sont des cellules post mitotiques hautement spécialisées qui ne prolifèrent généralement pas en réponse à une lésion. Cependant certaines glomérulopathies telles que la glomérulosclérose segmentaire focale, la néphrite lupique et la néphropathie à IgA peuvent les forcer à rentrer en cycle cellulaire³⁶⁹⁻³⁷¹. Les conséquences de leur entrer en mitose sont dramatiques³⁷². Plusieurs données supportent le concept qu'une entrée en mitose des podocytes mature constitue un évènement stressant qui provoquerait la perte des podocytes par apoptose ou par leur détachement. *Li et al* ont montré que l'inhibition de 4E-BP1 pourrait empêcher l'entrée en mitose des podocytes et diminuer les lésions et les pertes podocytaires induites par l'ADR³⁷³. REST pourrait donc jouer un rôle clé dans ce processus en inhibant l'expression de 4E-BP1 afin d'empêcher les lésions et l'apoptose des podocytes.

Wang D et al ont montré que l'ADR est impliqué dans l'activation de la voie Wnt/ β -caténine, responsable de l'apparition des lésions podocytaires et de la protéinurie par l'intermédiaire du TGF- β 1³⁷⁴. Il a été récemment montré que AF1q était surexprimée dans les podocytes de souris traitées par l'ADR via l'activation de la voie Wnt/ β -caténine et qu'elle aggraverait les lésions podocytaires³⁷⁵. Il est probable que REST régule l'expression de ce gène, par conséquent une éventuelle interaction entre REST et le promoteur de ce gène et son profil d'expression transcriptionnelle pourrait vérifier une possible régulation par REST lors du traitement avec l'ADR.

Les récepteurs RAGE ont aussi été montrés comme contribuant à la pathogénèse des lésions dans les glomérulopathies sclérosantes telles que la glomérulosclérose segmentaire et focale. Il serait possible que REST régule l'expression de ces récepteurs. Ainsi, l'absence de REST favoriserait leur expression et le développement des lésions dans des modèles expérimentaux de néphropathies induit par l'ADR.

Une étude récente a montré que dans les néphropathies induites par l'ADR, l'autophagie protège les podocytes contre les lésions³⁷⁶. Cependant une activation excessive du processus pourrait induire la mort cellulaire³⁷⁷. REST pourrait donc jouer un rôle dans la régulation des gènes impliqués dans le processus autophagique.

En fin, REST pourrait aussi jouer un rôle dans l'activation de la voie de signalisation Protéine kinase A/CREB qui est connue comme étant un facteur atténuant l'apoptose des podocytes induites par l'ADR via une régulation positive des complexes de chaînes respiratoire mitochondrial³⁷⁸.

CONCLUSION

L'ensemble des résultats de ce travail de thèse ont permis de connaître le rôle bénéfique du facteur de transcription REST dans l'adaptation des podocytes au cours des néphropathies chroniques (Figure 10). Ce rôle bénéfique de REST passe par son opposition à la progression de l'apoptose, des lésions et de la migration des cellules en favorisant l'adaptation des podocyte au stress du vieillissement et à l'apoptose (Figure 10). Par conséquent, ceux-ci ouvrent des perspectives très intéressantes sur l'utilisation de REST comme une cible thérapeutique des formes de podocytopathies de l'IRC.

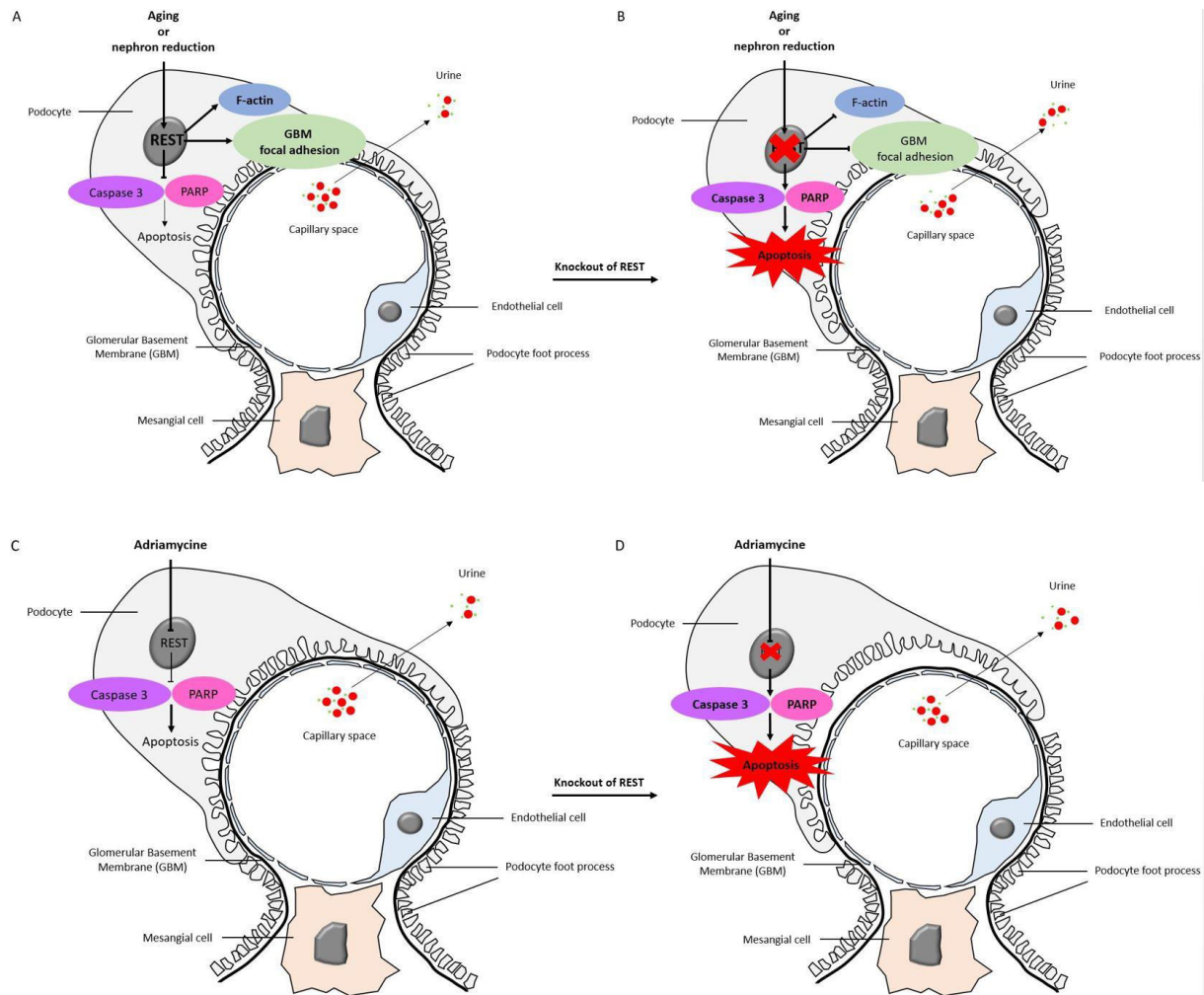


Figure 10 : Modèle physiopathologique proposé. A: Le vieillissement et la réduction néphronique entraînent l'augmentation de l'expression de REST dans le noyau des podocytes. La présence de REST inhibe l'apoptose, la migration et favorise l'adhésion focale à la membrane basale, permettant ainsi au podocytes de s'adapter aux contraintes mécanique et métaboliques. B: L'absence de REST au cours du vieillissement favorise l'apoptose podocytaire, augmente la migration cellulaire, diminue l'adhésion focale des podocytes à la MBG et induit de la protéinurie. C: l'adriamycine diminue significativement l'expression de REST dans les podocyte, cette diminution est associée à un peu d'apoptose et de protéinurie. D: le traitement avec l'adriamycine associé à une délétion de l'expression de REST dans les podocytes renforce la protéinurie et l'apoptose des podocytes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Lu, T. *et al.* REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. *Nature* **507**, 448–454 (2014).
2. Martin, D. *et al.* REST represses a subset of the pancreatic endocrine differentiation program. *Dev Biol* **405**, 316–327 (2015).
3. Kuwahara, K. Role of NRSF/REST in the regulation of cardiac gene expression and function. *Circ. J.* **77**, 2682–2686 (2013).
4. Cavadas, M. A. S. *et al.* REST is a hypoxia-responsive transcriptional repressor. *Sci Rep* **6**, (2016).
5. Mahamdallie, S. S. *et al.* Mutations in the transcriptional repressor *REST* predispose to Wilms tumor. *Nature Genetics* **47**, 1471–1474 (2015).
6. Alsahli, M. & Gerich, J. E. Renal glucose metabolism in normal physiological conditions and in diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* **133**, 1–9 (2017).
7. Gerich, J. E. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabet Med* **27**, 136–142 (2010).
8. Gerich, J. E., Meyer, C., Woerle, H. J. & Stumvoll, M. Renal Gluconeogenesis: Its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care* **24**, 382–391 (2001).
9. 25.3 Gross Anatomy of the Kidney – Anatomy and Physiology.
<https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/25-3-gross-anatomy-of-the-kidney/>.
10. Rennke, H. G. & Venkatachalam, M. A. Glomerular permeability of macromolecules. Effect of molecular configuration on the fractional clearance of uncharged dextran and neutral horseradish peroxidase in the rat. <https://www-jci-org.gate2.inist.fr/articles/view/109354/pdf> (1979) doi:10.1172/JCI109354.
11. Faul, C., Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Kim, K. & Mundel, P. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends in Cell Biology* **17**, 428–437 (2007).
12. Arif, E. & Nihalani, D. Glomerular Filtration Barrier Assembly: An insight. *Postdoc J* **1**, 33–45 (2013).

13. Appel, D. *et al.* Recruitment of Podocytes from Glomerular Parietal Epithelial Cells. *J Am Soc Nephrol* **20**, 333–343 (2009).
14. Couchman, J. R., Beavan, L. A. & McCarthy, K. J. Glomerular matrix: Synthesis, turnover and role in mesangial expansion. *Kidney International* **45**, 328–335 (1994).
15. Mason, R. M. & Wahab, N. A. Extracellular Matrix Metabolism in Diabetic Nephropathy. *JASN* **14**, 1358–1373 (2003).
16. Ronco, P., Lelongt, B., Piedagnel, R. & Chatziantoniou, C. Matrix Metalloproteinases in Kidney Disease Progression and Repair: A Case of Flipping the Coin. *Seminars in Nephrology* **27**, 352–362 (2007).
17. Foo, S. S. *et al.* Ephrin-B2 Controls Cell Motility and Adhesion during Blood-Vessel-Wall Assembly. *Cell* **124**, 161–173 (2006).
18. Quaggin, S. E. *et al.* The basic-helix-loop-helix protein pod1 is critically important for kidney and lung organogenesis. *Development* **126**, 5771–5783 (1999).
19. Kikkawa, Y., Virtanen, I. & Miner, J. H. Mesangial cells organize the glomerular capillaries by adhering to the G domain of laminin $\alpha 5$ in the glomerular basement membrane. *J Cell Biol* **161**, 187–196 (2003).
20. Pelletier, J. *et al.* Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* **67**, 437–447 (1991).
21. Satchell, S. C. & Braet, F. Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral component of the glomerular filtration barrier. *Am J Physiol Renal Physiol* **296**, F947–F956 (2009).
22. Risau, W. Development and differentiation of endothelium. *Kidney Int. Suppl.* **67**, S3-6 (1998).
23. Stan, R. V., Tkachenko, E. & Niesman, I. R. PV1 Is a Key Structural Component for the Formation of the Stomatal and Fenestral Diaphragms. *Mol Biol Cell* **15**, 3615–3630 (2004).
24. Stan, R.-V., Kubitza, M. & Palade, G. E. PV-1 is a component of the fenestral and stomatal diaphragms in fenestrated endothelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13203–13207 (1999).

25. Braet, F. *et al.* Assessment of a method of isolation, purification, and cultivation of rat liver sinusoidal endothelial cells. *Lab. Invest.* **70**, 944–952 (1994).
26. Vasmant, D., Maurice, M. & Feldmann, G. Cytoskeleton ultrastructure of podocytes and glomerular endothelial cells in man and in the rat. *The Anatomical Record* **210**, 17–24 (1984).
27. Weinbaum, S., Tarbell, J. M. & Damiano, E. R. The Structure and Function of the Endothelial Glycocalyx Layer. *Annual Review of Biomedical Engineering* **9**, 121–167 (2007).
28. Singh, A. *et al.* Glomerular Endothelial Glycocalyx Constitutes a Barrier to Protein Permeability. *JASN* **18**, 2885–2893 (2007).
29. Drumond, M. C. & Deen, W. M. Structural determinants of glomerular hydraulic permeability. *Am. J. Physiol.* **266**, F1-12 (1994).
30. Miner, J. H. The Glomerular Basement Membrane. *Exp Cell Res* **318**, 973–978 (2012).
31. Haraldsson, B. & Jeansson, M. Glomerular filtration barrier. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* **18**, 331–335 (2009).
32. Matejas, V. *et al.* Mutations in the Human Laminin β 2 (LAMB2) Gene and the Associated Phenotypic Spectrum. *Hum Mutat* **31**, 992–1002 (2010).
33. Noakes, P. G. *et al.* The renal glomerulus of mice lacking α -laminin/laminin β 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin β 1. *Nature Genetics* **10**, 400 (1995).
34. Jarad, G., Cunningham, J., Shaw, A. S. & Miner, J. H. Proteinuria precedes podocyte abnormalities in $\text{Lamb2}^{-/-}$ mice, implicating the glomerular basement membrane as an albumin barrier. *J Clin Invest* **116**, 2272–2279 (2006).
35. Suh, J. H., Jarad, G., VanDeVoorde, R. G. & Miner, J. H. Forced expression of laminin β 1 in podocytes prevents nephrotic syndrome in mice lacking laminin β 2, a model for Pierson syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 15348–15353 (2011).
36. Gubler, M. C. Inherited diseases of the glomerular basement membrane. *Nat Clin Pract Nephrol* **4**, 24–37 (2008).

37. Fox, J. W. *et al.* Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *The EMBO Journal* **10**, 3137–3146 (1991).
38. Murshed, M. *et al.* The Absence of Nidogen 1 Does Not Affect Murine Basement Membrane Formation. *Mol Cell Biol* **20**, 7007–7012 (2000).
39. Schymeinsky, J. *et al.* Gene Structure and Functional Analysis of the Mouse Nidogen-2 Gene: Nidogen-2 Is Not Essential for Basement Membrane Formation in Mice. *Mol Cell Biol* **22**, 6820–6830 (2002).
40. Bader, B. L. *et al.* Compound Genetic Ablation of Nidogen 1 and 2 Causes Basement Membrane Defects and Perinatal Lethality in Mice. *Mol Cell Biol* **25**, 6846–6856 (2005).
41. Kanwar, Y. S., Danesh, F. R. & Chugh, S. S. Contribution of Proteoglycans Towards the Integrated Functions of Renal Glomerular Capillaries. *Am J Pathol* **171**, 9–13 (2007).
42. Bohrer, M. P. *et al.* Permselectivity of the Glomerular Capillary Wall. *J Clin Invest* **61**, 72–78 (1978).
43. Harvey, S. J. *et al.* Disruption of Glomerular Basement Membrane Charge through Podocyte-Specific Mutation of Agrin Does Not Alter Glomerular Permselectivity. *Am J Pathol* **171**, 139–152 (2007).
44. Hoven, M. J. van den *et al.* Reduction of anionic sites in the glomerular basement membrane by heparanase does not lead to proteinuria. *Kidney International* **73**, 278–287 (2008).
45. Pavenstädt, H., Kriz, W. & Kretzler, M. Cell Biology of the Glomerular Podocyte. *Physiological Reviews* **83**, 253–307 (2003).
46. Haraldsson, B., Nyström, J. & Deen, W. M. Properties of the Glomerular Barrier and Mechanisms of Proteinuria. *Physiological Reviews* **88**, 451–487 (2008).
47. Marshall, S. M. The podocyte: a potential therapeutic target in diabetic nephropathy? *Curr. Pharm. Des.* **13**, 2713–2720 (2007).
48. Andrews, P. M. Investigations of cytoplasmic contractile and cytoskeletal elements in the kidney glomerulus. *Kidney International* **20**, 549–562 (1981).

49. Ichimura, K., Kurihara, H. & Sakai, T. Actin Filament Organization of Foot Processes in Rat Podocytes. *J Histochem Cytochem.* **51**, 1589–1600 (2003).
50. Podoendin. A new cell surface protein of the podocyte and endothelium. *J Exp Med* **162**, 245–267 (1985).
51. Schwarz, K. *et al.* Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* **108**, 1621–1629 (2001).
52. Tryggvason, K., Patrakka, J. & Wartiovaara, J. Hereditary Proteinuria Syndromes and Mechanisms of Proteinuria. *New England Journal of Medicine* **354**, 1387–1401 (2006).
53. Kriz, W. *et al.* A role for podocytes to counteract capillary wall distension. *Kidney International* **45**, 369–376 (1994).
54. Pavenstädt, H., Kriz, W. & Kretzler, M. Cell Biology of the Glomerular Podocyte. *Physiological Reviews* **83**, 253–307 (2003).
55. Kobayashi, N. *et al.* Process formation of podocytes: morphogenetic activity of microtubules and regulation by protein serine/threonine phosphatase PP2A. *Histochem Cell Biol* **115**, 255–266 (2001).
56. Ostalska-Nowicka, D., Zachwieja, J., Nowicki, M. & Witt, M. Expression of intermediate filaments of podocytes within nephrotic syndrome glomerulopathies in children. *Histochem Cell Biol* **121**, 109–113 (2004).
57. Stamenkovic, I., Skalli, O. & Gabbiani, G. Distribution of intermediate filament proteins in normal and diseased human glomeruli. *Am J Pathol* **125**, 465–475 (1986).
58. Drenckhahn, D. & Franke, R. P. Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Lab. Invest.* **59**, 673–682 (1988).
59. Smoyer, W. E., Mundel, P., Gupta, A. & Welsh, M. J. Podocyte alpha-actinin induction precedes foot process effacement in experimental nephrotic syndrome. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **273**, F150–F157 (1997).

60. Kos, C. H. *et al.* Mice deficient in α -actinin-4 have severe glomerular disease. *J Clin Invest* **111**, 1683–1690 (2003).
61. Michaud, J.-L. *et al.* Focal and Segmental Glomerulosclerosis in Mice with Podocyte-Specific Expression of Mutant α -Actinin-4. *JASN* **14**, 1200–1211 (2003).
62. Asanuma, K. *et al.* Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of α -actinin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest* **115**, 1188–1198 (2005).
63. Schurer, W., Fleuren, G. J., Hoedemaeker, P. J. & Molenaar, I. A model for the glomerular filter. *Ren Physiol* **3**, 237–243 (1980).
64. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol* **111**, 1255–1263 (1990).
65. Verma, R. *et al.* Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J Clin Invest* **116**, 1346–1359 (2006).
66. Shih, N.-Y. *et al.* CD2AP Localizes to the Slit Diaphragm and Binds to Nephrin via a Novel C-Terminal Domain. *Am J Pathol* **159**, 2303–2308 (2001).
67. Putaala, H., Sainio, K., Sariola, H. & Tryggvason, K. Primary Structure of Mouse and Rat Nephrin cDNA and Structure and Expression of the Mouse Gene. *JASN* **11**, 991–1001 (2000).
68. Jones, N. *et al.* Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature* **440**, 818 (2006).
69. Kestilä, M. *et al.* Positionally Cloned Gene for a Novel Glomerular Protein—Nephrin—Is Mutated in Congenital Nephrotic Syndrome. *Molecular Cell* **1**, 575–582 (1998).
70. Dong, L. *et al.* Integration of Cistromic and Transcriptomic Analyses Identifies Nphs2, Mafk, and Magi2 as Wilms' Tumor 1 Target Genes in Podocyte Differentiation and Maintenance. *J Am Soc Nephrol* **26**, 2118–2128 (2015).
71. Kann, M. *et al.* Genome-Wide Analysis of Wilms' Tumor 1-Controlled Gene Expression in Podocytes Reveals Key Regulatory Mechanisms. *J Am Soc Nephrol* **26**, 2097–2104 (2015).

72. Mundel, P., Gilbert, P. & Kriz, W. Podocytes in glomerulus of rat kidney express a characteristic 44 KD protein. *J Histochem Cytochem.* **39**, 1047–1056 (1991).
73. Mundel, P. *et al.* Synaptopodin: An Actin-associated Protein in Telencephalic Dendrites and Renal Podocytes. *J Cell Biol* **139**, 193–204 (1997).
74. Deller, T., Merten, T., Roth, S. U., Mundel, P. & Frotscher, M. Actin-associated protein synaptopodin in the rat hippocampal formation: Localization in the spine neck and close association with the spine apparatus of principal neurons. *Journal of Comparative Neurology* **418**, 164–181 (2000).
75. Delacour, A., Nepote, V., Trumpp, A. & Herrera, P. L. Nestin expression in pancreatic exocrine cell lineages. *Mechanisms of Development* **121**, 3–14 (2004).
76. Michalczyk, K. & Ziman, M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol. Histopathol.* **20**, 665–671 (2005).
77. Kachinsky, A. M., Dominov, J. A. & Miller, J. B. Myogenesis and the Intermediate Filament Protein, Nestin. *Developmental Biology* **165**, 216–228 (1994).
78. Klein, T. *et al.* Nestin Is Expressed in Vascular Endothelial Cells in the Adult Human Pancreas. *J Histochem Cytochem.* **51**, 697–706 (2003).
79. Lendahl, U., Zimmerman, L. B. & McKay, R. D. G. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**, 585–595 (1990).
80. Li, L. *et al.* Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *PNAS* **100**, 9958–9961 (2003).
81. Mayer, E. J., Hughes, E. H., Carter, D. A. & Dick, A. D. Nestin positive cells in adult human retina and in epiretinal membranes. *Br J Ophthalmol* **87**, 1154–1158 (2003).
82. Chen, J. *et al.* Differential Expression of the Intermediate Filament Protein Nestin during Renal Development and Its Localization in Adult Podocytes. *JASN* **17**, 1283–1291 (2006).
83. Su, W. *et al.* Expression of nestin in the podocytes of normal and diseased human kidneys. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **292**, R1761–R1767 (2007).

84. Barletta, G.-M., Kovari, I. A., Verma, R. K., Kerjaschki, D. & Holzman, L. B. Nephrin and Neph1 Co-localize at the Podocyte Foot Process Intercellular Junction and Form cis Hetero-oligomers. *J. Biol. Chem.* **278**, 19266–19271 (2003).
85. Patrakka, J. & Tryggvason, K. Nephrin – a unique structural and signaling protein of the kidney filter. *Trends in Molecular Medicine* **13**, 396–403 (2007).
86. Huber, T. B. *et al.* Nephrin and CD2AP Associate with Phosphoinositide 3-OH Kinase and Stimulate AKT-Dependent Signaling. *Mol Cell Biol* **23**, 4917–4928 (2003).
87. Ihalmo, P., Palmén, T., Ahola, H., Valtonen, E. & Holthöfer, H. Filtrin is a novel member of nephrin-like proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **300**, 364–370 (2003).
88. Gerke, P., Huber, T. B., Sellin, L., Benzing, T. & Walz, G. Homodimerization and Heterodimerization of the Glomerular Podocyte Proteins Nephrin and NEPH1. *JASN* **14**, 918–926 (2003).
89. Donoviel, D. B. *et al.* Proteinuria and Perinatal Lethality in Mice Lacking NEPH1, a Novel Protein with Homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol* **21**, 4829–4836 (2001).
90. Roselli, S. *et al.* Podocin Localizes in the Kidney to the Slit Diaphragm Area. *Am J Pathol* **160**, 131–139 (2002).
91. Boute, N. *et al.* NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nature Genetics* **24**, 349 (2000).
92. Sellin, L. *et al.* NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *The FASEB Journal* **17**, 115–117 (2002).
93. Mollet, G. *et al.* Podocin inactivation in mature kidneys causes focal segmental glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 2181–2189 (2009).
94. Inoue, T. *et al.* FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney International* **59**, 1003–1012 (2001).

95. Ciani, L., Patel, A., Allen, N. D. & French-Constant, C. Mice Lacking the Giant Protocadherin mFAT1 Exhibit Renal Slit Junction Abnormalities and a Partially Penetrant Cyclopia and Anophthalmia Phenotype. *Mol Cell Biol* **23**, 3575–3582 (2003).
96. Krendel, M. *et al.* Disruption of Myosin 1e Promotes Podocyte Injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **20**, 86 (2009).
97. Chase, S. E. *et al.* Podocyte-specific knockout of myosin 1e disrupts glomerular filtration. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **303**, F1099 (2012).
98. Sekine, T. *et al.* Patients with Epstein–Fechtner syndromes owing to MYH9 R702 mutations develop progressive proteinuric renal disease. *Kidney International* **78**, 207–214 (2010).
99. Johnstone, D. B. *et al.* Podocyte-Specific Deletion of Myh9 Encoding Nonmuscle Myosin Heavy Chain 2A Predisposes Mice to Glomerulopathy ∇ . *Mol Cell Biol* **31**, 2162–2170 (2011).
100. Müller, T. *et al.* Non-muscle myosin IIA is required for the development of the zebrafish glomerulus. *Kidney International* **80**, 1055–1063 (2011).
101. Fine, D. M. *et al.* APOL1 Risk Variants Predict Histopathology and Progression to ESRD in HIV-Related Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* **23**, 343–350 (2012).
102. Ohse, T. *et al.* The enigmatic parietal epithelial cell is finally getting noticed: a review. *Kidney Int* **76**, 1225–1238 (2009).
103. Bariety, J., Mandet, C., Hill, G. S. & Bruneval, P. Parietal Podocytes in Normal Human Glomeruli. *JASN* **17**, 2770–2780 (2006).
104. Ohse, T. *et al.* A new function for parietal epithelial cells: a second glomerular barrier. *Am J Physiol Renal Physiol* **297**, F1566–F1574 (2009).
105. Shankland, S. J., Anders, H.-J. & Romagnani, P. Glomerular parietal epithelial cells in kidney physiology, pathology, and repair: *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* **22**, 302–309 (2013).
106. Wang, T. Flow-activated transport events along the nephron: *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* **15**, 530–536 (2006).

107. Aronson, P. S. Ion exchangers mediating NaCl transport in the renal proximal tubule. *Cell Biochem Biophys* **36**, 147–153 (2002).
108. Pei, L. *et al.* Paracellular epithelial sodium transport maximizes energy efficiency in the kidney. *J Clin Invest* **126**, 2509–2518.
109. Chabardès, D. *et al.* Adenylate cyclase responsiveness to hormones in various portions of the human nephron. *J Clin Invest* **65**, 439–448 (1980).
110. Kaissling, B. & Kriz, W. Structural analysis of the rabbit kidney. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **56**, 1–123 (1979).
111. Dørup, J. Ultrastructure of distal nephron cells in rat renal cortex. *J. Ultrastruct. Res.* **92**, 101–118 (1985).
112. Chawla, L. S. & Kimmel, P. L. Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. *Kidney International* **82**, 516–524 (2012).
113. Ghata, J. & Cowley, B. D. Polycystic Kidney Disease. *Compr Physiol* **7**, 945–975 (2017).
114. Pirson, Y. Making the diagnosis of Alport’s syndrome. *Kidney International* **56**, 760–775 (1999).
115. Miller, N. L. & Lingeman, J. E. Management of kidney stones. *BMJ* **334**, 468–472 (2007).
116. Morgan, M. S. C. & Pearle, M. S. Medical management of renal stones. *BMJ* **352**, i52 (2016).
117. Gourtsoyiannis, N., Prassopoulos, P., Cavouras, D. & Pantelidis, N. The thickness of the renal parenchyma decreases with age: a CT study of 360 patients. *AJR Am J Roentgenol* **155**, 541–544 (1990).
118. Young, A. Ageing and physiological functions. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **352**, 1837–1843 (1997).
119. Wetzels, J. F. M., Kiemeneij, L. a. L. M., Swinkels, D. W., Willems, H. L. & Heijer, M. den. Age- and gender-specific reference values of estimated GFR in Caucasians: The Nijmegen Biomedical Study. *Kidney International* **72**, 632–637 (2007).

120. Fehrman-Ekholm, I. & Skeppholm, L. Renal function in the elderly (>70 years old) measured by means of iohexol clearance, serum creatinine, serum urea and estimated clearance. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **38**, 73–77 (2004).
121. Esposito, C. *et al.* Renal function and functional reserve in healthy elderly individuals. *J. Nephrol.* **20**, 617–625 (2007).
122. Baylis, C. & Corman, B. The aging kidney: insights from experimental studies. *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**, 699–709 (1998).
123. Schieppati, A. *et al.* Prognosis of Untreated Patients with Idiopathic Membranous Nephropathy. *New England Journal of Medicine* **329**, 85–89 (1993).
124. Andrassy, K., Küster, S., Waldherr, R. & Ritz, E. Rapidly progressive glomerulonephritis: analysis of prevalence and clinical course. *Nephron* **59**, 206–212 (1991).
125. Couser, W. G. Rapidly progressive glomerulonephritis: classification, pathogenetic mechanisms, and therapy. *Am. J. Kidney Dis.* **11**, 449–464 (1988).
126. Kambham, N. Crescentic Glomerulonephritis: an update on Pauci-immune and Anti-GBM diseases. *Adv Anat Pathol* **19**, 111–124 (2012).
127. Zoccali, C. *et al.* The systemic nature of CKD. *Nature Reviews Nephrology* **13**, 344–358 (2017).
128. Levin, A. *et al.* Kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO) CKD work group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney International Supplements* **3**, 1–150 (2013).
129. Couchoud, C., Lassalle, M., Stengel, B. & Jacquelinet, C. [Renal Epidemiology and Information Network: 2007 annual report]. *Nephrol. Ther.* **5 Suppl 1**, S3-144 (2009).
130. Hill, N. R. *et al.* Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE* **11**, e0158765 (2016).
131. Glassock, R. J., Warnock, D. G. & Delanaye, P. The global burden of chronic kidney disease: estimates, variability and pitfalls. *Nature Reviews Nephrology* **13**, 104–114 (2017).

132. Stanifer, J. W., Muiru, A., Jafar, T. H. & Patel, U. D. Chronic kidney disease in low- and middle-income countries. *Nephrol Dial Transplant* **31**, 868–874 (2016).
133. Stanifer, J. W. *et al.* The epidemiology of chronic kidney disease in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health* **2**, e174–e181 (2014).
134. Ene-lordache, B. *et al.* Chronic kidney disease and cardiovascular risk in six regions of the world (ISN-KDDC): a cross-sectional study. *The Lancet Global Health* **4**, e307–e319 (2016).
135. Groothoff, J. & Harambat, J. ESPN/ERA-EDTA Registry <http://www.espn-reg.org>. 8.
136. Harambat, J., van Stralen, K. J., Kim, J. J. & Tizard, E. J. Epidemiology of chronic kidney disease in children. *Pediatr Nephrol* **27**, 363–373 (2012).
137. Jha, V. *et al.* Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet* **382**, 260–272 (2013).
138. Stanifer, J. W. *et al.* Traditional Medicines and Kidney Disease in Low- and Middle-Income Countries: Opportunities and Challenges. *Seminars in Nephrology* **37**, 245–259 (2017).
139. Charlton, J. R., Springsteen, C. H. & Carmody, J. B. Nephron number and its determinants in early life: a primer. *Pediatr Nephrol* **29**, 2299–2308 (2014).
140. Khalsa, D. D. K., Beydoun, H. A. & Carmody, J. B. Prevalence of chronic kidney disease risk factors among low birth weight adolescents. *Pediatr Nephrol* **31**, 1509–1516 (2016).
141. Komenda, P. *et al.* The Prevalence of CKD in Rural Canadian Indigenous Peoples: Results From the First Nations Community Based Screening to Improve Kidney Health and Prevent Dialysis (FINISHED) Screen, Triage, and Treat Program. *American Journal of Kidney Diseases* **68**, 582–590 (2016).
142. Gifford, F. J., Gifford, R. M., Eddleston, M. & Dhaun, N. Endemic Nephropathy Around the World. *Kidney Int Rep* **2**, 282–292 (2016).
143. Levin, A. *et al.* Global kidney health 2017 and beyond: a roadmap for closing gaps in care, research, and policy. *Lancet* **390**, 1888–1917 (2017).

144. Saran, R. *et al.* US Renal Data System 2016 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis* **69**, A7–A8 (2017).
145. Li, P. K.-T. *et al.* Changes in the worldwide epidemiology of peritoneal dialysis. *Nat Rev Nephrol* **13**, 90–103 (2017).
146. ERA-EDTA Registry Annual Report 2016. 182.
147. Liyanage, T. *et al.* Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. *Lancet* **385**, 1975–1982 (2015).
148. Kassebaum, N. J. *et al.* Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet* **388**, 1603–1658 (2016).
149. Thomas, B. *et al.* Global Cardiovascular and Renal Outcomes of Reduced GFR. *J Am Soc Nephrol* **28**, 2167–2179 (2017).
150. Nitsch, D. *et al.* Associations of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with mortality and renal failure by sex: a meta-analysis. *BMJ* **346**, f324 (2013).
151. Mitch, W. E., Walser, M., Buffington, G. A. & Lemann, J. A simple method of estimating progression of chronic renal failure. *Lancet* **2**, 1326–1328 (1976).
152. Brenner, B. M., Troy, J. L. & Daugharty, T. M. The Dynamics of Glomerular Ultrafiltration in the Rat. *J Clin Invest* **50**, 1776–1780 (1971).
153. Hostetter, T. H. Progression of Renal Disease and Renal Hypertrophy. *Annual Review of Physiology* **57**, 263–278 (1995).
154. Hostetter, T. H., Olson, J. L., Rennke, H. G., Venkatachalam, M. A. & Brenner, B. M. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am. J. Physiol.* **241**, F85-93 (1981).
155. Miyazaki, M. *et al.* Regulation of renal extracellular matrix metabolism. *Contrib Nephrol* **139**, 141–155 (2003).

156. Tang, W. W., Van, G. Y. & Qi, M. Myofibroblast and alpha 1 (III) collagen expression in experimental tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int.* **51**, 926–931 (1997).
157. Lin, S.-L., Kisseleva, T., Brenner, D. A. & Duffield, J. S. Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am. J. Pathol.* **173**, 1617–1627 (2008).
158. Iwano, M. *et al.* Conditional abatement of tissue fibrosis using nucleoside analogs to selectively corrupt DNA replication in transgenic fibroblasts. *Mol. Ther.* **3**, 149–159 (2001).
159. Zeisberg, E. M., Potenta, S. E., Sugimoto, H., Zeisberg, M. & Kalluri, R. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 2282–2287 (2008).
160. Humphreys, B. D. *et al.* Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am. J. Pathol.* **176**, 85–97 (2010).
161. Kriz, W., Kaissling, B. & Le Hir, M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *J. Clin. Invest.* **121**, 468–474 (2011).
162. Sanz, A. B., Santamaría, B., Ruiz-Ortega, M., Egido, J. & Ortiz, A. Mechanisms of renal apoptosis in health and disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 1634–1642 (2008).
163. Nishio, S. *et al.* Pkd1 regulates immortalized proliferation of renal tubular epithelial cells through p53 induction and JNK activation. *J. Clin. Invest.* **115**, 910–918 (2005).
164. Yang, L., Besschetnova, T. Y., Brooks, C. R., Shah, J. V. & Bonventre, J. V. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat. Med.* **16**, 535–543, 1p following 143 (2010).
165. Remuzzi, G., Benigni, A. & Remuzzi, A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J. Clin. Invest.* **116**, 288–296 (2006).
166. Jafar, T. H. *et al.* Progression of chronic kidney disease: the role of blood pressure control, proteinuria, and angiotensin-converting enzyme inhibition: a patient-level meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* **139**, 244–252 (2003).

167. Abbate, M., Zoja, C. & Remuzzi, G. How does proteinuria cause progressive renal damage? *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 2974–2984 (2006).
168. Lemley, K. V. & Kriz, W. Glomerular injury in analbuminemic rats after subtotal nephrectomy. *Nephron* **59**, 104–109 (1991).
169. Okuda, S. *et al.* Albuminuria is not an aggravating factor in experimental focal glomerulosclerosis and hyalinosis. *J. Lab. Clin. Med.* **119**, 245–253 (1992).
170. Theilig, F. *et al.* Abrogation of protein uptake through megalin-deficient proximal tubules does not safeguard against tubulointerstitial injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 1824–1834 (2007).
171. Wu, W.-P. *et al.* A reduction of unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis by a therapy combining valsartan with aliskiren. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **299**, F929–941 (2010).
172. Ishidoya, S., Morrissey, J., McCracken, R., Reyes, A. & Klahr, S. Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* **47**, 1285–1294 (1995).
173. Olivetti, G., Anversa, P., Rigamonti, W., Vitali-Mazza, L. & Loud, A. V. Morphometry of the renal corpuscle during normal postnatal growth and compensatory hypertrophy. A light microscope study. *J. Cell Biol.* **75**, 573–585 (1977).
174. Seyer-Hansen, K., Gundersen, H. J. & Osterby, R. Stereology of the rat kidney during compensatory renal hypertrophy. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A* **93**, 9–12 (1985).
175. Shea, S. M., Raskova, J. & Morrison, A. B. A stereologic study of glomerular hypertrophy in the subtotally nephrectomized rat. *Am. J. Pathol.* **90**, 201–210 (1978).
176. Luyckx, V. A. & Brenner, B. M. The clinical importance of nephron mass. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 898–910 (2010).
177. Lee, G. S. *et al.* Differential response of glomerular epithelial and mesangial cells after subtotal nephrectomy. *Kidney Int.* **53**, 1389–1398 (1998).
178. Abdi, R., Slakey, D., Kittur, D., Burdick, J. & Racusen, L. Baseline glomerular size as a predictor of function in human renal transplantation. *Transplantation* **66**, 329–333 (1998).

179. Hoy, W. E., Wang, Z., VanBuynder, P., Baker, P. R. & Mathews, J. D. The natural history of renal disease in Australian Aborigines. Part 1. Changes in albuminuria and glomerular filtration rate over time. *Kidney Int.* **60**, 243–248 (2001).
180. Hoy, W. E. *et al.* The natural history of renal disease in Australian Aborigines. Part 2. Albuminuria predicts natural death and renal failure. *Kidney Int.* **60**, 249–256 (2001).
181. Hoang, K. *et al.* Determinants of glomerular hypofiltration in aging humans. *Kidney Int.* **64**, 1417–1424 (2003).
182. Kwoh, C., Shannon, M. B., Miner, J. H. & Shaw, A. Pathogenesis of nonimmune glomerulopathies. *Annu Rev Pathol* **1**, 349–374 (2006).
183. Kriz, W., Gretz, N. & Lemley, K. V. Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney Int.* **54**, 687–697 (1998).
184. Machuca, E., Benoit, G. & Antignac, C. Genetics of nephrotic syndrome: connecting molecular genetics to podocyte physiology. *Hum. Mol. Genet.* **18**, R185-194 (2009).
185. Lemley, K. V. *et al.* Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy. *Kidney Int.* **61**, 1475–1485 (2002).
186. Fries, J. W., Sandstrom, D. J., Meyer, T. W. & Rennke, H. G. Glomerular hypertrophy and epithelial cell injury modulate progressive glomerulosclerosis in the rat. *Lab. Invest.* **60**, 205–218 (1989).
187. Pagtalunan, M. E. *et al.* Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J. Clin. Invest.* **99**, 342–348 (1997).
188. Menini, S. *et al.* Increased glomerular cell (podocyte) apoptosis in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus: role in the development of diabetic glomerular disease. *Diabetologia* **50**, 2591–2599 (2007).
189. Wharram, B. L. *et al.* Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 2941–2952 (2005).

190. Dalla Vestra, M. *et al.* Is podocyte injury relevant in diabetic nephropathy? Studies in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**, 1031–1035 (2003).
191. Shankland, S. J. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* **69**, 2131–2147 (2006).
192. Petermann, A. & Floege, J. Podocyte damage resulting in podocyturia: a potential diagnostic marker to assess glomerular disease activity. *Nephron Clin Pract* **106**, c61–66 (2007).
193. Barisoni, L., Kriz, W., Mundel, P. & D'Agati, V. The dysregulated podocyte phenotype: a novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 51–61 (1999).
194. Wiggins, J. E. *et al.* Podocyte hypertrophy, 'adaptation,' and 'decompensation' associated with glomerular enlargement and glomerulosclerosis in the aging rat: prevention by calorie restriction. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 2953–2966 (2005).
195. Marshall, C. B. & Shankland, S. J. Cell cycle and glomerular disease: a minireview. *Nephron Exp. Nephrol.* **102**, e39–48 (2006).
196. Sugimoto, H. *et al.* Bone-marrow-derived stem cells repair basement membrane collagen defects and reverse genetic kidney disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 7321–7326 (2006).
197. Prodromidi, E. I. *et al.* Bone marrow-derived cells contribute to podocyte regeneration and amelioration of renal disease in a mouse model of Alport syndrome. *Stem Cells* **24**, 2448–2455 (2006).
198. Ronconi, E. *et al.* Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 322–332 (2009).
199. Meyer-Schwesinger, C. *et al.* Bone marrow-derived progenitor cells do not contribute to podocyte turnover in the puromycin aminoglycoside and renal ablation models in rats. *Am. J. Pathol.* **178**, 494–499 (2011).
200. Canaud, G. *et al.* AKT2 is essential to maintain podocyte viability and function during chronic kidney disease. *Nat. Med.* **19**, 1288–1296 (2013).

201. Chong, J. A. *et al.* REST: A mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell* **80**, 949–957 (1995).
202. Schoenherr, C. J. & Anderson, D. J. The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science* **267**, 1360–1363 (1995).
203. Schoenherr, C. J., Paquette, A. J. & Anderson, D. J. Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 9881–9886 (1996).
204. Bruce, A. W. *et al.* Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 10458–10463 (2004).
205. REST (RE1-silencing transcription factor).
<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/RESTID44266ch4q12.html>.
206. Palm, K., Metsis, M. & Timmusk, T. Neuron-specific splicing of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR is frequent in neuroblastomas and conserved in human, mouse and rat. *Molecular Brain Research* **72**, 30–39 (1999).
207. Coulson, J. M., Edgson, J. L., Woll, P. J. & Quinn, J. P. A Splice Variant of the Neuron-restrictive Silencer Factor Repressor Is Expressed in Small Cell Lung Cancer: A Potential Role in Derepression of Neuroendocrine Genes and a Useful Clinical Marker. *Cancer Res* **60**, 1840–1844 (2000).
208. Zuccato, C. *et al.* Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nature Genetics* **35**, 76–83 (2003).
209. Ooi, L. & Wood, I. C. Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from REST. *Nature Reviews Genetics* **8**, 544–554 (2007).
210. Shimojo, M., Lee, J.-H. & Hersh, L. B. Role of Zinc Finger Domains of the Transcription Factor Neuron-restrictive Silencer Factor/Repressor Element-1 Silencing Transcription Factor in DNA Binding and Nuclear Localization. *J. Biol. Chem.* **276**, 13121–13126 (2001).
211. Chen, Z.-F., Paquette, A. J. & Anderson, D. J. NRSF/REST is required *in vivo* for repression of multiple neuronal target genes during embryogenesis. *Nature Genetics* **20**, 136–142 (1998).

212. Lawinger, P. *et al.* The neuronal repressor REST/NRSF is an essential regulator in medulloblastoma cells. *Nature Medicine* **6**, 826–831 (2000).
213. Ballas, N., Grunseich, C., Lu, D. D., Speh, J. C. & Mandel, G. REST and Its Corepressors Mediate Plasticity of Neuronal Gene Chromatin throughout Neurogenesis. *Cell* **121**, 645–657 (2005).
214. Bruce, A. W. *et al.* The transcriptional repressor REST is a critical regulator of the neurosecretory phenotype. *Journal of Neurochemistry* **98**, 1828–1840 (2006).
215. Pance, A., Livesey, F. J. & Jackson, A. P. A role for the transcriptional repressor REST in maintaining the phenotype of neurosecretory-deficient PC12 cells. *Journal of Neurochemistry* **99**, 1435–1444 (2006).
216. D’Alessandro, R., Klajn, A. & Meldolesi, J. Expression of Dense-core Vesicles and of Their Exocytosis Are Governed by the Repressive Transcription Factor NRSF/REST. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1152**, 194–200 (2009).
217. Barrachina, M. *et al.* Target Genes of Neuron-Restrictive Silencer Factor Are Abnormally Up-Regulated in Human Myotilinopathy. *Am J Pathol* **171**, 1312–1323 (2007).
218. Kurschat, P., Bielenberg, D., Rossignol-Tallandier, M., Stahl, A. & Klagsbrun, M. Neuron Restrictive Silencer Factor NRSF/REST Is a Transcriptional Repressor of Neuropilin-1 and Diminishes the Ability of Semaphorin 3A to Inhibit Keratinocyte Migration. *J. Biol. Chem.* **281**, 2721–2729 (2006).
219. Sun, Y.-M. *et al.* Rest-Mediated Regulation of Extracellular Matrix Is Crucial for Neural Development. *PLoS One* **3**, (2008).
220. Westbrook, T. F. *et al.* A Genetic Screen for Candidate Tumor Suppressors Identifies REST. *Cell* **121**, 837–848 (2005).
221. Cheong, A. *et al.* Downregulated REST Transcription Factor Is a Switch Enabling Critical Potassium Channel Expression and Cell Proliferation. *Molecular Cell* **20**, 45–52 (2005).

222. Nishihara, S., Tsuda, L. & Ogura, T. The canonical Wnt pathway directly regulates NRSF/REST expression in chick spinal cord. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **311**, 55–63 (2003).
223. Gates, K. P., Mentzer, L., Karlstrom, R. O. & Sirotkin, H. I. The Transcriptional Repressor REST/NRSF modulates Hedgehog Signaling. *Dev Biol* **340**, 293–305 (2010).
224. Conaco, C., Otto, S., Han, J.-J. & Mandel, G. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 2422 (2006).
225. Yoo, A. S., Staahl, B. T., Chen, L. & Crabtree, G. R. MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. *Nature* **460**, 642 (2009).
226. Coulson, J. M. Transcriptional Regulation: Cancer, Neurons and the REST. *Current Biology* **15**, R665–R668 (2005).
227. Zuccato, C. *et al.* Widespread Disruption of Repressor Element-1 Silencing Transcription Factor/Neuron-Restrictive Silencer Factor Occupancy at Its Target Genes in Huntington's Disease. *J. Neurosci.* **27**, 6972–6983 (2007).
228. Bingham, A. J., Ooi, L., Kozera, L., White, E. & Wood, I. C. The Repressor Element 1-Silencing Transcription Factor Regulates Heart-Specific Gene Expression Using Multiple Chromatin-Modifying Complexes. *Mol Cell Biol* **27**, 4082–4092 (2007).
229. Formisano, L. *et al.* Ischemic insults promote epigenetic reprogramming of μ opioid receptor expression in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4170–4175 (2007).
230. Bassuk, A. G. *et al.* A Homozygous Mutation in Human PRICKLE1 Causes an Autosomal-Recessive Progressive Myoclonus Epilepsy-Ataxia Syndrome. *American Journal of Human Genetics* **83**, 572 (2008).
231. Garriga-Canut, M. *et al.* 2-Deoxy-D-glucose reduces epilepsy progression by NRSF-CtBP-dependent metabolic regulation of chromatin structure. *Nature Neuroscience* **9**, 1382 (2006).

232. Canzonetta, C. *et al.* DYRK1A-Dosage Imbalance Perturbs NRSF/REST Levels, Deregulating Pluripotency and Embryonic Stem Cell Fate in Down Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* **83**, 388–400 (2008).
233. Tahiliani, M. *et al.* The histone H3K4 demethylase SMCX links REST target genes to X-linked mental retardation. *Nature* **447**, 601–605 (2007).
234. Abrajano, J. J. *et al.* Corepressor for element-1–silencing transcription factor preferentially mediates gene networks underlying neural stem cell fate decisions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 16685–16690 (2010).
235. Paquette, A. J., Perez, S. E. & Anderson, D. J. Constitutive expression of the neuron-restrictive silencer factor (NRSF)/REST in differentiating neurons disrupts neuronal gene expression and causes axon pathfinding errors in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12318–12323 (2000).
236. Baldelli, P. & Meldolesi, J. The Transcription Repressor REST in Adult Neurons: Physiology, Pathology, and Diseases,,. *eNeuro* **2**, (2015).
237. Thiel, G., Ekici, M. & Rössler, O. G. RE-1 silencing transcription factor (REST): a regulator of neuronal development and neuronal/endocrine function. *Cell Tissue Res* **359**, 99–109 (2015).
238. McClelland, S. *et al.* Neuron-restrictive silencer factor-mediated cyclic nucleotide gated channelopathy in experimental temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* **70**, 454–465 (2011).
239. Ballas, N. & Mandel, G. The many faces of REST oversee epigenetic programming of neuronal genes. *Current Opinion in Neurobiology* **15**, 500–506 (2005).
240. Ding, N. *et al.* MED19 and MED26 Are Synergistic Functional Targets of the RE1 Silencing Transcription Factor in Epigenetic Silencing of Neuronal Gene Expression. *J Biol Chem* **284**, 2648–2656 (2009).
241. Qureshi, I. A. & Mehler, M. F. Regulation of Non-Coding RNA Networks in the Nervous System—What’s the REST of the Story? *Neurosci Lett* **466**, 73–80 (2009).
242. Hwang, J.-Y., Aromolaran, K. A. & Zukin, R. S. The emerging field of epigenetics in neurodegeneration and neuroprotection. *Nat Rev Neurosci* **18**, 347–361 (2017).

243. Rodenas-Ruano, A., Chávez, A. E., Cossio, M. J., Castillo, P. E. & Zukin, R. S. REST-dependent epigenetic remodeling promotes the in vivo developmental switch in NMDA receptors. *Nat Neurosci* **15**, 1382–1390 (2012).
244. Yamada, Y., Aoki, H., Kunisada, T. & Hara, A. Rest Promotes the Early Differentiation of Mouse ESCs but Is Not Required for Their Maintenance. *Cell Stem Cell* **6**, 10–15 (2010).
245. YEO, M., BERGLUND, K., AUGUSTINE, G. & LIEDTKE, W. Novel repression of *Kcc2* transcription by REST-RE-1 controls developmental switch in neuronal chloride. *J Neurosci* **29**, 14652–14662 (2009).
246. Negrini, S., Prada, I., D’Alessandro, R. & Meldolesi, J. REST: an oncogene or a tumor suppressor? *Trends in Cell Biology* **23**, 289–295 (2013).
247. REST (RE1-silencing transcription factor).
<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/RESTID44266ch4q12.html>.
248. Calderone, A. *et al.* Ischemic Insults Derepress the Gene Silencer REST in Neurons Destined to Die. *J. Neurosci.* **23**, 2112–2121 (2003).
249. Lunyak, V. V. *et al.* Corepressor-Dependent Silencing of Chromosomal Regions Encoding Neuronal Genes. *Science* **298**, 1747–1752 (2002).
250. Battaglioli, E. *et al.* REST Repression of Neuronal Genes Requires Components of the hSWI-SNF Complex. *J. Biol. Chem.* **277**, 41038–41045 (2002).
251. Roopra, A., Qazi, R., Schoenike, B., Daley, T. J. & Morrison, J. F. Localized Domains of G9a-Mediated Histone Methylation Are Required for Silencing of Neuronal Genes. *Molecular Cell* **14**, 727–738 (2004).
252. Noh, K.-M. *et al.* Repressor element-1 silencing transcription factor (REST)-dependent epigenetic remodeling is critical to ischemia-induced neuronal death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E962–E971 (2012).

253. Hwang, J.-Y., Kaneko, N., Noh, K.-M., Pontarelli, F. & Zukin, R. S. The gene silencing transcription factor REST represses miR-132 expression in hippocampal neurons destined to die. *J Mol Biol* **426**, 3454–3466 (2014).
254. Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A. & Nestler, E. J. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience* **8**, 355–367 (2007).
255. Borrelli, E., Nestler, E. J., Allis, C. D. & Sassone-Corsi, P. Decoding the Epigenetic Language of Neuronal Plasticity. *Neuron* **60**, 961–974 (2008).
256. Abel, T. & Zukin, R. S. Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Curr Opin Pharmacol* **8**, 57–64 (2008).
257. Andrés, M. E. *et al.* CoREST: A functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9873–9878 (1999).
258. Ballas, N. *et al.* Regulation of Neuronal Traits by a Novel Transcriptional Complex. *Neuron* **31**, 353–365 (2001).
259. Grimes, J. A. *et al.* The Co-repressor mSin3A Is a Functional Component of the REST-CoREST Repressor Complex. *J. Biol. Chem.* **275**, 9461–9467 (2000).
260. Huang, Y., Myers, S. J. & Dingledine, R. Transcriptional repression by REST: recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes. *Nature Neuroscience* **2**, 867 (1999).
261. Klose, R. J. & Bird, A. P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences* **31**, 89–97 (2006).
262. Lee, M. G., Wynder, C., Cooch, N. & Shiekhattar, R. An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature* **437**, 432 (2005).
263. Shi, Y.-J. *et al.* Regulation of LSD1 Histone Demethylase Activity by Its Associated Factors. *Molecular Cell* **19**, 857–864 (2005).
264. Lombardi, L. M., Baker, S. A. & Zoghbi, H. Y. MECP2 disorders: from the clinic to mice and back. *J Clin Invest* **125**, 2914–2923 (2015).
265. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6–21 (2002).

266. Miller, C. A. & Sweatt, J. D. Covalent Modification of DNA Regulates Memory Formation. *Neuron* **53**, 857–869 (2007).
267. Perera, A. *et al.* TET3 Is Recruited by REST for Context-Specific Hydroxymethylation and Induction of Gene Expression. *Cell Reports* **11**, 283–294 (2015).
268. Wagner, E. J. & Carpenter, P. B. Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 115–126 (2012).
269. Abramovitz, L. *et al.* Dual Role of NRSF/REST in Activation and Repression of the Glucocorticoid Response. *J. Biol. Chem.* **283**, 110–119 (2008).
270. Mortazavi, A., Thompson, E. C. L., Garcia, S. T., Myers, R. M. & Wold, B. Comparative genomics modeling of the NRSF/REST repressor network: From single conserved sites to genome-wide repertoire. *Genome Res* **16**, 1208–1221 (2006).
271. Johnson, D. S., Mortazavi, A., Myers, R. M. & Wold, B. Genome-Wide Mapping of in Vivo Protein-DNA Interactions. *Science* **316**, 1497–1502 (2007).
272. McClelland, S. *et al.* The transcription factor NRSF contributes to epileptogenesis by selective repression of a subset of target genes. *eLife* **3**, (2014).
273. Dietrich, N. *et al.* REST-Mediated Recruitment of Polycomb Repressor Complexes in Mammalian Cells. *PLoS Genet* **8**, (2012).
274. Tsai, M.-C. *et al.* Long Noncoding RNA as Modular Scaffold of Histone Modification Complexes. *Science* **329**, 689–693 (2010).
275. Johnson, R. *et al.* REST Regulates Distinct Transcriptional Networks in Embryonic and Neural Stem Cells. *PLoS Biol* **6**, (2008).
276. Philpot, B. D. & Zukin, R. S. Synapse-Specific Metaplasticity: To Be Silenced Is Not to Silence 2B. *Neuron* **66**, 814–816 (2010).
277. Fuller, G. N. *et al.* Many human medulloblastoma tumors overexpress repressor element-1 silencing transcription (REST)/neuron-restrictive silencer factor, which can be functionally countered by REST-VP16. *Mol Cancer Ther* **4**, 343–349 (2005).

278. Das, C. M. *et al.* The deubiquitylase USP37 links REST to the control of p27 stability and cell proliferation. *Oncogene* **32**, 1691–1701 (2013).
279. Kamal, M. M. *et al.* REST regulates oncogenic properties of glioblastoma stem cells. *Stem Cells* **30**, 405–414 (2012).
280. Conti, L. *et al.* REST Controls Self-Renewal and Tumorigenic Competence of Human Glioblastoma Cells. *PLoS One* **7**, (2012).
281. Wagoner, M. P. & Roopra, A. A REST derived gene signature stratifies glioblastomas into chemotherapy resistant and responsive disease. *BMC Genomics* **13**, 686 (2012).
282. Silber, J. *et al.* miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med* **6**, 14 (2008).
283. Fowler, A. *et al.* miR-124a is frequently down-regulated in glioblastoma and is involved in migration and invasion. *European Journal of Cancer* **47**, 953–963 (2011).
284. Xia, H. *et al.* Loss of Brain-enriched miR-124 MicroRNA Enhances Stem-like Traits and Invasiveness of Glioma Cells. *J Biol Chem* **287**, 9962–9971 (2012).
285. Yucebas, M. *et al.* Expression profiling of RE1-silencing transcription factor (REST), REST corepressor 1 (RCOR1), and Synapsin 1 (SYN1) genes in human gliomas. 9.
286. Liang, J. *et al.* The REST Gene Signature Predicts Drug Sensitivity in Neuroblastoma Cell Lines and Is Significantly Associated with Neuroblastoma Tumor Stage. *Int J Mol Sci* **15**, 11220–11233 (2014).
287. Coulson, J. M., Fiskerstrand, C. E., Woll, P. J. & Quinn, J. P. Arginine Vasopressin Promoter Regulation Is Mediated by a Neuron-restrictive Silencer Element in Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* **59**, 5123–5127 (1999).
288. Neumann, S. B. *et al.* Relaxation of glycine receptor and onconeural gene transcription control in NRSF deficient small cell lung cancer cell lines. *Molecular Brain Research* **120**, 173–181 (2004).

289. Moss, A. C. *et al.* SCG3 Transcript in Peripheral Blood Is a Prognostic Biomarker for REST-Deficient Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* **15**, 274–283 (2009).
290. Kreisler, A. *et al.* Regulation of the NRSF/REST gene by methylation and CREB affects the cellular phenotype of small-cell lung cancer. *Oncogene* **29**, 5828–5838 (2010).
291. Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274–293 (2012).
292. Reddy, B. Y., Greco, S. J., Patel, P. S., Trzaska, K. A. & Rameshwar, P. RE-1–silencing transcription factor shows tumor-suppressor functions and negatively regulates the oncogenic TAC1 in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4408–4413 (2009).
293. IB1/JIP-1 controls JNK activation and increased during prostatic LNCaP cells neuroendocrine differentiation - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/gate2.inist.fr/science/article/pii/S089865680400261X?via%3Dihub>.
294. Zhang, D. *et al.* Inhibition of REST Suppresses Proliferation and Migration in Glioblastoma Cells. *Int J Mol Sci* **17**, (2016).
295. Sook Lee, N. *et al.* Non-coding RNAs derived from an alternatively spliced REST transcript (REST-003) regulate breast cancer invasiveness. *Sci Rep* **5**, (2015).
296. EWS-FLI-1 regulates the neuronal repressor gene REST, which controls Ewing sarcoma growth and vascular morphology. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3969734/>.
297. Cho, E. *et al.* NRSF/REST regulates the mTOR signaling pathway in oral cancer cells. *Oncology Reports* **33**, 1459–1464 (2015).
298. Palm, K., Belluardo, N., Metsis, M. & Timmusk, T. ñis. Neuronal Expression of Zinc Finger Transcription Factor REST/NRSF/XBR Gene. *J. Neurosci.* **18**, 1280–1296 (1998).
299. Chuang, D.-M., Leng, Y., Marinova, Z., Kim, H.-J. & Chiu, C.-T. Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends Neurosci* **32**, 591–601 (2009).

300. Kaneko, N., Hwang, J.-Y., Gertner, M., Pontarelli, F. & Zukin, R. S. Casein Kinase 1 Suppresses Activation of REST in Insulted Hippocampal Neurons and Halts Ischemia-Induced Neuronal Death. *J Neurosci* **34**, 6030–6039 (2014).
301. Liu, S. J. & Zukin, R. S. Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends in Neurosciences* **30**, 126–134 (2007).
302. Nho, K. *et al.* Protective Variant for Hippocampal Atrophy Identified by Whole Exome Sequencing. *Ann Neurol* **77**, 547–552 (2015).
303. Yu, M. *et al.* NRSF/REST neuronal deficient mice are more vulnerable to the neurotoxin MPTP. *Neurobiology of Aging* **34**, 916–927 (2013).
304. Hwang, J.-Y. & Zukin, R. S. REST, a master transcriptional regulator in neurodegenerative disease. *Curr Opin Neurobiol* **48**, 193–200 (2018).
305. REST Gene Expression - Gene - NCBI.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5978/?report=expression>.
306. REST - RE1-silencing transcription factor - Homo sapiens (Human) - REST gene & protein.
<https://www.uniprot.org/uniprot/Q13127>.
307. Deng, P. *et al.* Knockdown of NRSF inhibits cell proliferation of ovarian cancer via activating Hippo pathway. *Life Sciences* **215**, 73–79 (2018).
308. Spencer, E. m. *et al.* Regulation and role of REST and REST4 variants in modulation of gene expression in in vivo and in vitro in epilepsy models. *Neurobiology of Disease* **24**, 41–52 (2006).
309. Kumar Gupta, S., Gressens, P. & Mani, S. NRSF downregulation induces neuronal differentiation in mouse embryonic stem cells. *Differentiation* **77**, 19–28 (2009).
310. Thakore-Shah, K., Koleilat, T., Jan, M., John, A. & Pyle, A. D. REST/NRSF Knockdown Alters Survival, Lineage Differentiation and Signaling in Human Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE* (2015) doi:10.1371/journal.pone.0145280.
311. Yu, M. *et al.* Alteration of NRSF expression exacerbating 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion-induced cell death of SH-SY5Y cells. *Neuroscience Research* **65**, 236–244 (2009).

312. Ariano, P., Zamburlin, P., D'Alessandro, R., Meldolesi, J. & Lovisolo, D. Differential repression by the transcription factor REST/NRSF of the various Ca²⁺ signalling mechanisms in pheochromocytoma PC12 cells. *Cell Calcium* **47**, 360–368 (2010).
313. Prada, I. *et al.* REST/NRSF governs the expression of dense-core vesicle gliosecretion in astrocytes. *The Journal of Cell Biology* **537** (2011).
314. Wagoner, M. P. *et al.* The transcription factor REST is lost in aggressive breast cancer. *PLoS Genetics* (2010).
315. Gurrola-Diaz, C., Lacroix, J., Dihlmann, S., Becker, C.-M. & von Knebel Doeberitz, M. Reduced expression of the neuron restrictive silencer factor permits transcription of glycine receptor $\alpha 1$ subunit in small-cell lung cancer cells. *Oncogene* **22**, 5636 (2003).
316. Kim, C. S. *et al.* Novel function of neuron-restrictive silencer factor (NRSF) for posttranscriptional regulation. *BBA - Molecular Cell Research* **1783**, 1835–1846 (2008).
317. Yang, Y. *et al.* NRSF silencing induces neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research* **314**, 2257–2265 (2008).
318. Epping, M. T. *et al.* TSPYL2 is an essential component of the REST/NRSF transcriptional complex for TGF β signaling activation. *Cell Death Differ* **22**, 1353–1362 (2015).
319. Nakano, Y. *et al.* Defects in the Alternative Splicing-Dependent Regulation of REST Cause Deafness. *Cell* **174**, 536-548.e21 (2018).
320. Pinnoji, R. C. *et al.* Repressor element-1 silencing transcription factor/neuronal restrictive silencer factor (REST/NRSF) can regulate HSV-1 immediate-early transcription via histone modification. *Virology* **4**, 1–11 (2007).
321. Tsuda, L. *et al.* An NRSF/REST-like repressor downstream of Ebi/SMRTER/Su(H) regulates eye development in *Drosophila*. *The EMBO Journal* **25**, 3191–3202 (2006).
322. Kobayashi, N. & Mundel, P. A role of microtubules during the formation of cell processes in neuronal and non-neuronal cells. *Cell Tissue Res* **291**, 163–174 (1998).

323. Kobayashi, N. *et al.* Process formation of the renal glomerular podocyte: Is there common molecular machinery for processes of podocytes and neurons? *Anato Sci Int* **79**, 1–10 (2004).
324. Moeller, M. J., Kovari, I. A. & Holzman, L. B. Evaluation of a New Tool for Exploring Podocyte Biology: Mouse Nphs1 5' Flanking Region Drives LacZ Expression in Podocytes. *JASN* **11**, 2306–2314 (2000).
325. Gerke, P. *et al.* Neuronal expression and interaction with the synaptic protein CASK suggest a role for Neph1 and Neph2 in synaptogenesis. *Journal of Comparative Neurology* **498**, 466–475 (2006).
326. Deller, T., Mundel, P. & Frotscher, M. Potential role of synaptopodin in spine motility by coupling actin to the spine apparatus. *Hippocampus* **10**, 569–581 (2000).
327. Deller, T., Merten, T., Roth, S. U., Mundel, P. & Frotscher, M. Actin-associated protein synaptopodin in the rat hippocampal formation: Localization in the spine neck and close association with the spine apparatus of principal neurons. *Journal of Comparative Neurology* **418**, 164–181 (2000).
328. Shirato, I., Asanuma, K., Takeda, Y., Hayashi, K. & Tomino, Y. Protein Gene Product 9.5 Is Selectively Localized in Parietal Epithelial Cells of Bowman's Capsule in the Rat Kidney. *JASN* **11**, 2381–2386 (2000).
329. Wilkinson, K. D. *et al.* The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science* **246**, 670–673 (1989).
330. Lowe, J., McDermott, H., Landon, M., Mayer, R. J. & Wilkinson, K. D. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of human neurodegenerative diseases. *The Journal of Pathology* **161**, 153–160 (1990).
331. Liu, Y. *et al.* UCH-L1 expression of podocytes in diseased glomeruli and in vitro. *The Journal of Pathology* **217**, 642–653 (2009).
332. Sakurai, M. *et al.* Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 regulates the morphology of neural progenitor cells and modulates their differentiation. *J Cell Sci* **119**, 162–171 (2006).

333. Rastaldi, M. P. *et al.* Glomerular Podocytes Possess the Synaptic Vesicle Molecule Rab3A and Its Specific Effector Rabphilin-3a. *Am J Pathol* **163**, 889–899 (2003).
334. Rastaldi, M. P. *et al.* Glomerular podocytes contain neuron-like functional synaptic vesicles. *The FASEB Journal* **20**, 976–978 (2006).
335. Lemieux, G. & Neemeh, J. A. Charcot-Marie-Tooth disease and nephritis. *Can Med Assoc J* **97**, 1193–1198 (1967).
336. O'Donnell, M. P., Michels, L., Kasiske, B., Raij, L. & Keane, W. F. Adriamycin-induced chronic proteinuria: a structural and functional study. *J. Lab. Clin. Med.* **106**, 62–67 (1985).
337. Wang, Y., Wang, Y. P., Tay, Y. C. & Harris, D. C. Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int.* **58**, 1797–1804 (2000).
338. Marshall, C. B., Pippin, J. W., Krofft, R. D. & Shankland, S. J. Puromycin aminonucleoside induces oxidant-dependent DNA damage in podocytes in vitro and in vivo. *Kidney Int.* **70**, 1962–1973 (2006).
339. Ricardo, S. D., Bertram, J. F. & Ryan, G. B. Antioxidants protect podocyte foot processes in puromycin aminonucleoside-treated rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* **4**, 1974–1986 (1994).
340. Remuzzi, G. *et al.* Low-protein diet prevents glomerular damage in adriamycin-treated rats. *Kidney Int.* **28**, 21–27 (1985).
341. Muzumdar, M. D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L. & Luo, L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *genesis* **45**, 593–605 (2007).
342. Kemeny, E., Mihatsch, M. J., Dürmüller, U. & Gudat, F. Podocytes lose their adhesive phenotype in focal segmental glomerulosclerosis. *Clin. Nephrol.* **43**, 71–83 (1995).
343. Sero, J. E., German, A. E., Mammoto, A. & Ingber, D. E. Paxillin controls directional cell motility in response to physical cues. *Cell Adh Migr* **6**, 502–508 (2012).
344. Dancker, P., Löw, I., Hasselbach, W. & Wieland, T. Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. *Biochim. Biophys. Acta* **400**, 407–414 (1975).

345. Endlich, N. *et al.* Two-photon microscopy reveals stationary podocytes in living zebrafish larvae. *J. Am. Soc. Nephrol.* **25**, 681–686 (2014).
346. Bertani, T. *et al.* Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab. Invest.* **46**, 16–23 (1982).
347. Okuda, S. *et al.* Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. *Kidney Int.* **29**, 502–510 (1986).
348. Mundel, P. *et al.* Synaptopodin: An Actin-associated Protein in Telencephalic Dendrites and Renal Podocytes. *J Cell Biol* **139**, 193–204 (1997).
349. Mundel, P. *et al.* Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp. Cell Res.* **236**, 248–258 (1997).
350. Mundel, P., Reiser, J. & Kriz, W. Induction of differentiation in cultured rat and human podocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **8**, 697–705 (1997).
351. Huh, D. *et al.* Microfabrication of human organs-on-chips. *Nat Protoc* **8**, 2135–2157 (2013).
352. Kriz, W. Podocyte is the major culprit accounting for the progression of chronic renal disease. *Microsc. Res. Tech.* **57**, 189–195 (2002).
353. Griffin, S. V., Petermann, A. T., Durvasula, R. V. & Shankland, S. J. Podocyte proliferation and differentiation in glomerular disease: role of cell-cycle regulatory proteins. *Nephrol. Dial. Transplant.* **18 Suppl 6**, vi8-13 (2003).
354. Mundel, P. & Shankland, S. J. Podocyte biology and response to injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 3005–3015 (2002).
355. Laurens, W. E., Vanrenterghem, Y. F., Steels, P. S. & Van Damme, B. J. A new single nephron model of focal and segmental glomerulosclerosis in the Munich-Wistar rat. *Kidney Int.* **45**, 143–149 (1994).

356. Kretzler, M., Koeppen-Hagemann, I. & Kriz, W. Podocyte damage is a critical step in the development of glomerulosclerosis in the uninephrectomised-desoxycorticosterone hypertensive rat. *Virchows Arch.* **425**, 181–193 (1994).
357. Meyer, T. W., Bennett, P. H. & Nelson, R. G. Podocyte number predicts long-term urinary albumin excretion in Pima Indians with Type II diabetes and microalbuminuria. *Diabetologia* **42**, 1341–1344 (1999).
358. Kaplan, C., Pasternack, B., Shah, H. & Gallo, G. Age-related incidence of sclerotic glomeruli in human kidneys. *Am. J. Pathol.* **80**, 227–234 (1975).
359. Brenner, B. M., Daugharty, T. M., Ueki, I. F. & Troy, J. L. Quantitative assessment of proximal tubule function in single nephrons of the rat kidney. *Am. J. Physiol.* **220**, 2058–2067 (1971).
360. Faul, C., Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Kim, K. & Mundel, P. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* **17**, 428–437 (2007).
361. Dai, C. *et al.* Wnt/beta-catenin signaling promotes podocyte dysfunction and albuminuria. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 1997–2008 (2009).
362. Heikkilä, E. *et al.* beta-Catenin mediates adriamycin-induced albuminuria and podocyte injury in adult mouse kidneys. *Nephrol. Dial. Transplant.* **25**, 2437–2446 (2010).
363. Zhou, L. *et al.* Wnt/ β -catenin links oxidative stress to podocyte injury and proteinuria. *Kidney Int.* **95**, 830–845 (2019).
364. Huber, T. B. & Benzing, T. The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **14**, 211–216 (2005).
365. Reiser, J. & Sever, S. Podocyte biology and pathogenesis of kidney disease. *Annu. Rev. Med.* **64**, 357–366 (2013).
366. Wiggins, R. C. The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int.* **71**, 1205–1214 (2007).

367. Mathieson, P. W. The podocyte as a target for therapies--new and old. *Nat Rev Nephrol* **8**, 52–56 (2011).
368. Rossmann, P., Matousovic, K. & Bohdanecká, M. Experimental adriamycin nephropathy. Fine structure, morphometry, glomerular polyanion, and cell membrane antigens. *J. Pathol.* **169**, 99–108 (1993).
369. Hotta, O. *et al.* Clinical and pathologic features of focal segmental glomerulosclerosis with mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene mutation. *Kidney International* **59**, 1236–1243 (2001).
370. Chandra, M., Stokes, M. B. & Kaskel, F. Multinucleated podocytes: a diagnostic clue to cystinosis. *Kidney International* **78**, 1052 (2010).
371. Nagata, M., Yamaguchi, Y., Komatsu, Y. & Ito, K. Mitosis and the Presence of Binucleate Cells among Glomerular Podocytes in Diseased Human Kidneys. *NEF* **70**, 68–71 (1995).
372. Liapis, H., Romagnani, P. & Anders, H.-J. New Insights into the Pathology of Podocyte Loss: Mitotic Catastrophe. *The American Journal of Pathology* **183**, 1364–1374 (2013).
373. Li, F. *et al.* Inhibiting 4E-BP1 re-activation represses podocyte cell cycle re-entry and apoptosis induced by adriamycin. *Cell Death Dis* **10**, 1–15 (2019).
374. Wang, D., Dai, C., Li, Y. & Liu, Y. Canonical Wnt/ β -catenin signaling mediates transforming growth factor- β 1-driven podocyte injury and proteinuria. *Kidney Int.* **80**, 1159–1169 (2011).
375. Zhang, H. *et al.* AF1q Contributes to Adriamycin-Induced Podocyte Injury by Activating Wnt/ β -Catenin Signaling. *KBR* **42**, 794–803 (2017).
376. Yi, M. *et al.* Autophagy is activated to protect against podocyte injury in adriamycin-induced nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **313**, F74–F84 (2017).
377. Levine, B. & Kroemer, G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* **132**, 27–42 (2008).
378. Xie, K. *et al.* Protein Kinase A/CREB Signaling Prevents Adriamycin-Induced Podocyte Apoptosis via Upregulation of Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. *Molecular and Cellular Biology* **38**, e00181-17 (2018).