



Progression des maladies rénales chroniques : Rôle de la voie AKT/mTORC

Guillaume Canaud

► To cite this version:

Guillaume Canaud. Progression des maladies rénales chroniques : Rôle de la voie AKT/mTORC. Sciences agricoles. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05T081 . tel-00922992

HAL Id: tel-00922992

<https://theses.hal.science/tel-00922992>

Submitted on 1 Jan 2014

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.

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

École doctorale : GC2ID

THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Paris Descartes

Spécialité : Biologie Cellulaire

**Progression des maladies rénales chroniques :
Rôle de la voie AKT/mTORC**

Présentée et soutenue par

Guillaume CANAUD

Le 10 Octobre 2012

devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Pierre RONCO

Président du Jury

Madame le Docteur Fabiola TERZI

Directeur de Thèse

Monsieur le Professeur Eric DAUGAS

Rapporteur

Monsieur le Professeur Djillali SAHALI

Rapporteur

Monsieur le Docteur Ned J. LAMB

Examineur

Monsieur le Docteur Stefano FUMAGALLI

Examineur

Je voudrais remercier tous les membres du jury qui ont accepté de juger mon travail : Monsieur le Professeur Pierre Ronco qui a bien voulu présider ce jury de thèse, Monsieur le Professeur Eric Daugas et Monsieur le Professeur Djillali Sahali qui ont accepté d'en être les rapporteurs, Monsieur le Docteur Ned J. Lamb et Monsieur le Docteur Stefano Fumagalli qui ont bien voulu en être les examinateurs.

À Fabiola, patronne exceptionnelle,

À Marion pour ton amour, ton soutien et ta patience...

À mes enfants Oscar, Arthur et Brune

À mes parents extraordinaires,

À Ludo, Axel, Perrine, Olivia, Ombeline et Vincent,

Au Professeur Christophe Legendre pour sa confiance,

À vous tous mes amis que je ne peux citer de peur d'en oublier.

*« Il n'y a que ceux qui sont dans
les batailles qui les gagnent »*

*Louis-Antoine de Saint Just,
discours du 9 thermidor de l'an II*

TABLE DES MATIERES

PRINCIPALES ABREVIATIONS	7
AVANT-PROPOS	9
INTRODUCTION	11
PREMIERE PARTIE: VOIE mTOR ET VOIE AKT	12
Voie mTOR	12
<i>Découverte des complexes mTOR</i>	12
<i>Structure des complexes mTOR</i>	13
<i>Fonction des complexes mTOR</i>	14
mTORC1	15
mTORC2	19
<i>Régulation de l'activité de mTORC</i>	20
mTORC1	20
mTORC2	22
<i>Sensibilité à la rapamycine de mTORC1 et mTORC2</i>	23
Voie AKT	23
<i>Découverte des protéines AKT</i>	23
<i>Structure des protéines AKT</i>	24
<i>Fonction des protéines AKT</i>	25
<i>Régulation de l'activité d'AKT</i>	28
<i>Isoformes d'AKT</i>	30
DEUXIEME PARTIE: LE REIN ET LES MALADIES RENALES CHRONIQUES	33
Fonctions et structure du rein normal	33
<i>Grandes fonctions rénales</i>	33
<i>Structure du rein</i>	33
Le glomérule	34
Le tubule rénal	37
Les maladies rénales chroniques	38
<i>Généralités</i>	38
<i>Épidémiologie</i>	38

<i>Progression des MRC</i>	39
Altérations du compartiment glomérulaire	40
Altérations du compartiment tubulointerstitielle	43
TROISIEME PARTIE: SYNDROME DES ANTIPHOSPHOLIPIDES ET MALADIE RENALE CHRONIQUE	45
Généralités	45
<i>Définitions</i>	45
<i>Signification et dépistage des anticorps antiphospholipides</i>	45
Anticoagulant circulant	45
Anticorps anti-β2-GPI	46
Anticorps anti-cardiolipines	47
Modèles expérimentaux	47
<i>Modèles spontanés</i>	48
<i>Modèles induits</i>	48
Physiopathologie des thromboses au cours du SAPL	49
Lésions vasculaires liées au SAPL	51
<i>Lésions vasculaires liées aux SAPL dans le rein</i>	51
<i>Lésions vasculaires liées aux SAPL dans d'autres organes</i>	53
QUATRIEME PARTIE: RÔLE DE mTORC ET AKT DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE RENALE	54
Rôle des complexes mTORC dans la physiopathologie rénale	54
<i>Néphropathie diabétique</i>	54
<i>Néphropathie du vieillissement et autophagie</i>	54
<i>Protéinurie et rapamycine</i>	55
<i>Polykystose rénale autosomique dominante</i>	56
<i>Sclérose Tubéreuse de Bourneville (STB)</i>	57
<i>Birt Hogg Dubé (BHD)</i>	58
<i>Nécrose tubulaire aigue</i>	58
Rôle des protéines AKT dans le rein	59
<i>AKT et podocytes</i>	60
<i>AKT et cellules mésangiales</i>	61

<i>AKT et cellules tubulaires</i>	61
OBJECTIF	63
EXPOSÉ DES TRAVAUX	65
1 Étude des fonctions de la voie AKT dans la progression des MRC : mise en évidence du rôle central d'AKT2 dans l'adaptation podocytaire à la réduction néphronique	66
2 Étude du rôle de la voie AKT/mTORC au cours de la néphropathie liée au syndrome des antiphospholipides	69
DISCUSSION et PERSPECTIVES	72
Rôle(s) de la voie AKT dans les podocytes	74
<i>Rôle de l'activation d'AKT dans l'adaptation podocytaire à la réduction néphronique</i>	74
<i>Spécificité fonctionnelle des isoformes d'AKT dans la biologie podocytaire</i>	76
<i>Pertinence des mécanismes d'adaptation à la réduction néphronique : des souris et des hommes</i>	77
Rôle(s) de la voie AKT/mTORC dans les cellules endothéliales au cours de l'APSN	79
<i>Prolifération des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire : évidence pour un crosstalk endothélium-cellules musculaires lisses?</i>	79
<i>Recrutement de la voie AKT/mTORC par les anticorps antiphospholipides</i>	80
<i>Mécanisme potentiel de développement accéléré des lésions vasculaires chez le transplanté ayant des anticorps antiphospholipides</i>	81
<i>Une nouvelle option thérapeutique : le sirolimus</i>	81
CONCLUSION	84
ANNEXE 1	86
BIBLIOGRAPHIE	89

PRINCIPALES ABREVIATIONS

4EBP	<i>eIF4E-binding protein</i>
ADPKD	<i>Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease</i>
ATG13	<i>autophagy-related 13</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
CDK	<i>cyclin dependant kinase</i>
DFG	débit de filtration glomérulaire
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
ERK	<i>extracellular regulated kinase</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FKBP12	<i>FK506 binding protein 12 (kDa)</i>
FOXO	<i>forkhead box O</i>
GLUT	<i>glucose transporter type</i>
GSK3	<i>glycogen synthase kinase 3</i>
IKK	<i>inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells kinase</i>
IRT	insuffisance rénale terminale
MAPK	<i>mitogen activated protein kinases</i>
MDM2	<i>murin double minute 2</i>
mLST8	<i>mammalian lethal with sec13 protein 8</i>
MODY	<i>mature onset diabetes of the young</i>
MRC	maladie rénale chronique
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC	<i>mechanistic target of rapamycin complexe</i>
NFkB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>
Nx	ablation chirurgicale de 75% de la masse rénale
PDGF	<i>platelett derived growth factor</i>
PDK1	<i>phosphatidyl inositol dependant kinase</i>
PGC1α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>

	<i>coactivator 1-α</i>
PHLDA3	<i>pleckstrin homology-like domain, family A, member 3</i>
PHLPP	<i>pleckstrin homology domain and leucine rich repeat protein phosphatase</i>
PI3K	<i>phosphatidyl inositol 3 kinase</i>
PKA	<i>protein kinase A</i>
PKB	<i>protein kinase B</i>
PKC	<i>protein kinase C</i>
PRAS40	<i>proline rich Akt substrate of 40kDa</i>
PROTOR	<i>protein observed with RICTOR 1 et 2,</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
RAPTOR	<i>regulatory associated protein of mTOR</i>
RICTOR	<i>rapamycin insensitive companion of TOR</i>
RTK	<i>récepteur membranaire à activité tyrosine kinase</i>
S6K	<i>S6 kinase</i>
S6RP	<i>S6 ribosomal protein</i>
SIN1	<i>stress activated MAP kinase interacting protein 1</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element binding protein</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TSC	<i>tuberous sclerosis complex</i>
TTC3	<i>tetratricopeptide repeat domain 3</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

AVANT-PROPOS

La voie AKT/mTOR est une voie de signalisation intracellulaire ubiquitaire, très conservée, jouant un rôle clé par sa fonction de régulation de la croissance, de l'apoptose et du cycle cellulaire. L'extraordinaire complexité de son mode de recrutement témoigne du rôle central de cette voie en intégrant des signaux multiples et très variés (facteurs de croissance, acides-aminés, niveau énergétique cellulaire, disponibilité de l'oxygène). Notre compréhension du rôle de cette voie dans la progression de la maladie rénale chronique est encore très limitée et les données de la littérature sont peu nombreuses et controversées.

Le travail que je vais vous présenter comporte deux volets :

- Un premier concerne le rôle de la voie AKT/mTORC au cours de la progression de la maladie rénale chronique. Notre équipe a montré chez la souris, un fort déterminisme génétique de la susceptibilité au développement de lésions rénales après réduction néphronique¹. Ainsi, les souris de la lignée FVB/N développent, deux mois après néphrectomie subtotale (Nx), des lésions rénales importantes alors que toutes les autres lignées testées sont, à ce stade, indemnes de lésions. Ces souris présentent une prolifération précoce des cellules tubulaires, atteignant son paroxysme 48 heures après la Nx. Cette réponse proliférative initiale a pour conséquence une augmentation de la masse de parenchyme rénal fonctionnel sans altération morphologique et constitue, en cela, une réponse adaptative tendant à compenser la réduction néphronique. Cette réponse est transitoire, et la prolifération des cellules tubulaires cesse dans le mois suivant la réduction néphronique. Après une phase de quiescence, une prolifération des cellules tubulaires réapparaît spécifiquement dans la souche FVB/N, contemporaine de l'apparition des lésions rénales, dépendante de l'activation du récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*) (EGFR). Avant mon arrivée dans le laboratoire, un travail de caractérisation des cibles d'aval de l'EGFR avait révélé une augmentation de l'expression de la protéine AKT sur des extraits de reins totaux au cours de la deuxième phase de prolifération après Nx, et ce uniquement chez les souris de souche FVB/N. Mais cette augmentation en quantité n'était pas associée à une augmentation de phosphorylation, témoin de son état d'activation. Mon travail a donc consisté à essayer de comprendre le rôle de cette voie au cours de la progression de la maladie rénale chronique.

- Le deuxième volet consiste en l'étude du rôle de la voie AKT/mTORC dans le

développement de la néphropathie associée au syndrome des antiphospholipides. Cette maladie rénale se caractérise par l'apparition de lésions vasculaires progressivement occlusives. Au cours de mon activité clinique j'avais été interpellé par ces lésions vasculaires sévères et l'hyperplasie de l'intima obstruant progressivement la lumière du vaisseau qui les définissent. L'aspect prolifératif et hypertrophique de ces lésions n'est pas sans rappeler les lésions que l'on peut observer après une agression mécanique de l'endothélium vasculaire tel qu'au cours d'une dilatation endo-coronarienne, où le rôle de la voie AKT/mTORC est crucial². Nous nous sommes donc demandés quel pouvait être le rôle de cette voie au cours de la néphropathie associée au syndrome des antiphospholipides.

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE: VOIE mTOR ET VOIE AKT

La voie AKT/mTOR est une voie ubiquitaire, complexe, régulant de nombreux processus cellulaires tel que la croissance, le cycle cellulaire, le métabolisme énergétique cellulaire ou encore l'apoptose. Sa complexité tient du fait qu'AKT constitue à la fois un élément activateur de la voie mTOR (anciennement dénommée 'mammalian Target Of Rapamycin (TOR)' maintenant baptisée officiellement 'mechanistic TOR') mais également une cible de celui-ci. Par souci de clarté, et afin de mieux caractériser le rôle supposé de chacune d'entre elle, j'ai choisi de séparer, dans l'exposé qui suit, ces 2 voies.

Voie mTOR

Découverte des complexes mTOR

La protéine kinase mTOR est une cible directe d'un macrolide appelée sirolimus ou rapamycine. L'identification de la rapamycine fût à l'origine de la découverte du complexe TOR. La rapamycine fut isolée et extraite à partir d'une bactérie, *Streptomyces Hygroscopius*, en 1975 sur l'île de Pâques, île encore appelée Rapa Nui qui donna ainsi son nom à la molécule rapamycine³. Elle fût considérée initialement comme un antifongique inhibant la croissance de champignons tels que le *Candida Albicans* ou le *Trichophyton granulosum*. Mais très rapidement d'autres propriétés de cet antibiotique furent mises en avant, telles que son effet paradoxal à la fois anti tumoral mais aussi immunosuppresseur^{4,5}. Le mécanisme d'action demeura longtemps mal compris. Il avait été observé que la rapamycine se fixait à FKBP12 au sein de la cellule, comme un autre macrolide aux propriétés immunosuppressives le FK506 (plus connu sous le nom de tacrolimus), mais générant des effets différents sur les lymphocytes T. En effet, le FK506 se fixe à FKBP12, et l'ensemble va lier la calcineurine pour l'inhiber. La calcineurine, dont la propriété principale est d'être une sérine/thréonine phosphatase, ne peut plus déphosphoryler le facteur de transcription NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*) empêchant ainsi son transfert intranucléaire et la traduction du gène *IL-2* (codant pour l'interleukine-2). La rapamycine agit différemment sur les lymphocytes T puisqu'une fois fixée à FKBP12, le complexe rapamycine-FKBP12 inhibe l'effet produit par la liaison de l'IL-2 à son récepteur bloquant la cellule en phase G1 du cycle cellulaire^{6,7 8-10}. Il avait été observé que la rapamycine était également capable de prévenir la phosphorylation de

p70 S6 kinase^{11,12}. Le chaînon manquant permettant l'action de la rapamycine sur le cycle cellulaire et l'inhibition de p70 S6 kinase demeura inconnu jusqu'au début des années 90. Ainsi, en 1991, le groupe de Mickaël N. Hall utilisant des levures résistantes à la rapamycine, identifia 2 gènes, *Target Of Rapamycin (TOR) 1* et *TOR2*, codant pour les protéines kinases TOR¹³. Ces kinases présentes également chez les mammifères furent purifiées puis cristallisées¹⁴ et identifiées comme cible physique de la rapamycine^{15,16}. mTOR est une serine/thréonine protéine kinase qui appartient à la famille des phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et interagit avec de nombreuses protéines pour former 2 complexes distincts appelés mTOR complexe 1 (mTORC1) et 2 (mTORC2). Les 2 complexes ont des mécanismes de recrutement, des cibles d'avales et une sensibilité à la rapamycine différents que nous allons détailler par la suite.

Structure des complexes mTOR

Les 2 complexes combinent plusieurs protéines (**Figure 1**). Ils ont une structure commune constituée par:

- la protéine mTOR, protéine domaine catalytique du complexe,
- la protéine mLST8 (*mammalian lethal with sec-13 protein 8*)^{17,18},
- la protéine DEPTOR (*DEP domain containing mTOR-interacting protein*)¹⁹,
- le complexe TTI 1/TEL 2²⁰.

Mais, ils diffèrent par la présence de protéines spécifiques au sein du complexe. Ainsi, mTORC1 comporte :

- la protéine RAPTOR (*regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin*)^{21,22},
- la protéine PRAS40 (*prolin-rich Akt substrate 40kDa*)²³,

mTORC2 comporte :

- la protéine RICTOR (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*)²⁴,
- la protéine mSIN1(*mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1*)^{25,26},
- la protéine PROTOR 1 et 2 (*protein observed with rictor 1 and 2*)^{27,28}.

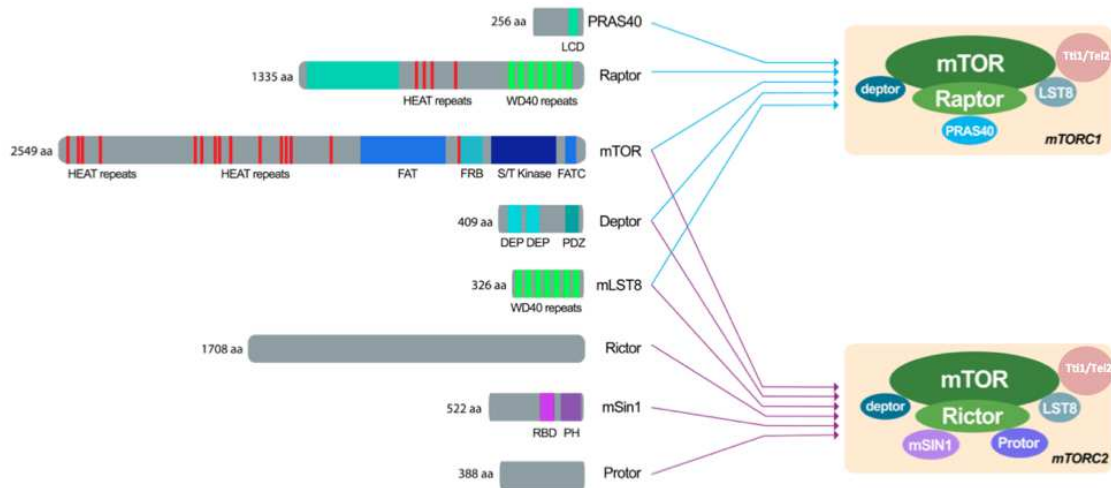


Figure 1 : Structure des complexes mTORC. mTORC1 et mTORC2 ont en commun les protéines mTOR, mLST8 et DEPTOR. mTORC1 possède en plus RAPTOR et PRAS40, et mTORC2 possède RICTOR, mSIN1 et PROTOR. Adapté de²⁹.

Fonction des complexes mTOR

Les fonctions des complexes mTORC sont nombreuses et résumées **Figure 2**. Ici nous détaillerons les grandes fonctions et substrats des complexes mTORC.

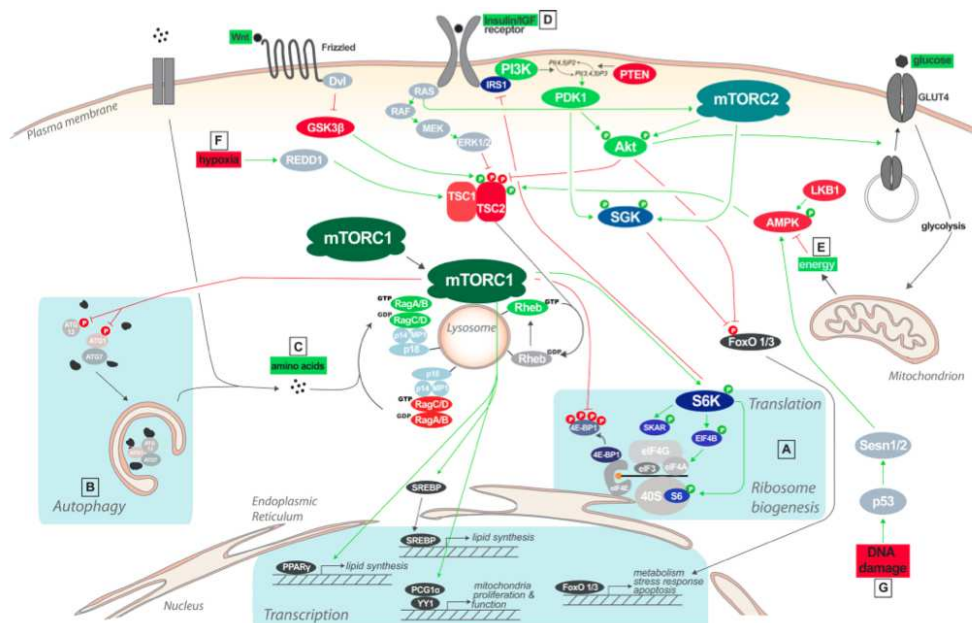


Figure 2 : La voie de signalisation mTORC. La voie mTORC1 favorise la synthèse protidique (A) et inhibe l'autophagie (B), en intégrant différents signaux tels que les acides-aminés (C), les facteurs de croissances (D), l'état énergétique de la cellule grâce au niveau d'AMPK (*AMP-activated kinase*) (E), les stress incluant l'hypoxie (F) et les cassures doubles brins de l'ADN (G). Un premier niveau d'intégration se fait par le biais du complexe TSC (*tuberous sclerosis complex*). AKT, ERK1/2 (*extracellular regulated kinase*) phosphorylent et inhibent TSC, alors que GSK3β (*glycogen synthase kinase*) et REDD1 l'active. Le deuxième niveau d'intégration se fait au niveau des lysosomes où le complexe RAGULATOR recrute mTORC1 en réponse aux acides aminés. mTORC2 est recruté par les facteurs de croissances par un mécanisme inconnu et va phosphoryler AKT. D'après²⁹.

mTORC1

Synthèse protéique

La synthèse protéique est de loin la mieux caractérisée des fonctions contrôlées par mTORC1. Pour favoriser la synthèse protéique, mTORC1 va permettre la traduction de l'ARN messager (ARNm) et la synthèse des ribosomes, éléments clés de la traduction de l'ARNm. Les 2 cibles les mieux caractérisées de mTORC1 au cours de la synthèse protéique sont 4E-BP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E protein binding1*) et S6K1/S6K2 (*S6 Kinase 1 et 2*)^{30,31}.

Le facteur de transcription 4E-BP1 est un membre de la famille 4EBP (4E-BP1, 2 et 3) qui fonctionnent comme des répresseurs de l'initiation de la traduction de l'ARNm. 4E-BP1 est composé de eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*) et de BP1 (*protein binding1*). 4E-BP1 se fixe dans le cytoplasme à la partie 5'UTR de l'ARNm et inhibe ainsi l'initiation de la traduction. Quand il est phosphorylé par mTORC1 sur les Thr³⁷ et Thr⁴⁶, il se dissocie de l'ARN et permet le recrutement de eIF4G en 5'UTR suivi de celui de la sous unité ribosomale 40S et permet ainsi l'initiation de la traduction.

S6K1 et S6K2 représentent les autres cibles d'aval de mTORC1 les mieux caractérisées. La phosphorylation de S6K1/S6K2 favorise la synthèse protéique en phosphorylant à son tour de nombreux substrats impliqués dans l'initiation de la traduction et la croissance cellulaire. Les effets précis et voies moléculaires en aval de S6K1/S6K2 sont mal connues mais la délétion de S6K1 chez la drosophile ou chez la souris entraîne une réduction de taille des animaux et une réduction de taille des cellules^{32,33}. Les données de la littérature permettent pour le moment d'affirmer que :

- S6K1 phosphoryle et active eIF4B qui vient à son tour compléter le complexe d'initiation de la traduction et favorise l'activité de eIF4A et de l'hélicase ARN³¹.
- S6K1 phosphoryle et entraîne la dégradation de PDCD4 (*programmed cell death protein 4*), protéine qui permet habituellement de bloquer l'association de eIF4A avec le complexe d'initiation de la traduction³¹.
- S6K1 se lie à SKAR sur les 'exon junction complex' de l'ARN où il favorise l'initiation de la traduction d'ARNm nouvellement formés et à peine exportés du noyau vers le cytoplasme^{34,35}.

mTORC1 favorise aussi la synthèse protéique en permettant la synthèse des ribosomes. Cette synthèse, extrêmement consommatrice d'énergie au sein de la cellule, nécessite l'activité

coordonnée de 3 ARN Polymérase (Pol I, II, III) dont l'activité et en partie coordonnées par mTORC1³⁶⁻⁴².

Synthèse lipidique

mTORC1 joue également un rôle clé dans la synthèse des lipides nécessaires entre autre pour générer les membranes cellulaires au cours de la prolifération cellulaire⁴³. Cette synthèse est coordonnée par le régulation du facteur de transcription SREB-1 (*sterol regulatory element-binding protein 1*) et d'une phosphatase, la protéine LIPIN-1.

Le facteur de transcription SREB-1 régule l'homéostasie lipidique en contrôlant l'expression de gènes nécessaire pour la synthèse du cholestérol, des acides gras, des triglycérides mais aussi des phospholipides. Trois membres de la famille SREBP ont été décrits chez les mammifères : SREBP-1a et -1c produit par épissage alternatif, et SREBP-2 produit par un gène différent⁴⁴. Les facteurs de transcriptions SREBP sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique sous forme de précurseurs qui devront subir des modifications post-traductionnelle, un clivage protéolytique dans l'appareil de Golgi, pour pouvoir sortir et rejoindre le noyau. SREBP-1 et -2 sont activés en réponse à des signaux différents : SREBP-2 est activé par la déplétion cellulaire en stérol alors que SREBP-1c est insensible au niveau cellulaire de stérol mais sensible à l'insuline⁴⁴⁻⁴⁶. L'insuline, l'activation constitutive d'AKT ou la délétion de *Tsc1/Tsc2*, induit l'accumulation intranucléaire de SREBP-1 et l'expression de gènes de lipogenèse. Le mécanisme exact par lequel l'insuline favorise le clivage de SREBP-1 n'est pas connu. Récemment, *Porstmann T. et col* ont observé que l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine bloquait la translocation nucléaire de SREBP-1 théoriquement induite par l'insuline ainsi que l'expression de gènes de lipogenèse et par conséquence la synthèse de lipides⁴⁷. De même, la réduction de l'expression de *Raptor* mais pas celle de *Rictor*, permet d'obtenir des résultats similaires⁴⁸⁻⁵⁰. Finalement, pour renforcer le lien entre activation de la voie PI3K/AKT/mTORC1 et synthèse lipidique il a été observé que la déplétion cellulaire de SREBP-1 réduisait *in vitro* la taille des cellules, ainsi qu'*in vivo* la taille de la drosophile⁴⁷.

mTORC1 contrôle l'expression et les modifications post-traductionnelles nécessaires à l'activité de SREBP-1 mais aussi son transfert intranucléaire grâce à un mécanisme dépendant de la protéine LIPIN-1. La LIPIN-1 est donc une phosphatase qui permet la synthèse de triglycérides. L'inactivation du gène *Lipin-1* est responsable d'une lipodystrophie alors que sa surexpression entraine une obésité^{51,52}. En plus de son activité de synthèse des triglycérides,

elle agit comme co-activateur de facteurs de transcriptions notamment pour PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ*)^{53,54}. La LIPIN-1 interagit directement avec PPAR- γ pour induire la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'adipogenèse. mTORC1 phosphoryle directement la LIPIN-1 sur différents résidus entraînant ainsi l'exclusion nucléaire de la LIPIN-1 et son accumulation dans le cytoplasme⁵⁵. La présence de LIPIN-1 dans le noyau, lorsque mTORC1 est inhibé, est nécessaire et suffisante pour réprimer l'activité de SREBP-1 et -2. La forme nucléaire non phosphorylée de la LIPIN-1 empêche l'accumulation de SREBP dans le noyau grâce à un mécanisme qui requiert la participation de la LAMIN-1⁵⁵.

Métabolisme cellulaire

L'activation de la voie mTORC1 est extrêmement consommatrice d'énergie mais va également permettre de générer de l'ATP. Ainsi, mTORC1 augmente la glycolyse en activant la transcription et la traduction de HIF-1 α (*hypoxia inducible factor-1 α*)⁵⁶⁻⁵⁹ lui-même étant un régulateur positif des nombreux gènes impliqués dans la glycolyse, permettant ainsi de produire de l'ATP via le cycle de Krebs.

De plus, il a été rapporté que mTORC1 pourrait augmenter la quantité d'ADN mitochondrial et l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif en favorisant l'interaction intranucléaire de PGC1 α (*PPAR- γ coactivator 1 α*) et du facteur de transcription YY1 (*Ying-Yang 1*) qui régule positivement la biogénèse des mitochondries ainsi que le métabolisme oxydatif⁶⁰.

Autophagie

mTORC1 régule en partie l'anabolisme cellulaire grâce à une régulation positive des ses différentes cibles d'aval comme nous venons de le voir, mais peut aussi favoriser la croissance cellulaire en inhibant certains processus tels que l'autophagie, élément central de la dégradation des organelles intracellulaires⁶¹. L'autophagie permet ainsi à une cellule de maintenir ses activités biologiques fondamentales en cas de stress cellulaire et en particulier au cours d'épisodes de réduction d'apport des nutriments. Dès que l'autophagie est activée, les composants cellulaires sont inclus dans une structure vacuolaire comportant une double membrane (autophagosome) qui fusionne ensuite avec les lysosomes pour former les autolysosomes où le contenu sera dégradé et fournira ainsi une source d'apport en nutriment pour la cellule.

Il a été montré par différents groupes que TORC1 régula négativement l'autophagie chez *S. cerevisiae*⁶². De plus, la rapamycine est suffisante pour induire l'autophagie, *in vitro* et *in vivo*, même en présence de nutriments⁶². Chez la levure *S. cerevisiae*, la kinase ATG1 (*autophagy related 1*) nécessaire à l'initiation de l'autophagie, est dépendante de TORC1^{63,64}. La délétion du gène *ATG1* chez *S. cerevisiae* empêche l'autophagie même en cas de réduction d'apports en nutriments ou d'inhibition de TORC1 suggérant qu'ATG1 se trouve en aval de TORC1⁶⁵. ATG1 interagit avec de nombreuses protéines de l'autophagie telles que ATG13 et ATG17⁶⁶. L'interaction d'ATG13 et d'ATG17 avec ATG1 est induite par la rapamycine ou la carence en nutriment, et la constitution de ce complexe est nécessaire pour l'activité kinase d'ATG1⁶⁵. TORC1 phosphoryle de nombreux sites d'ATG13 pour empêcher l'interaction ATG13-ATG1 et ainsi réprimer l'autophagie⁶⁵.

La fonction régulatrice d'autophagie de TORC1 est conservée chez les eucaryotes. Le génome humain comporte des équivalents d'ATG1 tel que ULK1 et ULK2 qui fonctionnent en aval de mTORC1⁶³. mTORC1 phosphoryle directement le complexe ULK1/ATG13/FIP200 (équivalent humain d'ATG17) et l'inhibe⁶⁷. Mais comme pour la synthèse protidique et lipidique, mTORC1 peut agir sur l'autophagie par d'autres mécanismes tel que la régulation de DAP1 (*death-associated protein 1*)⁶⁸, un suppresseur d'autophagie, ou encore par la régulation de WIPI2 (*WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2*)⁶⁹, équivalent chez le mammifère d'ATG18 chez la levure.

Biogénèse des lysosomes

mTORC1 a également la possibilité d'inhiber la formation des lysosomes. Il a été récemment montré que mTORC1 régule la formation des lysosomes en modulant l'activité du facteur de transcription EB (TFEB)⁷⁰. Ce facteur de transcription contrôle de nombreux gènes clés impliqués dans la fonction lysosomale. mTORC1 phosphoryle TFEB empêchant ainsi son accumulation nucléaire et donc son activité⁷⁰. Ainsi, au cours de périodes de jeûne ou au cours d'un traitement par la rapamycine, TFEB s'accumule dans le noyau et augmente son activité. TFEB contrôlant l'expression de nombreux gènes impliqués dans la formation d'autophagosome et la fusion avec les lysosomes, il s'agit d'un moyen de régulation supplémentaire de l'autophagie via mTORC1.

mTORC2

Comparé à mTORC1, beaucoup moins de choses sont connues sur les fonctions et cibles d'aval de mTORC2. En effet, mTORC2 ne semble phosphoryler aucun des substrats de mTORC1. Le complexe mTORC2 phosphoryle un motif particulier (*turn motif*) de certaines kinases AGC que sont AKT, SGK1 (*serum and glucocorticoid-regulated kinase 1*)⁷¹ et la PKC α (*protein kinase C α*)⁷². Cette phosphorylation constitutive permettrait de stabiliser ces protéines⁷³.

AKT

mTORC2 active directement AKT en phosphorylant la sérine en position 473, site requis pour son activation maximale⁷⁴. Les conséquences de cette phosphorylation seront décrites plus bas.

SGK-1 (*serum-glucocorticoid-induced protein kinase-1*)

mTORC2 phosphoryle et active directement SGK-1 sur une Sérine en position 422⁷⁵. A son tour, cette kinase va stimuler le transport du sodium dans les cellules épithéliales en stabilisant et favorisant l'expression du canal sodique (eNac). En effet, SGK-1 phosphoryle la protéine NEDD4-2 (*neural-precursor-cell-expressed developmentally down-regulated 4-2*) qui est une ubiquitine ligase. Cette phosphorylation inhibitrice de NEDD4-2 empêche ainsi l'adressage de eNac au protéasome⁷⁵. SGK-1 phosphoryle et inhibe également la protéine WNK4 (*with no lysine kinase 4*), kinase connue entre autre pour son activité inhibitrice sur eNac⁷⁶.

SGK-1 exerce aussi une activité inhibitrice par le biais de phosphorylation sur de nombreux autres substrats tels que MEKK3 (*mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 3*)⁷⁷, SEK1⁷⁷, B-Raf kinase⁷⁸, phosphomannose mutase 2⁷⁹, inducible NO (*nitric oxide*) synthase⁸⁰, mais également sur certains facteurs de transcription tels que CREB (*cAMP responsive element binding protein*)⁸¹, NF κ B (nuclear factor kappa B)⁸² ou encore FOXO3a (*forkhead transcription factor FKHR-L1*)⁸³.

Son rôle précis fait encore l'objet de multiples travaux expérimentaux et il est à noter que les souris *SGK-1*^{-/-} sont viables et présentent essentiellement une fuite sodée urinaire⁸⁴.

PKC α (*protein kinase C α*)

PKC α est la troisième AGC kinase activée par mTORC2. PKC α est une sérine thréonine

kinase exprimée de manière ubiquitaire⁸⁵. PKC α régule suivant le type cellulaire la prolifération ou l'apoptose, la différenciation cellulaire et la migration cellulaire⁸⁵. Pour exercer ces différentes fonctions, PKC α active la voie ERK/MAPK (*extracellular signal regulated kinase/mitogen activated protein kinase*), les RHO GTPases et les inhibiteurs des kinases cycline-dépendante (p21, p27)⁸⁵.

PKC α est activée par phosphorylation de 3 de ces résidus : 2 thréonines en position 497 et 638 et une sérine en position 657. En 2004, l'équipe de *DM. Sabatini* identifia le complexe mTORC2 comme kinase responsable de la phosphorylation de PKC α sur la sérine 657 qui permet ainsi son activation maximale²⁴.

Régulation de l'activité de mTORC

mTORC1

Cette voie se caractérise par une capacité assez fabuleuse à pouvoir sentir et intégrer un grand nombre de signaux³¹. La régulation est multiple et complexe mais on peut recenser au moins 5 familles de signaux intra et extracellulaire pouvant recruter mTORC1 : les facteurs de croissances, les stress, l'hypoxie, le statut énergétique et les acides aminés (**Figure 3**).

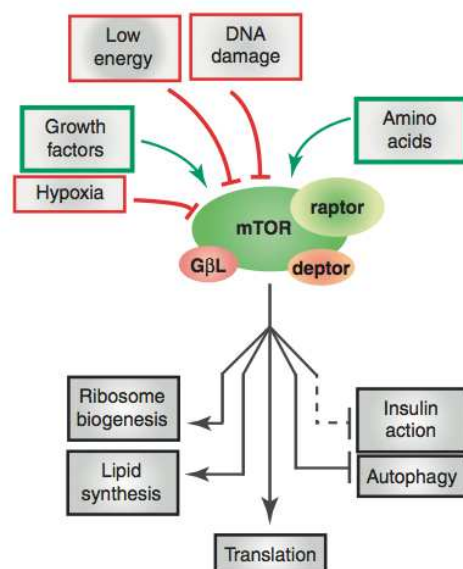


Figure 3 : Recrutement de la voie mTORC1 par les facteurs de croissances, les stress, l'hypoxie, le statut énergétique et les acides aminés. D'après⁸⁶.

Facteurs de croissances, stress, hypoxie, statut énergétique

Le complexe hétérodimérique constitué par TSC1 (*tuberous sclerosis 1*, encore appelé hamartine) et TSC2 (*tuberous sclerosis 2*, encore appelé tubérine) représente l'élément principal de la régulation de mTORC1. Ce complexe régule négativement mTORC1, en fonctionnant comme une GAP (*GTPase-activating protein*) inhibant le passage de la forme GDP, forme inactive, à la forme GTP, forme active, de Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) qui peut elle agir et activer directement mTORC1 sous cette forme. Le complexe TSC1/TSC2 transmet un grand nombre de signaux qui vont agir sur mTORC1 tel que les facteurs de croissances, comme l'insuline et l'IGF1 (*insuline-like growth factor 1*). Le complexe TSC1/TSC2 est lui même phosphorylé par AKT, ERK1/2 (*extracellular-signal-regulated kinase*), RSK1 (*ribosomal S6 kinase*), IKK β (*I κ B kinase β*)⁸⁷⁻⁹². Ces phosphorylations sont responsables de l'inhibition du complexe TSC1/TSC2 et favorisent donc l'activité de mTORC1. Comme nous le verrons plus bas, AKT peut également réguler mTORC1 par une voie TSC1/TSC2 indépendante en phosphorylant PRAS40 qui entraîne ainsi la dissociation du complexe mTORC1²³. La voie WNT, élément majeur contrôlant la croissance, la prolifération, la polarité, la différenciation et le développement, régule indirectement le complexe mTORC1 en inhibant GSK3- β qui phosphoryle lui même TSC2⁹³.

De nombreux stress peuvent activer la voie mTORC1 en modulant l'activité du couple TSC1/TSC2. Parmi ceux-ci les mieux caractériser sont : la faible quantité de nutriments disponibles, l'hypoxie et les dommages à l'ADN.

L'hypoxie comme la carence en nutriments stimulent l'AMPK (*adenosine monophosphate activated protein kinase*) qui phosphoryle TSC2 sur différents sites et augmente le tonus inhibiteur du complexe sur mTORC1 en renforçant l'activité GAP de TSC sur RHEB⁶¹. De plus, AMPK phosphoryle directement RAPTOR et se fixe dessus à la manière d'une protéine 14-3-3 générant un encombrement stérique qui déstabilise mTORC1⁹⁴.

L'hypoxie induit aussi l'expression du facteur de transcription REDD1 (*regulation of DNA damage response 1*) qui active TSC2 de manière inconnue⁹⁵⁻⁹⁷.

Les dommages à l'ADN induisent la transcription des gènes *Tsc2* et *Pten* (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*), réduisant ainsi l'activité de l'ensemble de la voie PI3K-mTORC1, mais aussi la transcription des gènes codant pour SESN 1 (*sestrin 1*) et SESN 2 (*sestrin 2*) dépendant de p53^{98,99}. Ces 2 protéines, SESN 1 et 2, ont été montrés comme activant directement l'AMPK¹⁰⁰.

Acides aminés

Les acides aminés, et en particuliers 2 d'entre eux (leucine et arginine), activent directement mTORC1. De plus, leur présence est indispensable pour la transmission du signal d'activation de mTORC1 par les facteurs de croissances^{101,102}.

Les mécanismes moléculaires qui permettent aux acides aminés d'activer directement mTORC1 restent en partie mystérieux mais des avancées très récentes permettent d'en dessiner les contours. En 2008, 2 groupes indépendants ont découvert que l'activation de mTORC1 par les acides aminés nécessitait la présence de RAG GTPases^{103,104}. Il existe chez les mammifères 4 protéines RAG (-A à -D) qui forment des hétérodimères RAG-A ou -B avec RAG-C ou RAG-D. Par un mécanisme inconnu, les acides aminés favorisent la fixation des hétérodimères RAG au GTP et son interaction avec RAPTOR. Cette interaction permet la translocation de mTORC1 vers la surface des lysosomes où les RAG GTPases se lient à un complexe récemment identifié, appelé RAGULATOR, composé de trois protéines : MP1, P14 et P18. Comme les RAG GTPases, ce complexe est indispensable à l'activation de mTORC1 par les acides aminés. Une hypothèse avancée pour expliquer la migration de RAG GTPases/mTORC1 à la membrane des lysosomes repose sur la présence en grande quantité de RHEB à leurs surfaces pouvant peut être favoriser ainsi l'activation de mTORC1¹⁰⁴.

Au sein des lysosomes, les acides aminés s'accumulent et vont initier une signalisation via la pompe v-ATPase (vacuolar H⁺-adenosine triphosphate ATPase). Cette pompe est indispensable puisque la déplétion membranaire en v-ATPase bloque le recrutement de mTORC1 à la surface des lysosomes ainsi que la signalisation d'aval de mTORC1¹⁰⁵. Il a été montré que la pompe v-ATPase interagissait physiquement avec le complexe RAGULATOR à la surface des lysosomes¹⁰⁵. La voie mTORC1 régule l'expression de la pompe v-ATPase suggérant ainsi une voie de rétrocontrôle entre mTORC1 et la fonction lysosomale^{57,106}.

D'autres protéines ont été impliquées dans le 'sensing' des acides aminés par mTORC1 telles que la protéine MAP4k3 (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase*)¹⁰⁷, la protéine hVPS34 (*mammalian vacuolar protein sorting 34 homolog*)¹⁰⁸ et la protéine IPMK (*inositol polyphosphate monokinase*)¹⁰⁹. Cependant, leurs liens avec le système RAG-RAGULATOR n'est pas expliqué.

mTORC2

Les mécanismes qui modulent l'activité de mTORC2 sont peu connus. Ce complexe, insensible aux nutriments, semble être dépendant de PI3K, car les facteurs de croissance qui

l'activent provoquent la phosphorylation d'AKT dépendante de mTORC2³¹. Le complexe TSC1/2 semble également être un activateur de mTORC2 en se liant directement à mTORC2 et en l'activant par un mécanisme encore méconnu¹¹⁰. Récemment, il a été montré que RICTOR pouvait être phosphorylé par S6K1, inhibant l'activité de mTORC2 et ainsi la phosphorylation/activation d'AKT^{111,112}

Sensibilité à la rapamycine de mTORC1 et mTORC2

Jusqu'à récemment, en plus de leur composition protéique, les complexes mTORC1 et mTORC2 se distinguaient par leur sensibilité à la rapamycine. En effet, les travaux expérimentaux initiaux montraient que l'administration aigue de rapamycine inhibait la voie de signalisation mTORC1 mais n'avait aucun effet sur celle dépendante de mTORC2¹⁷. Ce complexe fut donc considéré comme insensible à l'action inhibitrice de la rapamycine. En fait la situation est beaucoup plus complexe qu'elle n'y paraît. En effet, des travaux récents, *in vitro* mais aussi *in vivo*, montrent qu'un traitement prolongé par la rapamycine est capable de réduire l'activité de mTORC2 dans un certain nombre de type cellulaire¹¹³⁻¹²². Le mécanisme d'action tout en restant flou n'est pas univoque, mais passe tantôt par la déstabilisation du complexe mTORC2, tantôt par l'inhibition de la synthèse de RICTOR.

Voie AKT

Découverte des protéines AKT

Les protéines AKT sont des serines thréonines kinases appartenant à la famille AGC (apparentées aux protéines kinases PKA, PKG et PKC) jouant un rôle central dans la survie, la croissance et la prolifération cellulaire.

Les gènes codant ces protéines chez les mammifères ont été découverts, par plusieurs groupes, entre la fin des années 80 et le début des années 90, au travers d'approches différentes. L'équipe de *P. Tsichlis* identifia les gènes *Akt* comme des homologues cellulaires de l'oncogène *v-Akt* transduit par un retrovirus murin¹²³. Le terme « AKT » fait référence au nom de la lignée cellulaire dérivée d'un thymome murin à partir de laquelle *v-Akt* fut cloné¹²⁴. À la même époque, deux groupes indépendants reconnurent dans les ADNc codant AKT, des séquences apparentées aux protéines kinases A et C, ce qui leur valu la dénomination, encore largement utilisée, de protéines kinases B (PKB)^{125,126}.

S'il n'existe qu'un gène AKT chez la drosophile, trois protéines AKT, codées par des gènes distincts, sont retrouvées chez la souris comme chez l'homme.

Structure des protéines AKT

Les protéines AKT partagent une structure modulaire conservée. On distingue à partir de l'extrémité amino-terminale (**Figure 4**):

- Un domaine d'homologie à la plekstrine permettant aux AKT d'interagir avec les membranes cellulaires au niveau de domaines enrichis en phosphatidyl-inositol (3, 4, 5) triphosphate ou (3, 4) diphosphate. Ce domaine joue un rôle clé dans le recrutement à la membrane d'AKT ainsi que dans sa reconnaissance en tant que substrat d'autres kinases.
- Un domaine intermédiaire assurant la liaison entre le domaine d'homologie à la plekstrine et le domaine catalytique (domaine « *linker* »).
- Un domaine central portant l'activité kinase d'AKT. Ce domaine présente une forte homologie avec d'autres kinases de la famille AGC. En plus de porter l'activité kinase des AKT, ce domaine comporte un élément de régulation post-traductionnel. Il existe en effet, en position 308, un résidu thréonine conservé dont la phosphorylation est nécessaire à l'activité de la protéine.
- Un domaine hydrophobe carboxy-terminal d'environ 40 acides aminés comportant également un motif de régulation très conservé au sein de la famille des kinases AGC. Toutes les protéines AKT présentent au sein de ce motif, un résidu sérine en position 473 dont la phosphorylation détermine leur état d'activation.

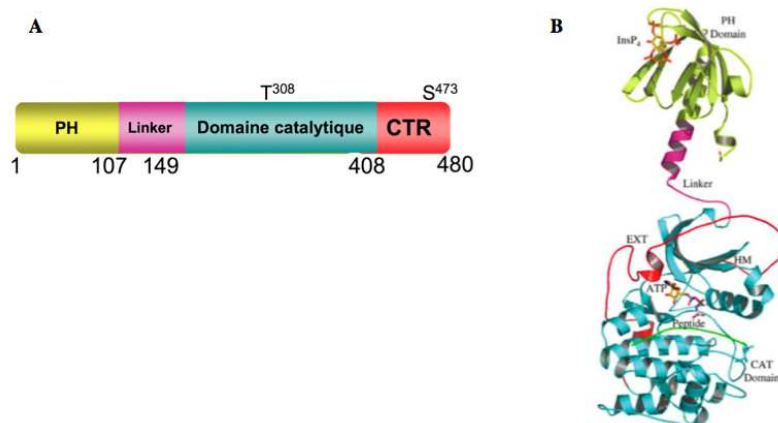


Figure 4 : Structure des protéines AKT. (A) Organisation modulaire des protéines AKT. (B) Représentation tridimensionnelle en ruban de la protéine AKT d'après¹²⁷. PH : domaine d'homologie à la plekstrine; CTR : domaine régulateur C-terminal. Les codes couleurs des différents domaines sont conservés en (A) et (B).

Fonction des protéines AKT

L'implication d'AKT dans un grand nombre de processus cellulaires a été démontrée par la surexpression ou l'inactivation des isoformes de cette kinase dans différents organismes¹²⁸⁻¹³¹. Comme pour la voie mTOR, AKT joue un rôle important, non seulement dans le contrôle de la survie, de la croissance et de la prolifération cellulaires, mais également dans le métabolisme énergétique et la migration cellulaire (**Figure 5**).

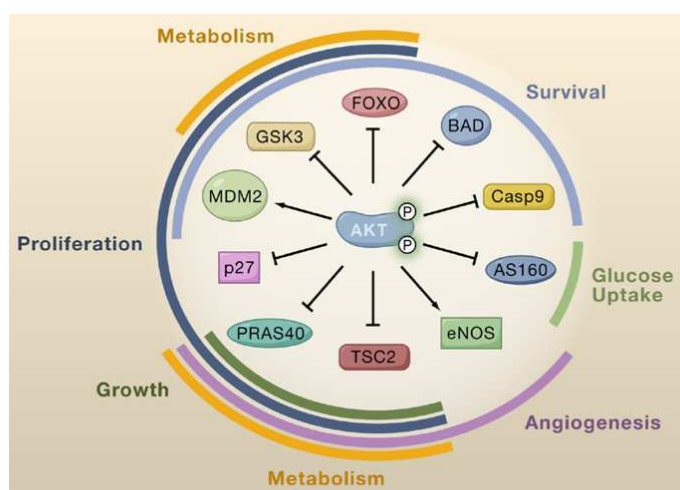


Figure 5 : Fonctions d'AKT. AKT phosphoryle et active ou inhibe de nombreuses protéines impliquées dans un grand nombre de processus incluant la prolifération, la survie, le métabolisme cellulaire, la croissance et la migration. Il est intéressant de noter qu'il existe un certain degré de redondance dans les fonctions de ces différentes cibles. D'après¹³².

AKT phosphoryle un grand nombre de substrats, dont une partie a pu être identifiée, lui permettant ainsi d'exercer ses fonctions¹³². Les motifs préférentiellement phosphorylés par les protéines AKT ont été déterminés au travers du criblage de bibliothèques peptidiques. Le motif minimal identifié (R-X-R-X-X-S/T-B) a permis la recherche de cibles putatives d'AKT. Plus de 100 substrats potentiels d'AKT ont été proposés, et 18 cibles d'AKT ont été bien caractérisées¹³². Dans la plupart des cas, la phosphorylation catalysée par AKT a un effet inhibiteur sur sa cible. Cependant, certaines exceptions existent comme c'est le cas pour MDM2 (*murin double minute 2*), eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) ou encore IKK α (*inhibitor of κ B kinase α*) qui sont toutes trois activées par AKT. En dehors de ses fonctions exercées par le biais de la voie mTORC précédemment décrites, AKT peut exercer différentes fonctions par le biais d'autres cibles. Ainsi, AKT est aussi impliquée dans la survie cellulaire, la prolifération, le métabolisme cellulaire et le cytosquelette.

Survie cellulaire

Les principales cibles d'AKT impliquées dans la survie cellulaire sont MDM2, BAD (*BCL2 associated death promoter*), FOXO1 (*forkhead box O1*), FOXO3a (*forkhead box O3a*) et FOXO4 (*forkhead box O4*)¹³². En phosphorylant ces effecteurs, AKT favorise la survie cellulaire en inhibant l'apoptose.

Ainsi, la phosphorylation de MDM2 par AKT favorise l'accumulation nucléaire de cette ubiquitine ligase. Dans le noyau, MDM2 ubiquitine p53 permettant ainsi la dégradation protéasomale de cet inducteur de l'apoptose¹³³. Par contre, à la différence de son action sur MDM2, AKT inhibe l'activité de BAD et des facteurs de transcription FOXO1, 3a et 4. L'activité d'AKT s'oppose ainsi aux effets pro-apoptotiques de ces molécules. Ainsi, BAD favorise l'apoptose en inhibant les deux molécules anti-apoptotiques BCL2 et BCLXL qui, elles-mêmes, s'opposent à la libération cytosolique du cytochrome C mitochondrial. La phosphorylation de BAD par AKT permet la séquestration de BAD par des protéines de la famille 14-3-3 et empêche ainsi l'interaction de BAD avec BCL2 et BCLXL.

Cycle cellulaire

Une partie des effets pro-prolifératifs d'AKT est expliquée par une modulation directe de l'activité de protéines régulant le cycle cellulaire. En effet, AKT inhibe par phosphorylation les inhibiteurs de la progression du cycle cellulaire p27 et p21¹³³⁻¹³⁶. La phosphorylation de ces protéines entraîne leur exclusion nucléaire et leur relocalisation cytosolique. Ceci a pour

conséquence d'empêcher leurs interactions avec les complexes cycline/CDK (*cycline dependant kinase*) sur lesquels ils exercent un tonus inhibiteur. Il a été suggéré que toutes les isoformes d'AKT ne modulaient pas p21 de la même façon¹³⁷.

D'autres cibles d'AKT comme GSK3^{138,139}, FOXO¹⁴⁰ et mTORC1¹⁴¹ sont capable d'affecter, de façon directe ou indirecte, des régulateurs du cycle cellulaire

Croissance cellulaire

Comme nous l'avons vu précédemment, AKT est un intermédiaire important de l'activation de mTORC1 par les facteurs de croissance. Deux cibles directes d'AKT sont impliquées dans cette activation : TSC2 et PRAS40¹³². AKT phosphoryle TSC2 sur 2 sites très conservés, une sérine en position 939 et une thréonine en position 1462. Cette phosphorylation inhibitrice permet de lever l'effet inhibiteur de TSC2 sur RHEB GTP¹³².

AKT phosphoryle PRAS40 sur un résidu thréonine en position 246. Comme nous l'avons vu, PRAS40 fait parti du complexe mTORC1 et exerce un tonus inhibiteur sur l'activation de mTORC1. La phosphorylation de PRAS40 permet l'activation de la voie mTORC1¹³².

Métabolisme énergétique cellulaire

Les protéines AKT jouent un rôle à la fois central et complexe dans le contrôle du métabolisme énergétique cellulaire. En dehors de son action sur mTORC1, AKT intervient sur le métabolisme cellulaire du glucose et le métabolisme lipidique.

AKT favorise l'entrée et l'utilisation du glucose par la cellule. En effet, l'activation d'AKT favorise la translocation du transporteur de glucose sensible à l'insuline GLUT4. Cet effet sur le trafic des vésicules contenant GLUT4 semble lié à la phosphorylation inhibitrice d'AS160 (*AKT substrate of 160 kD*) et de TBC1D1 (*TBC 1 domain 1*) par AKT¹⁴². Ces deux protéines modulent la migration des vésicules en favorisant l'activité GTPasique d'une famille de petites protéines G particulièrement impliquée dans le trafic vésiculaire. AKT favorise également l'expression du transporteur GLUT1 par différents mécanismes indirects^{143,144}. L'utilisation du glucose intracellulaire est également stimulée par AKT. En effet, AKT augmente la conversion du glucose en glucose-6-phosphate en modulant l'activité des hexokinases par un mécanisme encore inconnu. AKT favorise également la glycolyse par différents mécanismes faisant intervenir deux de ses cibles directes: FOXO et PGC1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α*) ainsi que de façon

indirecte le facteur HIF1 α ¹⁴⁵. Enfin, AKT favorise la synthèse de glycogène en inhibant GSK3 qui, elle-même, inhibe la glycogène-synthase.

À côté de son rôle dans le contrôle du métabolisme glucidique, AKT augmente la synthèse de cholestérol et d'acides gras en inhibant GSK3 qui, lui-même, favorise la dégradation des facteurs de transcription SREBP qui jouent un rôle central la synthèse de ces lipides comme nous l'avons précédemment vu¹⁴⁶.

Migration cellulaire

Les protéines AKT modulent les capacités migratoires des cellules mais leur rôle varie en fonction du type cellulaire et de l'isoforme considérés^{147,148}. Les cibles spécifiques responsables de ces effets n'ont pas été clairement définies, bien qu'il ait été suggéré que les différences observées entre les effets des isoformes d'AKT sur la migration cellulaire soit liée à une modulation de l'activité de la petite protéine G RAC¹⁴⁸.

Régulation de l'activité d'AKT

L'activation d'AKT nécessite la coopération de différentes enzymes. Elle est initiée par une PI3K (**Figure 6**). Cette enzyme, qui phosphoryle en position 3 le phosphatidyl-inositol-4-5-diphosphate (PIP2) contenu dans les membranes, permet le recrutement membranaire d'AKT par l'intermédiaire de son domaine d'homologie à la plekstrine. Cette phosphorylation est cruciale au recrutement d'AKT puisque ces protéines ne peuvent interagir qu'avec le (3, 4) PIP2 ou le (3, 4, 5) PIP3.

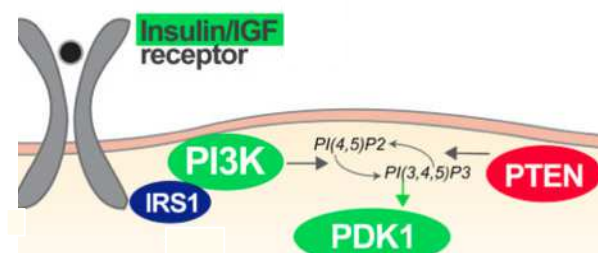


Figure 6 : Activation de PDK1(phosphatidyl inositol dependant kinase 1).

Adapté de²⁹.

Une fois recrutée à la membrane, la protéine AKT doit, pour atteindre son activité maximale, être phosphorylée à la fois sur la Thr³⁰⁸ et la Ser⁴⁷³ par deux kinases distinctes.

- PDK1 (*phosphatidyl inositol dependant kinase 1*) est la kinase responsable de la phosphorylation de la Thr^{308 149}. Cette serine/threonine kinase qui appartient elle aussi à la famille AGC, est également recrutée à la membrane par un domaine d'homologie à la pleckstrine en réponse à la phosphorylation du PIP2.
- Le complexe mTORC2 représente la principale, sinon la seule, kinase impliquée dans la phosphorylation du résidu Ser⁴⁷³ comme nous l'avons vu précédemment.

La phosphorylation d'AKT sur la Th³⁰⁸ par PDK1 et sur la Ser⁴⁷³ par mTORC2 résulte en son activation maximale. Mais il est important de noter que ces deux phosphorylations ne sont ni forcément simultanées ni équivalentes. En effet, l'invalidation de RICTOR⁷² et de PDK1¹⁵⁰ a permis de montrer que ces deux sites pouvaient être phosphorylés indépendamment. De plus, les différents substrats d'AKT ne sont pas affectés de la même façon par la phosphorylation de la Ser⁴⁷³. Ainsi, la perte de cette phosphorylation affecte l'action d'AKT sur les protéines FOXO1 et FOXO3 alors que la phosphorylation de TSC2 n'apparaît pas modifiée⁷².

L'activité des protéines AKT est soumise à une régulation fine impliquant entre autres des boucles de rétrocontrôles qui vont limiter l'activation de la voie PI3K/AKT en aval de certains récepteurs membranaires comme le récepteur à l'insuline¹⁵¹. Parmi les mécanismes permettant cette régulation il a été identifié des facteurs limitant le recrutement membranaire d'AKT, une déphosphorylation sélective de la Th³⁰⁸ et de la Ser⁴⁷³ et finalement, une modulation de leur stabilité protéique.

Le recrutement d'AKT aux membranes cellulaires constitue une étape cruciale de son activation qui est soumise à une inhibition permanente par la protéine PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*)¹⁵². PTEN est une phosphatase dont la principale cible est le PIP3. En hydrolysant spécifiquement la liaison 3-phosphate du PIP3, PTEN catalyse la conversion du phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate en phosphatidylinositol 4, 5-diphosphate. La diminution de la concentration membranaire de PIP3 induite par PTEN s'oppose au recrutement des protéines à domaine d'homologie à la pleckstrine comme AKT et PDK1.

Le recrutement d'AKT à la membrane peut aussi être inhibé par la protéine PHLDA3 (*pleckstrin homology-like domain, family A, member 3*) qui entre en compétition avec AKT pour sa fixation aux phosphoinositides triphosphatés¹⁵³. Il est intéressant de constater que PHLDA3 est une cible transcriptionnelle de l'anti-oncogène p53. La répression de p53 induite

par l'activation de MDM2 par AKT est ainsi susceptible d'établir une boucle d'amplification de l'activation d'AKT.

Après son activation, AKT est susceptible d'être directement déphosphorylée par les protéines phosphatases PP2A (*protein phosphatase 2*) et les phosphatases de la famille PHLPP (*Pleckstrin homology domain and leucine rich repeat protein phosphatase*). PP2A déphosphoryle préférentiellement la Th³⁰⁸ alors que les PHLPP ne ciblent que la Ser⁴⁷³¹⁵⁴. Récemment, il a pu être montré que l'expression des PHLPP était régulée positivement par mTORC1 de façon S6K dépendante¹⁵⁵. Ces résultats suggèrent l'existence d'une nouvelle boucle de rétrocontrôle de l'activité d'AKT susceptible d'être inhibée par la rapamycine.

La dégradation d'AKT est également susceptible d'être modulée. En effet, AKT peut être adressé au protéasome pour dégradation. Ainsi, TTC3 (*tetratricopeptide repeat domain 3*) a été récemment identifié comme étant une ubiquitine ligase liant spécifiquement AKT¹⁵⁶. A côté de cette dégradation par la voie protéasomale, plusieurs observations ont montré qu'AKT pouvait être clivé et inactivé par certaines caspases *in vitro*. L'existence d'un tel clivage *in vivo* et son rôle physiologique ne sont pas établis. La stabilité d'AKT peut également être modulée par son association à PIN1 (*peptidyl-prolyl cis/trans isomerase 1*)¹⁵⁷.

Isoformes d'AKT

Il existe, chez les mammifères, trois gènes codant les protéines AKT : *Akt1*, *Akt2* et *Akt3*¹⁵⁸. Ces isoformes présentent plus de 80% d'homologie de séquence mais diffèrent par leur expression tissulaire et par la nature de certains de leurs substrats (**Figure 7**). De plus, des expériences menées sur des cellules en culture ont permis de mettre en évidence des fonctions spécifiques et parfois opposées des isoformes d'AKT (**Table 1**).

Isoformes	Homologie des différents domaines			
	Domaine d'homologie à la plekstrine	Domaine « linker »	Domaine catalytique	Domaine C-terminal régulateur
AKT1/AKT2	80%	46%	90%	66%
AKT2/AKT3	76%	17%	87%	70%
AKT1/AKT3	84%	40%	88%	76%

Figure 7: Isoformes des protéines AKT. Figure récapitulant les pourcentages d'homologie de séquence, entre isoformes, des différents domaines des protéines AKT. D'après¹²⁷.

AKT1 et AKT2 sont d'expression ubiquitaire. AKT2 est cependant significativement enrichi dans les tissus sensibles à l'insuline¹³⁰. Contrairement à AKT1 et 2, AKT3 n'est pas ubiquitaire et apparaît particulièrement abondant dans le cerveau et les testicules¹⁵⁹. À ces distributions distinctes correspondent des rôles physiologiques différents qui ont été bien illustrés par les résultats de l'inactivation d'AKT1, 2 et 3 chez la souris.

Le rôle crucial joué par AKT2 dans l'homéostasie glucidique chez la souris a été confirmé chez l'homme par la mise en évidence d'une famille présentant un diabète familial de type MODY (*mature onset diabetes of the young*) sévère et précoce co-ségrégeant avec une mutation d'AKT2 à effet « dominant négatif »¹⁶⁰.

Les différences fonctionnelles entre AKT1, 2 et 3 ne sont cependant pas la seule conséquence des variations de leur profil d'expression. En effet, l'inactivation d'AKT1 ou d'AKT2 dans des populations homogènes de cellules en culture entraîne des conséquences différentes sur la prolifération cellulaire¹⁶¹, la migration cellulaire^{147,158} ou de régulation du trafic intracellulaire¹⁶². La fonction de chaque isoforme n'est cependant pas stéréotypée et peut varier avec les types cellulaires considérés. Ainsi, la délétion d'*Akt2* augmente le pouvoir migratoire des fibroblastes embryonnaires alors qu'elle diminue la migration cellulaire dans plusieurs lignées cancéreuses^{147,148,158}. Par ailleurs, il est actuellement bien établi que le recrutement membranaire des transporteurs de glucose GLUT4 en réponse à l'insuline est dépendante d'AKT2 mais pas d'AKT1¹⁶².

Les déterminants moléculaires expliquant les différences entre les isoformes d'AKT sont mal compris. Une étude récente a suggéré que les effets d'AKT2 sur le trafic de GLUT4 étaient

liés à des différences de localisation subcellulaire et, en particulier, à un recrutement préférentiel d'AKT2 au niveau des membranes cellulaires¹⁶³.

Tableau 1 : Conséquences phénotypiques de l'inactivation des isoformes d'Akt chez la souris

Génotype	Phénotype	Référence
<i>Akt1</i> ^{-/-}	• Retard de croissance embryonnaire et post-natal • Diminution de la prolifération des fibroblastes embryonnaires	141,148
<i>Akt2</i> ^{-/-}	• Résistance à l'insuline compensée par une hyperplasie des îlots β pancréatiques • Lipoatrophie progressive • Dyslipidémie	130,164
<i>Akt3</i> ^{-/-}	• Réduction de la taille du cerveau	131,159
<i>Akt1</i> ^{-/-} <i>Akt2</i> ^{-/-}	• Taille réduite de 50% • Défaut de développement de la peau et des os • Atrophie sévère des muscles squelettiques • Lipoatrophie • Létalité néonatale probablement par hypoxie sur atrophie des muscles respiratoires	165
<i>Akt1</i> ^{-/-} <i>Akt3</i> ^{-/-}	• Létalité embryonnaire à E10.5	166
<i>Akt2</i> ^{-/-} <i>Akt3</i> ^{-/-}	• Addition des phénotypes des souris simples mutantes	167

DEUXIEME PARTIE: LE REIN ET LES MALADIES RENALES CHRONIQUES

Fonctions et structure du rein normal

Grandes fonctions rénales

Le rein est un organe rétro-péritonéal assurant plusieurs fonctions vitales. Cet organe assure à la fois le maintien de la composition hydro-électrolytique du milieu intérieur et l'élimination des produits terminaux du catabolisme, notamment du catabolisme azoté. Le rein produit également plusieurs hormones jouant un rôle important dans le maintien de la pression artérielle (rénine), de l'érythropoïèse (érythropoïétine) et du métabolisme minéral (calcitriol).

Structure du rein

Le rein est composé d'unités fonctionnelles, les néphrons, auxquels s'associent des vaisseaux organisés en un réseau aussi complexe qu'original et un tissu interstitiel conjonctif peu abondant, tout au moins en condition physiologique (**Figure 8**). Anatomiquement, on distingue le cortex rénal qui constitue la partie externe du parenchyme et la médulla qui joue un rôle crucial dans les phénomènes de concentration des urines.

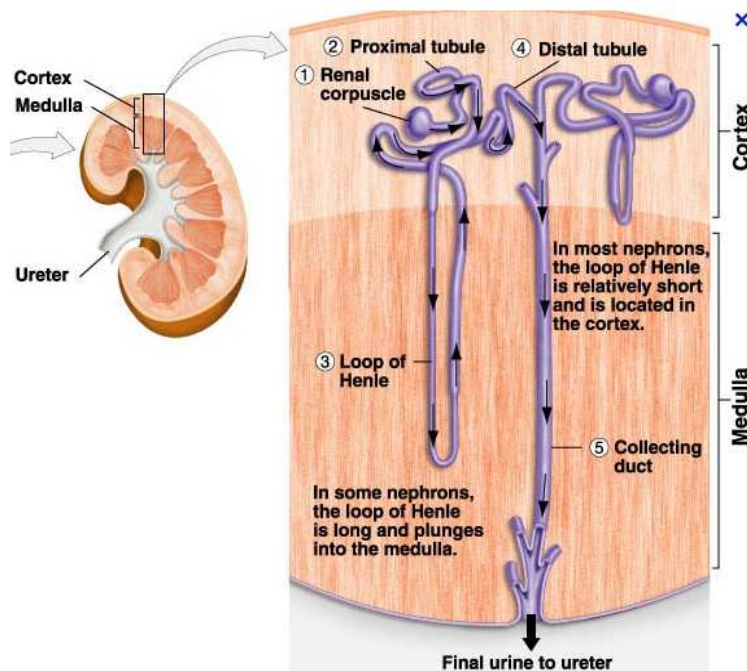


Figure 8 : Le néphron. Au glomérule fait suite le tube proximal, lui-même subdivisé en un segment contourné proximal auquel fait suite un segment droit qui pénètre dans la médulla externe. À la jonction entre la médulla externe superficielle et la médulla externe profonde, le tubule proximal se jette dans la branche descendante fine de l'anse de Henle. A cette branche descendante succède la branche ascendante d'abord fine, puis épaisse qui pénètre le cortex. À proximité du glomérule, la branche ascendante large donne naissance au tube contourné distal qui se jette dans le système collecteur par l'intermédiaire du tubule connecteur. Il existe des néphrons courts dont l'anse de Henle est de taille réduite et des néphrons longs qui se caractérisent par une anse de Henle pénétrant profondément dans la médulla.

Les néphrons sont formés de deux structures aux fonctions radicalement différentes. Le glomérule assure, par ultrafiltration du plasma, la formation de l'urine primitive alors que le tubule modifie, au travers de phénomènes de réabsorption et de sécrétion, l'urine primitive pour former l'urine définitive qui sera excrétée.

Le glomérule

Les glomérules sont situés dans le cortex du rein. L'urine primitive y est formée par ultrafiltration du sang au travers d'une barrière composée de trois couches successives : les cellules endothéliales du capillaire glomérulaire, la membrane basale glomérulaire et des cellules épithéliales spécialisées situées de l'autre côté de la membrane basale glomérulaire (MBG) que sont les podocytes (**Figure 9**).

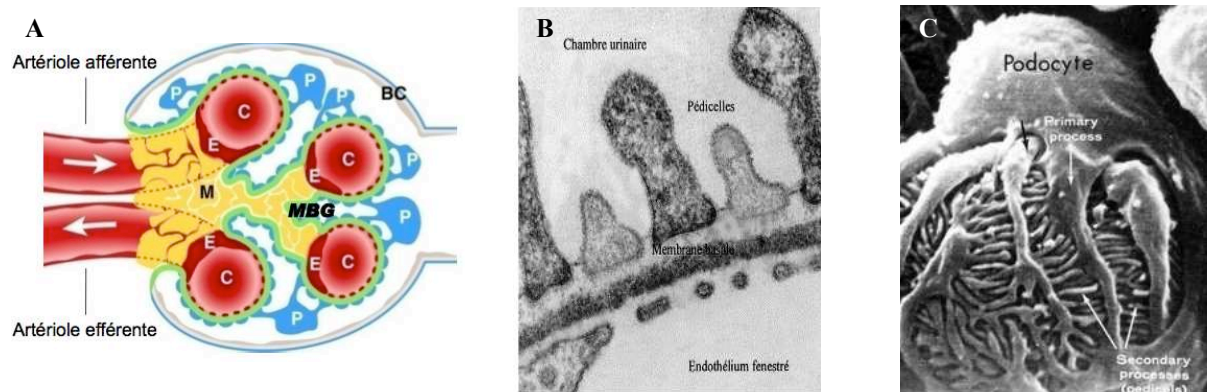


Figure 9: Le glomérule. (A) Représentation schématisée d'un glomérule mature modifiée d'après¹⁶⁸. Le glomérule est composé de différents types cellulaires incluant les cellules de la capsule de Bowman (BC) ou cellules épithéliales pariétales, les podocytes (P), les cellules endothéliales fenestrées (E), les cellules mésangiales (M). Les capillaires glomérulaires et le mésangium sont séparés des podocytes par la membrane basale glomérulaire (vert). Plusieurs anses capillaires coexistent dans le glomérule (C) soutenues par les cellules mésangiales. Le sang apporté au glomérule par l'artériole afférente, traverse les anses capillaires et repart par l'artériole efférente. Les cellules du mésangium extra-glomérulaire sont situées entre ces deux artérioles. (B) La barrière de filtration glomérulaire vue en microscopie électronique. La barrière de filtration glomérulaire est composée de 3 couches: l'endothélium (E), la membrane basale glomérulaire (MBG) et les pieds des podocytes (P) qui sont séparés l'un de l'autre par la fente de filtration. (C) Podocyte vu en microscopie électronique, composé d'un corps, d'expansions principales et des pieds.

Les podocytes

Les podocytes sont des cellules hautement spécialisées, ayant une organisation cellulaire et une cytoarchitecture complexes divisées en trois segments différents au plan structural et

fonctionnel : le corps cellulaire, les expansions principales et les pieds des podocytes. Les pieds des podocytes ont une organisation et un agencement en réseau entrelacé caractéristique, connectés entre eux par le diaphragme de fente et formant la barrière de filtration glomérulaire¹⁶⁹. Le diaphragme de fente est une structure protéique complexe similaire à une jonction adhérente permettant de relier entre eux les pieds de différents podocytes formant ainsi la chaîne terminal empêchant la filtration de protéines. Cette jonction adhérente forme une sorte de fermeture éclair poreuse uniquement aux protéines de poids moléculaire inférieur à celui de l'albumine. Les protéines qui constituent le diaphragme de fente (i.e. la néphrine, NEF1 (*nephrin related factor1*), FAT1...) ne sont pas toutes identifiées et sont connectées, grâce à d'autres protéines adaptatrices telle que NCK, au cytosquelette d'actine. Le cytosquelette d'actine au sein des pieds des podocytes est constitué par un réseau dense de filaments organisé en faisceaux parallèle. Ce réseau d'actine constitue une structure dynamique dont les propriétés rappellent celles de péricytes. La plupart des protéines constituant le diaphragme de fente ont été identifiées chez l'homme à cause de maladie génétique. Pour l'essentiel ces mutations résultent en une perte de fonction mais dans certains cas au contraire il peut s'agir de mutation gain de fonction (i.e. TRPC6). Le remaniement du cytosquelette d'actine conduit à l'effacement des pieds des podocytes avec perte du diaphragme de fente et le développement d'une protéinurie. Cette anomalie est la marque principale d'une souffrance podocytaire.

Les capillaires glomérulaires

Le réseau capillaire glomérulaire s'intercale entre deux artérioles, l'afférente qui irrigue le capillaire glomérulaire et l'efférente qui reçoit le sang sortant du capillaire. Ces deux artérioles émergent du glomérule à son pôle vasculaire. L'endothélium glomérulaire est de type fenêtré. Des pores endothéliaux d'un diamètre de 60 à 100 nm, permettent aux éléments sanguins de venir en contact direct avec la membrane basale glomérulaire sous-jacente.

La membrane basale glomérulaire

La MBG a une épaisseur deux fois supérieure à celle des membranes basales des autres tissus. Celle-ci varie en effet, chez l'adulte, de 310 à 350 nm. Elle est composée de trois couches visibles en microscopie électronique : une zone centrale épaisse, dense aux électrons, appelée *lamina densa* avec de part et d'autre une zone mince plus claire, la *lamina rara interna* (du côté de l'endothélium) ou *externa* (en contact avec les podocytes). L'épaisseur

importante de la MBG provient de la fusion, lors du développement du glomérule, des membranes basales des cellules endothéliales et des podocytes. La MBG mature est caractérisée par la présence d'isoformes spécifiques de protéines des membranes basales, critiques pour le maintien de sa structure et de sa fonction : la laminine 11 ($\alpha 5\beta 2\gamma 1$), les chaînes $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\alpha 5$ du collagène de type IV, le nidogène et l'agrine¹⁷⁰.

En dedans de la membrane basale et des capillaires glomérulaires se trouve le mésangium qui constitue le tissu de soutien des anses capillaires. Le mésangium est constitué d'un compartiment cellulaire (les cellules mésangiales) et de matrice extracellulaire. Les cellules mésangiales sont apparentées aux péricytes vasculaires¹⁷¹. En effet, ces cellules s'enroulent autour des capillaires glomérulaires et ont des propriétés contractiles. Du fait de l'absence de membrane basale entre les cellules endothéliales et les cellules mésangiales, celles-ci sont directement soumises à la pression hydrostatique du capillaire et sont capables, en se contractant ou se relâchant, de moduler la pression glomérulaire ainsi que la surface d'ultrafiltration. La matrice mésangiale, sécrétée par les cellules mésangiales, diffère par sa composition de la MBG puisqu'on y retrouve les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène de type IV auxquelles s'associent du collagène de type V, des laminines, de la fibronectine, des protéoglycanes, de l'entactine et du nidogène.

Les cellules pariétales

En dehors des podocytes et séparé d'eux par la chambre urinaire, se trouve la capsule de Bowman composée d'un épithélium pariétal assis sur une basale épaisse. On retrouve, au sein de l'épithélium pariétal, des cellules ressemblant à des podocytes tant au plan ultrastructural qu'au niveau des marqueurs de différenciation qu'elles expriment¹⁷². Ces cellules, appelées podocytes pariétaux, sont plus fréquemment retrouvées à proximité du pôle vasculaire au niveau de la transition entre épithélium viscéral et pariétal. Les fonctions des cellules épithéliales pariétales sont mal connues. Ces cellules forment une barrière empêchant la sortie de composant de l'urine primitive au travers de la capsule de Bowman¹⁷³. De plus, il semble exister, au sein de ces cellules, certaines populations capables de se différencier en podocytes et/ou en cellules tubulaires proximales¹⁷⁴. Néanmoins, la signification physiologique ou physiopathologique de ces observations récentes reste à déterminer.

L'intégrité des structures glomérulaires permet une filtration efficace du plasma. En condition physiologique, le débit de filtration glomérulaire est de 120 mL/min. Ainsi, environ 180 litres de plasma sont filtrés chaque jour. La structure de la barrière de filtration glomérulaire limite

considérablement le passage de protéines de haut poids moléculaire dans la chambre urinaire. Ainsi, la quantité d'albumine présente dans l'ultrafiltrat est estimée à seulement 30 mg/L soit environ 1000 fois moins que sa concentration plasmatique¹⁷⁵. L'urine primitive ainsi formée est transportée vers le système tubulaire où elle va subir des modifications importantes aboutissant à la constitution de l'urine définitive.

Le tubule rénal

Le tubule rénal est une structure épithéliale complexe comportant plusieurs segments spécifiques qui se font suite. Chaque segment est composé d'un ou de plusieurs types cellulaires présentant des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles spécifiques.

Le tube proximal

Le tubule proximal fait immédiatement suite au glomérule et représente quantitativement le site majeur de réabsorption des constituants de l'urine primitive devant être conservés par l'organisme. Ainsi, la totalité du glucose, la quasi-totalité des protéines et des acides aminés ainsi que la majeure partie du sodium et de l'eau sont réabsorbées dans ce segment. Cette activité de transport intense est soutenue au plan structural par une bordure en brosse au pôle apical qui augmente la surface de contact entre les cellules proximales et l'urine primitive.

Anse de Henle

Au tube proximal, fait suite une structure en épingle à cheveux appelée anse de Henle (du nom de l'anatomiste allemand Friedrich Gustav Jakob Henle, qui fut le premier à la décrire). Cette structure est responsable de la constitution du gradient osmotique cortico-papillaire qui est nécessaire à la formation d'urines concentrées.

Tube contourné distal

L'anse de Henle se poursuit par le tube contourné distal suivi du tube connecteur, du tubule collecteur et du canal collecteur. Si ces segments réabsorbent quantitativement peu d'électrolytes, la réabsorption du sodium, du potassium et de l'eau ainsi que l'excrétion de protons ou de bicarbonates y est très finement régulée. Ces segments tubulaires jouent ainsi un rôle central dans le maintien d'un bilan hydro-électrolytique équilibré.

Les maladies rénales chroniques

Généralités

Les maladies rénales chroniques (MRC) correspondent à un ensemble de pathologies responsables d'altérations structurales chroniques du rein et susceptibles d'en compromettre la fonction. Ces affections sont en général caractérisées par une réduction progressive du nombre de néphrons fonctionnels entraînant une dégradation de la fonction rénale. Au stade d'insuffisance rénale terminale (IRT), la fonction rénale résiduelle devient incompatible avec la survie du patient et un traitement de suppléance doit être initié pour maintenir ce dernier en vie.

Les causes de MRC sont très variées. Ainsi, le rein peut être affecté par des maladies génétiques comme la polykystose rénale autosomique dominante, par des maladies chroniques comme l'hypertension artérielle ou le diabète sucré, ou par des maladies inflammatoires comme les glomérulonéphrites primitives dont la plus fréquente est la néphropathie à dépôts mésangiaux d'immunoglobulines A. Certaines infections rénales, certains toxiques ou, plus trivialement, une résection chirurgicale peuvent également retentir durablement sur la fonction rénale.

Bien que les causes des MRC soient très variées, le diabète et l'hypertension artérielle sont chacun à l'origine de 20% des cas d'IRC terminale en France. Les glomérulonéphrites primitives et la polykystose rénale représentent 16% et 8% des cas respectivement¹⁷⁶.

Épidémiologie

La MRC est devenue un enjeu de santé publique majeur au cours des dernières années. L'augmentation de l'incidence et de la prévalence de la MRC et de son stade ultime, l'IRC terminale, a été constatée à l'échelle mondiale¹⁷⁷. En France, l'incidence et la prévalence de l'IRT étaient respectivement estimées à 150 et 1098 cas par million d'habitants en 2009¹⁷⁶. La progression annuelle de l'incidence est estimée à 1,5% et celle de la prévalence à 4%. Cette augmentation est un phénomène mondial affectant les pays développés comme les pays en voie de développement¹⁷⁷. Le coût économique associé à la dialyse ou à la transplantation rénale étant considérable, le poids de la prise en charge de l'IRT dans les dépenses de santé, déjà important (5% du budget sanitaire au Japon et 6% aux Etats-Unis) est appelé à augmenter. À ce fardeau économique s'ajoute un coût humain important, puisque l'IRC terminale est associée à une mortalité et une morbidité importantes auxquelles il faut ajouter

les contraintes existentielles qu'impose une prise en charge en dialyse ou, à un moindre degré, une transplantation rénale.

S'il est établi que seule une minorité des patients présentant une MRC évolue vers l'IRC terminale¹⁷⁸, la réduction du débit de filtration glomérulaire (DFG) en dessous de 60 mL/min/1,73m², est associée à une augmentation de la morbi-mortalité cardiovasculaire^{179,180}. Ces données récentes conduisent à repenser le rôle des stratégies thérapeutiques visant à freiner le déclin de la fonction rénale.

Progression des MRC

Quelle qu'en soit leur cause, les néphropathies chroniques sont caractérisées par un déclin progressif de la fonction rénale aboutissant à l'IRC terminale. Cette détérioration progressive n'est pas observée chez tous les patients, mais devient inéluctable dès que la fonction rénale est suffisamment altérée¹⁸¹. À cette dégradation fonctionnelle correspondent des altérations structurales du parenchyme affectant tous les compartiments rénaux. Le développement de ces lésions précède et accompagne le déclin du DFG. Les altérations du parenchyme associent des modifications des glomérules (glomérulosclérose, hyalinose segmentaire et focale), de l'interstitium (fibrose interstitielle, infiltrat inflammatoire) et des tubules (atrophie tubulaire et dilatation tubulaire).

Notre connaissance des mécanismes de progression des MRC doit beaucoup aux modèles murins de réduction néphronique. En particulier, l'introduction des techniques de néphrectomie subtotalaire chirurgicale chez le rat dans les années 1930 a été à l'origine d'importantes observations physiopathologiques dans le domaine de la progression des maladies rénales. L'introduction dans les années 1970 des techniques de microponction glomérulaire et tubulaire chez une lignée de rat présentant des glomérules très superficiels (rat Munich-Whistar) a rendu possible la mesure de la pression intraglomérulaire et du DFG des néphrons restants après néphrectomie subtotalaire¹⁸².

La néphrectomie subtotalaire chez le rat s'accompagne en effet d'une insuffisance rénale sévère rapidement suivie d'une augmentation de la pression hydraulique intracapillaire glomérulaire responsable d'une augmentation du DFG de chaque néphron restant¹⁸³. Ces altérations hémodynamiques s'accompagnent d'une augmentation du volume des néphrons restants, maximale vers le 14^{ème} jour suivant la réduction néphronique. Cette augmentation de volume des néphrons restant dépend de plusieurs mécanismes intriqués : prolifération et hypertrophie

cellulaires¹⁸⁴. Ensuite, apparaissent une protéinurie et une insuffisance rénale chronique qui s'aggravent progressivement conduisant à la mort de l'animal. Les lésions histologiques alors observées dans ce modèle sont très superposables à celles des MRC chez l'homme. Il fut ensuite mis en évidence que les interventions s'opposant à l'hyperfiltration glomérulaire initiale, au premier rang desquelles figure l'emploi d'inhibiteurs du système rénine-angiotensine, étaient associées à ralentissement de la progression des lésions rénales¹⁸⁵.

Ces observations jouèrent un rôle crucial dans l'élaboration d'une théorie générale de la progression des MRC : la théorie de la surcharge des néphrons restants¹⁸³. Selon cette théorie, les mécanismes adaptatifs mis en jeu après réduction néphronique vont avoir pour conséquence d'accroître les contraintes mécaniques et métaboliques imposées aux néphrons restants, favorisant ainsi leur dégradation progressive par des mécanismes cellulaires et moléculaires mal connus.

Altérations du compartiment glomérulaire

Le glomérule, de part sa position anatomique, subit directement l'augmentation des contraintes mécaniques et métaboliques liées à la réduction néphronique.

Ainsi, après réduction néphronique, un des premiers changements morphologiques observable est une augmentation du volume glomérulaire¹⁸⁶⁻¹⁸⁹. L'élargissement des glomérules progresse parallèlement à celui de l'hypertrophie de l'ensemble du rein et apparaît précocement puisqu'il est décelable dès le 2^{ème} Jour post néphrectomie subtotale¹⁹⁰. Cette augmentation de volume intéresse de la même manière tous les glomérules qu'il s'agisse des glomérules superficiels ou profonds juxta-médullaire. L'hypertrophie glomérulaire a été documentée grâce à la mesure de son volume en microscopie électronique mais également par l'augmentation des ratios ARN/ADN et protéines/ADN glomérulaire¹⁹⁰. Cette hypertrophie glomérulaire est la résultante d'une triple association combinant l'expansion de la matrice mésangiale, l'élévation de la pression intracapillaire et l'hypertrophie podocytaire.

L'hypertrophie glomérulaire est un mécanisme adaptatif à l'hyperfiltration qui peut malheureusement s'avérer délétère, avec la constitution progressive de lésions de hyalinose segmentaire et focale puis de glomérulosclérose. Ainsi, l'hypertrophie glomérulaire, observée sur des biopsies préimplantatoire chez certains donneurs de reins, est corrélée à une plus mauvaise fonction rénale à long terme chez les receveurs¹⁹¹. De même, il est fréquemment observé une hypertrophie glomérulaire sur les biopsies rénales d'Aborigènes Australiens,

population caractérisée par un petit poids de naissance, une réduction du nombre de néphron et une grande prévalence de MRC¹⁹²⁻¹⁹⁴. S'il est très probable que tous les compartiments cellulaires du glomérule participent à la constitution des lésions glomérulaires, de nombreux travaux expérimentaux ont amené à placer le podocyte au centre du processus lésionnel responsable de la progression des lésions glomérulaires au cours des néphropathies chroniques^{195,196}.

En effet, un premier faisceau d'arguments suggérant un rôle des podocytes dans la constitution des lésions glomérulaires au cours de la MRC nous est fourni par l'analyse des déficits génétiques de protéines podocytaires. Chez la souris comme chez l'homme, les altérations des gènes codant des protéines cruciales du podocyte sont responsables de lésions glomérulaires et tubulointerstitielles superposables à celles observées au cours de la progression des néphropathies chroniques¹⁹⁷.

De plus, une réduction du nombre de podocytes est attestée dans différentes MRC humaines ou expérimentales¹⁹⁸⁻²⁰¹. Il existe également une corrélation significative entre le niveau de raréfaction podocytaire et l'importance des lésions glomérulaires.

Récemment, le lien de causalité entre perte podocytaire et lésion glomérulaire a pu être démontré. En effet, *Wharram et coll.* ont produit des rats transgéniques exprimant spécifiquement le récepteur humain à la toxine diphtérique à la surface des podocytes. Cette construction, qui rend possible une déplétion podocytaire dépendante de la dose de toxine diphtérique injectée, a permis de montrer que la perte podocytaire induisait des lésions glomérulaires dont la sévérité s'aggravait avec la réduction du nombre de podocytes²⁰². Il apparaît ainsi qu'une perte podocytaire de l'ordre de 20% est associée à une protéinurie modérée et des remaniements histologiques mêlant de l'expansion mésangiale et de discrètes synéchies capsulaires. Dans cette situation, la fonction rénale est conservée. Une hypothèse pour expliquer cette protéinurie transitoire est, comme nous le verrons plus loin, la capacité des podocytes survivant à couvrir rapidement la membrane basale mise à nue par la perte de podocytes voisins secondaire à l'injection de la toxine diphtérique. Ceci permettrait d'éviter la fuite protéique mais aussi la constitution de lésion de synéchies. Une déplétion podocytaire de l'ordre de 21 à 40% induit une protéinurie modérée mais persistante, associée à une expansion mésangiale, la formation de synéchies et de lésions de hyalinose segmentaire et focale. La capacité de compensation des podocytes survivants serait dépassée expliquant la formation de lésions. Avec plus de 40% de la population podocytaire décimée, on constate l'apparition

d'une protéinurie abondant, des lésions de glomérulosclérose et une détérioration de la fonction rénale. Les résultats de cette étude sont superposables à ceux obtenus avec des doses croissantes d'adriamycine chez le rat¹⁹⁹ ou en corrélant perte podocytaire et débit de protéinurie chez des patients diabétiques²⁰³.

Plusieurs mécanismes sont susceptibles de rendre compte de la diminution du nombre de podocytes au cours de la progression des néphropathies chroniques. L'apoptose podocytaire²⁰⁴, la dédifférenciation podocytaire ou enfin le détachement des podocytes et leur élimination dans l'urine²⁰⁵ participent probablement, à des degrés divers, à la raréfaction des podocytes.

La perte podocytaire est très probablement exacerbée par les faibles possibilités d'expansion de cette population cellulaire. En effet, contrairement aux autres cellules glomérulaires, les podocytes ont, en dehors de certaines situations pathologiques particulières²⁰⁶, un faible potentiel prolifératif^{207,208}. Cette particularité, que les podocytes partagent avec d'autres cellules très spécialisées comme les neurones, est en partie liée à une forte expression d'inhibiteurs de l'entrée en cycle (p21, p27 et p57)²⁰⁹.

S'il est généralement admis que les capacités d'auto-renouvellement des podocytes sont très réduites, la possibilité d'une repopulation de ce « pool » par des cellules initialement non podocytaires est actuellement débattue. En effet, certaines observations expérimentales ont suggéré que les cellules hématopoïétiques^{210,211} ou certaines cellules de la capsule de Bowman¹⁷⁴ pouvaient se différencier en podocytes. L'existence réelle de ces phénomènes ainsi que leur contribution à la constitution des lésions glomérulaires restent encore incertaines²¹².

Ainsi il reste communément admis que dans le contexte d'hypertrophie glomérulaire secondaire à la réduction néphronique, la raréfaction podocytaire entraîne un déséquilibre entre une densité podocytaire plus faible et une augmentation de la surface endothéliale glomérulaire à couvrir. Ce déséquilibre est directement proportionnel à l'apparition de lésions de hyalinose segmentaire et focale. Ces lésions sont associées à un détachement des pieds des podocytes de la MBG^{196,198}.

Altérations du compartiment tubulointerstitielle

La réduction néphronique résulte donc en une hypertrophie glomérulaire adaptative avec le risque de développement progressif de lésions glomérulosclérose mais aussi d'altération du compartiment tubulointerstitielle.

Brièvement, les mécanismes de développement de la fibrose sont complexes et constituent un facteur de l'auto-aggravation des lésions rénales. La fibrose est la conséquence d'une augmentation quantitative de la matrice extracellulaire rénale mais aussi de modifications qualitatives de celle-ci²¹³. Si la plupart des études ont montré qu'au cours des néphropathies chroniques, les principales cellules productrices de la matrice extracellulaire étaient les fibroblastes interstitiels^{214,215}. L'origine des fibroblastes responsables de la fibrose interstitielle est très débattue et pourrait provenir de cellules tubulaires²¹⁶, de cellules endothéliales²¹⁷ ou comme cela a été évoqué plus récemment, de péricytes²¹⁸. La réalité de la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules rénales fait l'objet actuellement d'un vif débat²¹⁹.

L'adaptation des cellules tubulaires à la réduction néphronique est initialement marquée par une augmentation de la masse des cellules tubulaires. Le déclin de la fonction rénale ultérieure s'associe quant à lui à une raréfaction, une atrophie et une dédifférenciation des cellules tubulaires à laquelle s'ajoute une augmentation de leur prolifération^{184,220,221}. Des résultats obtenus récemment par l'équipe de *J.V. Bonventre* semblent lier plus directement prolifération des cellules tubulaires et fibrose rénale²²². Ce groupe a montré que, dans différents modèles de néphropathies chroniques, les cellules tubulaires bloquées en phase de transition G2/M du cycle cellulaire était responsable de la sécrétion de molécules favorisant la progression de la fibrose rénale. Ce blocage est dépendant de la voie ATM/ATR (*ataxia telangiectasia mutated*). Le rôle de la prolifération, de la mort et de la desquamation des cellules tubulaires au cours de la progression des MRC n'est que très partiellement compris.

Comme nous l'avons vu, au cours de la réduction néphronique vont se développer des lésions de hyalinose segmentaire et focale associées à une protéinurie. De nombreuses études ont démontré, chez l'homme, une forte association entre le débit de la protéinurie et le risque de progression des maladies rénales²²³. De plus, le contrôle de la pression artérielle et le blocage du système rénine-angiotensine-aldostérone réduisent le débit de protéinurie et ralentissent la progression des néphropathies chroniques²²⁴. L'exposition des cellules tubulaires proximales en culture à de fortes concentrations de protéines plasmatiques, incluant l'albumine, les protéines du système du complément, les immunoglobulines ou la transferrine, est associée à

la sécrétion de molécules pro-fibrosantes et pro-inflammatoires mais aussi à la prolifération ou l'apoptose²²⁵. Si l'albumine représente la protéine plasmatique dont les actions délétères sur le tubule ont été les plus étudiées, certaines observations expérimentales originales conduisent à reconsidérer son rôle dans la progression des lésions rénales. En effet, il a été observé dans les années 1990 que des rats spontanément analbuminémiques soumis à différents modèles de néphropathies chroniques développaient des lésions au moins aussi marquée que les rats normo-albuminémiques, en dépit d'une réduction importante de la protéinurie et d'une albuminurie nulle^{226,227}. Ces rats présentent cependant une hypertriglycémie ainsi qu'une augmentation des globulines circulantes qui pourraient jouer un rôle délétère dans la progression des lésions rénales. Plus récemment, il a pu être montré que l'inhibition de l'endocytose protéique par les cellules tubulaires proximales ne modifiait pas la progression des lésions tubulo-interstitielles dans un modèle de néphropathie protéinurique²²⁸. Enfin, il faut signaler que la grande majorité des études ayant suggéré que la protéinurie pouvait jouer un rôle délétère dans la progression des lésions rénales chroniques était basée sur l'effet spectaculaire des bloqueurs du système rénine-angiotensine sur la diminution du débit de protéinurie et la progression des lésions rénales. Cependant, chez le rongeur, le blocage du système rénine-angiotensine a un effet protecteur sur le parenchyme rénal dans des modèles de néphropathies non protéinuriques^{229,230}, si bien que la protéinurie ne pourrait être ici qu'un facteur confondant. Ainsi, si l'albuminurie et la protéinurie sont des biomarqueurs cliniques extrêmement précieux, le lien causal entre protéinurie et progression des maladies rénales n'est pas indiscutablement établi à ce jour.

TROISIEME PARTIE: SYNDROME DES ANTIPHOSPHOLIPIDES ET MALADIE RENALE CHRONIQUE

Généralités

Définitions

Le syndrome des antiphospholipides (SAPL), ou syndrome de Hughes, est défini par l'association d'évènements cliniques (thromboses artérielles/veineuses et/ou d'avortement spontanés à répétitions) à la présence d'anticorps antiphospholipides²³¹. La définition du SAPL apparût en 1992²³² mais fût officiellement reconnue en 1998 au cours de la 8^{ème} conférence sur les anticorps antiphospholipides à Sapporo (Japon)²³³. Il peut être « primaire », c'est à dire isolé, ou « secondaire » c'est à dire associé à une autre maladie auto-immune. Les anticorps antiphospholipides sont des auto-anticorps dirigés contre des phospholipides, des protéines se liant aux phospholipides ou bien les deux. Les phospholipides, constituants normaux des membranes biologiques, forment une famille de molécules possédant en commun un squelette glycérophosphate, deux chaînes d'acides gras et une tête de nature variable. Il existe 3 grand types d'anticorps antiphospholipides : anticoagulants circulants de type lupique, les anticorps anti- β 2-glycoprotéine-1 (anti- β 2-GPI) et les anticorps anti-cardiolipines.

Signification et dépistage des anticorps antiphospholipides

Anticoagulant circulant

Les anticoagulants circulants sont caractérisés par leur action anticoagulante *in vitro*, c'est-à-dire leur capacité à allonger le temps des tests de coagulation en laboratoire et en particulier ceux dépendant de la présence de phospholipides. Bien qu'ils soient anticoagulant *in vitro*, ils favorisent la thrombose *in vivo*. L'anticoagulant circulant fût décrit pour la première fois en 1952 chez deux patients atteints de lupus érythémateux disséminé avec un allongement spontané du temps de coagulation²³⁴. Cet allongement du temps de coagulation n'était pas corrigeable par l'adjonction de plasma de patients sains suggérant ainsi, non pas un déficit en facteur de coagulation, mais la présence d'un inhibiteur circulant. Malgré cette découverte ancienne, peu de propriétés des anticoagulants circulants sont connues. L'anticoagulant circulant correspondrait à une immunoglobuline de type IgG ou IgM, et n'est détectable que

dans les tests dépendants des phospholipides. L'hypothèse actuelle reposant sur une compétition *in vitro* de l'anticoagulant circulant avec les facteurs de coagulation vitamine K dépendant sur les sites chargés négativement des phospholipides modifiant ainsi la réaction. Les tests actuels pour mettre en évidence l'anticoagulant circulant sont uniquement qualitatif et ne permettent pas d'identifier l'antigène cible. Il est important de noter, et nous reviendrons dessus par la suite, que cet anticorps improprement appelé, anticoagulant circulant, possède dans la plupart des cas une activité dépendante de la protéine $\beta 2$ -GPI²³⁵.

La présence d'un anticoagulant circulant représente l'indice le plus important du risque thrombotique²³⁶. Ainsi, la détection d'un anticoagulant circulant chez une femme de moins de 50 ans multiplie par 40 le risque d'accident vasculaire cérébral et par 5 le risque d'infarctus du myocarde. Egalement, la présence d'un anticoagulant circulant chez la femme enceinte est fortement associée au risque de fausse couche avant la 24^{ème} semaine de gestation²³⁶.

Anticorps anti- $\beta 2$ -GPI

L'existence d'anticorps anti- $\beta 2$ -GPI fût décrite pour la première fois en 1990 par 3 groupes différents²³⁷⁻²³⁹. La $\beta 2$ -GPI (ou APOLIPROTEINE H) est une apolipoprotéine présente dans le plasma de sujets normaux dont le rôle principal est d'inhiber la coagulation en empêchant l'hémostase primaire (inhibe le relargage plaquettaire de sérotonine) et l'hémostase secondaire via son action sur la voie intrinsèque de la coagulation. La $\beta 2$ -GPI est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 326 acides aminés organisée en cinq structures répétitives, numérotées de I à V du N- au C-terminal, d'environ 60 acides aminés chacune, le domaine V étant le plus long. C'est sur ce cinquième domaine que se situe le site principal de liaison aux phospholipides anioniques. Seul les anticorps dirigés contre le domaine I de la $\beta 2$ -GPI semble être corrélés avec le risque thrombotique et d'avortement spontané^{240,241}. Ainsi, l'injection systémique, dans un modèle murin de SAPL, du domaine I de la $\beta 2$ -GPI suffit à réduire l'activité de la maladie²⁴². Il a également été montré que les anti- $\beta 2$ -GPI dirigés contre le domaine I pouvaient exercer une activité de type anticoagulant circulant²⁴³. Il est important de noter qu'au sein même du domaine I de la $\beta 2$ -GPI il semble exister différents épitopes, et qu'il existe des polymorphismes de $\beta 2$ -GPI, dont un (VAL247LEU) est particulièrement retrouvé chez les patients porteurs de SAPL. Ce polymorphisme est responsable de modifications de la structure tertiaire de la protéine^{244,245}.

Par contre les anticorps dirigés contre les autres domaines semblent moins associés au risque thrombotique, tel que ceux dirigés contre le domaine V de la β 2-GPI, fréquemment retrouvés chez les patients atteints de lèpre, ou bien encore les anticorps dirigés contre le domaine IV de la β 2-GPI observés chez les jeunes enfants^{246,247}.

La présence isolée d'anti- β 2-GPI dans différentes études ne semble pas augmenter de manière très significative le risque thrombotique ou de perte fœtale mais les résultats sont contradictoires²³⁶. Ces variabilités sont à mettre sur le compte de l'absence de standardisation des tests ELISA de dépistage de ces auto-anticorps. L'arrivée prochaine de test ELISA comportant spécifiquement le domaine I de la β 2-GPI permettra certainement d'améliorer la spécificité de détection des anticorps.

Anticorps anti-cardiolipines

Les cardiolipines (ou cardiolipides) sont phospholipides anioniques présent dans la membrane interne des mitochondries. Ces phospholipides doivent leur nom à leur découverte initiale dans les mitochondries des cellules cardiaques de bovins en 1942. Les cardiolipines constituent l'antigène principal du test sérologique de la syphilis de *Wasserman* expliquant ainsi la fausse positivité du test chez les patients ayant des anticorps anti-cardiolipines²⁴⁸. Ils furent corrélés avec la survenue de thrombose au cours du lupus érythémateux disséminé en 1983²⁴⁹. En réalité les anticorps anti-cardiolipines ne sont pas dirigés directement contre les cardiolipines mais contre un complexe formé par les cardiolipines avec un cofacteur, dont le principal est la β 2-GPI. Ainsi on distingue maintenant schématiquement les anticorps anti-cardiolipines dépendant ou non de la β 2-GPI. Les anticorps anti-cardiolipines non dépendant de la β 2-GPI sont souvent observés de manière transitoire (par exemple au cours de pathologies infectieuses) et faiblement associé à un risque de thrombose ; alors que les anticorps anti-cardiolipines dépendant de la β 2-GPI corrélerent avec le risque thrombotique.

Modèles expérimentaux

Des modèles expérimentaux ont été développés afin d'étudier de SAPL. On distingue schématiquement deux types de modèles de souris : un modèle de souris développant spontanément des anticorps de type SAPL, et un modèle de souris dit induits, où des anticorps de patients porteurs de SAPL sont purifiés et administrés à des souris.

Modèles spontanés

Deux lignées de souris ont été identifiées comme développant spontanément des anticorps antiphospholipides et des manifestations proche de celles de l'homme : les souris MRL/lpr et les souris NZBxNZW (F1)

Les souris MRL/lpr portent une mutation du gène *Fas* qui code pour la protéine FAS (ou CD95). Cette protéine est une protéine transmembranaire appartenant à la famille du récepteur du TNF. Une fois liée à son ligand, FAS recrute la procaspase 8 et induit l'apoptose cellulaire par la voie dite extrinsèque. Cette voie d'apoptose joue un rôle crucial dans le système immunitaire en induisant l'apoptose des lymphocytes T activés. La mutation chez les souris MRL/lpr est une mutation inactivatrice responsable d'un défaut d'apoptose et de l'accumulation de cellules lymphocytaire T auto-réactives. Ces souris développent dès l'âge de 2 mois une maladie semblable à celle d'un lupus érythémateux disséminé associé des titres élevés de IgG anticardiolipines mais sans anticorps anti-β2-GPI ou anticoagulant circulant. Ces anticorps anticardiolipines sont associés à une thrombopénie et des portées de faible nombre²⁵⁰. L'analyse histopathologique de ces souris montre une vasculopathie du système nerveux central avec occlusions vasculaires et infiltrat périvasculaire des plexus choroïdes^{250,251}.

Le deuxième modèle spontané correspond aux souris issues du croisement NZBxNZW (F1). Ces souris développent une maladie auto-immune très proche de celle du lupus érythémateux chez l'homme, mais pour lesquelles la ou les mutation(s) génétique(s) responsable(s) n'a (ont) pas été formellement identifiée(s). La physiopathologie en est très mal connue et repose sur une production excessive d'INFα (*interféron alpha*). En dehors des manifestations liées au lupus, ces souris présentent des symptômes évocateurs de SAPL avec la constitution d'évènements thrombotiques et des anticorps de type anticardiolipines ou encore anti-β2-GPI. Malheureusement, ces 2 modèles ont de grandes limites. En effet, ces souris présentent avant tout une maladie lupique, ensuite il existe une grande hétérogénéité de phénotype d'une souris à une autre, et enfin elles ne récapitulent pas toutes les manifestations liées au SAPL. Pour pallier à ces limites des modèles induits ont été développés.

Modèles induits

L'injection d'IgG purifiées de patients ayant un SAPL chez la souris Balb/c gestante induit un avortement en 48h avec histologiquement une nécrose, des dépôts d'IgG et de fibrine^{252,253}. Ce model est utilisé pour comprendre la physiopathologie des avortements spontanés chez les

patientes atteintes de SAPL. Il a ainsi pu être démontré que l'héparine jouait un rôle préventif au cours de l'avortement spontané en bloquant l'activité du complément plutôt que par son effet anticoagulant comme cela était supposé initialement²⁵³.

Si ce modèle permet d'étudier de manière reproductible l'avortement induit par les anticorps antiphospholipides, il n'est pas aisé pour étudier les thromboses.

En effet, l'injection d'anticorps antiphospholipides chez la souris, qu'il s'agisse d'IgG purifiées de patients ayant un SAPL, d'anticorps anti- β 2-GPI monoclonaux obtenu à partir d'hybridome de souris ou encore de sérum complet de patients, n'induit pas de thrombose spontanément²⁵⁴⁻²⁵⁷. Pour cela, un deuxième événement tel qu'une lésion traumatique de l'endothélium est nécessaire pour activer l'endothélium.

Physiopathologie des thromboses au cours du SAPL

Les thromboses peuvent survenir dans n'importe quel type de vaisseaux (artères, veines ou microcirculation) mais touchent avec prédilection le réseau veineux profond et les artères cérébrales. La physiopathologie de la thrombose au cours du SAPL reste mal connue (**Figure 10**). De plus en plus d'éléments convergent pour donner un rôle central à la β 2-GPI au cours de la physiopathologie du SAPL. En effet, comme nous l'avons vu les anticorps anticardiolipines pathologiques ou les anticoagulants circulants les plus associés aux thromboses sont ceux qui lient la β 2-GPI. L'hypothèse retenue actuellement repose sur une modification post-traductionnelle de la β 2-GPI aboutissant au développement du SAPL chez des patients prédisposés. La β 2-GPI circule sous forme réduite avec une forme cyclique dans le plasma de sujets sains. Chez les patients avec SAPL elle se trouve oxydée et perd sa structure cyclique pour adopter une conformation linéaire qui expose le fameux domaine I immunogène normalement non exposé. Chez des patients ayant une susceptibilité à l'auto-immunité cette exposition du domaine I induit une rupture de tolérance et la formation d'anticorps spécifiquement dirigés contre lui²⁵⁸. Le complexe anticorps- β 2-GPI interagit à la surface de l'endothélium, des plaquettes ou encore des monocytes, avec de nombreux récepteurs tels que TLR2 (*toll-like receptor-2*), TLR4, TLR8, Annexin A2, la glycoprotéine Ib α (GPIb α) ou ApoER2²⁵⁹. L'invalidation de certains de ces récepteurs tels que TLR4, Annexin A2 ou encore LRP8 chez la souris, réduit l'incidence des thromboses après injection d'anticorps antiphospholipides mais ne permet pas une prévention complète de celles-ci²⁵⁹. Ainsi, il apparaît comme probable que ces récepteurs agissent de manière synergique au cours

de la physiopathologie de la thrombose. L'interaction du complexe anticorps- β 2GPI à la surface des cellules endothéliales et des monocytes induit l'activation de nombreuses voies de signalisations dont les mieux caractérisées sont l'activation de NF κ B (*Nuclear factor κ B*) et de p38 MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinase*)²⁵⁹. Cette activation induit l'expression de molécules d'adhésions (cell adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, E-selectin), la sécrétion de cytokines et de Facteur Tissulaire (activateur de la coagulation)^{231,259}. Ce complexe induit à la surface des plaquettes l'expression de la Glycoprotéine 2b3a et la synthèse de Thromboxane A2²³¹.

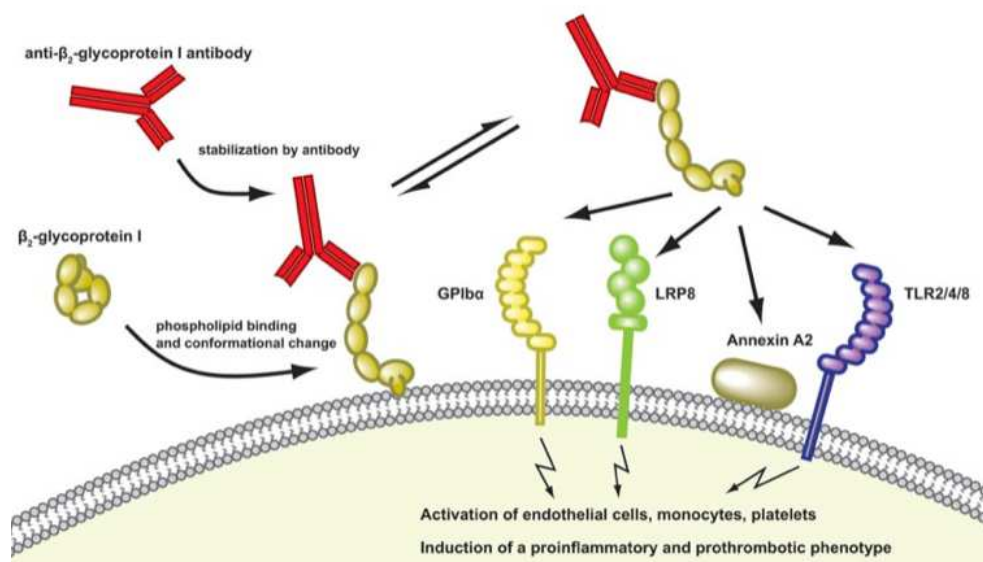


Figure 10: Séquences d'événements conduisant à l'activation cellulaire par le complexe anticorps- β 2-GPI. La β 2-GPI n'est pas reconnue comme pathogénique dans la circulation. Quand les phospholipides membranaires chargés négativement sont exposés, la β 2-GPI se fixe à leurs surfaces et change de conformation. Cette étape entraîne l'exposition d'un épitope cryptique au sein du domaine I qui est alors reconnu par les anticorps pathologiques. Le complexe anticorps- β 2-GPI peut ensuite interagir avec de nombreux récepteurs. D'après²³⁵.

Il est important de retenir que les anticorps antiphospholipides sont présents dans la circulation sanguine de manière constante et que la thrombose ne survient que dans certaines situations supportant ainsi l'hypothèse de la nécessité d'un deuxième événement dont la nature exacte n'est pas connue.

Les anticorps antiphospholipides semblent aussi jouer directement sur la coagulation avec une possible action directe inhibitrice des anticorps antiphospholipides sur la protéine C ou encore

un effet direct générant une résistance à l'Annexine V, deux puissants inhibiteurs de la coagulation, mais aussi en favorisant une augmentation des concentrations de facteur de von Willebrand²⁶⁰⁻²⁶².

Le complément joue également un rôle clé dans les modèles murins de SAPL. Ainsi, l'invalidation chez la souris de gènes codant pour des protéines du complément, C3 ou C5, permet de prévenir les thromboses ou les pertes fœtales induites par les anticorps antiphospholipides^{253,263}. Chez l'homme, l'observation en immunohistochimie de dépôts de fragment du complément activé sur du placenta de patientes atteintes de SAPL, ou encore l'efficacité de l'eculizumab (anticorps monoclonal anti-C5 bloquant l'activité terminale du complément) dans certaines microangiopathies liées aux anticorps antiphospholipides soutiennent cette hypothèse^{264 265}.

Il est important de noter que pour l'instant le seul traitement dans ces situations reste l'anticoagulation efficace au long court mais celle-ci ne permet pas de prévenir intégralement le risque thrombotique. Les récentes avancées dans la physiopathologie du développement de la thrombose au cours du SAPL ont conduit les industriels à développer de nouveaux anticorps bloquant la liaison du domaine I de la β 2GPI avec les anticorps dirigés contre. Cette approche est actuellement en cours d'évaluation.

Lésions vasculaires liées au SAPL

A côté de ces manifestations thrombotiques, d'autres lésions moins connues ont été décrites mais au potentiel probablement tout aussi dévastateur. Ces lésions vasculaires ont été initialement décrites dans les reins puis dans d'autres organes.

Lésions vasculaires liées aux SAPL dans le rein

Le rein constitue une cible majeure au cours du SAPL. Les manifestations les plus connues sont les thromboses artérielles ou veineuses, les sténoses des artères rénales induisant de l'hypertension réno-vasculaire et les infarctus rénaux partiels. Outre ces lésions classiques, d'autres types de lésions avaient été décrites par différentes équipes²⁶⁶⁻²⁷³. En effet, il avait été observé chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé associé à la présence d'un anticoagulant circulant, des lésions de microangiopathies thrombotiques^{274,275}. Ces lésions, observables uniquement en microscopie, sont caractérisées par la formation d'agrégats

plaquettaires et de thromboses des petites artéioles et des capillaires artériolaires. En 1998, *D. Nochy et coll* proposèrent une classification des lésions rénales liées au SAPL qu'ils dénommèrent : néphropathie associées aux antiphospholipides²⁷⁶. Cette classification distingue:

- Lésions aiguës caractérisées par la présence de lésions de microangiopathie thrombotique (**Figure 11A**).
- Lésions chroniques définies par : la présence d'une hyperplasie fibreuse intinale des artéioles rétrécissant leur lumière (**Figure 11B**), de l'atrophie corticale focale et un aspect pseudothyroïdien (**Figure 11C**) des tubes témoignant du processus ischémique.

Il est important de noter que ces lésions surviennent même en présence d'une anticoagulation efficace.

Ces lésions rénales ont aussi été retrouvées chez des patients ayant un SAPL secondaire (en pratique associé à un lupus érythémateux disséminé)^{277, 278}.

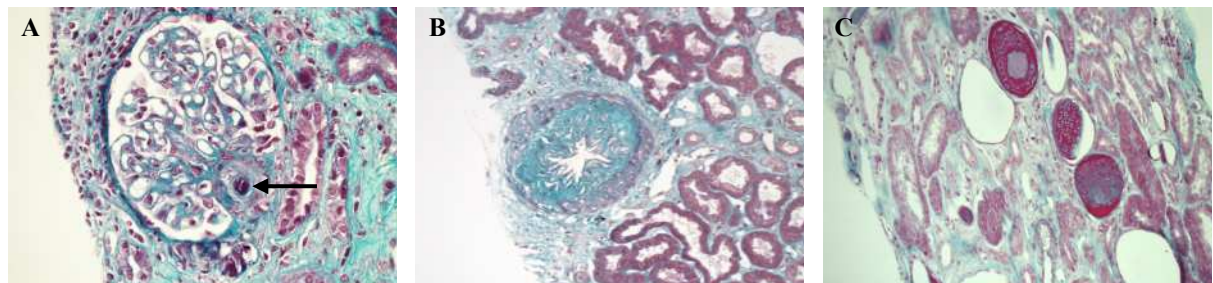


Figure 11 : Lésions histologiques observées au cours de la néphropathie associée au SAPL. (A) Microangiopathie thrombotique avec thrombose d'une artériole glomérulaire (flèche). (B) Lésion vasculaire avec aspect d'hyperplasie fibreuse intinale. (C) Aspect pseudothyroïdien des tubes témoignant de l'ischémie tissulaire. D'après²⁷⁹.

Ces lésions histologiques d'APSN surajoutées à des lésions de néphropathies lupiques ont un impact fonctionnel certains puisque elles sont associées à une hypertension artérielle et une créatininémie plus élevée au moment de la biopsie du rein²⁷⁷, mais leur impact à plus long terme reste débattu²⁷⁸.

Après transplantation rénale, le risque le mieux caractérisé chez les patients ayant un SAPL primaire ou secondaire est d'avoir une thrombose des vaisseaux rénaux. En dehors de ces

thromboses, nous avons récemment rapporté qu'il existe un risque élevé de récurrence de néphropathie liée au SAPL sur le greffon²⁷⁹. Cette récurrence est associée à une augmentation rapide et sévère des scores de lésions vasculaires et réduit significativement la survie du greffon.

Lésions vasculaires liées aux SAPL dans d'autres organes

Comme pour le rein, ces lésions vasculaires ont été rapportées dans d'autres territoires tel que les membres inférieurs, le cerveau ou encore les vaisseaux pulmonaires. Les lésions consistent essentiellement en de l'hyperplasie intimale asymétrique rétrécissant ainsi la lumière artérielle conduisant à une ischémie des territoires d'aval²⁶⁷. Ceci a été particulièrement bien documenté au cours du syndrome de Sneddon qui associe un livédo réticulaire et des accidents vasculaires cérébraux. Les lésions vasculaires au cours de ce syndrome sont visibles sur les vaisseaux cutanés et les artéioles cérébro-méningées^{280,281}. L'incidence exacte de ces lésions est mal connue et certainement sous-estimée car peu d'études y ont été consacrées.

Il apparaît donc qu'à côté des lésions les plus connues, que sont les thromboses et les avortements spontanés au cours du SAPL, il existe un autre type de lésions vasculaires artérielles caractérisé par l'épaississement de l'intima conduisant à une ischémie progressive du territoire d'aval. A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée pour en comprendre les mécanismes physiopathologiques.

QUATRIEME PARTIE: RÔLE DE mTORC ET AKT DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE RENALE

Rôle des complexes mTORC dans la physiopathologie rénale

Néphropathie diabétique

La néphropathie diabétique touche près de 40% des patients porteurs de diabète sucré. Elle se manifeste initialement sous forme d'une albuminurie de faible abondance, appelée microalbuminurie, puis son amplitude va croître pour devenir de rang néphrotique. La protéinurie s'accompagne d'hypertension artérielle associée à une perte de fonction rénale progressive qui aboutira à l'insuffisance rénale chronique.

La physiopathologie de la néphropathie diabétique est très complexe impliquant plusieurs voies de signalisations. En particulier, la voie mTORC pourrait jouer un rôle central au cours du diabète de type 2 où l'insulinorésistance périphérique constitue un point crucial³¹. Au cours du diabète de type 2, l'excès de nutriments stimule directement la voie mTORC1 qui semble jouer un rôle important dans le développement de ces lésions. En effet, l'hyperactivité podocytaire de la voie mTORC1 a été observée précocement dans les modèles murins de néphropathie diabétique (streptozotocine et souris *db/db*) mais aussi chez l'homme, l'ensemble coïncidant avec le développement de l'hypertrophie rénale et l'expansion mésangiale²⁸². De plus, l'administration de rapamycine chez l'animal ou encore l'haploinsuffisance podocytaire de *Raptor*, permettent de ralentir la progression des lésions de néphropathie diabétique²⁸². Ceci est en accord avec la résistance des souris *S6K1^{-/-}* pour développer des lésions de néphropathie diabétique²⁸³. A contrario, la délétion podocytaire de TSC1 entraîne la stimulation excessive de mTORC1, et les souris développent une protéinurie et des lésions glomérulaires évocatrices de néphropathie diabétique réversibles avec de la rapamycine²⁸⁴.

Néphropathie du vieillissement et autophagie

Le vieillissement s'accompagne d'un déclin de la fonction rénale chez l'homme et l'animal, estimé chez l'homme à 10% par décennie²⁸⁵. Ceci correspond, suivant les études, à une perte de 0,4-1,02ml/min/année²⁸⁶⁻²⁸⁸. Ce déclin de fonction a été attribué à une perte du nombre de glomérules fonctionnels et une augmentation du nombre de glomérules scléreux²⁸⁹. Si ces données restent encore débattues chez l'homme, elles sont mieux caractérisées dans les

modèles murins. Ainsi, chez le rat Sprague Dawley il est observé une réduction du nombre de néphron fonctionnel qui va en s'aggravant au bout de quelques mois de vie²⁹⁰. Ces lésions sont caractérisées par des lésions glomérulaires associant de l'expansion mésangiale, un épaississement de la capsule de Bowman, une réduction du nombre de podocyte puis des lésions de hyalinose segmentaire et focales. Ces anomalies s'accompagnent de lésions tubulointerstitielles progressives. Cette évolution n'est pas systématique mais dépend du fond génétique, du sexe, de l'environnement ainsi que du type d'alimentation²⁹⁰. Dans ces modèles, un rôle de la voie mTORC1 a été évoqué. En effet, la rapamycine ou l'inactivation de *S6K1* chez la souris permettent de ralentir les effets du vieillissement et d'allonger la survie^{291,292}. Plus spécifiquement pour le rein, la restriction calorique, sans dénutrition, permet de prévenir l'apparition de lésions glomérulaires²⁰⁷. Parmi les mécanismes mis en jeu dans le ralentissement du vieillissement via l'inhibition de mTORC1, un rôle pour l'autophagie a été évoqué.

Le rôle de l'autophagie dans le rein a été récemment exploré dans le rein²⁹³. Chez la souris adulte l'autophagie est principalement décelable dans les podocytes. Pour mieux caractériser son rôle podocytaire, *T.B. Huber et coll* ont étudiés des souris dont le gène *ATG5*, gène codant pour une protéine impliquée dans l'autophagie, a été invalidé dans les podocytes²⁹³. Ces souris partiellement déficientes pour l'autophagie ont un phénotype similaire aux souris contrôles pendant les premiers mois de vie. Cependant, en vieillissant (8-12 mois) elles développent progressivement une protéinurie modérée associée à des lésions de glomérulosclérose, de la fibrose interstitielle et des dilatations tubulaires. De plus ces souris ont une susceptibilité accrue au développement de lésions rénales lorsqu'elles sont soumises à différentes agressions podocytaires. Ces données suggèrent donc un rôle de l'autophagie podocytaire dans le vieillissement rénale. Chez l'homme, l'autophagie est décelable dans les podocytes au cours de maladies associées à de la protéinurie (hyalinose segmentaire et focale, glomérulonéphrite extramembraneuse). Ainsi, le rôle exact de l'autophagie dans le rein n'est pas parfaitement caractérisé et reste à élucider.

Protéinurie et rapamycine

L'introduction dans les années 1990 de la rapamycine comme immunosuppresseur en transplantation d'organe a joué un rôle important dans l'intérêt porté à la signalisation podocytaire de mTORC. En effet, un petit nombre de patients recevant ce traitement développent une protéinurie glomérulaire associée à des altérations structurales

podocytaires²⁹⁴⁻²⁹⁶. Les patients présentant une réduction de la fonction rénale semblent plus exposés à la survenue d'une protéinurie sous rapamycine suggérant que la réduction néphronique puisse constituer un facteur prédisposant^{297,298}.

Plusieurs groupes ont utilisé la néphrectomie subtotale ou l'uropathie obstructive chez le rat comme modèles de néphropathie chronique, et administré de la rapamycine ou de l'everolimus²⁹⁹⁻³⁰². Les résultats de ces études sont très variables, les effets rapportés étant parfois opposés dans le même modèle^{299,300}.

Ces données contradictoires tout comme la difficulté pour faire la distinction entre ce qui revient de l'inhibition de mTORC1 ou mTORC2 par la rapamycine dans ces modèles ont poussé l'équipe de *T.B. Huber* à réaliser l'invalidation conditionnelle dans le podocyte de *Raptor* et *Rictor*²⁸². L'invalidation podocytaire du gène *Raptor* chez la souris est responsable d'une protéinurie dès l'âge de 4 semaines associée à des lésions de glomérulosclérose accompagnées de lésions tubulo interstitielles. L'invalidation podocytaire de *Rictor* n'entraîne pas de phénotype spontané. En revanche, ces souris sont plus sensibles à la néphropathie induite par l'injection d'albumine bovine. Curieusement, les conséquences de la perte de mTORC2 sur l'état d'activation d'AKT n'ont pas été documentées dans ce travail. La double invalidation à la fois de *Raptor* et de *Rictor* dans le podocyte résulte en un phénotype très sévère avec une protéinurie abondante dès les premières semaines de vie associée à des lésions glomérulaires et tubulointerstitielles aboutissant à la mort des souris entre 6-12 semaines.

Ainsi, cette étude apporte des informations très intéressantes sur les fonctions des complexes mTORC1 et mTORC2 sans toutefois permettre de juger du rôle d'AKT dans les podocytes, et n'apporte pas de réponse aux mécanismes de protéinurie induits par la rapamycine chez l'homme.

Polykystose rénale autosomique dominante

La polykystose rénale autosomique dominante de l'adulte (ADPKD) est la maladie rénale génétique la plus fréquente affectant entre 1:500 à 1:1000 personne dans le monde. Elle est caractérisée par la formation de kystes multiples qui se développent dans les 2 reins au cours de la deuxième ou troisième décennie aboutissant progressivement à l'insuffisance rénale terminale³⁰³. La majorité des cas d'ADPKD sont dues à des mutations soit de *PKD1* (85-90%) soit de *PKD2* (10-15%) qui altèrent le fonctionnement de la polycystine 1 (PC1) et 2 (PC2) respectivement. PC1 est une large protéine (>460 kDa) transmembranaire qui possède une

longue portion N-terminale extracellulaire, 11 domaines transmembranaires et une courte portion intracytoplasmique C-terminale qui interagirait avec TSC1³⁰⁴. La pathogénie de la formation des kystes reste mal connue. Les mutations germinales de *PKD1* et *PKD2* sont présentes à l'état hétérozygotes et nécessitent une seconde mutation ('2nd hit') dite somatique qui modifie le fonctionnement de la cellule tubulaire entraînant un excès de prolifération, une augmentation de l'apoptose, des anomalies de polarité ainsi qu'une désorganisation de la matrice extracellulaire³⁰⁵.

En 2005, en raison de ses propriétés antiproliférative, la rapamycine a été testée dans un modèle murin de polykystose rénale³⁰⁶. Ce traitement eut pour effet spectaculaire de réduire le nombre et la taille des kystes. L'activation intra tubulaire de la voie mTORC1 a ensuite été confirmée de nombreux modèles murins³⁰⁴ ainsi qu'au sein des sections tubulaires kystiques chez les patients atteints d'ADPKD.

L'ensemble de ces observations, conduisit à la mise en place de 2 essais multicentriques randomisés et en double aveugle chez les patients atteints d'ADPKD pour tester l'efficacité de la rapamycine ou de l'everolimus (un autre rapalog) sur la progression de la maladie^{307,308}. Malheureusement, les résultats de ces 2 essais ont été décevants avec peu ou pas d'effet sur le volume kystique et la fonction rénale. Les explications sont nombreuses, et parmi celles-ci une pourrait être une posologie de rapamycine insuffisante (voire **Annexe 1**)³⁰⁹.

La cause de l'augmentation du tonus de la voie mTORC1 au sein des cellules tubulaires chez le patient polykystique n'est pas claire. L'invalidation de *PTEN* dans les cellules tubulaires, régulateur négatif d'AKT et donc de mTORC1, n'entraîne pas la formation de kyste, mais l'invalidation homozygote de *TSC1* est responsable de l'apparition de nombreux kystes rénaux associée à une activation de mTORC1³¹⁰.

Sclérose Tubéreuse de Bourneville (STB)

La STB est une maladie génétique autosomique dominante résultant de la mutation d'un des deux gènes *Tsc1* ou *Tsc2*³¹¹. Ces mutations sont responsables de nombreuses atteintes multi organes incluant le système nerveux central, la peau, le coeur, les poumons et les reins. L'atteinte rénale au cours de la STB comporte essentiellement par des lésions très particulières appelées angiomyolipomes. Les angiomyolipomes sont des tumeurs bénignes composées de vaisseaux anormaux, de cellules musculaires lisses immatures et de cellules graisseuses. D'autres lésions rénales peuvent également être présentes telles que les kystes rénaux pouvant parfois donner lieu au développement d'un véritable aspect de polykystose

rénale ou encore à des carcinomes rénaux. Ces mutations de *Tsc1* ou *Tsc2* sont présentes à l'état hétérozygote et nécessitent une deuxième mutation somatique pour aboutir à une mutation homozygote. La perte des protéines TSC1 ou TSC2 entraîne l'activation non contrôlée de la voie mTORC1. Une partie des lésions induites par les mutations de TSC semblent sensibles à la rapamycine ou l'everolimus. En effet, les souris invalidées pour *Tsc1* dans les cellules tubulaires développent de nombreux kystes rénaux sensibles à la rapamycine³¹⁰. De même, les souris *Tsc2*^{+/-} présentent des troubles cognitifs et comportementaux associés à une hyperactivation de la voie mTORC1 au sein de l'hippocampe. L'administration de rapamycine permet de bloquer l'activation de la voie mTORC1 dans le système nerveux central et d'améliorer les troubles neurologiques³¹².

Chez l'homme atteint de STB, la rapamycine ou l'everolimus améliorent également un certains nombres de lésions tels que les angiomyolipomes et les astrocytomes sous épendymaires à cellules géantes^{313,314}.

Birt Hogg Dubé (BHD)

Le syndrome de BHD est une maladie génétique associant des tumeurs bénignes des follicules pileux, des kystes pulmonaires, des pneumothorax spontanés et un risque élevé de tumeurs rénales (carcinomes à cellules chromophobes et des oncocytomes). Cette maladie génétique correspond à une mutation germinale présente à l'état hétérozygote du gène *Bhd* codant pour FLCN (*Folliculin*) et qui nécessite une deuxième mutation somatique pour entraîner le développement des anomalies. FLCN est une protéine de 64 kDa situé au niveau du cil et qui active directement l'AMPK (*5'-AMP-activated protein kinase*)³¹⁵. L'invalidation tubulaire de *BHD* chez la souris entraîne le développement de nombreux kystes rénaux et tumeurs oncocytaires, associées à une activation de la voie AKT/mTORC. La rapamycine permet d'améliorer significativement les lésions histologiques et le poids de reins³¹⁶.

Nécrose tubulaire aigue

La nécrose tubulaire aigue fait suite à une agression rénale aigue qui peut être ischémique ou toxique. Au cours de cette agression, les cellules tubulaires nécrosent et se détachent des membranes basales. Les cellules tubulaires survivantes vont proliférer, récupérer une polarité apico-basale et pouvoir restaurer l'épithélium tubulaire *ad integrum*³¹⁷.

La voie mTORC1 pourrait être impliquée dans ce processus de réparation puisqu'elle stimule l'activité mitochondriale permettant la production d'ATP, qui sera utile à la régénération cellulaire, et régule le processus de croissance cellulaire et la prolifération.

La voie mTORC2 pourrait également être impliquée dans la régénération cellulaire en modulant le cytosquelette de la cellule lui permettant de restaurer la polarité cellulaire, les adhésions cellulaires et la reprise du transport unidirectionnel.

Le rôle des complexes mTORC1 et mTORC2 a été étudié chez l'animal au cours de l'ischémie reperfusion³¹⁸. L'activité de mTORC1 est très peu décelable au sein des cellulaires tubulaires à l'état basal, mais devient intense après ischémie-reperfusion. La rapamycine administrée dans ce contexte ralentit la régénération des cellules tubulaires en inhibant la prolifération et en favorisant l'apoptose. Cependant, même si l'administration de rapamycine est prolongée dans le temps, les structures tubulaires finissent tout de même par se régénérer témoignant d'un possible mécanisme d'échappement.

Ces données ont été confirmées chez l'homme, où après transplantation rénale, la rapamycine administrée comme drogue immunosuppressive, retarde la reprise de fonction en prolongeant la nécrose tubulaire aigue³¹⁸. Ces observations ont ainsi modifié l'utilisation de la rapamycine après la greffe qui est maintenant utilisée une fois la phase de nécrose épithéliale tubulaire passée.

Rôle des protéines AKT dans le rein

Si plusieurs études ont évalué le rôle de la voie mTORC dans différentes pathologies rénales, *in vivo*, en modulant son action au travers d'inhibiteurs pharmacologiques ou de délétion génique, peu de choses sont connues sur le rôle précis d'AKT dans le rein.

Comme nous l'avons vu précédemment, AKT1 et AKT2 sont exprimées à l'état basal dans le rein adulte alors que l'expression d'AKT3 n'est pas détectable¹³¹. Cependant, le rôle précis des protéines AKT dans le rein sain ou pathologique est très largement inconnue. Aucun phénotype rénal n'a été associé à l'invalidation des isoformes d'AKT chez la souris. Aucun phénotype notable n'est de plus observé chez les souris présentant une invalidation de *Pten* dans les tubules rénaux^{310,319}. Aucune étude menée *in vivo* n'a analysé la fonction de ces protéines dans la physiopathologie rénale. Seules des études *in vitro* suggèrent qu'AKT pourrait jouer un rôle important dans différents types cellulaires rénaux. Mais compte tenu des

interactions complexes entre AKT, mTORC1 et mTORC2, les résultats de ces études ne permettent pas de statuer sur la fonction d'AKT.

AKT et podocytes

Le rôle d'AKT dans la biologie podocytaire a été principalement évalué *in vitro*, et au cours d'études observationnelles *in vivo* ne permettant pas de statuer sur les fonctions précises d'AKT dans différents contextes pathologiques.

Dans les podocytes, l'activité d'AKT apparaît régulée par l'engagement de protéines structurales dont la fonction est cruciale pour la biologie podocytaire. En effet, les protéines-clés du podocyte que sont la néphrine, la podocine et CD2AP sont capables d'induire une activation d'AKT *in vitro*³²⁰. Cette activation implique une phosphorylation de la partie intracytosolique de la néphrine par une kinase de la famille SRC : FYN³²¹⁻³²³. Cette phosphorylation permet le recrutement local d'une PI3K qui va permettre l'activation d'AKT³²³.

Le rôle que joue, dans les podocytes, l'activation de la voie AKT demeure très incertain. Une diminution de la phosphorylation d'AKT au niveau glomérulaire ou podocytaire a été observée dans différents modèles de néphropathies chroniques murines : néphropathie à la puromycine chez le rat^{323,324} ou néphropathie diabétique³²⁵. Dans le cas de la néphropathie à la puromycine, il est intéressant de noter que l'administration de vitamine D, qui réduit les lésions glomérulaires et l'apoptose podocytaire, est associée à une préservation de la phosphorylation d'AKT³²⁴. Une diminution de l'activation d'AKT pourrait dans ce cas favoriser l'apparition de lésions rénales comme le suggèrent des résultats montrant que l'activation d'AKT inhibe l'apoptose podocytaire *in vitro*³²⁵. Un rôle bénéfique d'AKT est également suggéré par l'étude du groupe de *D. Sahali* montrant que la surexpression de la protéine C-MIP dans les podocytes diminue l'activation d'AKT et est associée à des remaniements du cytosquelette et une protéinurie importante³²⁶. Si ces données corrélatives tendent à proposer qu'AKT intervient dans le maintien du cytosquelette, cette hypothèse n'est cependant pas corroborée par des données obtenues *in vitro* montrant que l'activation d'AKT entraîne une augmentation du nombre des lamellipodes et une diminution des fibres de stress³²³. Ce type d'effet a habituellement pour corollaire, *in vivo*, un effacement des pieds des podocytes, et l'apparition d'une protéinurie et d'une glomérulosclérose^{322,327}. AKT pourrait également jouer un rôle délétère en favorisant une répression de la néphrine dans un contexte

inflammatoire. En effet, l'exposition de podocytes au TNF α diminue l'activité du promoteur de la néphrine d'une façon dépendante d'une activation de la PI3K³²⁸.

AKT et cellules mésangiales

Il a été suggéré, *in vitro*, que l'activation d'AKT dans les cellules mésangiales pouvait avoir un effet délétère au cours de la progression des néphropathies chroniques. En effet, l'exposition de cellules mésangiales en culture à des facteurs mis en jeu lors de la progression des néphropathies chroniques comme l'exposition à l'angiotensine II^{329,330}, à de l'aldostérone³³¹, à des concentrations importantes de glucose³³²⁻³³⁴, au TGF³³⁵, au complexe d'attaque membranaire du complément³³⁶ ou à une contrainte mécanique³³⁷ induit l'activation d'AKT. L'activation d'AKT favorise la survie cellulaire^{338,339}, entraîne une hypertrophie des cellules mésangiales³³² ainsi qu'une augmentation de la synthèse de matrice extracellulaire^{337,340}. L'activation, *in vivo*, d'AKT dans les cellules mésangiales est contradictoire selon les études^{325,337,341,342,343}.

AKT et cellules tubulaires

Comme pour les cellules mésangiales, les principales données concernant AKT sont issues d'études réalisées *in vitro*. L'activation d'AKT peut être induite par différents stimuli très vraisemblablement mis en jeu *in vivo* dans la progression des néphropathies chroniques. Ainsi, une phosphorylation d'AKT est observée après exposition à l'angiotensine II³⁴⁴, à de fortes concentrations de glucose³⁴⁵⁻³⁴⁷, à un stress oxydatif³⁴⁸, au TGF β ³⁴⁹ ou encore en réponse à l'hypoxie³⁵⁰.

Les effets de l'activation d'AKT dans les cellules tubulaires *in vitro* sont superposables à ceux observés dans d'autres types cellulaires. Ainsi, l'activation d'AKT entraîne une inhibition de l'apoptose³⁵¹ et favorise la prolifération des cellules tubulaires^{352,353}. De façon plus spécifique, AKT favorise l'acquisition par les cellules épithéliales tubulaires d'un phénotype mésenchymateux et la synthèse de matrice extracellulaire^{347,349,350}. L'ensemble des données obtenues *in vitro* suggère qu'AKT pourrait jouer un rôle délétère au cours des MRC.

Peu d'études ont évalué, *in vivo*, le rôle d'AKT dans les cellules tubulaires rénales (en dehors de la maladie polykystique). Comme nous l'avons précédemment vu, l'invalidation spécifique de *Pten* dans le tubule rénal n'a pas non plus montré d'effet notable^{310,319}, mais il faut cependant noter que cette invalidation n'entraîne pas d'augmentation de l'activation d'AKT suggérant que d'autres mécanismes de régulation compensent la perte de *Pten*. En revanche,

l'invalidation combinée de *Pten* et de *Vhl* (*Von Hippel Lindau*) entraîne l'apparition d'une polykystose rénale associée à une activation excessive d'AKT³¹⁹.

Le rôle d'AKT dans les maladies kystiques rénales est incertain. Une activation de la voie AKT a été retrouvée dans différentes néphropathies kystiques génétiques murines ou humaines^{316,354-356}. Le rôle pathogénique de l'activation d'AKT dans ce contexte n'a été ni formellement établi ni exclu. Comme nous l'avons plusieurs fois souligné, l'effet de la rapamycine sur le complexe mTORC2 varie en fonction du type cellulaire considéré et de la durée du traitement. L'état d'activation d'AKT n'a pas été évalué dans la majeure partie des études ayant documenté un effet du sirolimus sur les néphropathies kystiques. Une étude récente de *Belibi et coll.* est, à cet égard, très intéressante³⁵⁶. Ces auteurs ont analysé l'impact du dimorphisme sexuel sur l'effet de la rapamycine dans un modèle murin de polykystose. Bien que ce traitement apparaisse inhiber mTORC1 chez les femelles et les mâles de façon identique, il ne réduit la progression de la maladie kystique que chez les mâles. Cet effet est associé, chez les mâles, à une réduction de la phosphorylation d'AKT sur la Ser⁴⁷³. En revanche, chez les femelles, la rapamycine augmente la phosphorylation d'AKT³⁵⁶. De façon purement corrélative et un peu provocatrice, cette étude suggère que l'effet de la rapamycine sur la progression kystique pourrait être lié à l'action de cette drogue sur mTORC2 plutôt que mTORC1.

Ainsi, l'ensemble des données publiées à ce jour ne permet pas de statuer sur un éventuel rôle, délétère ou bénéfique, des kinases AKT au cours de la progression des MRC. Si notre connaissance du rôle de la signalisation mTORC dans le domaine des MRC a récemment progressé, elle reste très parcellaire en regard de l'expansion des données plus fondamentales concernant les acteurs de cette voie. La disponibilité grandissante de modulateurs pharmacologiques ciblant de façon de plus en plus spécifique les différents intermédiaires des voies AKT et mTORC rend nécessaire une meilleure analyse du rôle moléculaire de ces protéines dans des pathologies humaines aussi fréquentes et graves que la MRC.

OBJECTIF

L'objectif de ce travail était de caractériser le rôle de la voie AKT/mTORC dans la physiopathologie rénale. En particulier nous envisagions de :

1) Comprendre le rôle de cette voie dans l'adaptation à la réduction néphronique en combinant des modèles expérimentaux de réduction néphronique à l'utilisation de souris génétiquement modifiées (**Etude 1**).

2) D'élucider le rôle de cette voie dans le développement des lésions vasculaires rénales au cours du syndrome des antiphospholipides en utilisant des biopsies de patients, des modèles expérimentaux *in vitro* et des modulateurs pharmacologiques (**Etude 2**).

Enfin, en parallèle, j'ai réalisé, à partir d'une observation clinique exceptionnelle, un travail sur le rôle de la voie mTORC au cours de la polykystose rénale autosomique dominante que vous trouverez en **Annexe 1**.

EXPOSÉ DES TRAVAUX

1 Étude des fonctions de la voie AKT dans la progression des MRC : mise en évidence du rôle central d'AKT2 dans l'adaptation podocytaire à la réduction néphronique

(Article soumis, en cours de révision)

La réduction néphronique entraîne des modifications adaptatives des néphrons restants permettant d'augmenter le travail fourni par chaque unité fonctionnelle rénale. Ces altérations ont pour conséquence une augmentation des contraintes mécaniques et métaboliques imposées aux cellules rénales. Du fait de leur localisation, de leur fonction et de leur faible potentiel prolifératif, les podocytes sont particulièrement exposés à ces conditions défavorables. Les mécanismes permettant aux podocytes de s'adapter à cette charge supplémentaire de travail et à ces nouvelles contraintes sont actuellement très mal connus.

Le but de mon travail de thèse a été d'étudier le rôle des protéines AKT au sein des podocytes en réponse à la réduction néphronique.

En partant de l'observation d'une augmentation de l'expression rénale des protéines AKT lors de la phase de progression des lésions, nous avons démontré une compartimentation glomérulaire de l'activation d'AKT, intéressant plus particulièrement les podocytes. En analysant l'expression rénale des deux principales isoformes d'AKT, AKT1 et AKT2, nous avons mis en évidence une expression préférentielle d'AKT2 dans les podocytes. En utilisant différents modèles de réduction néphronique, nous avons montré que la délétion systémique d'*Akt2* avait pour conséquence une aggravation des lésions glomérulaires et une albuminurie alors que celle d'*Akt1* n'avait aucune conséquence. De façon remarquable, la délétion d'*Akt2* abolit l'activation de la voie AKT podocytaire induite par la réduction néphronique. Elle entraîne également une augmentation de l'apoptose glomérulaire et une raréfaction podocytaire ainsi que des altérations ultrastructurales glomérulaires avec, en particulier, un effacement des pédicelles témoins du remaniement du cytosquelette des podocytes. Nos données montrent que la perte d'AKT2 a également pour conséquence une dérégulation de plusieurs cibles d'aval d'AKT incluant MDM2, GSK3 et RAC1, susceptibles d'expliquer les altérations glomérulaires observées chez les souris *Akt2*^{-/-}. Afin de démontrer l'importance de son rôle podocytaire, nous avons invalidé *Akt2* spécifiquement dans le podocyte et observé

que ces souris récapitulaient l'ensemble du phénotype après réduction néphronique. Finalement, l'utilisation *in vitro* d'ARN interférences (Sh *Akt1* et Sh *Akt2*), nous a permis de confirmer le rôle spécifique d'AKT2 dans le remodelage du cytosquelette.

Nous avons par la suite évalué la pertinence de nos résultats en pathologie humaine en étudiant une cohorte de patients transplantés rénaux développant ou non une protéinurie en réponse à un traitement par sirolimus. Nos résultats montrent que, comparé à un groupe de patients transplantés ayant une fonction rénale préservée, les patients transplantés rénaux ayant une fonction rénale compromise ont spécifiquement une activation podocytaire d'AKT. Fait majeur, nous observons que les patients ayant une fonction rénale altérée et développant une protéinurie sous sirolimus ont une inhibition complète de la phosphorylation d'AKT dans les podocytes. Comme chez la souris, nous avons par ailleurs mis en évidence un enrichissement spécifique d'AKT2 dans les podocytes humains. Ces observations suggèrent qu'AKT2 puisse jouer, également chez l'homme, un rôle déterminant dans l'adaptation du podocyte à la réduction néphronique.

Cette étude démontre pour la première fois le rôle crucial joué par la voie AKT dans l'adaptation podocytaire et permet d'identifier la kinase AKT2 comme la principale isoforme impliquée dans ces phénomènes. Elle apporte également un éclairage intéressant sur les mécanismes responsables des effets délétères des inhibiteurs de mTOR sur la biologie podocytaire. Enfin, nos résultats suggèrent que l'examen de la phosphorylation d'AKT podocytaire pourrait servir de test pronostique avant l'introduction de sirolimus. En effet, une phosphorylation d'AKT (Ser⁴⁷³) podocytaire suggérerait une adaptation à la réduction néphronique et prédirait l'apparition d'une protéinurie à l'introduction du sirolimus.

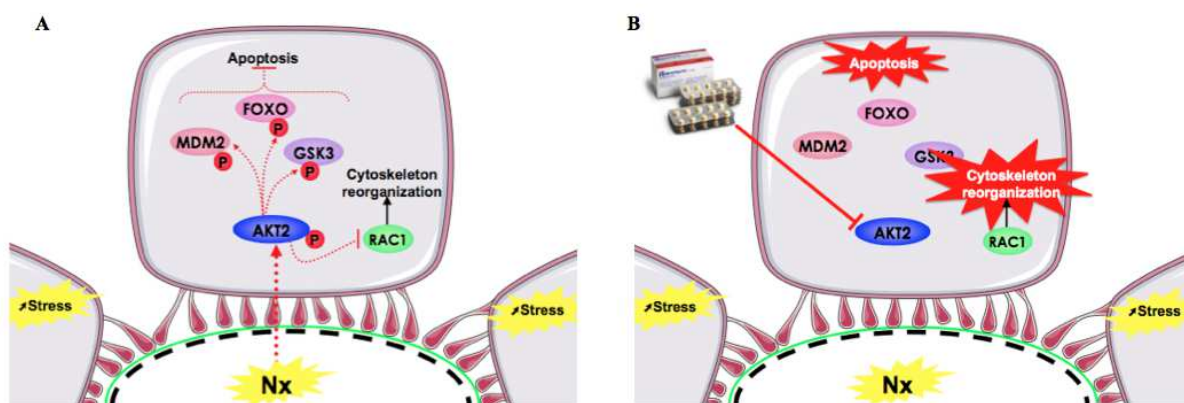


Figure 12: Modèle physiopathologique proposé. (A) La réduction néphronique entraîne la phosphorylation d'AKT2 podocytaire. AKT2 phosphorylé inhibe le remodelage du cytosquelette et l'apoptose. (B) Le sirolimus inhibe la phosphorylation d'AKT2 nécessaire à l'adaptation liée aux stress secondaires à la réduction néphronique et favorise le remodelage du cytosquelette et l'apoptose podocytaire.

The essential role of Akt2 in stressed podocytes

Guillaume Canaud^{1,2,6}, Frank Bienaimé^{1,3,6}, Amandine Viau¹, Caroline Treins¹, William Baron¹, Clément Nguyen¹, Martine Burtin¹, Sophie Berissi¹, Konstantinos Giannakakis⁴, Andrea Onetti Muda⁵, Gérard Friedlander^{1,3}, Christophe Legendre², Mario Pende¹, and Fabiola Terzi^{1,2}.

- 1 INSERM U845, Centre de Recherche “Croissance et Signalisation”, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Hôpital Necker - Enfants Malades, 149 Rue de Sèvres, 75015 Paris, France
- 2 Service de Néphrologie Transplantation Adultes, Hôpital Necker - Enfants Malades, Paris, France
- 3 Service de Physiologie–Explorations Fonctionnelles, Hôpital Necker - Enfants Malades, Paris, France
- 4 Department of Radiology, Oncology and Pathology, Sapienza University, Rome, Italy
- 5 Department of Pathology, Campus Bio-Medico University, Rome, Italy
- 6 These authors contributed equally to this work

Corresponding author: Fabiola Terzi, MD, PhD
INSERM U845
Team: Mechanisms and Therapeutic Strategies in Chronic Nephropathies.
Hôpital Necker Enfants Malades
Tour Lavoisier, 6ème étage
149 Rue de Sèvres
75015 Paris, France
Phone +33 1 44495245
Fax +33 1 44490290
email fabiola.terzi@inserm.fr

ABSTRACT

In chronic kidney disease (CKD), the loss of functional nephrons typically results in the overload of the remaining ones. This leads to a metabolic and mechanical stress that in turn generates further nephron loss. The molecular pathways engaged to counteract this stress are still unknown. Here, we show that the activation of the serine/threonine kinase Akt2 plays an essential role in the protection and survival of podocytes after nephron reduction. Interestingly, glomerular lesions and albuminuria were dramatically worsened in *Akt2*^{-/-}, but not in *Akt1*^{-/-} mice. Specific *Akt2* deletion in podocytes revealed that the protective effect of Akt2 is cell autonomous. Mechanistically, Akt2 triggers a compensatory program involving the modulation of Mdm2, Gsk3 and Rac1 functions. The defective activation of this pathway is associated with increased apoptosis and foot process effacement. These data are remarkably relevant to human CKD where we observed that the activation of AKT2 by mTORC2 is essential for podocyte survival in patients with severe nephron reduction. More importantly, we elucidate the nature of the molecular events underlying the adverse renal effect of sirolimus, one of the most widely used immunosuppressive treatments, and provide a novel essential criterion for the rational use of this drug. In conclusion, our results disclose a novel and critical function played by Akt2 and identify a potential therapeutic target for preserving glomerular function in CKD.

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) represents a worldwide health concern: in the United States, 20 million patients suffer from CKD and this disease is the ninth leading cause of death in the country^{1,2}. Similar rates were found in developing countries³. CKD was recently recognized as an important risk factor for death and cardiovascular diseases⁴. Understanding the pathophysiology of CKD progression is, therefore, a key challenge for medical planning.

Regardless of the initial insult, human CKD is characterized by progressive destruction of renal parenchyma and loss of functional nephrons, which ultimately lead to end stage renal failure⁵. The mechanisms of CKD progression are poorly understood, but it has been suggested that compensatory processes may play a role. In fact, a reduction in the number of functional nephrons triggers molecular and cellular events promoting compensatory growth of remaining nephrons and this compensatory process is required to maintain kidney function⁵. In glomeruli, the increase of blood flow and intracapillary pressure leads to a higher single nephron glomerular filtration rate. In tubules, the increase of transport and metabolic activities leads to higher solute and water reabsorption. However, over time, the strain imposed by these adaptations results in mechanical and metabolic stresses of the remaining nephrons that ultimately lead to nephron damage, albuminuria and further nephron loss^{5,6}. The result is a vicious cycle in which the loss of damaged nephrons leads to the damage of the so far healthy nephrons (overload hypothesis)⁷. Hence, the rate of CKD progression entirely depends on the ability of remaining nephrons to cope with stress.

Akt proteins have been shown to play a role in adaptation to physiopathological stresses^{8,9}. Akts are conserved cytosolic serine/threonine kinases that regulate many cellular stress-induced processes including survival, proliferation, migration and cytoskeletal organization¹⁰. In mammals, three distinct genes encode *Akt* homologs: *Akt1*, *Akt2* and *Akt3*, respectively.

Akt activation first requires its recruitment to the plasma membrane, which is initiated by phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), then the phosphorylation on Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³ by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 2 (mTORC2), respectively¹⁰. Once activated, Akt proteins phosphorylate several substrates distributed within the cell to regulate multiple cellular functions¹⁰. In the heart, the Akt signaling pathway has been shown to mediate the adaptive response to increased hemodynamic load¹¹. Similarly, the Akt pathway has been implicated in the adaptation of skeletal muscle to situations of altered use such as strength training, aging or immobilization¹².

The very few studies that have analyzed Akt activation in CKD using *in vivo* experimental models have led to conflicting results, indicating that Akt may act in a context- and/or cell-dependent manner^{13,14}. Indirect evidence suggests that Akt might play a role in podocyte physiology¹⁵. Podocytes are terminally differentiated, highly specialized epithelial cells that, together with endothelial cells and the glomerular basement membrane, compose the glomerular filtration barrier^{16,17}. The filtration barrier ensures that albumin and other plasma proteins are retained in the circulation. Podocytes help prevent proteinuria through a complex regulation of the actin cytoskeleton of their foot process. Interestingly, *in vitro*, Akt can be activated by nephrin^{18,19}, a protein of the slit diaphragm that mediates actin reorganization under mechanical stress¹⁵. Taking all these data together, we hypothesize that Akt is the critical pathway activated to counteract the stress imposed by compensation after nephron loss.

To test this hypothesis, we used experimental models of nephron reduction and *Akt1* and *Akt2* mutant mice to uncover a novel function of Akt2 and to show that Akt2 has a unique role in podocyte adaptation to nephron reduction. Furthermore, we provide evidence that these

findings are relevant to human CKD and propose a possible novel strategy to prevent the adverse renal effect of sirolimus, a mTOR inhibitor and a widely used immunosuppressive drugs.

RESULTS

Nephron reduction activates Akt pathway in podocytes

To investigate whether Akt activation might be involved in adaptation to the stress imposed by nephron loss during CKD, we performed 75% nephron reduction in lesion-prone FVB/N mice²⁰ and analyzed Akt phosphorylation. Western blot analysis revealed that neither Akt nor its downstream target Gsk3 were phosphorylated in whole kidney extracts two months after nephron reduction (**Supplementary Fig. 1**). However, on laser capture microdissected glomeruli (**Fig. 1a**), we found a robust (3-fold) increase in Akt phosphorylation at residue Ser⁴⁷³ (**Fig. 1b**). Colocalization studies using an antibody directed against podocin showed that Akt is predominantly activated in podocytes (**Fig. 1c**). Immunohistochemical and colocalization experiments of P-Gsk3 α and P-Gsk3 β confirmed the activation of the pathway in podocytes (**Fig. 1d**, **Supplementary Fig. 2a**). In addition, we observed that three other Akt targets (Mdm2, Tsc2, Foxo-1) were phosphorylated in podocytes (**Supplementary Fig. 2b**). Hence, Akt activation after nephron reduction seems to be compartmentalized in podocytes.

Akt2 isoform is specifically enriched in podocytes

It is known that Akt1 and 2, but not Akt3, mRNA are expressed in the kidney²¹. Immunohistochemistry showed that the two isoforms display a different pattern of distribution. Indeed, whereas Akt1 was predominantly found in tubules and almost undetectable in glomeruli, Akt2 was mainly located in podocytes (**Fig. 1f**). Double immunostaining using antibodies directed against WT1, a podocyte specific protein, confirmed this observation (**Fig. 1g**). The distribution of the two proteins did not change after nephron reduction, except for the presence of a few Akt2-positive tubular cells (**Fig. 1f**).

Akt2 gene inactivation accelerates the development of glomerular lesions

To investigate the role of Akt2 activation in CKD, we applied our experimental model of nephron reduction to *Akt2*^{-/-} mice. To this end, we first introduced the *Akt2* mutated allele in

the lesion-prone (FVB/N) background²². The *Akt2*^{-/-} FVB/N mice reproduced normally and had no grossly apparent phenotype under physiological conditions (data not shown). As expected, two months after nephron reduction, wild-type mice developed renal lesions, mainly comprising of tubular dilations, interstitial fibrosis and mild glomerulosclerosis (**Fig. 2a**). The frequency and severity of glomerular lesions were dramatically increased in *Akt2*^{-/-} mice (**Fig. 2a**). Consistently, albuminuria was significantly increased in *Akt2*^{-/-} mice (**Fig. 2b**). In contrast, tubular and interstitial lesions were comparable regardless of the genotype, at least up to two months after nephron reduction (**Fig. 2a**). Western blot analysis on microdissected glomeruli showed that P-Akt levels were similar between *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} sham-operated mice (**Fig. 2c**), indicating that Akt1 is sufficient to compensate for *Akt2* gene inactivation under physiological conditions. However, after nephron reduction, *Akt2* deficiency completely prevented the increase of Akt phosphorylation (Ser⁴⁷³) in glomeruli (**Fig. 2c**), despite the increase of Akt1 protein (**Fig. 2d**). Notably, colocalization experiments confirmed the absence of Akt phosphorylation in podocytes of *Akt2*^{-/-} mice, two months after nephron reduction (**Supplementary Fig. 3**).

To rule out the possibility that the impact of *Akt2* gene inactivation was only relevant in the subtotal nephrectomy model, we followed the evolution of kidney function in *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice from 2 to 13 months. Aging is known to be associated with progressive nephron reduction and late onset renal damage²³. Notably, whereas urinary albumin excretion remained stable in *Akt2*^{+/+} mice throughout the 2- to 13-month follow-up, it progressively increased in *Akt2*^{-/-} mice (**Supplementary Fig. 4a**). Morphological analysis showed more severe glomerular lesions in 13-month old *Akt2*^{-/-} mice than in wild-type littermates (**Supplementary Fig. 4b**). In addition, we observed that the severity of both tubular dilations and interstitial fibrosis was significantly increased in *Akt2*^{-/-} mice 13 months after birth (**Supplementary Fig. 4b**), confirming the role of glomerular damage in CKD progression.

Akt2 regulates podocyte survival and morphology

We next aimed at elucidating the mechanisms underlying the beneficial effect of Akt2 in preserving stressed glomeruli in CKD. Akt has been implicated in cardiovascular adaptation to hypertension and in diabetes^{24,25}, two major risk factors of CKD progression. As expected, mean arterial blood pressure increased while large renal arteries underwent hypertrophy two months after nephron reduction; however, the increase was of the same magnitude in *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice (**Supplementary Fig. 5a**, **Supplementary Fig. 5b**). Similarly, nephron reduction resulted in a weak increase of fasting glycemia in both *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} animals (**Supplementary Fig. 5c**). Although the increase was slightly higher in *Akt2*^{-/-} mice, neither diabetes mellitus nor glycosuria could be detected in mutant mice.

Since hypertension or diabetes did not seem to account for impaired glomerular lesions in our model, we wondered whether the effect of Akt2 was cell autonomous. It is known that the balance between cell proliferation and apoptosis as well as the maintenance of foot processes are critical events for podocyte adaptation to pathological conditions¹⁶. Previous studies have shown that Akt pathway activation may stimulate cell proliferation, inhibit apoptosis and control the ability of cells to migrate¹⁰. We therefore monitored the number and function of *Akt2*^{-/-} podocytes after nephron reduction. As expected, the rate of cell proliferation was very low in control mice (**Fig. 3a**). The number of PCNA-positive cells significantly increased two months after nephron reduction regardless of the genotype (**Fig. 3a**), although the increment tended to be lower in *Akt2*^{-/-} mice. Conversely, whereas the percentage of glomeruli with apoptotic cells was modestly enhanced in wild-type mice after nephron reduction, it dramatically increased in *Akt2*^{-/-} mice (**Fig. 3a**). A significant number of apoptotic cells were also observed in control *Akt2*^{-/-} mice (**Fig. 3a**). The increased apoptosis associated with lower cell proliferation correlated with podocyte rarefaction; in fact, the number of WT1-positive cells was 50 % of the control wild-type value in subtotaly nephrectomized *Akt2*^{-/-} mice (**Fig.**

3a). Similar results were obtained in aging *Akt2*^{-/-} mice, in which the development of albuminuria was also associated with increased glomerular apoptosis and podocytes rarefaction (**Fig. 3b**). Transmission electron microscopy revealed marked foot process effacement in 13-month old *Akt2*^{-/-} mice (**Fig. 3c**), indicating that podocyte rarefaction is associated with severe damage of the remaining ones. Notably, slight focal foot process effacement was detectable by three months of age in *Akt2*^{-/-} mice and led to the doubling of the width between foot processes in 13-month old animals (**Fig. 3c**).

Akt2 regulates critical targets for podocyte survival after nephron reduction

We next tried to identify the molecular link between Akt2 activation and podocyte modifications. Our data demonstrated that *Akt2* deficient podocytes are more susceptible to apoptosis after nephron reduction. Akt prevents apoptosis by modulating both anti- and pro-apoptotic molecules, such as Mdm2 or Gsk3¹⁰. Western blot analysis revealed that the phosphorylation of both Mdm2 and Gsk3 α was significantly increased in microdissected glomeruli two months after nephron reduction, but exclusively in *Akt2*^{+/+} mice (**Fig. 4a**). Immunohistochemistry confirmed the absence of P-Gsk3 α and P-Gsk3 β up-regulation in podocytes of *Akt2*^{-/-} mice (**Fig. 4b**).

Our results also showed that the remaining *Akt2*^{-/-} podocytes display ultrastructural changes that suggest cytoskeleton alterations. Rac1 is a small G protein belonging to the Rho family²⁶ that regulates many biological processes including cytoskeleton organization, cell cycle progression and apoptosis²⁶. Interestingly, excessive Rac1-GTP leads to foot process effacement, albuminuria and glomerulosclerosis in mice and humans^{27,28}. Using GST-Pak pull down assay, we observed that kidneys of sham-operated *Akt2*^{-/-} mice displayed a spontaneous higher amount of Rac1-GTP as compared with *Akt2*^{+/+} littermates (**Fig. 4c**). More importantly, whereas Rac1-GTP level did not change after nephron reduction in *Akt2*^{+/+} mice, it markedly increased in *Akt2*^{-/-} mice. Similarly, Rac1 activity was significantly increased in

damaged kidneys of 13-month old *Akt2*^{-/-} mice as compared with wild type littermates (**Supplementary Fig. 6**). Since two other Rho GTPase proteins, Cdc42 and RhoA have been shown to play a pivotal role in podocyte actin cytoskeleton regulation^{29,30}, we also assessed their activity. However, neither *Akt2* deletion nor nephron reduction affected the amount of both GTP bound Cdc42 and RhoA (**Fig. 4c**), indicating distinct modulations for each GTPase.

Akt function in podocytes is isoform specific

We observed that *Akt2* is particularly enriched in podocytes where its expression is crucial for adaptation to nephron reduction. Recent studies have revealed that, despite their high sequence homology, Akt isoforms may regulate distinct physiological phenomena³¹. In order to definitively rule out a role of *Akt1* in podocyte homeostasis, we studied the evolution of kidney function in *Akt1*^{-/-} and *Akt2*^{-/-} mice from 2 to 6 months. Since inactivation of *Akt1* gene was embryonic lethal in the lesion-prone FVB/N background (data not shown), we studied C57BL/6 *Akt1*^{-/-} and *Akt2*^{-/-} mice. Remarkably, urinary albumin excretion increased over the time, but exclusively in *Akt2*^{-/-} mice (**Fig. 5a**). Tubular casts, which are a morphological marker of proteinuria, were found only in kidneys of *Akt2*^{-/-} mice (**Fig. 5b**). More importantly, we observed that whereas *Akt2*^{-/-} podocytes displayed an effacement of foot processes and a decrease of cell survival, the morphology and the number of podocytes lacking *Akt1* did not differ from those of wild-type littermates (**Fig. 5c, d**). Of note, also when exposed to further nephron reduction, *Akt1*^{-/-} mice did not develop any apparent renal phenotype (**Supplementary Fig. 7a, b**). Consistently, Rac1 activity was found significantly increased only in kidneys of *Akt2*^{-/-} uninephrectomized mice (**Supplementary Fig. 7c**). Collectively, these data point to *Akt2* as the critical isoform acting in glomerular pathophysiology.

Podocyte specific *Akt2* deletion accelerates podocyte injury and proteinuria

Finally, to unequivocally determine the cell autonomous function of *Akt2* in podocytes, we generated podocyte-specific *Akt2* mutant mice (*Akt2*^{Δpod}) by crossing mice bearing floxed *Akt2*

alleles (*Akt2*^{fl^{ox}}) with a *Nphs2.Cre* deleter strain. Immunohistochemical analysis confirmed the marked reduction ($90 \pm 2\%$) of Akt2 protein expression in podocytes of mutant mice (**Fig. 6a**). *Akt2*^{Δ^{pod}} mice born in an expected Mendelian ratio and were indistinguishable from *Akt2*^{fl^{ox}} littermates at least up to six months after birth under physiological conditions (data not shown). However, when subjected to subtotal nephrectomy, *Akt2*^{Δ^{pod}} mice developed significantly proteinuria (**Fig. 6b**). Consistently, we observed a marked effacement of foot processes (**Fig. 6c**), suggesting a direct effect of Akt2 on podocyte cytoskeleton. To further characterize the function played by Akt2 in podocyte cytoskeleton maintenance, we generated different podocyte cell lines using shRNA lentivirus targeting either *Akt2* or *Akt1* (**Supplementary Fig. 8**). Phalloidin staining revealed that F-actin localized to the cell cortex, but also diffusely throughout the cell cytoplasm in control cells (**Fig. 6d, Supplementary Fig. 9a**). *Akt2* knockdown resulted in a completed reorganization of F-actin cytoskeleton and massive formation of focal adhesion processes, as judged by the increased number of paxillin patches (**Fig. 6d, f, Supplementary Fig. 9a**), a phenotype reminiscent of that reported in *Rictor* silenced cells³². In contrast, both the morphology of actin distribution and the pattern of paxillin staining were undistinguishable between in *Akt1* knockdown and control cells (**Fig. 6d, f, Supplementary Fig. 9a**). Both phenotypes were confirmed with two independent ShRNA direct against distinct *Akt1* and *Akt2* sequences.

Akt phosphorylation by mTORC2 is critical to prevent proteinuria in human CKD

Sirolimus, a specific inhibitor of mammalian target of rapamycin (mTOR), is a potent immunosuppressive drug currently used after transplantation³³. mTOR is a component of two complexes, mTORC1 that mediates S6 kinase and 4EBP phosphorylation, and mTORC2 that regulates Akt Ser⁴⁷³ phosphorylation. Sirolimus is an allosteric inhibitor acting on mTORC1 activity. However, long-term treatment can also affect Akt phosphorylation in particular cell types *via* mTORC2^{34,35}, including in cultured podocytes^{36,37}. A number of studies have

reported that, despite the fact sirolimus is not nephrotoxic, kidney transplant recipients might develop proteinuria upon sirolimus treatment³⁸. This side effect is predominantly observed in patients who suffer from predamaged grafts (and, consequently, more severe nephron reduction), suggesting that, as in mice, Akt activation might be required for glomerular adaptation to nephron reduction. To test this hypothesis, we studied a cohort of kidney transplant recipients treated or not with sirolimus, displaying different stages of renal failure. Only patients with severe nephron reduction developed albuminuria upon sirolimus treatment (**Fig. 7a, Supplementary Table 1**). A careful analysis of clinical variables known to affect CKD progression revealed that none of them accounted for the increase rate of urinary albumin excretion in these patients (**Supplementary Table 1, 2**). In particular, the age, the gender ratio, co-morbidities, i.e. diabetes, hypertension or acute cellular rejection, were comparable in the four groups of patients. Medications were also comparable, with the exception of calcineurin inhibitors which were given instead of sirolimus. Remarkably, we observed that whereas P-AKT (Ser⁴⁷³) was barely detectable in transplant biopsies from patients with preserved renal function, a strong staining was found in podocytes of patients with severe nephron reduction (**Fig. 7b, f**). Colocalization experiments confirmed that AKT is mainly activated in podocytes (**Fig. 7c, Supplementary Fig. 10a**). In addition, we observed that, as in mice, AKT2 is predominantly expressed in podocytes, whereas AKT1 was mainly located in tubules (**Supplementary Fig. 10b**). Sirolimus administration prevented the activation of AKT in patients with impaired renal function (**Fig. 7b, c, f, Supplementary Fig. 10a**), which was associated with increased glomerular apoptosis (**Fig. 7d, f**). More importantly, by studying P-AKT (Ser⁴⁷³) in sequential transplant biopsies, we showed a mechanistic association between the inhibition of AKT phosphorylation and the development of albuminuria (**Fig. 8**). In fact, whereas administration of sirolimus resulted in severe albuminuria and decreased AKT phosphorylation in the first patient (given as an example), its

removal restored the phosphorylation of AKT at Ser⁴⁷³ and reversed albuminuria in the second patient (**Fig. 8**).

Since long-term sirolimus treatment may affect both mTORC1 and mTORC2 activities *in vitro*^{34,36,37}, we finally thought that it was important to determine which of these two pathways was involved in the proteinuria-promoting effect of sirolimus. Immunohistochemical analysis of two downstream targets of mTORC1 revealed that podocytes were only occasionally stained for P-S6RP and P-4EBP and that phosphorylation was not enhanced in glomeruli of patients with compromised renal function (**Supplementary Fig. 11**). As a consequence, the staining remained undetectable in glomeruli of sirolimus-treated patients (**Supplementary Fig. 11**). In contrast, we observed that the expression of RICTOR, a critical component of mTORC2, was markedly increased in podocytes of patients with severe nephron reduction, and that sirolimus completely abolished such an increase (**Fig. 7e, f**). In order to provide further evidence in favor of mTORC2, we studied the activation of PKC α , another specific target of mTORC2. Although technical limitations prevented us from detecting PKC α phosphorylation (Ser⁶⁵⁷) in human biopsies using commercially available antibodies, we could confirm that nephron reduction resulted in marked PKC α activation in podocytes of subtotal nephrectomized mice (**Supplementary Fig. 12**). As expected, *Akt2* deficiency did not affect PKC α (Ser⁶⁵⁷) phosphorylation in damaged kidney of *Akt2* mutant mice (**Supplementary Fig. 12**), suggesting that Akt2 is a critical target of mTORC2 in stressed podocytes. In favor of this observation, we observed that differentiated podocytes treated by sirolimus over five days displayed the same morphological changes that those of *Akt2* silenced podocytes. In particular, the F-actin cytoskeleton was completely reorganized and a number of focal adhesion processes appeared (**Fig. 6d, e, f, Supplementary Fig. 9b**). Of note, a similar pattern was observed in *Akt1* knockdown podocytes treated with sirolimus, whereas any additive effect was evidenced when the compound was added to *Akt2* silenced cells (**Fig. 6e,**

f, Supplementary Fig. 9b). Collectively, these results point to mTORC2/AKT2 inhibition as a critical mediator of sirolimus induced proteinuria.

DISCUSSION

The molecular pathways that counteract the stress imposed by compensation following nephron reduction are largely unknown. By combining experimental models of nephron reduction with *Akt1*, *Akt2* and *Akt2^{flox}* mutant mice, we have uncovered a novel function for Akt proteins and showed that Akt2, but not Akt1, plays a critical role in podocyte adaptation to nephron reduction. Inactivation of the *Akt2* gene resulted in podocyte apoptosis and foot process effacement after both experimental and aging-induced nephron reduction, which led to severe proteinuria and glomerulosclerosis. Furthermore, we have identified Gsk3, Mdm2 and Rac1 as potential intermediates between Akt2 activation and podocyte survival. More importantly, we have shown that these experimental observations were relevant to human diseases. In kidney transplant recipients with severe nephron reduction, treatment by sirolimus decreased the phosphorylation of AKT2 in podocytes resulting in marked proteinuria and podocyte loss. Notably, the deleterious effect of sirolimus seemed to be mediated by mTORC2 inhibition. These results unveil a novel molecular pathway of podocyte adaptation to stress and show that Akt2 acts as a survival factor whose activation might mark patients at risk to develop proteinuria after treatment with mTOR inhibitors.

Although many studies have been conducted to elucidate the molecular mechanisms leading to podocyte injury during CKD³⁹⁻⁴³, 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 Akt as the kinase that prevents podocyte dedifferentiation and loss in this setting. In fact, we observed that Akt is activated in podocytes in response to nephron reduction, consistent with previous *in vitro* studies reporting an activation of Akt in cultured podocytes submitted to stress⁴⁴. More importantly, we demonstrated that the preclusion of such activation by *Akt2* gene disruption or sirolimus treatment led to morphological and functional podocyte damage in both humans and mice. Furthermore, we provide strong

evidence for a cell autonomous effect. First, Akt2 displayed a strong and specific expression pattern in podocytes. Second, *Akt2* deletion completely abrogated the activation of Akt as well as that of its down-stream signaling pathway in response to nephron reduction specifically in podocytes. Third, *Akt2* deletion did not induce significant systemic changes that could participate in glomerular injury, such as diabetes or hypertension. More importantly, the specific deletion of *Akt2* gene in podocytes blunted the adaptive response to nephron reduction. It is noteworthy that, consistent with its expression pattern, the absence of Akt2 did not affect the development of early tubulo-interstitial lesions, suggesting that specific molecular pathways are involved in glomerular and tubular adaptation. However, in agreement with the idea that injured glomeruli may affect the fate of tubules⁷, the progression of tubulo-interstitial lesions were faster in *Akt2*^{-/-} mice over the time.

Phenotypic analyses of *Akt* isoform knockout mice revealed both specific and redundant functions for each isoform^{21,24,45}. In this study, we found a striking dichotomy of Akt isoform distribution in the kidney with a preferential location of Akt2 to podocytes. More importantly, we demonstrated that this location is functionally relevant: *Akt2*^{-/-}, but not *Akt1*^{-/-} mice, displayed a glomerular phenotype. Similarly, *Akt2*, but not *Akt1*, silencing resulted in cytoskeleton rearrangement in cultured differentiated podocytes. Intriguingly, although immunohistochemistry failed to detect significant amounts of Akt1 in glomeruli, western blot experiments clearly showed that this isoform is also expressed in glomeruli. It is likely that technical limitations account for these discrepancies. Although we cannot completely rule out the possibility that Akt1 has a function in *Akt2*^{-/-} glomeruli under physiological conditions, our data clearly showed that this isoform is not sufficient to compensate for the lack of Akt2 in glomerular homeostasis after nephron reduction.

One of the most prominent features of podocytes is the very specific organization of the cytoskeleton that appears crucial for their proper function⁴⁶. Indeed, a strong correlation has been recently shown between podocyte cytoskeleton modifications and podocyte-enhanced migratory properties and the development of albuminuria and glomerulosclerosis^{40,47,48}. Interestingly, the ability to regulate cytoskeleton organization and migration diverge dramatically between the Akt isoforms⁴⁹. *Akt1*^{-/-} mouse embryonic fibroblasts have reduced migratory properties and prominent stress fibers, whereas those from *Akt2*^{-/-} mice have enhanced migratory properties and lamellipodia formation⁴⁹. Consistently, *Akt1* and *Akt2* silencing differently affected cytoskeleton organization in culture differentiated podocytes. More importantly, *Akt2*^{-/-}, but not *Akt1*^{-/-}, kidneys displayed an up-regulation of Rac1, a key regulator of cell migration and lamellipodia formation. Loss of Rac1 inhibition has been recently shown to induce foot process effacement, albuminuria and glomerulosclerosis²⁷, suggesting that Rac1 activation in *Akt2*^{-/-} stressed podocytes might be mechanistically involved in their morphological changes. It should be noted that Akt2, but not Akt1, has been shown to inhibit Rac1 in mouse embryonic fibroblasts⁴⁹. Hence, we propose that by its selective ability to control cytoskeleton organization, the Akt2 isoform has a specific function in podocyte biology.

Akt2 has also been shown to be the critical isoform mediating insulin receptor signaling in skeletal muscle and liver^{24,25}. A recent study has shown that the insulin receptor is also expressed and acts in podocytes⁵⁰. Indeed, podocyte-specific insulin receptor inactivation resulted in podocyte loss and foot process effacement leading to progressive glomerular disease⁵⁰. This phenotype is highly reminiscent of what we observed in aging *Akt2*^{-/-} mice. Moreover, paralleling our observation, insulin receptor activation reduced Rac1 and enhanced Rho activity in cultured podocytes⁵⁰. Taking all these data together, it is tempting to speculate that Akt2 is the critical link between the insulin receptor and podocyte homeostasis. Since

defective insulin signaling in podocytes is emerging as a critical determinant of diabetic nephropathy, Akt2 may represent a novel therapeutic target in this very common disease.

In the present study we also observed that *Akt2* gene inactivation led to increased podocyte loss after nephron reduction by enhancing apoptosis. Akt is known to prevent apoptosis by inhibiting several actors involved in the control of cell death⁵¹⁻⁵³. In particular, Mdm2, an E3 ubiquitin-ligase that modulates p53 stability, and Gsk-3, a serine/threonine kinase that controls caspase 3 activity, have been shown to be critical targets. Interestingly, we observed that Akt deficiency prevented both Mdm2 and Gsk-3 activation after nephron reduction, suggesting that the phosphorylation of these molecules is critical for podocyte survival after nephron reduction. On the other hand, the increase of Rac1 activity may be also involved in *Akt2*^{-/-} podocyte loss, since this GTPase has been shown to control apoptosis in several pathophysiological conditions^{26,54}. Interestingly, a recent study, using podocyte-specific inactivation of the *Atg5* gene, has suggested that also autophagy may be involved in the maintenance of podocyte during aging⁵⁵. Although Akt/mTORC1 is usually considered as an inhibitor of autophagy⁵⁶, the similarity between *Akt2*^{-/-} and *Atg5*^{-/-} in aging mice raises the possibility of an interplay between Akt2 and autophagy in podocyte biology⁵⁵. Whether Akt2 is also involved in the control of autophagy in podocytes requires further investigations.

Sirolimus is known to induce albuminuria in renal transplant recipients with compromised renal function, but the mechanism involved is unknown³⁶. Our results strongly suggest that, by preventing the compensatory phosphorylation of AKT in podocytes, sirolimus led to albuminuria in patients with significant nephron reduction. Moreover, we discovered that mTORC2 is the crucial target of sirolimus in this situation. So far, it has been accepted that sirolimus acts mainly by inhibiting mTORC1. However, recent *in vitro* studies have shown that prolonged exposure to the drug can lead to mTORC2 inhibition^{34,36,37}. It is worthy to note

that our patients were treated by sirolimus for several months. Notably, an elegant study has very recently provided the physiopathological evidence for an uncoupled effect of rapamycin on mTOR complexes *in vivo*, with a predominant role of mTORC1 inhibition in extended lifespan and of mTORC2 disruption in insulin resistance⁵⁷. In line with these observations, it has been recently shown that the specific inactivation of *rictor* in stressed podocytes results in increased proteinuria⁵⁸, whereas haploinsufficiency of *raptor* ameliorates the progression of glomerular lesions^{58,59}, indicating a dichotomy of mTOR complexes function in glomerular pathophysiology. By demonstrating for the first time that mTORC2 inhibition by sirolimus is clinically relevant, our study extends these experimental observations to human pathology. Because of the key role played by the Akt pathway in several pathological conditions, including cancer and cardiovascular disease, we can anticipate a growing use of Akt inhibitors in therapies⁶⁰. In this regard, our results add, at least, two important contributions. First, we have identified a sensitive way to predict the adverse effect of sirolimus on renal function. Determining mTORC2/AKT2 activation in podocytes may identify patients with the highest risk to develop proteinuria. Second, since we showed that albuminuria is linked to mTORC2/AKT2 inhibition, we expect that specific TORC1 or AKT1 targeting therapies should be a valuable strategy to overcome this side effect in patients with reduced renal function.

In conclusion, this work has established mTORC2/Akt2 as a stress-responsive axis in podocyte biology that prevents cytoskeleton alteration and apoptosis after nephron reduction. Disruption of this adaptive pathway leads to glomerular lesions and albuminuria in both humans and mice. Therefore, Akt2 in podocytes may be both a prognostic marker to predict the deleterious proteinuric effect of mTOR inhibitors and as well as a therapeutic target for the maintenance of glomerular functions to prolong renal survival during chronic renal disease.

METHODS

Animals

Mice used for these studies were FVB/N and C57BL/6 (Charles River), *Akt1*^{-/-45}, *Akt2*^{-/-24}, *Akt2*^{flox/flox61} and *Nphs2.Cre*⁶² mice. *Akt1*^{-/-} and *Akt2*^{-/-} mice were bred onto an FVB/N genetic background for at least 10 generations. *Akt2*^{flox/flox} mice were crossed with *Nphs2.Cre* mice to generate podocyte-specific *Akt2* knockout mice (*Akt2*^{Δpod}).

Animals were fed *ad libitum* and housed at constant ambient temperature in a 12-hour light cycle. Animal procedures were approved by the Departmental Director of “Services Vétérinaires de la Préfecture de Police de Paris” and by the ethical committee of the Paris Descartes University.

Several groups of mice were investigated in complementary studies. For subtotal nephrectomy studies, FVB/N *Akt2*^{-/-} mice were subjected to 75% nephrectomy (Nx; n = 6-10) or sham-operation (Controls; n = 4-6) and mice were sacrificed 2 months after surgery. One week before sacrifice, blood pressure was recorded in both sham-operated (n = 3) and subtotally nephrectomized (n = 6) awake *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice for 2 consecutive days, using tail-cuff plethysmography and PowerLab/4SP software (AD Instruments). C57BL/6 *Akt2*^{flox/flox} (n=16) and *Akt2*^{Δpod} (n=18) males and females mice were also subjected to 75% nephrectomy and sacrificed 1 month after surgery. Subtotal nephrectomy was performed as previously described⁶³. After surgery, mice were fed a defined diet containing 30% casein and 0.5% sodium. Twenty-four hours before sacrifice, blood was collected from the tail vein of overnight-fasted mice for determination of fasting glucose levels and urine for determination of proteinuria. For aging nephropathy studies on FVB/N background, 4-6 *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice were followed, respectively, and urine were collected at 2, 4, 6, 9, 12 and 13 months. Mice were sacrificed at 13 months of age. For aging nephropathy studies on C57BL/6 background, wild type, *Akt1*^{-/-} and *Akt2*^{-/-} mice were followed (n = 5-11 for each genotype),

and urine were collected at 3 and 6 months. At 6 months, one kidney was removed for morphological analysis and mice were sacrificed 3 months later. At the time of sacrifice, kidneys were removed for morphological, protein and microdissection studies.

Clinical samples

The study was conducted on 80 renal transplant recipients followed at the Renal Transplant Department of Necker hospital. The patients were divided into four groups: 1) patients (n = 13) fulfilling the criteria of sirolimus-induced albuminuria, i.e. (i) the occurrence of a severe albuminuria (> 3 g/day), (ii) no other causes of post-transplant albuminuria, and (iii) a reduction of 50% of albuminuria after sirolimus withdrawal or significant dosage reduction, 2) patients (n = 25) matched for glomerular filtration rate, as estimated by MDRD formula (eGFR) who did not receive sirolimus; 3) patients (n = 22) with sirolimus treatment that did not develop albuminuria; 4) patients (n = 20) with preserved renal function (eGFR > 60 mL/mn/1.73m²) who did not receive sirolimus. Patient demographic and clinical characteristics are listed in Supplementary Table 1 and the details for each patient are provided in Supplementary Table 2. In the sirolimus induced proteinuria group, 9 patients received sirolimus as an initial immunosuppressive regimen after enrolment in Wyeth Sirolimus study 219, whereas 4 additional patients were switch from calcineurin inhibitor to sirolimus due to calcineurin inhibitor toxicity. In the sirolimus group without proteinuria, all the patients received sirolimus as an initial immunosuppressive regimen. This protocol was approved by the Institutional Review Board of Necker Hospital; informed written consent was obtained from each patient.

Cell cultures

Mouse immortalized podocytes were cultured as previously described⁶⁴. Briefly, cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin. To propagate podocytes, cells were cultivated at 33°C on

type I collagen (permissive conditions) in culture medium supplemented with 10UI/ml recombinant interferon- γ . To induce differentiation, podocytes were maintained on type I collagen at 37°C without supplementation with interferon- γ (non permissive conditions). For sirolimus experiments, cells were treated with sirolimus 10 ng/mL for 5 days before performing immunofluorescence. Each experiment was performed in duplicate and repeated at least three times.

Lentiviral production and transfection

Lentiviral shRNA plasmids for *Akt1* and *Akt2* were obtained from Sigma-Aldrich. We used a target set of 5 clones for each target with pLKO.1-puro as backbone (TRCN0000022934, TRCN0000022935, TRCN0000022936, TRCN0000022937 and TRCN0000054707 for *Akt1* and TRCN0000055258, TRCN0000055259, TRCN0000055260, TRCN0000022669 and TRCN0000022670 for *Akt2*). The lentiviral particles were produced by co-transfection of HEK293T cells with three plasmids (pMD2G, psPAX2, and the plasmid vector) using calcium phosphate method. Cells were infected in the presence of 8 μ g/ml polybrene over night, and were selected 2 days after viral transduction in puromycin (1 μ g/ml) to achieve 100% positive cells. For each targeted *Akt* isoform, two lentiviral constructs were selected for the subsequent experiments, according to the level and the selectivity of Akt1 or Akt2 protein reduction as evaluated by western blot.

Urine and plasma analyses

For mouse samples, urinary albumin, glucose and creatinine concentrations were measured using an Olympus multiparametric analyzer (Instrumentation Laboratory). In addition, Coomassie gels were used to visualize albuminuria. Blood glucose levels were determined using a glucotrend glucometer (Roche Diagnostics).

For human samples, urinary creatinine and albumin were determined using a Hitachi 917 analyzer (Roche Diagnostics), whereas plasma creatinine and sirolimus were evaluated using

a Synchron Cx4 autoanalyser (Beckman Coulter) and high-performance liquid chromatography, respectively.

Morphological analysis

Mouse kidneys were fixed in 4% paraformaldehyde, paraffin embedded, and 4- μ m sections were stained with periodic acid Schiff (PAS), Masson's trichrome, hematoxylin and eosin (H&E) and picro-sirius red. The degree of glomerular lesions was evaluated using semiquantitative score methodology as previously described²⁰. The degree of tubular dilation and interstitial fibrosis was automatically quantified using a Nikon digital camera Dx/m/1200 and Lucia software (Laboratory Imaging Ltd) as previously described⁶⁵.

Human transplant biopsies were fixed in alcohol-formalin-acetic acid solution (AFA) and embedded in paraffin. Sections (4 μ m) were stained with PAS, Masson's trichrome and H&E. For each biopsy, examination was based on the Banff'07 scoring system reference⁶⁶.

Electron microscopy studies were performed as previously described⁶⁷.

Immunohistochemistry and immunofluorescence

For mouse samples, 4- μ m sections of paraffin-embedded kidneys were incubated with anti-Akt1 antibody (Cell Signaling Technology), anti-Akt2 antibody (Cell Signaling Technology), anti-pan-P-Gsk3 antibody (Cell Signaling Technology), anti-P-Akt (Ser⁴⁷³) antibody (Cell Signaling Technology), anti-P-Gsk3 α antibody (Cell Signaling Technology), anti-P-Gsk3 β antibody (Cell Signaling Technology), anti-P-Mdm2 antibody (Cell Signaling Technology), anti-Tsc2 antibody (Cell Signaling Technology), anti-Foxo1 antibody (Cell Signaling Technology), anti-P-PKC α (S⁶⁵⁷) antibody (Cell Signaling Technology), anti-nephrin antibody (Progen), anti-WT1 antibody (Dako), anti-podocin antibody (a gift of Corinne Antignac), and anti- α Sma antibody (Sigma, A2547). For P-Gsk3 α and P-Gsk3 β , the glomerular-stained area was automatically quantified using a Nikon digital camera Dx/m/1200 and Lucia software and expressed as the percentage of the podocyte-stained area

upon the total glomerular area. To quantify the hypertrophy of renal large and small arteries, the α Sma stained area was automatically quantified for each vessel using the same system described above. All the microscopic fields of a whole kidney section were quantified.

For human samples, 4- μ m sections of paraffin-embedded kidneys were incubated with P-Akt Ser⁴⁷³ antibody (Cell Signaling Technology), anti-podocin antibody, anti-Rictor antibody (Cell Signaling Technology), anti-P-S6RP antibody (Cell Signaling Technology) and anti-P-4EBP1 antibody (Cell Signaling Technology). For each antibody, the intensity of the staining was determined using a semi quantitative score methodology based on a 0-2 staining scale; 0, 1 and 2 correspond to 0%, 1-50% and > 50% of positive-podocytes for glomerulus. All the glomeruli of a single section were counted.

Differentiated podocytes were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min, permeabilized in PBS containing 0.2% Triton X-100, then incubated with anti-Paxillin antibody (BD Transduction Laboratories) and Phalloidin-TRITC (Sigma).

Immunofluorescence studies were analyzed using the confocal microscope Zeiss LSM 700. Quantification were performed using Image J software.

Cell proliferation assay

Proliferative cells were detected in mouse kidney using proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining. Four- μ m sections of paraffin-embedded kidneys were incubated with a mouse anti-PCNA antibody (DAKO) at 1:50, followed by a sheep HRP-conjugated anti-mouse antibody (Amersham) at 1:100. Staining was revealed by DAB. The glomerular proliferation index was calculated as the number of glomeruli with at least one PCNA-positive nuclei for the total number of glomeruli. All the microscopic fields of a whole kidney section were quantified.

Apoptosis assay

Apoptosis was detected in 4- μ m sections of paraffin-embedded kidneys by TUNEL assay using the In Situ Cell Death Detection kit (Roche) according to the manufacturer's protocol. The glomerular apoptotic index was calculated as the number of glomeruli with at least one TUNEL-positive nuclei for the total number of glomeruli. All the microscopic fields of a whole kidney section were quantified.

Isolation of adult mice glomeruli by laser capture microdissection

Thirty micrometer frozen kidney sections were fixed in absolute ethanol and stained with eosin Y. Glomeruli were selectively dissected using the Palm MicroBeam laser microdissection microscope (Zeiss). A total of 1200 glomerular structures were microdissected from each mouse and proteins were extracted with the appropriate buffer.

Western blot

Western blots were performed as previously described^{65,68}. Briefly, protein extracts from kidneys were resolved by SDS-PAGE before being transferred onto the appropriate membrane and incubated with anti-P-Akt Ser⁴⁷³ antibody (Cell Signaling Technology), anti-Akt1 antibody (Cell Signaling Technology), anti-Akt2 antibody (Cell Signaling Technology), anti-P-Gsk3 α antibody (Cell Signaling Technology), anti-P-Mdm2 antibody (Cell Signaling Technology), anti-Rac1 antibody (Upstate Biotechnology), anti-Cdc42 antibody (Cytoskeleton), anti-RhoA antibody (Cytoskeleton) and anti- β actin antibody (Sigma-Aldrich), followed by the appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody. Chemiluminescence was acquired using a Fusion FX7 camera (Vilbert Lourmat) and densitometry was performed using Bio1D software (Certain Tech).

Rho GTPase activation assay

RhoA and Cdc42 activities were measured using a commercially available kit (Cytoskeleton) according to the manufacture's instructions. For Rac1 activity, a PAK1-GST fusion protein expressing vector (a gift of Rodrick Montjean) was used to transform the BL21 strain of

Escherichia coli. The fusion protein was purified with glutathione-Sepharose 4B beads (Amersham). The beads were incubated with kidney lysate for 1 hour at 4°C. Then the beads were washed in lysis buffer and the pulled down fraction of Rac1 was resolved by immunoelectrophoresis.

Data analysis and statistics

Data were expressed as means $\pm$ SEM. Differences between the experimental groups were evaluated using ANOVA, followed when significant ($P < 0.05$) by the Tukey-Kramer test. When only two groups were compared, Mann-Whitney tests were used. The statistical analysis was performed using Graph Prism Software.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Laure-Hélène Noël and the clinicians of the Renal Transplant Department of Necker hospital for patient data and sample collection. We are grateful to Morris J Birnbaum for *Akt* mutant mice, to Corinne Antignac for anti-podocin antibodies and and Rodrick Montjean for PAK1-GST fusion protein expression vector. We thank Marco Pontoglio, Marie-Claire Gubler, Corinne Antignac, Charlotte Sumida and Scott Harvey for critical advice. This work was supported by INSERM, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, AP-HP, Fondation de la Recherche Médicale (DEQ20061107968 grant), AIRG, AURA (Paris) and Roche Laboratories.

REFERENCES

1. Heron, M., et al. Deaths: final data for 2006. *Natl Vital Stat Rep* 57, 1-134 (2009).
2. U S Renal Data System, *USRDS 2010 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States*, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD. (2010).
3. Eknoyan, G., et al. The burden of kidney disease: improving global outcomes. *Kidney international* 66, 1310-1314 (2004).
4. Go, A.S., Chertow, G.M., Fan, D., McCulloch, C.E. & Hsu, C.Y. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *The New England journal of medicine* 351, 1296-1305 (2004).
5. Hostetter, T.H. Progression of renal disease and renal hypertrophy. *Annual review of physiology* 57, 263-278 (1995).
6. Hostetter, T.H. Hyperfiltration and glomerulosclerosis. *Seminars in nephrology* 23, 194-199 (2003).
7. Kriz, W. & LeHir, M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases- insights from animal models. *Kidney international* 67, 404-419 (2005).
8. Franke, T.F. Intracellular signaling by Akt: bound to be specific. *Science signaling* 1, pe29 (2008).
9. Ceci, M., Ross, J., Jr. & Condorelli, G. Molecular determinants of the physiological adaptation to stress in the cardiomyocyte: a focus on AKT. *J Mol Cell Cardiol* 37, 905-912 (2004).
10. Manning, B.D. & Cantley, L.C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274 (2007).

11. Oudit, G.Y., et al. Loss of PTEN attenuates the development of pathological hypertrophy and heart failure in response to biomechanical stress. *Cardiovasc Res* 78, 505-514 (2008).
12. Wu, M., Falasca, M. & Blough, E.R. Akt/protein kinase B in skeletal muscle physiology and pathology. *J Cell Physiol* 226, 29-36 (2011).
13. Tejada, T., et al. Failure to phosphorylate AKT in podocytes from mice with early diabetic nephropathy promotes cell death. *Kidney international* 73, 1385-1393 (2008).
14. Stylianou, K., et al. The PI3K/Akt/mTOR pathway is activated in murine lupus nephritis and downregulated by rapamycin. *Nephrol Dial Transplant* 26, 498-508 (2011).
15. Chuang, P.Y. & He, J.C. Signaling in regulation of podocyte phenotypes. *Nephron Physiol* 111, p9-15 (2009).
16. Shankland, S.J. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney international* 69, 2131-2147 (2006).
17. Mundel, P. & Reiser, J. Proteinuria: an enzymatic disease of the podocyte? *Kidney international* 77, 571-580 (2010).
18. Zhu, J., et al. Nephrin mediates actin reorganization via phosphoinositide 3-kinase in podocytes. *Kidney international* 73, 556-566 (2008).
19. Huber, T.B., et al. Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling. *Molecular and cellular biology* 23, 4917-4928 (2003).
20. Pillebout, E., et al. Proliferation and remodeling of the peritubular microcirculation after nephron reduction: association with the progression of renal lesions. *The American journal of pathology* 159, 547-560 (2001).

21. Tschopp, O., et al. Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development (Cambridge, England)* 132, 2943-2954 (2005).
22. Laouari, D., et al. TGF-alpha mediates genetic susceptibility to chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 22, 327-335 (2011).
23. Yumura, W., et al. Age-associated changes in renal glomeruli of mice. *Experimental gerontology* 24, 237-249 (1989).
24. Cho, H., et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science (New York, N.Y)* 292, 1728-1731 (2001).
25. Garofalo, R.S., et al. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *The Journal of clinical investigation* 112, 197-208 (2003).
26. Jaffe, A.B. & Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual review of cell and developmental biology* 21, 247-269 (2005).
27. Shibata, S., et al. Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: implication in proteinuric kidney disease. *Nature medicine* 14, 1370-1376 (2008).
28. Akilesh, S., et al. Arhgap24 inactivates Rac1 in mouse podocytes, and a mutant form is associated with familial focal segmental glomerulosclerosis. *The Journal of clinical investigation* 121, 4127-4137 (2011).
29. Scott, R.P., et al. Podocyte-Specific Loss of Cdc42 Leads to Congenital Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* (2012).
30. Faul, C., et al. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nature medicine* 14, 931-938 (2008).

31. Gonzalez, E. & McGraw, T.E. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* 8, 2502-2508 (2009).
32. Sarbassov, D.D., et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 14, 1296-1302 (2004).
33. Kreis, H., et al. Long-term benefits with sirolimus-based therapy after early cyclosporine withdrawal. *J Am Soc Nephrol* 15, 809-817 (2004).
34. Sarbassov, D.D., et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular cell* 22, 159-168 (2006).
35. Laplante, M. & Sabatini, D.M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274-293 (2012).
36. Letavernier, E., et al. Sirolimus interacts with pathways essential for podocyte integrity. *Nephrol Dial Transplant* 24, 630-638 (2009).
37. Vollenbroeker, B., et al. mTOR regulates expression of slit diaphragm proteins and cytoskeleton structure in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 296, F418-426 (2009).
38. Letavernier, E., Pe'raldi, M.N., Pariente, A., Morelon, E. & Legendre, C. Proteinuria following a switch from calcineurin inhibitors to sirolimus. *Transplantation* 80, 1198-1203 (2005).
39. Niranjana, T., et al. The Notch pathway in podocytes plays a role in the development of glomerular disease. *Nature medicine* 14, 290-298 (2008).
40. Wei, C., et al. Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nature medicine* 14, 55-63 (2008).
41. Reiser, J., et al. Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *The Journal of clinical investigation* 113, 1390-1397 (2004).

42. Dai, C., et al. Wnt/beta-catenin signaling promotes podocyte dysfunction and albuminuria. *J Am Soc Nephrol* 20, 1997-2008 (2009).
43. Ma, H., et al. Inhibition of podocyte FAK protects against proteinuria and foot process effacement. *J Am Soc Nephrol* 21, 1145-1156 (2010).
44. Faour, W.H., Thibodeau, J.F. & Kennedy, C.R. Mechanical stretch and prostaglandin E2 modulate critical signaling pathways in mouse podocytes. *Cell Signal* 22, 1222-1230 (2010).
45. Cho, H., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Feng, F. & Birnbaum, M.J. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *The Journal of biological chemistry* 276, 38349-38352 (2001).
46. 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).
47. Reiser, J., et al. Podocyte migration during nephrotic syndrome requires a coordinated interplay between cathepsin L and alpha3 integrin. *The Journal of biological chemistry* 279, 34827-34832 (2004).
48. Yanagida-Asanuma, E., et al. Synaptopodin protects against proteinuria by disrupting Cdc42:IRSp53:Mena signaling complexes in kidney podocytes. *The American journal of pathology* 171, 415-427 (2007).
49. Zhou, G.L., et al. Opposing roles for Akt1 and Akt2 in Rac/Pak signaling and cell migration. *The Journal of biological chemistry* 281, 36443-36453 (2006).
50. Welsh, G.I., et al. Insulin signaling to the glomerular podocyte is critical for normal kidney function. *Cell metabolism* 12, 329-340 (2010).
51. Jope, R.S. & Johnson, G.V. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends in biochemical sciences* 29, 95-102 (2004).

52. Gottlieb, T.M., Leal, J.F., Seger, R., Taya, Y. & Oren, M. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene* 21, 1299-1303 (2002).
53. Zhou, B.P., et al. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nature cell biology* 3, 973-982 (2001).
54. Shen, E., et al. Rac1 is required for cardiomyocyte apoptosis during hyperglycemia. *Diabetes* 58, 2386-2395 (2009).
55. Hartleben, B., et al. Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. *The Journal of clinical investigation* 120, 1084-1096 (2010).
56. Jung, C.H., Ro, S.H., Cao, J., Otto, N.M. & Kim, D.H. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* 584, 1287-1295 (2010).
57. Lamming, D.W., et al. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science (New York, N.Y)* 335, 1638-1643 (2012).
58. Godel, M., et al. Role of mTOR in podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice. *The Journal of clinical investigation* 121, 2197-2209 (2011).
59. Inoki, K., et al. mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. *The Journal of clinical investigation* 121, 2181-2196 (2011).
60. Lindsley, C.W., Barnett, S.F., Layton, M.E. & Bilodeau, M.T. The PI3K/Akt pathway: recent progress in the development of ATP-competitive and allosteric Akt kinase inhibitors. *Current cancer drug targets* 8, 7-18 (2008).
61. Lu, M., et al. Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1. *Nature medicine* 18, 388-395 (2012).

62. Moeller, M.J., Sanden, S.K., Soofi, A., Wiggins, R.C. & Holzman, L.B. Podocyte-specific expression of cre recombinase in transgenic mice. *Genesis* 35, 39-42 (2003).
63. Terzi, F., et al. Targeted expression of a dominant-negative EGF-R in the kidney reduces tubulo-interstitial lesions after renal injury. *The Journal of clinical investigation* 106, 225-234 (2000).
64. Shankland, S.J., Pippin, J.W., Reiser, J. & Mundel, P. Podocytes in culture: past, present, and future. *Kidney international* 72, 26-36 (2007).
65. Viau, A., et al. Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *The Journal of clinical investigation* 120, 4065-4076 (2010).
66. Solez, K., et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 8, 753-760 (2008).
67. Mollet, G., et al. Podocin inactivation in mature kidneys causes focal segmental glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 20, 2181-2189 (2009).
68. Lautrette, A., et al. Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases: a new therapeutic approach. *Nature medicine* 11, 867-874 (2005).

Figure 1: Nephron reduction activates Akt pathway in podocytes. (a) Representative frozen section of a glomerulus before and after laser capture microdissection. (b) Western blot of Akt phosphorylation of Ser⁴⁷³ on laser microdissected glomerular extracts from kidneys of sham-operated (Sh) and 75% nephrectomized (Nx) FVB/N mice, 2 months after surgery. (c) Colocalization between P-Akt (Ser⁴⁷³) and podocin in kidneys of Nx FVB/N mice. (d) Immunostaining and quantification of Gsk3 α and Gsk3 β phosphorylation in Sh and Nx mice, 2 months after surgery. (e) Colocalization between P-Gsk3 α and nephrin, a podocyte specific protein, in kidneys of Nx FVB/N mice. (f) Immunostaining of Akt1 and Akt2 proteins in Sh and Nx FVB/N mice 2 months after surgery. *Akt1*^{-/-} and *Akt2*^{-/-} mice served as control of antibody specificity (C⁻). (g) Colocalization between Akt2 (brown staining) and WT1 (blue staining), a podocyte specific protein. *Akt2*^{-/-} mice served as control. Pictures are representative samples from at least 6 mice from each group. Scale bar: 50 μ m. Data are means $\pm$ SEM; n = 4-6 and 6-10 for Sh and Nx, respectively. Mann-Whitney test: Sh *versus* Nx mice * P < 0.05, ** P < 0.01.

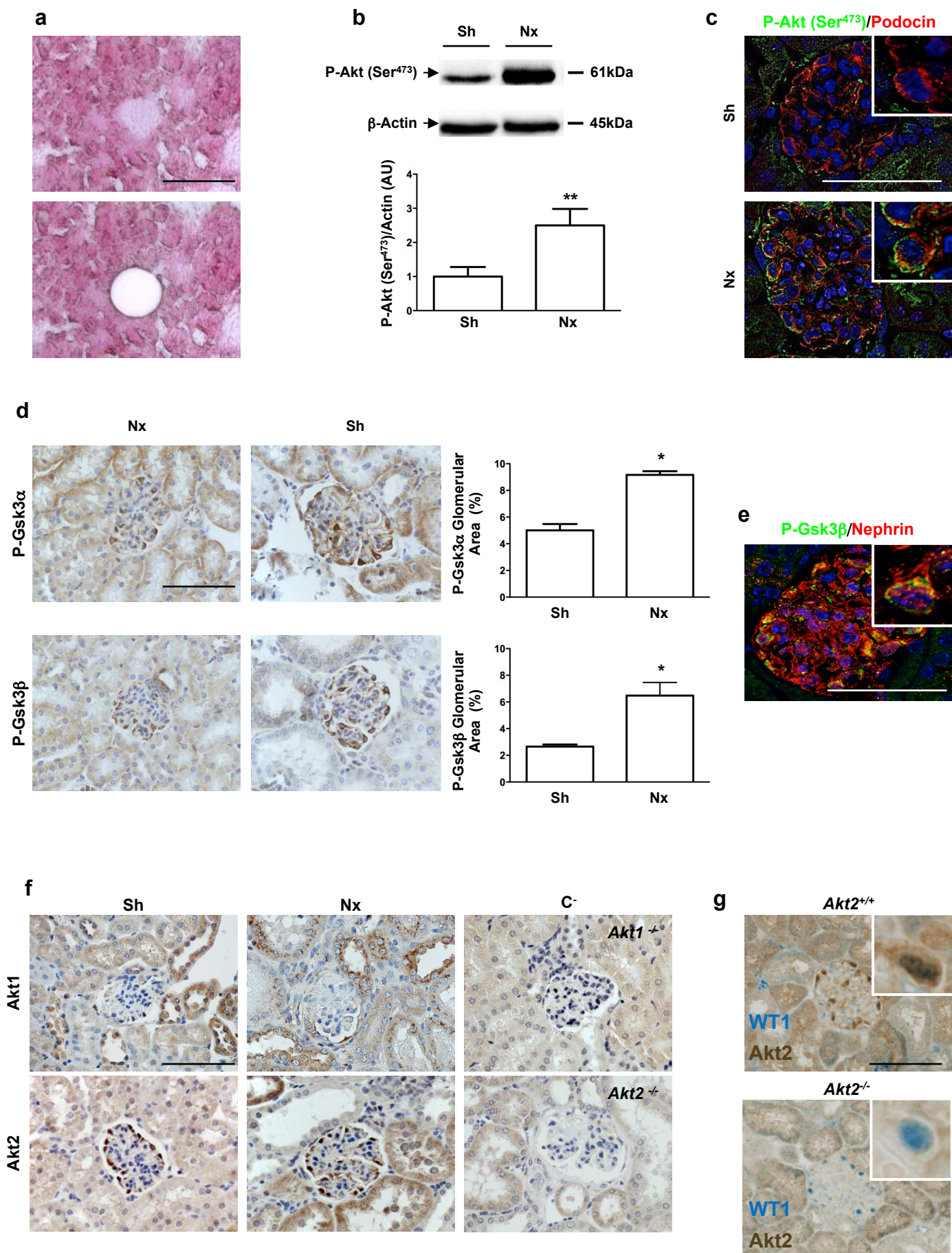


Figure 1

Figure 2: *Akt2* deficiency accelerates the development of glomerular lesions. (a) Morphology and lesion scores of kidneys from sham-operated (Sh) and 75% nephrectomized (Nx) *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice, 2 months after surgery. (b) Coomassie staining (left panel) and measure of albumin to creatinine ratio (mg/mmol) (right panel) in urine from Sh and Nx *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice, 2 months after surgery. Bovine Serum Albumin served as control (C⁺) for Coomassie staining. (c) Western blot and quantification of P-Akt (Ser⁴⁷³) in laser microdissected glomerular extracts from kidneys of Sh and Nx *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice, 2 months after surgery. (d) Western blot and quantification of Akt1 and Akt2 in laser microdissected glomerular extracts from kidneys of Sh and Nx *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice, 2 months after surgery. Pictures are representative samples from at least 6 mice from each group. Scale bar: 50 μ m. Data are means $\pm$ SEM; n = 4-6 and 6-10 for Sh and Nx, respectively. ANOVA followed by Tukey-Kramer test; Sh *versus* Nx mice: * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001; *Akt2*^{-/-} *versus* *Akt2*^{+/+} mice: # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001.

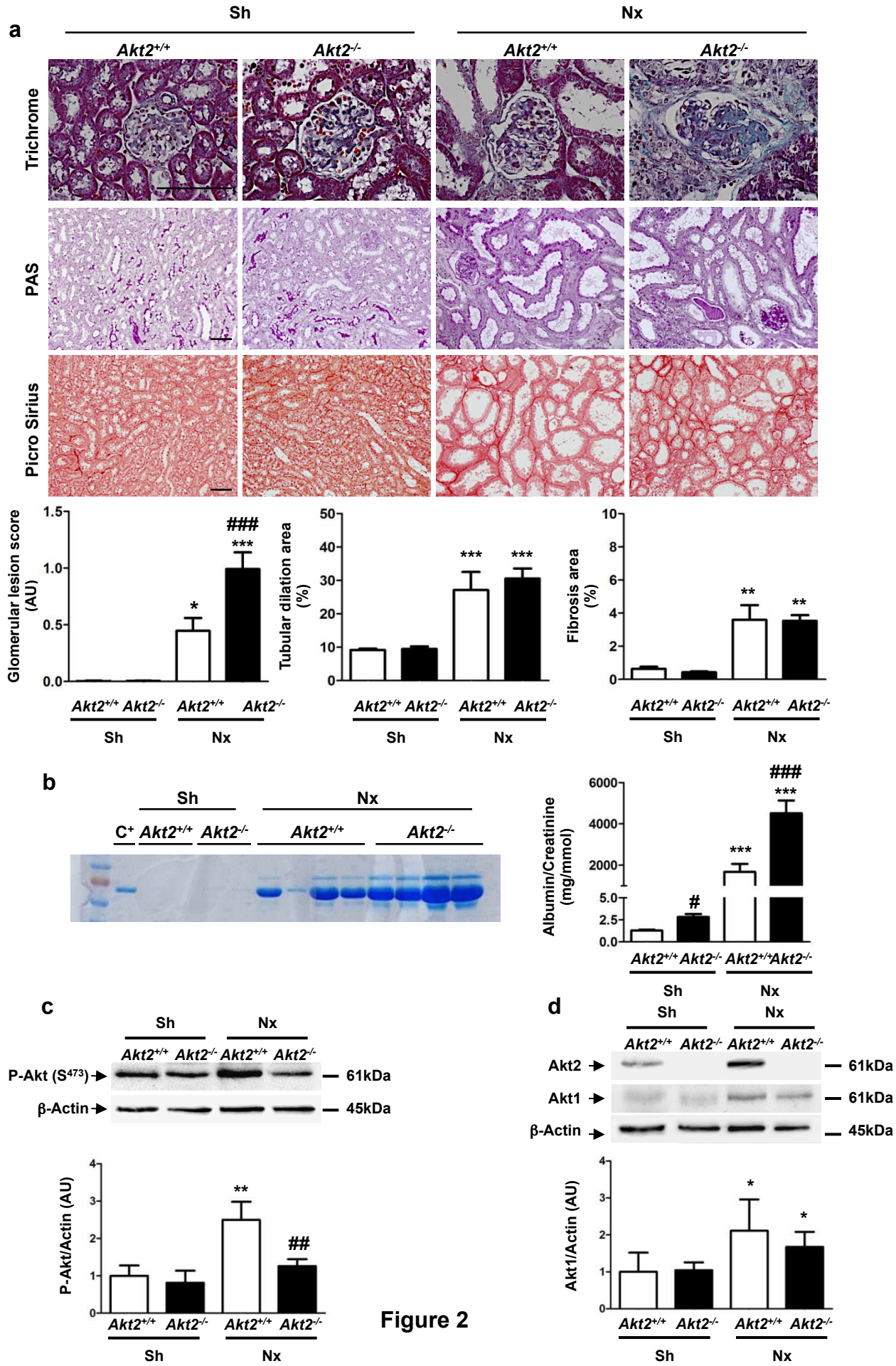


Figure 3: Akt2 regulates podocyte survival and morphology. (a) PCNA immunostaining (upper panels, black arrows) and quantification of PCNA-positive glomerular cells in kidneys from sham-operated (Sh) and 75% nephrectomized (Nx) *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice, 2 months after surgery. TUNEL assay (middle panels, white arrows) and quantification of TUNEL-positive glomerular cells in kidneys from Sh and Nx *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice, 2 months after surgery. WT1 immunostaining (lower panels) and quantification of WT1-positive glomerular cells in kidneys from Sh and Nx *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice, 2 months after surgery. Pictures are representative samples from at least 6 mice from each group. (b) TUNEL assay (upper panels, white arrows) and WT1 immunostaining (lower panels) in kidneys from *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice at 13 months of age. Pictures are representative samples from at least 5 mice from each group. (c) Electron microscopy of glomerular basement membrane and quantification of foot process effacement in kidneys from *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice at 13 months of age. *Akt2*^{-/-} deficiency led to variable degrees of foot process effacement; in addition, even when foot processes were present, slit diaphragms were not evident. Pictures are representative samples from at least 4 mice from each group. Scale bar: 50 μ m. Data are means $\pm$ SEM; n = 4-6, 6-10 and 4-5 for Sh, Nx, and 13 month-old mice, respectively. Mann-Whitney test (when two groups are compared) or ANOVA followed by Tukey-Kramer test (when more than two groups are compared). Sh *versus* Nx mice: * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001; *Akt2*^{-/-} *versus* *Akt2*^{+/+} mice: # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001.

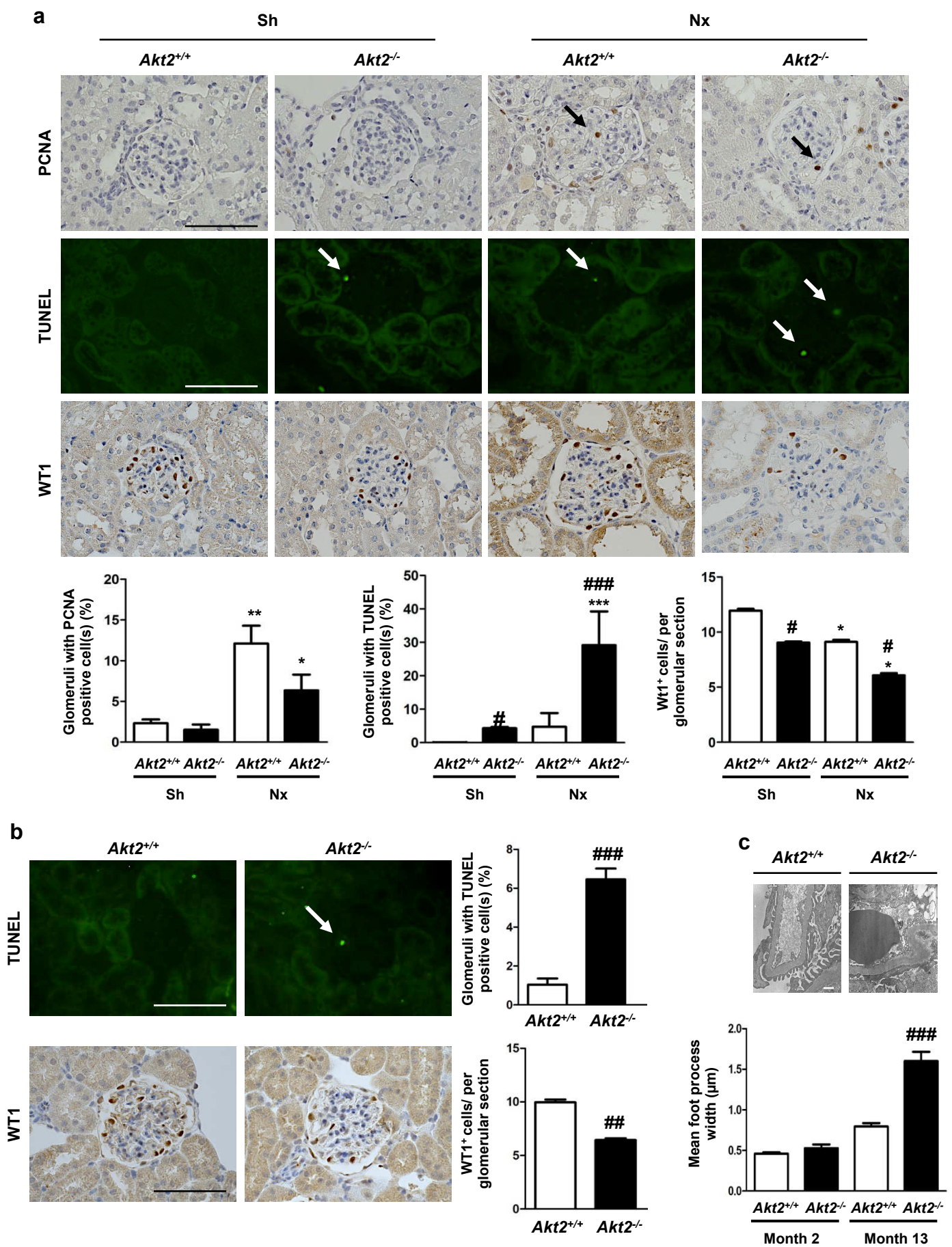


Figure 4: Akt2 controls critical targets for podocyte survival after nephron reduction.

(a) Western blot and quantification of P-Mdm2 and P-Gsk3 α , two downstream targets of P-Akt, in laser microdissected glomerular extracts from kidneys of sham-operated (Sh) and 75% nephrectomized (Nx) *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice, 2 months after surgery. (b) Immunostaining and quantification of Gsk3 α and Gsk3 β phosphorylation in kidneys from Sh and Nx *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice, 2 months after surgery. Pictures are representative samples from at least 6 mice from each group. (c) Rac1-GTP (left panels), Cdc42-GTP (middle panels) and RhoA-GTP bound assay in kidneys from Sh and Nx *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice, 2 months after surgery. Scale bar: 50 μ m. Data are means $\pm$ SEM; n = 4-6 and 6-10 for Sh and Nx, respectively. ANOVA followed by Tukey-Kramer test; Sh *versus* Nx mice: * P < 0.05, ** P < 0.01; *Akt2*^{-/-} *versus* *Akt2*^{+/+} mice: # P < 0.05, ## P < 0.01.

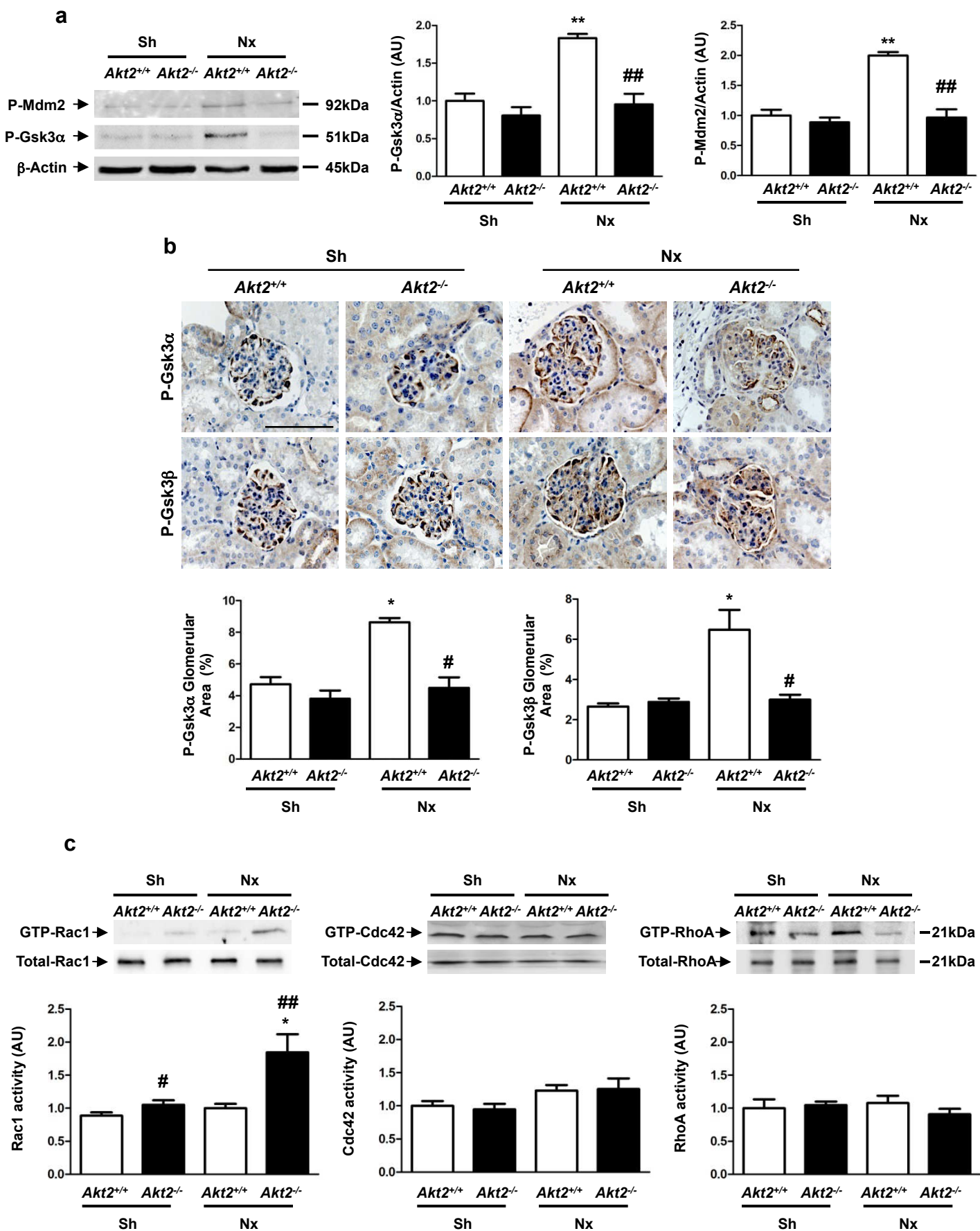


Figure 4

Figure 5: Akt function in podocytes is isoform specific. (a) Coomassie staining (left panel) and measure of the albumin to creatinine ratio (mg/mmol) (right panel) in C57BL/6 wild type (WT), *Akt1*^{-/-} and *Akt2*^{-/-} mice at 3 and 6 months of age. Only, the *Akt2*^{-/-} mice developed albuminuria. Bovine Serum Albumin served as control (C⁺) for Coomassie staining. (b) Renal morphology of kidneys from WT, *Akt1*^{-/-} and *Akt2*^{-/-} mice at 6 months of age. Whereas *Akt1*^{-/-} mice were indistinguishable from wild-type littermates, *Akt2*^{-/-} mice displayed tubular dilations with casts (asterisk). (c) Electron microscopy of glomerular basement membrane and quantification of foot process effacement in kidneys from WT, *Akt1*^{-/-} and *Akt2*^{-/-} mice at 6 months of age. Variable degrees of foot process effacement and the loss of the slit diaphragms were observed, but exclusively in kidneys from *Akt2*^{-/-} mice. (d) TUNEL assay (white arrows) and (e) WT1 immunostaining of kidneys from wild type, *Akt1*^{-/-} and *Akt2*^{-/-} mice at 6 months of age. The graphs represent the quantification of the TUNEL-positive and the WT1-positive glomerular cells. Pictures are representative samples from at least 6 mice from each group. Scale bar: 50 μ m and 1 μ m, in b-d and c, respectively. Data are means $\pm$ SEM; n = 5-11 for WT, *Akt1*^{-/-} and *Akt2*^{-/-} mice. ANOVA followed by Tukey-Kramer test; *Akt1*^{-/-} and *Akt2*^{-/-} versus WT mice: * P < 0.05; *Akt2*^{-/-} versus *Akt1*^{-/-} mice: # P < 0.05.

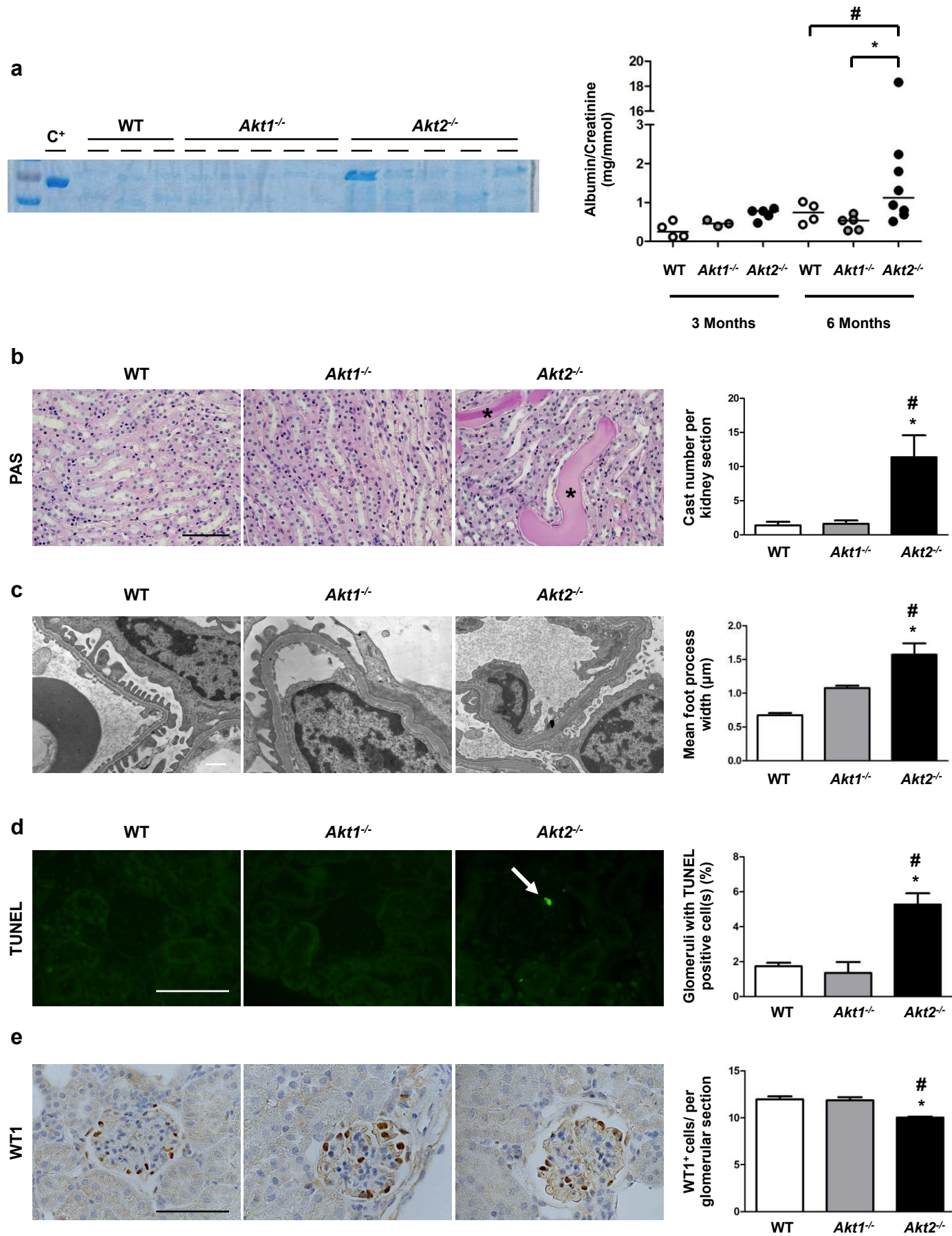


Figure 5

Figure 6: Akt2 is an intrinsic regulator of podocyte cytoskeleton and function.

(a) Akt2 immunostaining in *Akt2^{fllox}* and *Akt2^{pod}* kidneys. Scale bar: 50 μ m. (b) Coomassie staining (upper panel) and measure of the albumin to creatinine ratio (mg/mmol) (lower panel) in 75% nephrectomized (Nx) C57BL/6 *Akt2^{fllox}* and *Akt2^{pod}*, 1 month after surgery. Only, *Akt2^{pod}* mice developed albuminuria. Bovine Serum Albumin served as control (C⁺) for Coomassie staining. (c) Electron microscopy of glomerular basement membrane and quantification of foot process effacement in kidneys from *Akt2^{fllox}* and *Akt2^{pod}* mice 1 month after Nx. Podocyte specific *Akt2* deficiency led to variable degrees of foot process effacement; in addition, even when foot processes were present, the slit diaphragm was not evident. (d) Double immunofluorescence using phalloidin, a F-actin marker, and anti-paxillin antibodies in conditionally immortalized murine podocytes transfected with lentiviruses expressing ShRNA directed against either *Akt1* (Sh *Akt1*) or *Akt2* (Sh *Akt2*). Lentivirus expressing scramble (Sc) ShRNA served as controls. (e) Double immunofluorescence using phalloidin and anti-paxillin antibodies in conditionally immortalized murine podocytes transfected with Sc, Sh *Akt1* or Sh *Akt2* lentiviruses and treated with sirolimus for 5 days. Scale bar: 20 μ m (f) Quantification of the number of focal adhesions in podocytes transfected with Sc, Sh *Akt1* or Sh *Akt2* and treated or not with sirolimus. Similar results were obtained with two independent lentiviral constructs targeting each *Akt* isoforms. Data are means $\pm$ SEM; n = 16-18 for *Akt2^{fllox}* and *Akt2^{pod}* mice, respectively, and n = 3-6 for *in vitro* experiments. Mann-Whitney test: *Akt2^{fllox}* versus *Akt2^{pod}* mice *** P<0.001. ANOVA followed by Tukey-Kramer test: Sh versus Sc: *** P<0.001; Sh *Akt2* versus Sh *Akt1*: ### P < 0.001, Sirolimus versus Vehicle: °°° P < 0.001.

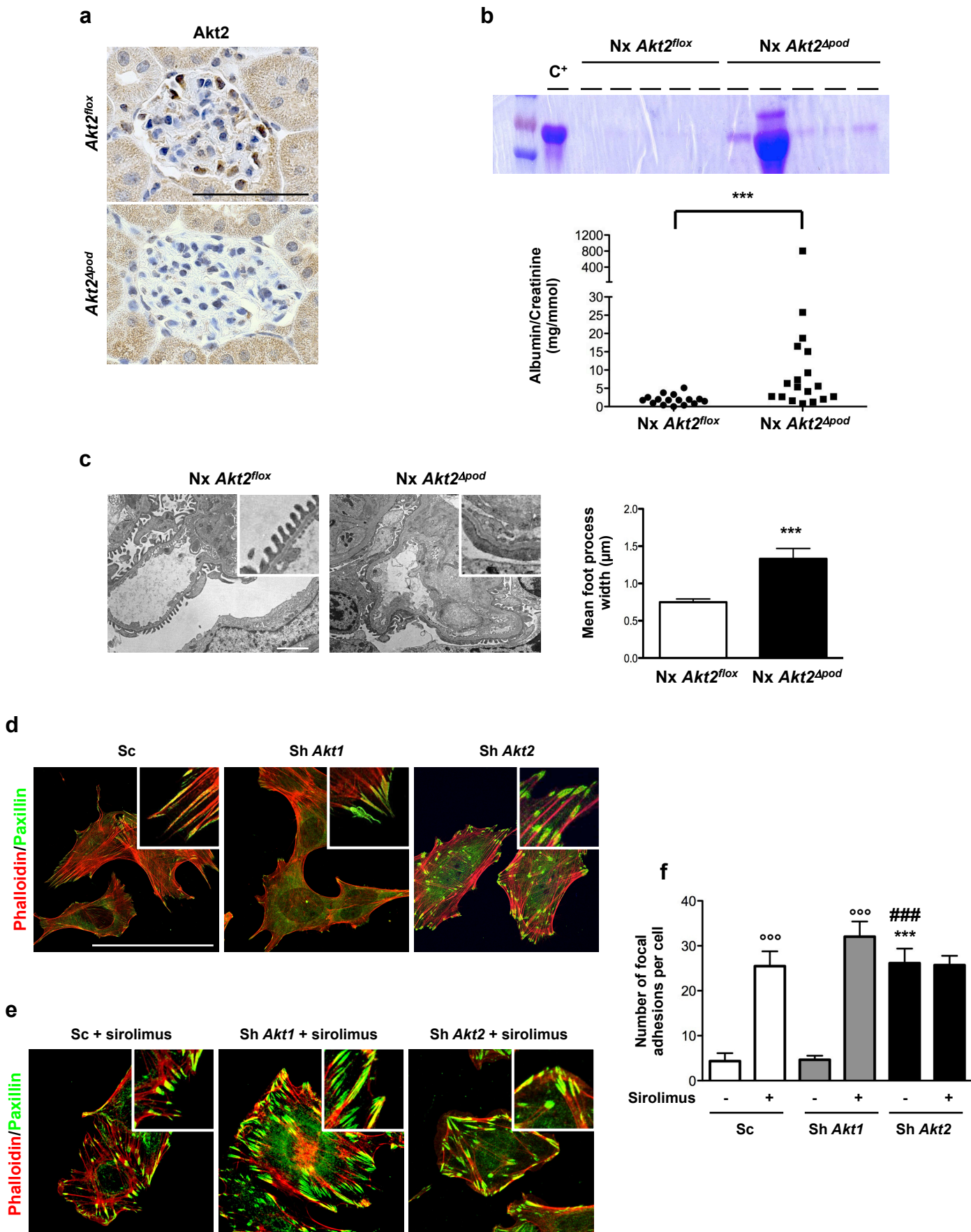


Figure 6

Figure 7: Akt phosphorylation is critical to prevent proteinuria in humans. (a) Clinical data defining the four groups of renal transplant recipients: patients with higher estimated glomerular filtration rate (eGFR) +/- sirolimus and patients with lower eGFR +/- sirolimus. (b) Glomerular immunostaining of P-AKT (Ser⁴⁷³) in the four groups of patients. Akt phosphorylation could be detected exclusively in podocytes of kidneys from renal transplant recipients with lower eGFR. Sirolimus completely blunted such activation. (c) Colocalization between P-AKT (Ser⁴⁷³) and podocin in the four groups of patients. (d) Glomerular TUNEL assay (white arrows) in the four groups of patients. Sirolimus treatment led to a marked increased of apoptosis, but exclusively in kidneys from renal transplant recipients with lower eGFR. (e) Glomerular immunostaining of RICTOR in the four groups of patients. Paralleling P-AKT pattern, Rictor protein could be detected exclusively in podocytes of kidneys from renal transplant recipients with lower eGFR. Sirolimus completely blunted such increase. (f) Quantification of glomerular P-AKT (Ser⁴⁷³) staining (left panel), TUNEL assay (middle panel) and RICTOR staining (right panel). Pictures are representative samples from at least 10 patients from each group. Scale bar: 50 μ m. Data are means $\pm$ SEM; n = 20, 22, 25 and 13 in high eGFR +/- sirolimus and low eGFR +/- sirolimus, respectively. ANOVA followed by Tukey-Kramer test. Low eGFR *versus* high eGFR: *** P < 0.001; Siro+ *versus* Siro-: ### P < 0.001.

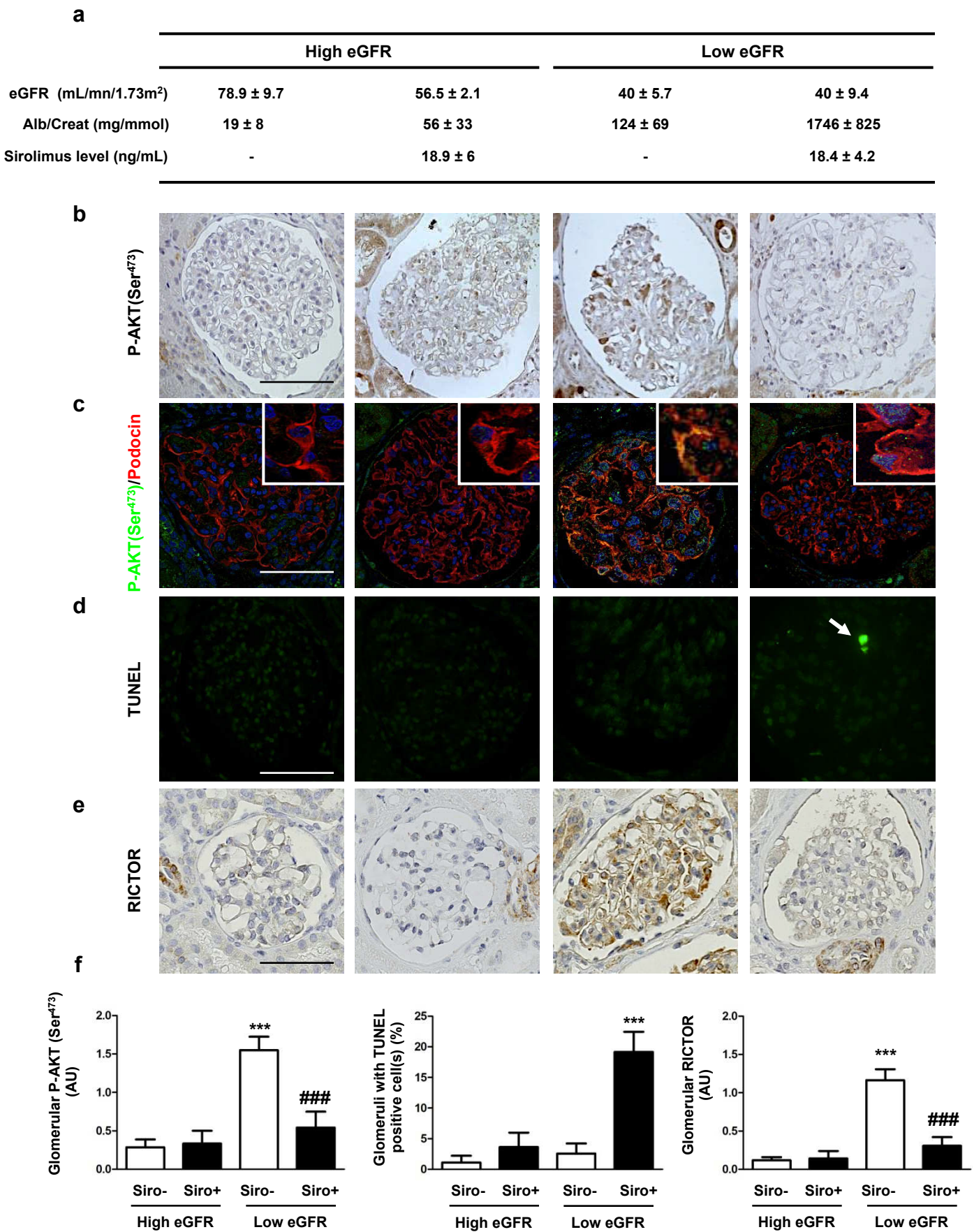
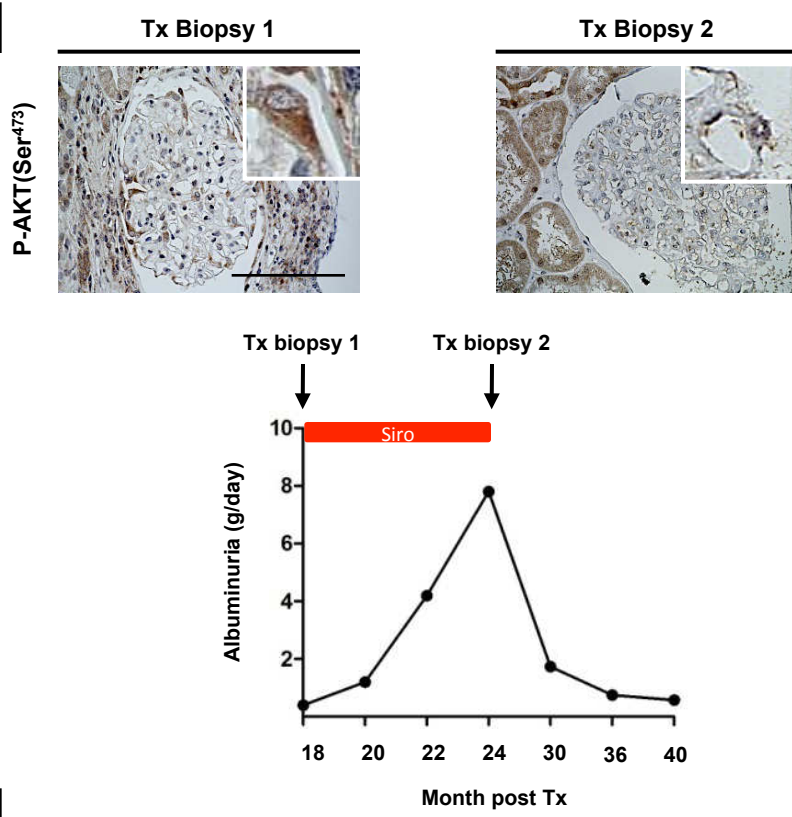


Figure 7

Figure 8: Inhibition of podocyte Akt phosphorylation by sirolimus parallels albuminuria development in humans. Urinary albumin excretion (lower panels) and P-Akt (Ser⁴⁷³) immunostaining (upper panels) in serial biopsies from two representative renal transplant recipients, each of them was treated or not with sirolimus. Tx = Transplantation. Note the strong correlation between the inhibition of Akt phosphorylation and the development of albuminuria; whereas sirolimus treatment leads to severe albuminuria and blunts Akt phosphorylation in patient 1, its removal restores Akt phosphorylation and reverses albuminuria in patient 2. Scale bar: 50 μ m.

Patient 1



Patient 2

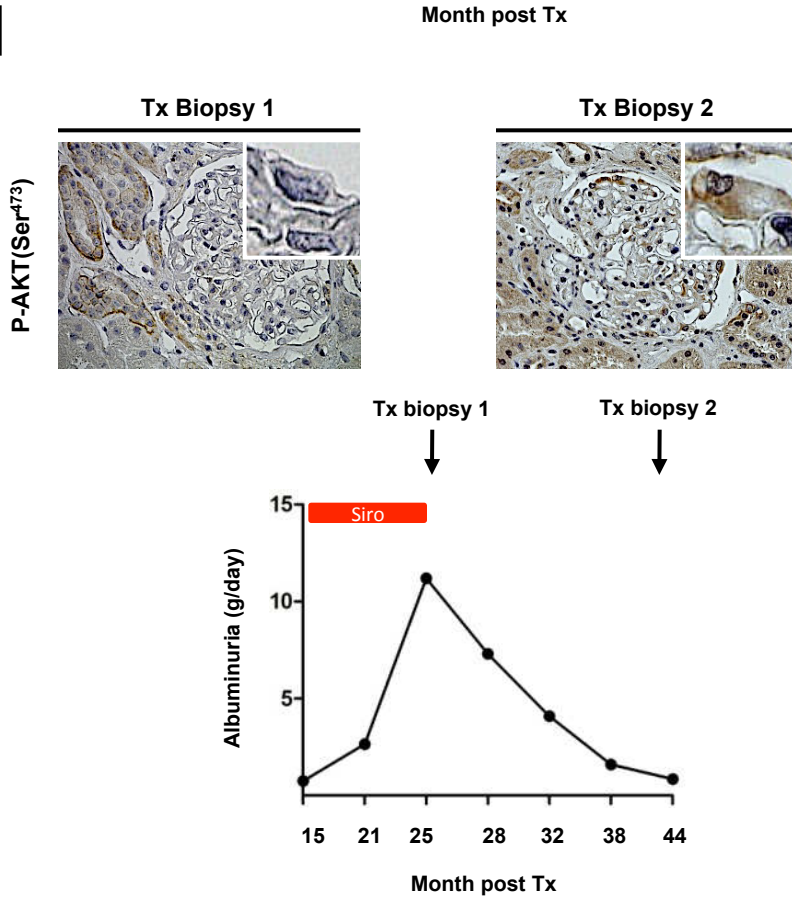
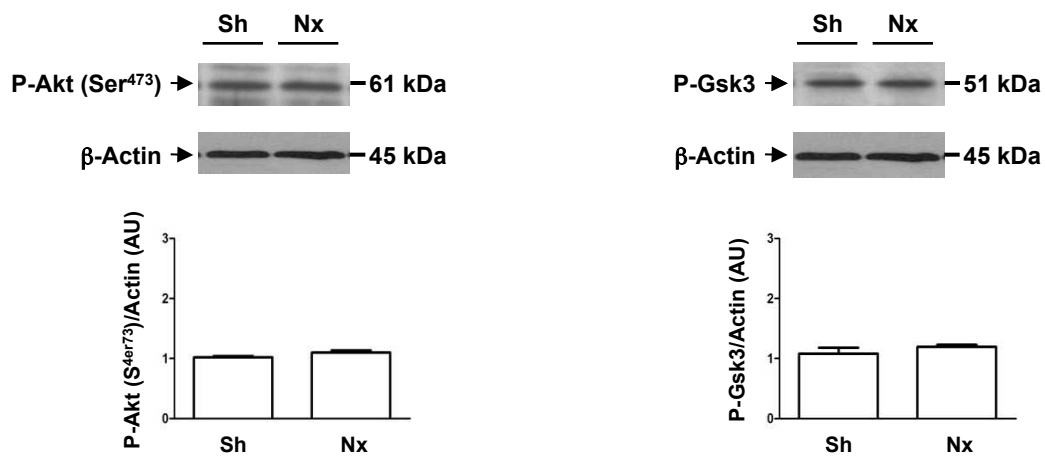
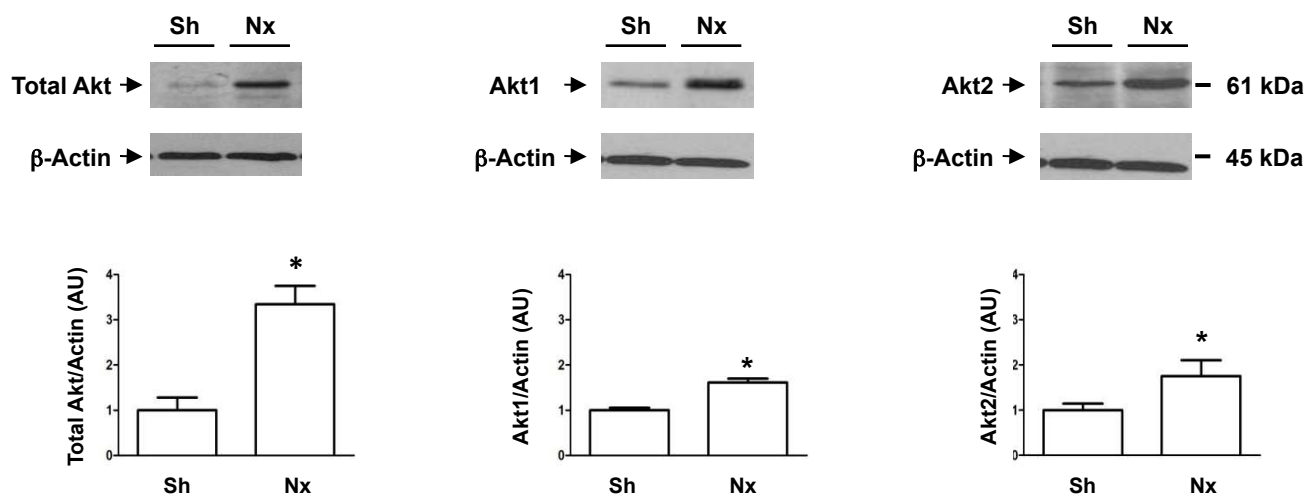


Figure 8

Supplementary Figure 1: Akt pathway phosphorylation after nephron reduction in whole kidney. Western blot of Akt (Ser⁴⁷³) and Gsk3 phosphorylation in whole kidneys of sham-operated (Sh) and 75% nephrectomized (Nx) FVB/N mice, 2 months after surgery. Despite the increase of both Akt1 and Akt2 proteins, neither Akt, nor Gsk3 were phosphorylated after Nx. Data are means $\pm$ SEM; n = 6 and 10 for Sh and Nx, respectively. Mann-Whitney test: Sh *versus* Nx mice * P < 0.05.

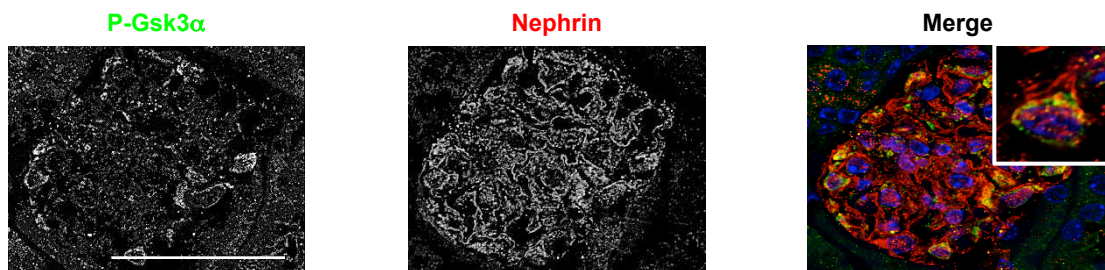


Supplementary Figure 1

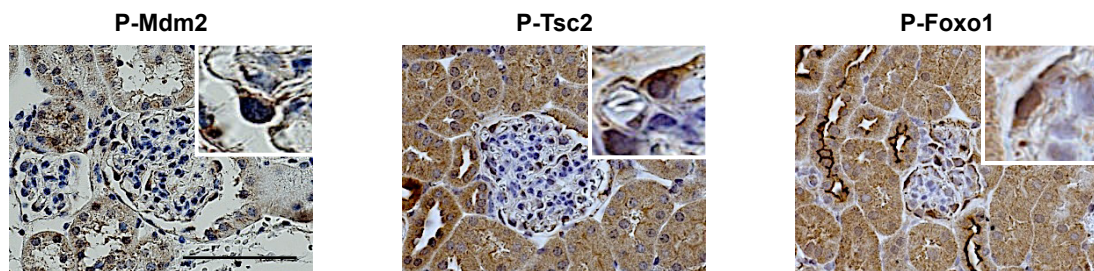
Supplementary Figure 2: Podocytes are enriched in downstream targets of Akt. (a)

Colocalization between P-Gsk3 α and nephrin, a podocyte specific protein, in kidney of FVB/N mice, 2 months after 75% nephrectomy. **(b)** Immunostaining of P-Mdm2, P-Tsc2 and P-Foxo1 in FVB/N mice. All three proteins are expressed in podocytes. Pictures are representative samples from at least 6 mice from each group. Scale bar: 50 μ m.

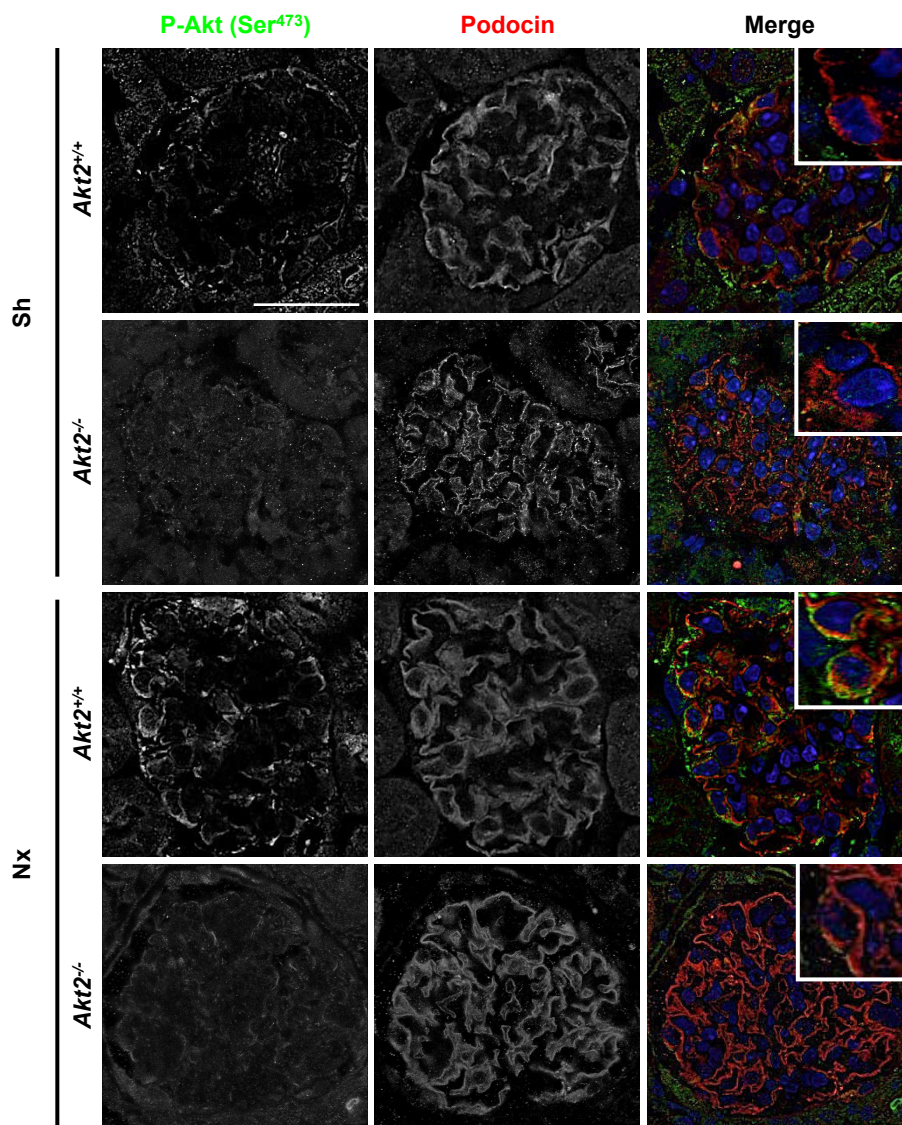
a



b

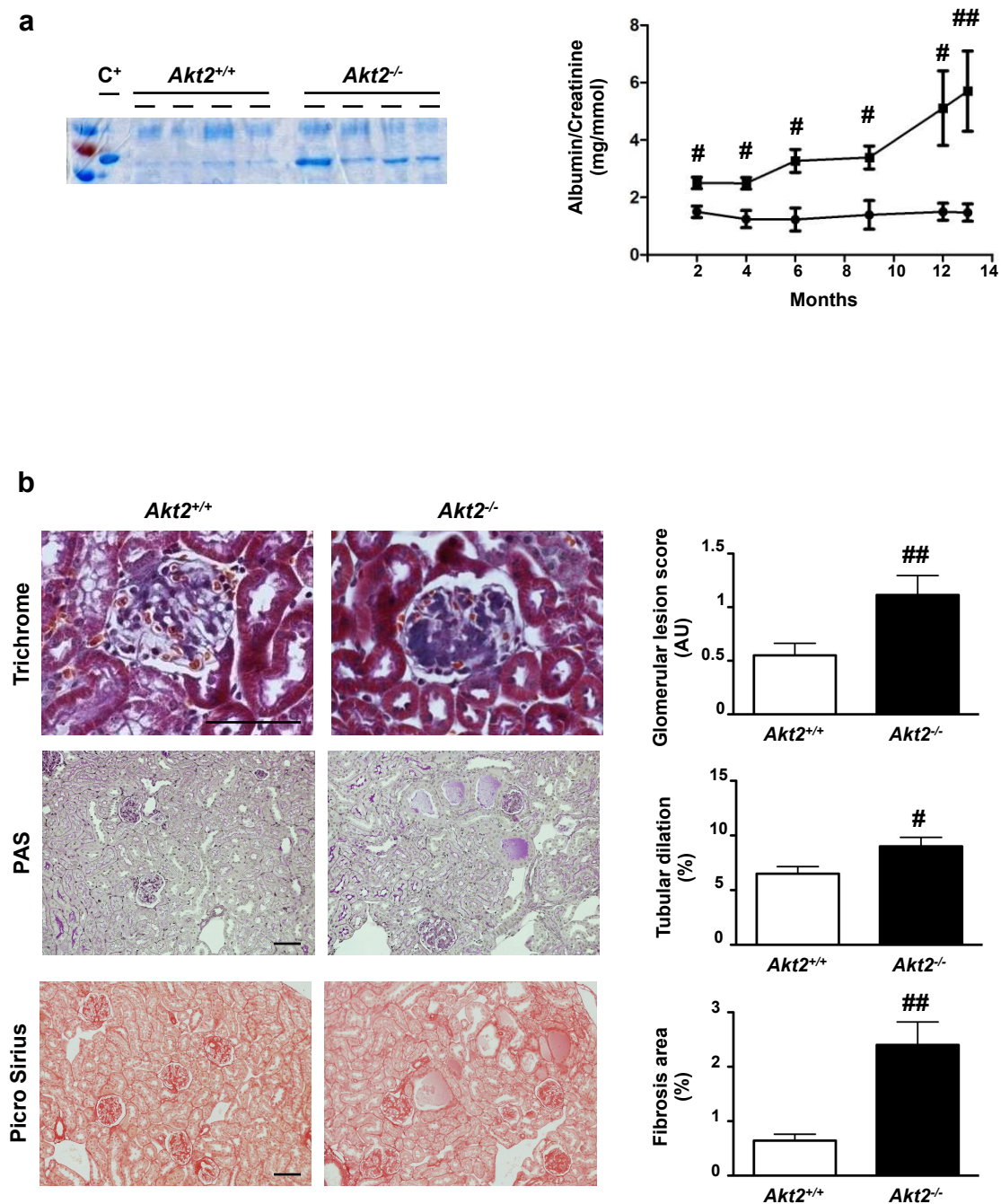


Supplementary Figure 3: Akt2 deletion abolishes Ser⁴⁷³ Akt phosphorylation in podocytes after nephron reduction. Colocalization between P-Akt (Ser⁴⁷³) and podocin in kidneys from sham-operated (Sh) and 75% nephrectomized (Nx) *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice, 2 months after surgery. Pictures are representative samples from at least 4 mice from each group. Scale bar: 50 μ m.



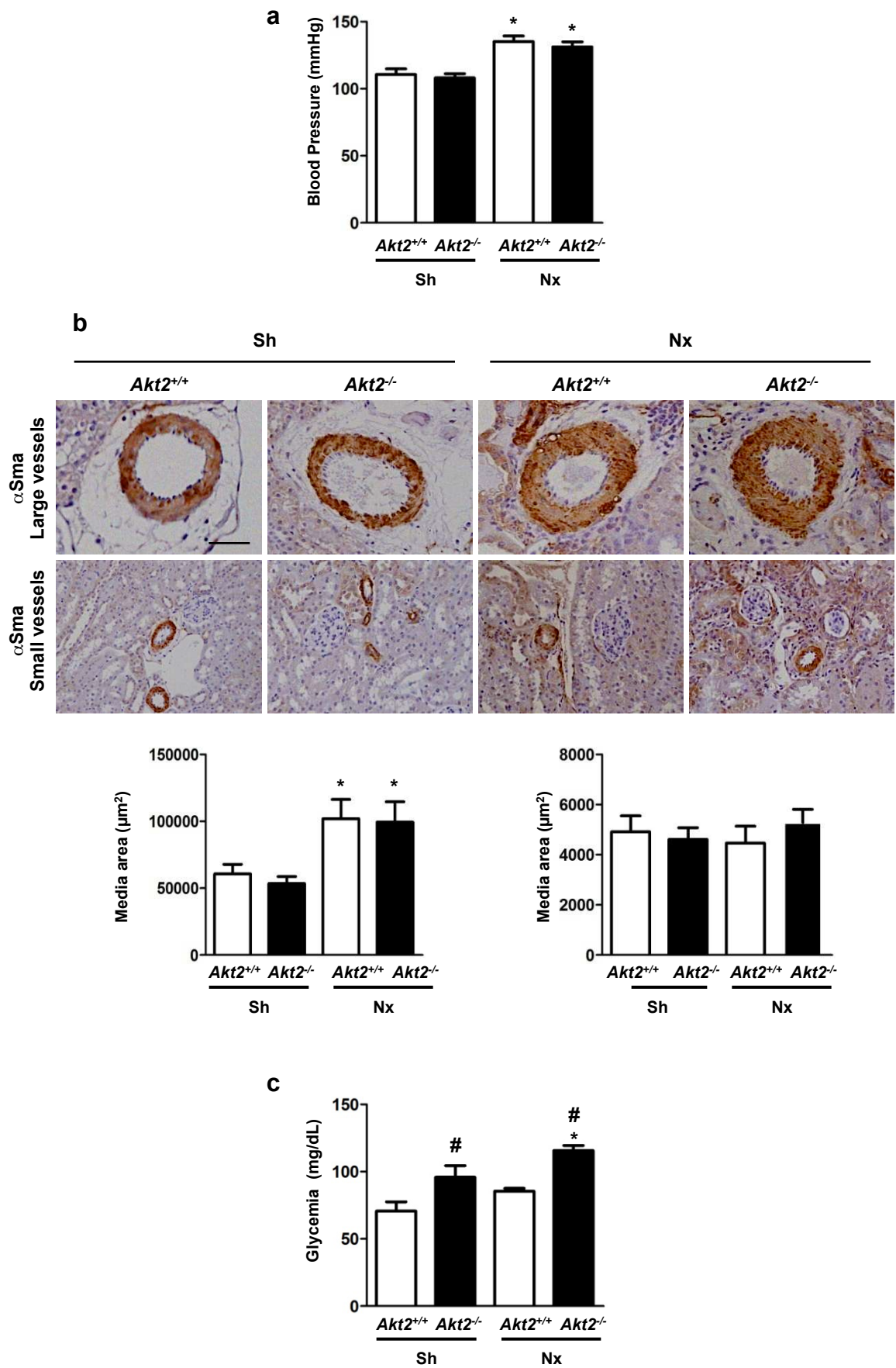
Supplementary Figure 3

Supplementary Figure 4: Akt2 deficiency accelerates the development of aging nephropathy. (a) Coomassie staining (left panel) and measure of the albumin to creatinine ratio (mg/mmol) (right panel) in FVB/N *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice from 2 to 13 months of age. Coomassie staining picture is a representative sample of 13-month-old mice and Bovine Serum Albumin served as control (C⁺). (b) Morphology and lesion scores of kidneys from *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice at 13 months of age. Pictures are representative samples from at least 4 mice from each group. Scale bar: 50 μ m. Data are means $\pm$ SEM; n = 4-5 for WT, *Akt1*^{-/-} and *Akt2*^{-/-} mice. Mann-Whitney test: *Akt2*^{-/-} versus *Akt2*^{+/+} mice # P<0.05, ## P<0.01.



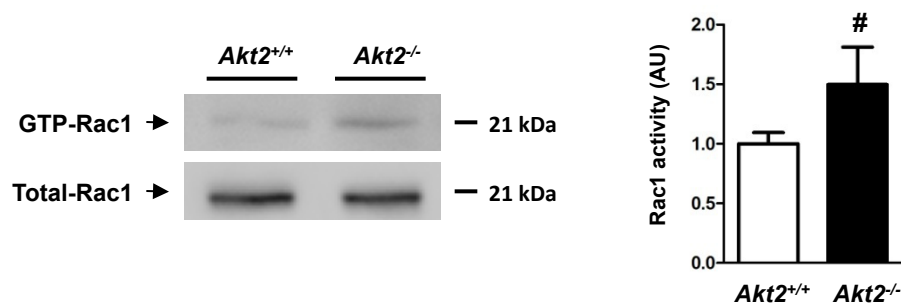
Supplementary Figure 4

Supplementary Figure 5: Blood pressure and glycemia two months after nephron reduction. (a) Blood pressure in sham-operated (Sh) and 75% nephrectomized (Nx) *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice, 2 months after surgery. (b) Immunostaining of α -smooth muscle actin (α -sma) and quantification of the stained area of vessels in Sh and Nx *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice, 2 months after surgery. (c) Blood fasting glucose in Sh and Nx *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice, 2 months after surgery. Although glycemia was slightly higher in *Akt2*^{-/-} than in *Akt2*^{+/+} mice, *Akt2*^{-/-} mice do not develop overt diabetes. Pictures are representative samples from at least 6 mice from each group. Scale bar: 50 μ m. Data are means $\pm$ SEM; n = 3-6 and 6-10 for Sh and Nx, respectively. ANOVA followed by Tukey-Kramer test; Sh *versus* Nx mice: * P < 0.05; *Akt2*^{-/-} *versus* *Akt2*^{+/+} mice: # P < 0.05, ##.



Supplementary Figure 5

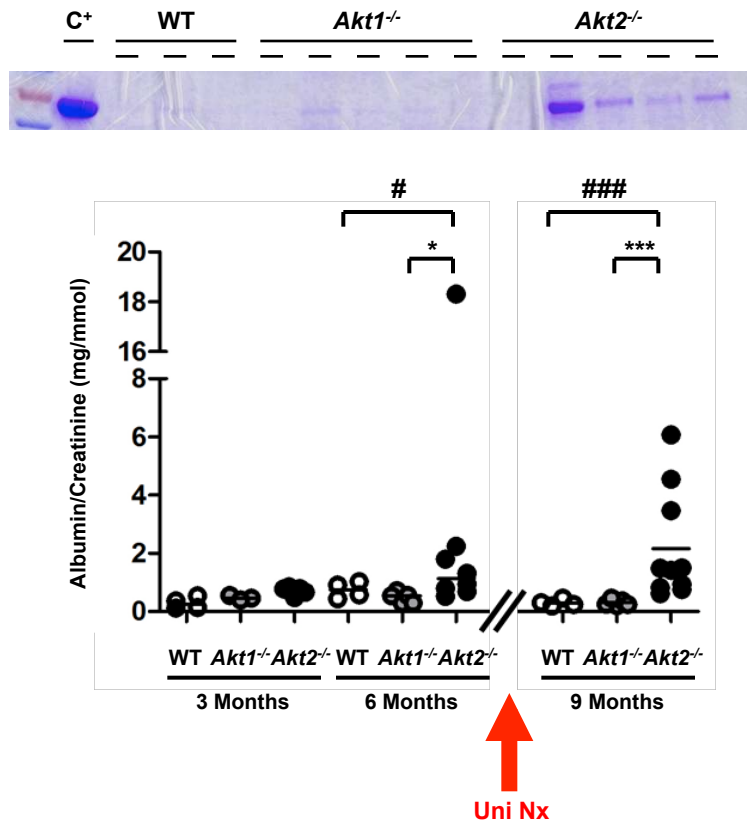
Supplementary Figure 6: Rac1 activity in aging kidneys. Rac1-GTP bound assay in kidneys of *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice at 13 months of age. Data are means $\pm$ SEM; n = 4. Mann-Whitney test: *Akt2*^{-/-} versus *Akt2*^{+/+} mice: # P < 0.05.



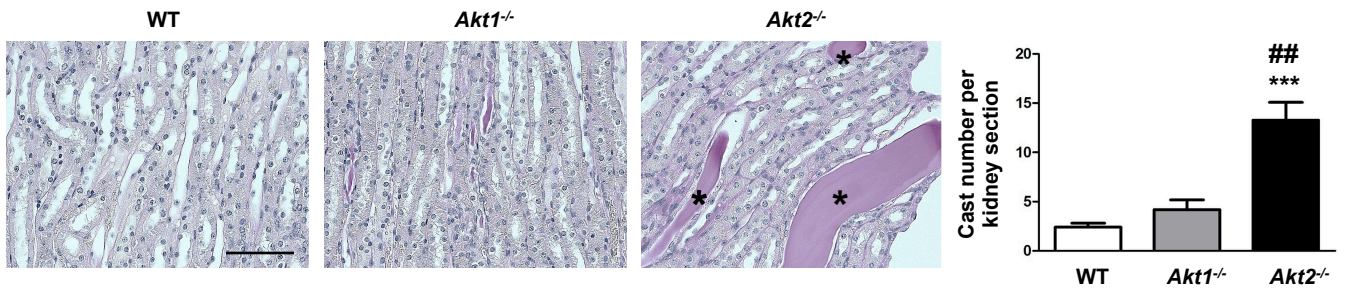
Supplementary Figure 6

Supplementary Figure 7: Impact of unilateral nephrectomy in aging mice. (a) Coomassie staining (upper panel) and measure of the albumin to creatinine ratio (mg/mmol) (lower panel) in C57BL/6 wild type (WT), *Akt1*^{-/-} and *Akt2*^{-/-} mice before (3 and 6 months) and 3 months after (9 months) unilateral nephrectomy (Uni Nx). Only, the *Akt2*^{-/-} mice developed albuminuria. Bovine Serum Albumin served as control (C⁺) for Coomassie staining. (b) Renal morphology of kidneys from WT, *Akt1*^{-/-} and *Akt2*^{-/-} mice at 9 months of age and 3 months after Uni Nx. Whereas *Akt1*^{-/-} mice were indistinguishable from wild-type littermates, *Akt2*^{-/-} mice displayed tubular dilations with casts (asterisk). (c) Rac1-GTP bound assay in kidneys of WT, *Akt1*^{-/-} and *Akt2*^{-/-} mice at 9 months of age and 3 months after Uni Nx. Scale bar: 50 μ m. Data are means $\pm$ SEM; n = 5-11. ANOVA followed by Tukey-Kramer test; *Akt2*^{-/-} versus WT mice: * P < 0.05, *** P < 0.001; *Akt2*^{-/-} versus *Akt1*^{-/-} mice: # P < 0.05, ## P < 0.01, ###P < 0.001.

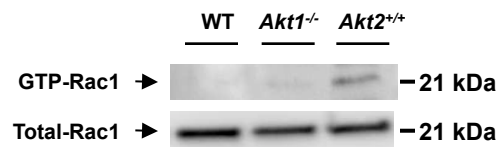
a



b

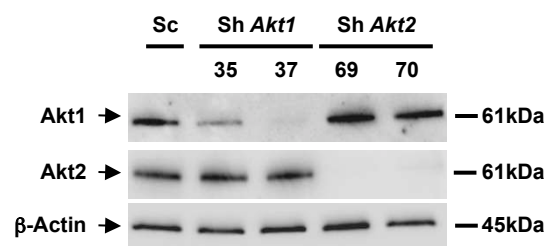


c



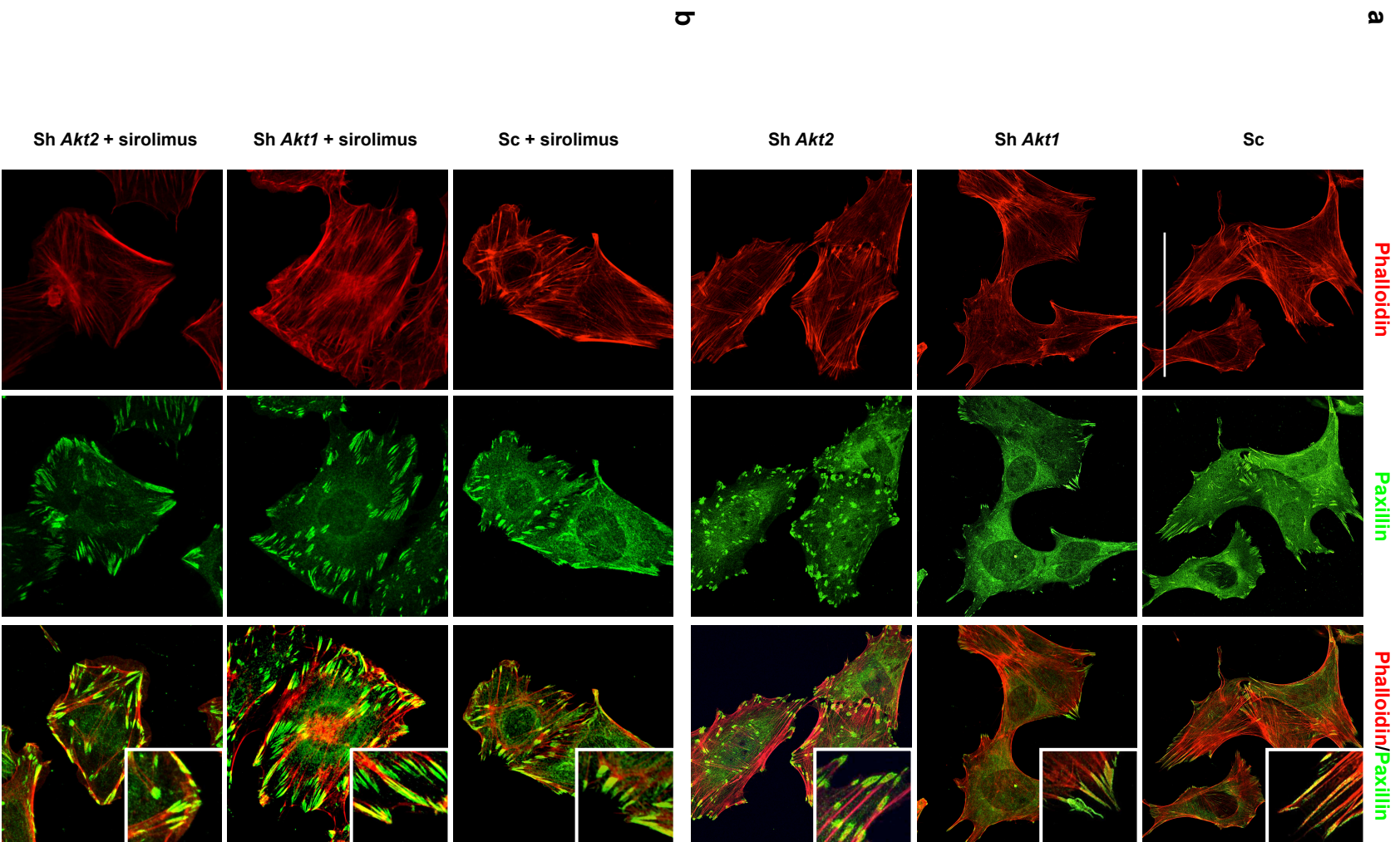
Supplementary Figure 7

Supplementary Figure 8: *Akt1* and *Akt2* silencing in cultured podocytes. Western blot of Akt1 and Akt2 in cultured murine podocytes transfected with lentivirus expressing ShRNA directed against either two sequences (35 and 37) of *Akt1* (Sh *Akt1*) or two sequences (69 and 70) of *Akt2* (Sh *Akt2*). Lentivirus expressing scramble (Sc) ShRNA served as controls. Pictures are representative samples of four experiments.



Supplementary Figure 8

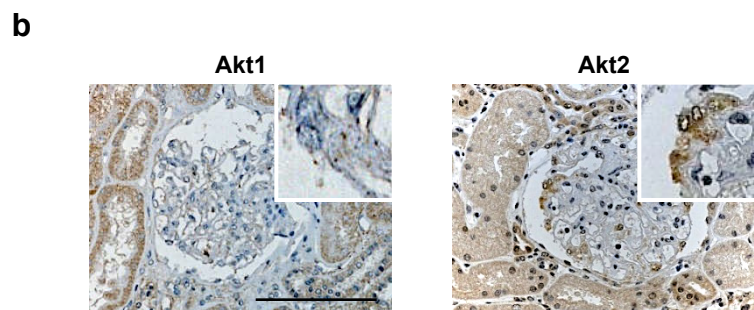
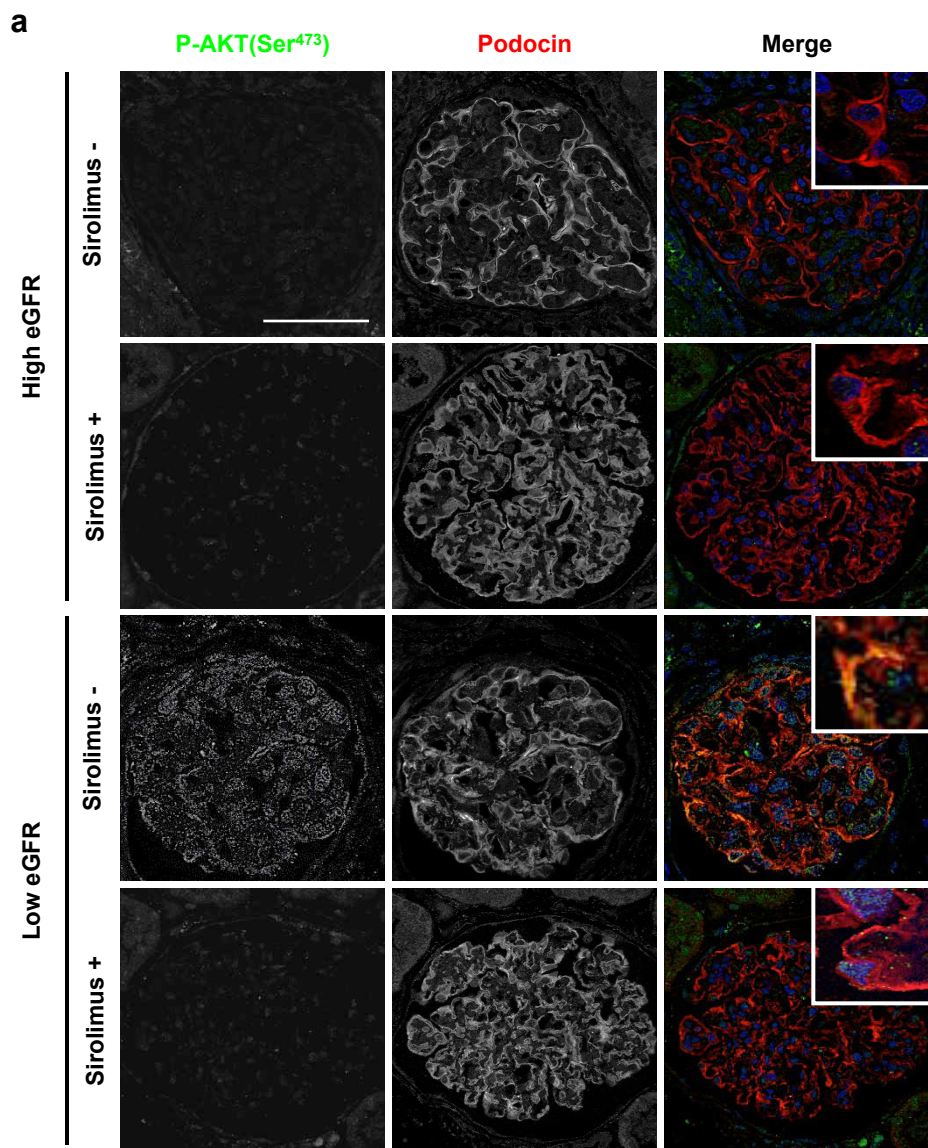
Supplementary Figure 9: *Akt2* silencing and sirolimus treatment lead to the same cytoskeleton rearrangement. (a) Double immunofluorescence using phalloidin and anti-paxillin antibodies in murine podocytes transfected with lentiviruses expressing ShRNA directed against either *Akt1* (Sh *Akt1*) or *Akt2* (Sh *Akt2*). Lentivirus expressing scramble (Sc) ShRNA served as controls. (b) Double immunofluorescence using phalloidin and anti-paxillin antibodies in murine podocytes transfected with Sc, Sh *Akt1* or Sh *Akt2* lentiviruses and treated with sirolimus for 5 days. Similar results were obtained with two independent lentiviral constructs targeting each Akt isoforms. Scale bar: 20 μ m



Supplementary Figure 9

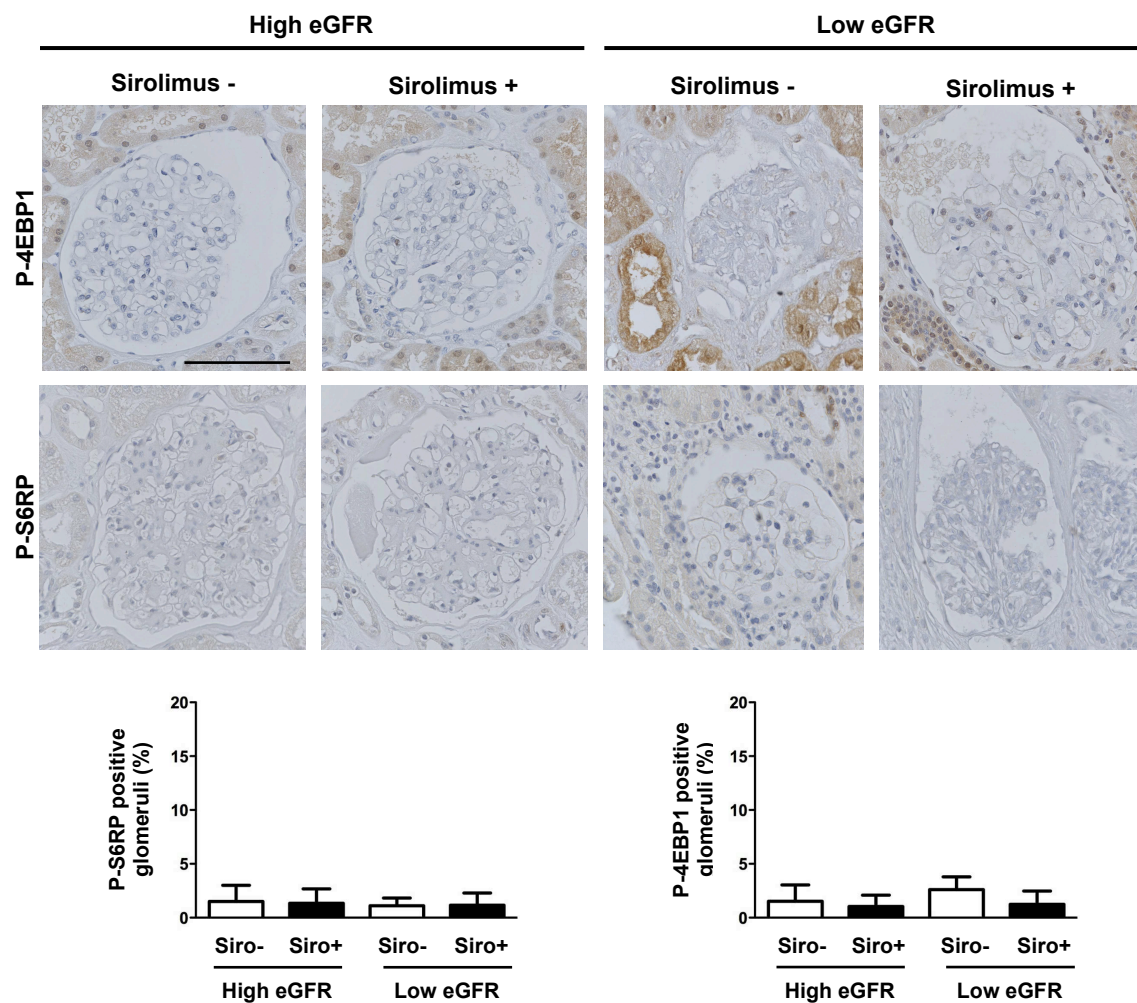
Supplementary Figure 10: Akt2 is activated in podocytes of renal transplant recipients.

(a) Colocalization between P-AKT (Ser⁴⁷³) and podocin in human kidneys from renal transplant recipients treated or not with sirolimus. **(b)** Immunostaining showing the distribution of AKT1 and AKT2 isoforms in human kidneys. Pictures are representative samples from at least 8 patients from each group. Scale bar: 50 μ m.



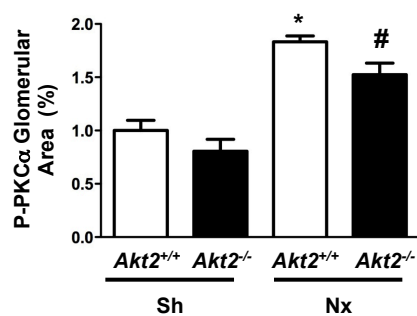
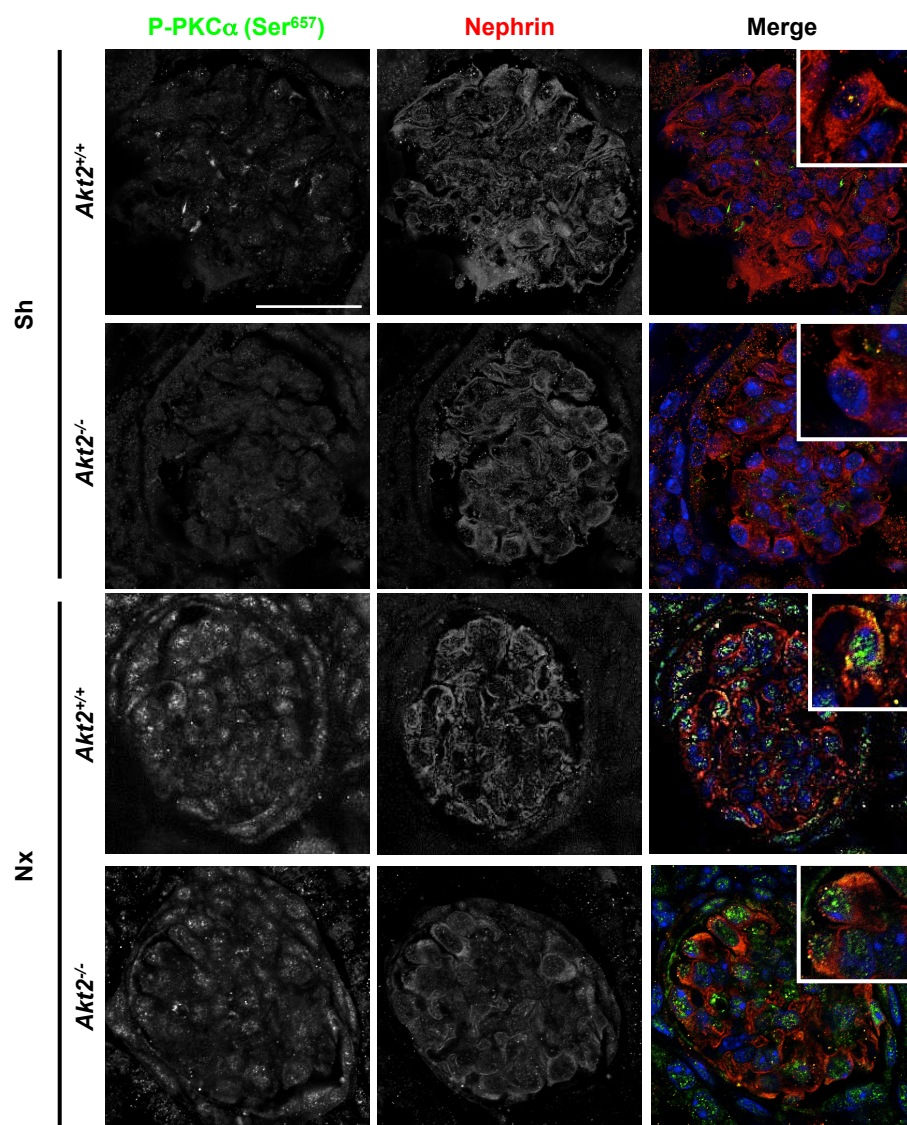
Supplementary Figure 10

Supplementary Figure 11: mTORC1 is not activated in podocytes of renal transplant recipients. (a) Glomerular immunostaining (upper panels) and quantification (lower panels) of P-4EBP1 and P-S6RP in human kidneys from renal transplant recipients treated or not with sirolimus. Scale bar: 50 μ m. Data are means $\pm$ SEM; n = 10 for each group.



Supplementary Figure 11

Supplementary Figure 12: The mTORC2 target PKC α is activated in podocytes after nephron reduction. Colocalization (upper panels) and quantification (lower panel) between P-PKC α (Ser⁶⁵⁷) and nephrin in kidneys from sham-operated (Sh) and 75% nephrectomized (Nx) *Akt2*^{+/+} and *Akt2*^{-/-} mice, 2 months after surgery. PKC α phosphorylation was markedly increased after nephron reduction regardless of the genotype. Pictures are representative samples from at least 6 mice from each group. Scale bar: 50 μ m. Data are means $\pm$ SEM; n = 4-6 and 6-10 for Sh and Nx, respectively. ANOVA followed by Tukey-Kramer test; Sh *versus* Nx mice: * P < 0.05; *Akt2*^{-/-} *versus* *Akt2*^{+/+} mice: # P < 0.05.



Supplementary Figure 12

Supplementary Table 1: Demographic and clinical characteristics of the four groups of patients

Characteristics	High GFR		Low GFR	
	Sirolimus – (n=20)	Sirolimus + (n=22)	Sirolimus – (n=25)	Sirolimus + (n=13)
Males (%)	55	59	60	61
Age at ESRD (year)	43±11	40±12	45±15	36±10
Dialysis duration (year)	4.7±3.8	4.1±4	4.9±3.9	3.7±2.2
eGFR (ml/min/1.73m ²)	79±9	56±2	40±5	40±9
A/C (mg/mmoL)	19±8	56±33	124±68	1746±825
IF/TA score	0.2±0.4	0.3±0.4	2.4±0.5	2.5±0.5
Steroids (%)	85	82	80	92
Purine Analog (%)	100	100	100	100
Calcineurin inhibitor (%)	100	0	100	0
Diabetes (%)	15	9	16	8
Hypertension (%)	95	86	100	92
Acute Cellular Rejection (%)	10	13	8	8

GFR: Glomerular Filtration Rate; ESRD: End Stage Renal Disease; eGFR: estimated Glomerular Filtration Rate; A/C: Albumin/Creatinine ratio in the urine; IF/TA: Interstitial Fibrosis/Tubular Atrophy score.

Supplementary Table 2: Individual clinical characteristics of the 80 patients included in the study.

	Patient	Sex	Age at ESRD (year)	Dialysis duration (year)	eGFR (mL/mn/ 1.73m²)	A/C (mg/mm oL)	IF/TA	Steroids	Purine Analog	CNI	Diabetes	HTA	ACR	Donor Age (year)	Cold Ischemia Time (hour)
High eGFR Siro-Group	1	M	34	0.8	78	18	0	1	1	1	0	1	0	47	16
	2	F	46	6.9	80	23	0	1	1	1	0	1	0	51	17
	3	M	41	6.3	60	13	1	1	1	1	1	1	1	32	12
	4	F	32	7.5	90	14	0	0	1	1	0	1	0	39	21
	5	F	39	1.6	77	34	1	1	1	1	0	1	0	46	18
	6	F	45	6.4	72	27	0	1	1	1	0	1	0	51	15
	7	F	54	10.4	77	14	0	1	1	1	0	1	0	43	19
	8	F	60	3.1	81	26	1	1	1	1	0	1	0	38	15
	9	M	33	1.0	82	37	0	1	1	1	0	1	0	37	14
	10	M	57	4.4	87	8	0	0	1	1	0	1	0	33	16
	11	M	39	3.6	95	19	0	1	1	1	1	1	1	38	11
	12	M	33	4.0	84	11	0	1	1	1	0	1	0	58	10
	13	F	18	16.1	61	13	1	1	1	1	0	1	0	45	19
	14	M	57	2.2	61	11	0	1	1	1	0	1	0	59	17
	15	M	40	0.6	84	9	1	1	1	1	0	1	0	31	22
	16	M	52	5.0	78	26	0	1	1	1	1	1	0	22	18
	17	M	37	0.9	82	24	0	1	1	1	0	1	0	42	13
	18	F	47	2.0	76	22	0	1	1	1	0	1	0	45	14
	19	F	52	5.8	93	11	0	1	1	1	0	0	0	32	8
	20	M	58	3.7	80	18	0	0	1	1	0	1	0	41	9

	Patient	Sex	Age at ESRD (year)	Dialysis duration (year)	eGFR (mL/min/1.73m ²)	A/C (mg/mm oL)	IF/TA	Steroids	Purine Analog	CNI	Diabetes	HTA	ACR	Donor Age (year)	Cold Ischemia Time (hour)
High eGFR Siro+ Group	1	M	27	1.0	55	33	0	1	1	0	0	1	1	23	14
	2	F	17	7.7	53	50	0	1	1	0	0	1	0	45	13
	3	M	39	1.1	54	42	1	1	1	0	0	1	0	61	16
	4	F	38	1.8	56	14	0	1	1	0	0	0	0	51	15
	5	M	28	16.3	57	30	0	1	1	0	0	1	0	34	17
	6	M	38	2.1	58	31	1	1	1	0	0	1	0	36	16
	7	M	39	1.8	59	20	0	1	1	0	0	1	0	43	11
	8	M	58	1.6	59	46	1	1	1	0	1	1	0	51	13
	9	F	52	4.1	58	37	0	1	1	0	0	1	0	29	14
	10	F	56	3.3	61	58	0	1	1	0	0	1	0	31	10
	11	M	35	3.3	59	53	1	1	1	0	0	1	0	49	9
	12	M	49	5.1	57	138	0	1	1	0	0	1	0	45	22
	13	F	47	2.0	56	61	0	1	1	0	0	1	0	52	20
	14	M	52	3.1	57	100	0	0	1	0	0	1	1	49	18
	15	M	28	2.2	58	32	1	0	1	0	0	1	0	38	17
	16	F	47	3.5	57	43	0	1	1	0	0	1	0	35	19
	17	M	56	0.0	56	29	0	1	1	0	0	0	0	25	20
	18	F	16	13.5	57	47	0	1	1	0	1	1	0	58	12
	19	F	37	5.9	53	81	0	0	1	0	0	1	0	54	11
	20	M	36	0.4	55	35	0	1	1	0	0	1	0	22	16
	21	M	56	3.7	55	33	1	0	1	0	0	1	1	41	9
	22	F	32	6.2	53	94	0	1	1	0	0	1	0	35	12

	Patient	Sex	Age at ESRD (year)	Dialysis duration (year)	eGFR (mL/min/1.73m ²)	A/C (mg/mm oL)	IF/TA	Steroids	Purine Analog	CNI	Diabetes	HTA	ACR	Donor Age (year)	Cold Ischemia Time (hour)
Low eGFR Siro-Group	1	F	11	12.7	38	65	3	1	1	1	1	1	0	55	18
	2	F	43	11.7	45	229	2	0	1	1	0	1	0	51	19
	3	F	51	3.4	44	171	2	0	1	1	0	1	0	41	20
	4	F	51	3.4	42	136	2	1	1	1	0	1	0	39	17
	5	M	42	4.5	30	190	2	1	1	1	0	1	0	34	18
	6	F	62	0.8	38	182	3	1	1	1	0	1	0	43	15
	7	F	57	3.2	36	26	3	1	1	1	0	1	0	41	19
	8	F	15	12.2	41	24	2	1	1	1	0	1	0	54	17
	9	M	53	1.4	39	100	2	1	1	1	0	1	0	58	12
	10	F	47	15.2	37	112	3	1	1	1	0	1	0	42	21
	11	M	50	6.9	46	24	2	1	1	1	0	1	0	29	15
	12	M	63	3.3	41	55	3	1	1	1	0	1	0	37	24
	13	F	53	4.7	35	229	3	1	1	1	1	1	0	41	21
	14	M	41	0.3	38	216	3	1	1	1	0	1	0	51	16
	15	M	43	3.6	40	170	2	1	1	1	1	1	1	47	15
	16	M	23	4.7	29	182	2	0	1	1	0	1	0	34	17
	17	M	41	3.4	49	89	3	1	1	1	0	1	0	57	11
	18	M	52	3.1	48	60	2	1	1	1	0	1	0	48	17
	19	M	19	1.13	27	61	3	1	1	1	0	1	0	32	18
	20	F	26	4.5	42	98	3	0	1	1	0	1	0	39	22
	21	M	32	1.3	49	137	2	1	1	1	0	1	1	44	12
	22	M	64	4.5	40	180	2	1	1	1	0	1	0	41	19
	23	M	40	3.8	43	157	3	1	1	1	0	1	0	38	27
	24	M	64	4.6	44	24	2	0	1	1	0	1	0	21	16
	25	M	63	3.2	40	193	2	1	1	1	1	1	0	29	14

	Patient	Sex	Age at ESRD	Dialysis duration (year)	eGFR (mL/min/1.73m ²)	A/C (mg/mm oL)	IF/TA	Steroids	Purine Analog	CNI	Diabetes	HTA	ACR	Donor Age (year)	Cold Ischemia Time (hour)
Low eGFR Siro+ Group	1	M	35	4.3	47	1855	2	1	1	0	0	1	0	51	21,5
	2	M	35	4.3	42	1570	3	1	1	0	0	1	0	29	20,1
	3	M	40	3.8	39	1529	3	1	1	0	0	1	0	55	21,3
	4	M	33	4	48	3455	3	1	1	0	0	1	0	47	13,5
	5	M	54	1.7	47	1472	2	0	1	0	1	1	0	51	12,7
	6	F	34	1.9	26	2963	2	1	1	0	0	1	0	39	18,3
	7	F	48	3.2	24	1332	3	1	1	0	0	1	0	31	17,5
	8	M	15	8.6	36	1578	3	1	1	0	0	1	0	36	16
	9	M	38	5.4	51	1426	3	1	1	0	0	1	1	41	15,5
	10	F	45	0.5	26	2215	2	1	1	0	0	1	0	44	19,3
	11	M	21	2.2	50	2153	2	1	1	0	0	1	0	52	21
	12	F	36	6.3	42	286	2	1	1	0	0	0	0	29	13,5
	13	F	37	1.6	43	864	2	1	1	0	0	1	0	48	14,8

eGRF: estimated Glomerular Filtration Rate; ESRD: End Stage Renal Disease; A/C: Albumin/Creatinine ratio in the urine; IF/TA: Interstitial Fibrosis/Tubular Atrophy; CNI: Calcineurin

Inhibitor at the time of biopsy; HTA: Hypertension at the time of biopsy; ACR: Acute Cellular Rejection at the time of biopsy.

2 Étude du rôle de la voie AKT/mTORC au cours de la néphropathie liée au syndrome des antiphospholipides

(Article soumis)

Le syndrome des antiphospholipides (SAPL) se caractérise par la survenue de thromboses et/ou d'avortements spontanés associés à des anticorps antiphospholipides. A coté des thromboses, manifestation la plus connue et la mieux caractérisée, le SAPL s'accompagne de lésions vasculaires proliférative très particulières, intéressant l'intima des vaisseaux et conduisant progressivement à l'obstruction de la lumière. Ces lésions décrites dans tous les vaisseaux sont particulièrement bien connues dans le rein sous l'appellation : néphropathie liée au SAPL. Ces lésions ne sont pas modifiées par l'anticoagulation efficace qui constitue le traitement de référence du SAPL. Les voies moléculaires impliquées dans ce processus pathologique ne sont pas connues et aucune thérapeutique n'est actuellement envisagée.

Le but de mon travail de thèse a été d'étudier le rôle précis de la voie AKT/mTOR dans le développement de la néphropathie liée au SAPL.

Nous avons tout d'abord étudié l'état d'activation des voies mTORC1 et mTORC2 sur des biopsies rénales de patients ayant une néphropathie liée au SAPL. Alors qu'aucune phosphorylation n'est décelable dans les vaisseaux de reins normaux, nous avons observé sur les biopsies rénales patients ayant une néphropathie liée au SAPL, une phosphorylation, sélectivement endothéliale, de S6RP, cible d'aval de mTORC1, et de AKT sur la Ser⁴⁷³, cible d'aval de mTORC2. Les expériences de colocalisations ont confirmé que ces voies étaient activées dans les mêmes cellules endothéliales. Afin de mieux caractériser l'impact fonctionnelle de cette activation de la voie AKT/mTORC, nous nous sommes attachés ensuite à étudier la prolifération cellulaire. Nos résultats montrent une augmentation significative de la prolifération des cellules endothéliales mais aussi des cellules musculaires lisses adjacentes. Pour renforcer le lien entre le SAPL et activation endothéliale de la voie AKT/mTORC nous avons ensuite comparé le degré d'activation de cette voie dans une deuxième cohorte composée de patients ayant la même maladie, un lupus érythémateux disséminé, et le même niveau de fonction rénale, mais associée ou non à un SAPL. Les résultats confirment l'activation spécifiquement endothéliale de la voie AKT/mTORC et ce uniquement dans le

groupe ayant un SAPL. Cette activation de la voie AKT/mTORC s'accompagnait d'une prolifération des cellules de la paroi vasculaire.

Afin de juger du caractère systémique ou non de l'activation endothéliale de la voie AKT/mTORC au cours du SAPL, nous avons ensuite étudié différents territoires vasculaires de patients ayant une forme extrêmement sévère de SAPL, appelée le syndrome catastrophique des antiphospholipides (CAPS). Nous observâmes une activation endothéliale de cette voie et ainsi le caractère disséminé de cette activation.

Pour confirmer le lien direct entre anticorps antiphospholipides et activation endothéliale de la voie AKT/mTORC, nous avons ensuite étudié *in vitro* les effets de ces anticorps. Nous avons constaté que les anticorps antiphospholipides induisaient le recrutement endothéliale rapide de mTORC1 et mTORC2 et ce de manière PI3K dépendante. Afin d'identifier d'éventuelles pistes thérapeutiques, nous nous sommes intéressés à l'impact du sirolimus sur l'activation de ces voies. Nous avons observé que le traitement de cellules endothéliales par sirolimus durant une durée courte inhibait l'activation de la voie mTORC1 mais pas celle du complexe mTORC2 induite par les anticorps antiphospholipides. Fait important, un traitement prolongé dans le temps permettait une abolition complète de la signalisation mTORC1 mais aussi mTORC2 induite par les anticorps antiphospholipides.

Finalement, nous avons voulu évaluer l'impact d'un traitement par sirolimus sur la signalisation AKT/mTORC endothéliale de patients atteints de SAPL. Le sirolimus étant utilisé de manière courante comme immunosuppresseur, et compte tenu de la grande fréquence récurrence après greffe, nous avons étudié son impact chez des patients transplantés rénaux ayant un SAPL. Nous avons observé que le sirolimus inhibait l'activation endothéliale de la voie mTORC1 mais aussi mTORC2. Cette inhibition s'accompagnait d'une nette réduction de prolifération des cellules de la paroi vasculaire et d'un ralentissement de la progression des lésions vasculaires. Singulièrement, l'administration de sirolimus dans cette population s'accompagnait d'une meilleure fonction rénale à 12 mois post greffe et d'un allongement significatif de la survie du greffon rénal.

Ainsi, ce travail permet de révéler une partie des mécanismes physiopathologiques de la progression des lésions vasculaires liées au SAPL en mettant en lumière le rôle crucial de l'activation endothéliale de la voie AKT/mTORC. De plus, nous proposons une nouvelle arme thérapeutique dans cette pathologie dévastatrice.

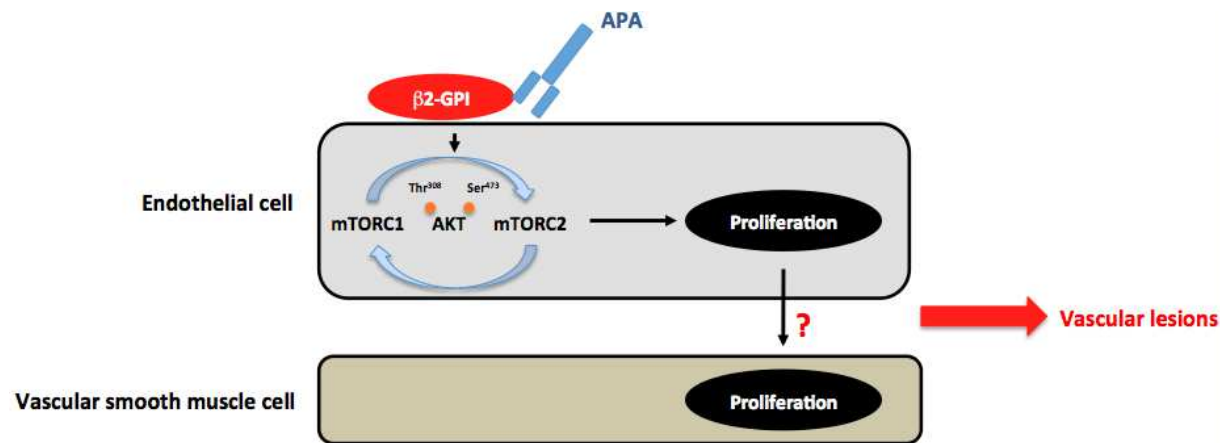


Figure 13: Modèle physiopathologique proposé. Les anticorps antiphospholipides (APA) en se liant à la β2-GPI à la surface de l'endothélium induisent le recrutement des voies PI3K et mTORC2 avec phosphorylation d'AKT. L'activation d'AKT induit la prolifération endothéliale mais aussi la synthèse d'un facteur mitogène d'origine endothéliale ciblant les cellules musculaires lisses.

mTORC pathway activation is instrumental in vascular lesion induced by antiphospholipid antibodies

Guillaume Canaud^{1,2}, Frank Bienaimé^{1,3}, Fanny Tabarin¹, Guillaume Bataillon⁴, Daniele Seilhan⁴, Laure-Hélène Noël⁵, Marie-Agnès Dragon-Durey⁶, Gérard Friedlander^{1,3}, Philippe Lesavre^{1,3}, Lise Mecarelli¹, Christophe Legendre^{1,2}, Fabiola Terzi¹.

- 1 INSERM U845, Centre de Recherche “Croissance et Signalisation”, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Hôpital Necker - Enfants Malades, 149 Rue de Sèvres, 75015 Paris, France
- 2 Service de Néphrologie Transplantation Adultes, Hôpital Necker - Enfants Malades, Paris, France
- 3 Service de Physiologie–Explorations Fonctionnelles, Hôpital Necker - Enfants Malades, Paris, France
- 4 Department of Pathology, Hôpital La Pitié-Salpêtrière, Paris, France
- 5 Department of Pathology, Hôpital Necker - Enfants Malades, Paris, France
- 6 Department of Immunology, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

Abstract

Antiphospholipid syndrome, the most frequent acquired cause of thrombophilia, is characterized by the presence of auto-antibodies directed against cell membrane phospholipids and phospholipid binding proteins. Proliferative lesion of the arterial vessels is the hallmark of the severe forms of APS such as APS nephropathy (APSN). The pathophysiology of these lesions is currently unknown and efficient therapeutic strategies are lacking. The key regulators of cell growth, mechanistic target of rapamycin (mTOR) complex 1 and 2 (mTORC1 and mTORC2), have been implicated in vascular narrowing after mechanical injury. Here, we observed a vascular activation of both mTORC1 and 2 pathways in APSN as well as in other critical arterial beds in patients with severe APS. Remarkably, this activation concerned selectively the endothelial cells but correlated with proliferation of both endothelial and smooth muscle cells and, more importantly, with vascular lesions. Mechanistically purified IgG from patients with APS activate both mTORC1 and mTORC2 in cultured endothelial cells in a complement independent manner. Remarkably, mTORC inhibition in kidney transplant recipient with recurrent APSN was associated with a reduction of the severity of the vascular lesions and with a marked improvement of allograft survival. In conclusion, our results disclose a novel and critical function played by mTOR during APS induce vascular lesion and identify a potential therapeutic target for preserving kidney function in this population.

Introduction

Antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune disease characterized by the presence of circulating antiphospholipid antibodies (APA) that cause arterial, venous and small vessels thrombosis and/or obstetrical complications consisting in pregnancy loss or preterm birth due to pre-eclampsia or placental insufficiency¹. APA are a family of autoantibodies that recognize various phospholipids and plasma proteins with affinity for anionic cell surface phospholipids. There are three main types of APA: lupus anticoagulant (LA), anti-cardiolipin (aCL) and anti- β 2 glycoprotein I antibodies (anti- β 2GPI)¹. This clinical syndrome is observed either isolated or in association with in a number of autoimmune disorders, i.e. systemic lupus erythematosus (SLE).

APS is considered as the most frequent cause for acquired thrombophilia and is associated with a significant morbidity and mortality¹. Indeed, APS account for 20% of the stroke in young patients. In addition, APS represents a major adverse prognostic factor in patients with SLE². The main consequence of the APS is thrombotic complication³, and so far, the only treatment, which has been shown to reduce the vascular complication in APS patients, is permanent anticoagulation. However, this regimen does not completely prevent the recurrence of vascular events in high risks patients and is associated with an increase incidence of bleeding.

Although thrombosis is considered as the key feature of the vascular disease in APS, chronic arterial and arteriolar lesions have been frequently associated. These lesions consist mainly in a thickening of the intima and the media often associated with an increased in the cellularity of the two layers⁴⁻¹¹. These lesions have been particularly well characterized in the kidney and called APS-nephropathy (APSN). These vascular changes lead to progressive fibrosis that ultimately results in end-stage renal failure (ESRF)¹²⁻¹⁴. Moreover, others and we have reported that kidney transplant recipients with APA are at greater risk to develop thrombotic

complication¹⁵⁻¹⁹. In addition to thrombotic complication, we have observed that these patients developed typical features of APSN recurrence on the allograft¹⁵. These lesions led to a fast decline of the measured glomerular filtration rate (mGFR).

To date the effort made to elucidate the pathogenesis of APS have focused on the mechanisms of thrombosis formation whereas the pathophysiological processes responsible for the chronic vascular changes associated with APS have not been investigated. In that regard, a better understanding of APSN pathogeny could represent an important milestone to elaborate therapeutic strategies limiting the chronic vascular alterations in APS.

mTORC kinase is a central node of the signalling pathways that regulates cellular growth, proliferation and survival. mTORC is a component of two functionally distinct complexes. mTOR complex 1 (mTORC1) stimulates ribosome biogenesis and protein translation by phosphorylating S6 kinase while in turn activates S6 ribosomal protein (S6RP), and 4E-BP1 protein (4EBP1). mTOR complex 2 (mTORC2) promotes survival, proliferation or migration depending on the cellular context, through AKT phosphorylation on Ser⁴⁷³. An important and complex cross-regulation exists between mTORC1 and mTORC2. Indeed, the activation of AKT by mTORC2 stimulates mTORC1, whereas mTORC1 reduces mTORC2 activation²⁰. mTORC has been shown to play an important role in the vascular narrowing secondary to mechanical endothelial injury in both experimental models and patients undergoing arterial angioplasty notably by promoting vascular smooth muscle cells (VSMC) proliferation in the media²¹⁻²⁴. Indeed the mTORC inhibitor sirolimus is now currently used to prevent reactive arterial stenosis after coronary artery stenting. Hence, we wondered whether mTORC pathway could play an instrumental role in vascular change associated with APSN.

Methods

Patients and data collection

Native kidney diseases

To analyse mTORC activation in APSN on native kidneys, we studied four distinct groups of patients followed in the Nephrology Department of Necker Hospital. The demographical characteristics are summarized in the Supplementary Table 1. Briefly, we examined (i) a group of patients with primary APS associated with biopsy proven APSN (n=12), (ii) a group of patients with APSN due to secondary APS superimposed on SLE nephritis (class III or IV) (n=20), (iii) a group of patients with SLE nephritis (class III or IV) but without APS nor APSN (n=25), (iv) and a control group composed of healthy renal peritumoral tissues from patients who undergone partial or complete nephrectomy for renal neoplasia (n=10).

Transplant recipients

The cohort of transplant recipients was previously described¹⁵ and demographical characteristics are summarized in the Supplementary Table 2. Briefly, we studied a first group of transplant recipients with APA+ (Tx APA+, n=37) and a control group of transplants recipients without APA- (Tx APA-, n=59) engrafted during the same period. These patients were followed in the Transplant unit of Necker Hospital. All patients with functioning allograft had surveillances biopsies and measured glomerular filtration rate (mGFR) at 3- and 12-months post transplantation. Thirteen and ten patients had an immunosuppressive regimen with sirolimus in the Tx APA- and Tx APA+ group, respectively.

Autopsy cases

We studied two groups of deceased patients autopsied in the Department of Pathology of La Pitié Salpêtrière, a first group of patients with catastrophic antiphospholipid syndrome (CAPS) (n=4) and a group of patients with SLE but without APS (n=4). The demographical

characteristics are listed in Supplementary Table 3. We explored two large arteries per patients: carotid and left anterior descending artery.

The Institutional Review Board of Necker Hospital approved this protocol and informed written consent was obtained from each patient.

Renal function and sirolimus serum levels

The serum creatinine level was measured using a Synchron Cx4 autoanalyzer (Beckman Coulter, Villepinte, France). The glomerular filtration rate (GFR) was evaluated by iohexol clearance at 3- and 12-months posttransplant as previously described²⁵. Sirolimus serum levels were determined by high-performance liquid chromatography²⁶.

Biopsy samples and morphological analysis

Human kidney biopsies were either fixed, in alcoholic Bouin's solution (native kidneys) or in alcohol-formalin-acetic acid solution (transplant kidneys). For carotid and left anterior descending artery providing from autopsy cases, samples were fixed in formalin. All samples were then embedded in paraffin. 4- μ m sections were stained with the Periodic Acid Schiff (PAS), Masson's trichrome and hematoxylin and eosin (H&E). Schiff (PAS), Masson's trichrome and hematoxylin and eosin. Transplant biopsies were evaluated using the Banff classification²⁷.

Immunohistochemistry and immunofluorescence

Immunofluorescence

4-mm sections of paraffin-embedded kidneys were incubated with P-AKT (Ser⁴⁷³) antibody (Cell Signaling Technology), anti-P-S6RP antibody (Cell Signaling Technology), anti- α SMA antibody (Sigma-Aldrich), anti-KI67 antibody (Novus Biological), anti-CD31 antibody (Dako) and anti-CD105 antibody (Sigma-Aldrich) after the appropriate antigen retrieval. The

primary antibodies were revealed with the appropriate Alexa 488- or 555-conjugated secondary antibody (Molecular Probes). Immunofluorescence staining was acquired with the Zeiss LSM 700 confocal microscope.

Immunohistochemistry

4-mm sections of paraffin-embedded kidneys were incubated with P-AKT (Ser⁴⁷³) antibody (Cell Signaling Technology), anti-P-S6RP antibody (Cell Signaling Technology) after the appropriate antigen retrieval. The primary antibodies were revealed with the appropriate secondary antibody (Molecular Probes). Peroxidase activity was revealed by 3-30-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB, Dako).

Cell proliferation assay

Proliferative cells were detected in kidney using proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining. 4- μ m sections of paraffin-embedded kidneys were incubated with a mouse anti-PCNA antibody (DAKO).

IgG purification

Human IgG containing antiphospholipid antibodies (APA IgG) were obtained from 12 patients with APS. IgG were purified using the Melon Gel IgG Purification System (Thermo Scientific) and control human IgG from a healthy non-autoimmune person (NH IgG) were purified by an identical method (n=14).

Cells culture and cells experiments

We choose Human micro vascular endothelial cells (HMEC) cells for their relevance and implication in the pathophysiology of the disease as observed in dermatological vasculopathy associated with APA. HMEC were cultured in MCDB 131 medium supplemented with 10% FCS (MCDB 131-10% FCS medium). HMEC were grown to a confluence of 80% and then

starved for 12 h in MCDB 131 medium supplemented with 2% FCS before use (MCDB 131-2% FCS medium). Next, cells were incubated during one hour with β 2-GP1 (5mg/ml, Stago) in MCDB 131-2% FCS medium. After washing, HMEC were exposed to NH IgG (100mg/mL) (n=14) or APA IgG (100mg/mL) (n=12) antibodies in MCDB 131-2% FCS medium during five minutes.

Western blot

Western blots were performed as previously described²⁸. Briefly, protein extracts from HMEC were resolved by SDS-PAGE before being transferred onto the appropriate membrane and incubated with anti-P-AKT (Ser⁴⁷³) antibody (Cell Signaling Technology), anti-P-AKT (Thr³⁰⁸) antibody (Cell Signaling Technology), anti-P-S6RP antibody (Cell Signaling Technology), anti-P-GSK3 α antibody (Cell Signaling Technology), anti-AKT antibody (Cell Signaling Technology), anti-S6RP antibody (Cell Signaling Technology) and anti- β actin antibody (Sigma-Aldrich).

Sirolimus, LY294002, PP242 and cells experiments

For sirolimus (LC laboratories, L-7962), we used two different procedures: a short exposure (one hour) and a long one (twenty four hours). In the short exposure procedure, HMEC were incubated during one hour with β 2-GP1 plus sirolimus 20nM and finally exposed to NH IgG (n=6) or APA IgG (n=6) during five minutes. For long exposure, we used the same experimental procedure but HMEC were pretreated with sirolimus 20nM during 48h. For LY294002 (20mM) (LC laboratories, R-5000) and PP242 (0.5mM) (home made by Azasynth) we also used the same experimental procedure but HMEC were pretreated before use during one hour. All experiments were performed in duplicates.

Data analysis and statistics

Data were expressed as means $\pm$ SEM. Differences between the experimental groups were evaluated using ANOVA, followed when significant ($P < 0.05$) by the Tukey-Kramer test. When only two groups were compared, Mann-Whitney tests were used. The statistical analysis was performed using Graph Prism Software.

Results

1/ mTORC pathway is activated in endothelial cells of patients with APA

In order to investigate the state of activation of the mTORC pathway in the arterial and arteriolar renal beds of patients with primary APS we analysed the phosphorylation of two critical downstream targets, S6RP and AKT (Ser⁴⁷³), which reflect the activation of mTORC1 and mTORC2 respectively. Immunofluorescence revealed a high kidney number P-S6RP and P-AKT (Ser⁴⁷³) positive vascular sections in kidney biopsies from patients with primary APS whereas any signal could be detected in controls (Figure 1A, 1B and 1E, Supplementary Figure 1). Interestingly, most of positive cells localized to vascular sections with prominent lesions. Colocalization experiments showed that, both P-S6RP and P-AKT (Ser⁴⁷³) were activated in endothelial cells (CD105 positive cells) but not in α -smooth muscle actin positive cells (α -SMA positive cells) (Figure 1A and 1B). In addition, immunostaining on serial section showed that mTORC1 and mTORC2 activation occurred in the same vessels (Figure 1D and Supplementary Figure 1).

To ascertain that mTOR activation in endothelial cells resulted by APA and not by chronic kidney disease, we took advantage of a cohort of patients with SLE complicated by APS (SLE APS+) or not (SLE APS-). By comparing kidney biopsies from patients with similar degree of lupus nephritis, we observed that P-S6RP and P-AKT (Ser⁴⁷³) positive vascular sections were almost exclusively detected in the SLE APS+ group. Colocalization experiments confirmed the endothelial nature of mTORC activation (Figure 1A, 1B and 1E). Collectively these results indicate that the occurrence of renal vascular lesions is strongly and specifically associated with mTORC1 and mTORC2 activation in APS patients.

2/ Endothelial mTORC pathway is activated during CAPS

To determine if APA induces vascular lesion is restricted to kidney or associated with a more

general vascular disease, we explored autopsy cases from patients with CAPS and a group of patients with SLE but without APS (SLE APS-) as a control group. Interestingly, in two different vascular beds studied (carotid and left anterior descending artery), we observed severe and extraordinary narrowed lumen of vessels by neointimal formation in both territories specifically in the CAPS group (Supplementary Figure 2). Importantly, these lesions on large arteries did not have features of

atheromatous lesions in this young population. We observed, on serial sections, that all narrowed vessel in the CAPS group had positive endothelial cells for P-S6RP and P-AKT (Ser⁴⁷³) whereas SLE APS- patients did not (Supplementary Figure 2). Hence, APA induces systemic vascular lesions with endothelial mTORC pathway activation.

3/ mTORC activation is associated with vascular proliferation in APSN

Since morphological appearance of the intima suggests hypercellularity and, as mTOR pathway activation is associated with proliferation, we hypothesized that vascular cell proliferation might contribute to the development of lesions. PCNA immunostaining showed that very few cells were positive in vessels of the control group and the SLE APS- group. Remarkably, the number of vascular cross section with PCNA positive cells dramatically increased in the group of patients with either primary APS or SLE APS+ (Figure 1C and 1E). Colocalization studies showed that proliferation was not restricted to endothelial cells but also involved VSMC (data not shown). Interestingly, proliferation in VSMC suggests a cross talk with endothelial cells.

4/ APA activate mTOR in endothelial cells *in vitro*

We next investigate if APA may directly activate mTORC pathway in endothelial cells. In this aim, we incubated a line of HMEC with either normal human IgG obtained from healthy

individuals (NH IgG) or polyclonal APA isolated from APS patients (APA IgG). Strikingly, APA IgG induced a marked increase in the phosphorylation of S6RP and AKT (Ser⁴⁷³) within five minutes whereas NH IgG did not (Figure 2A). To further support the activation of AKT, we observed that one of its direct targets, GSK3 α , was also phosphorylated (Figure 2A). To characterize the mTORC implication in APA induces AKT activation, we then pretreated HMEC with PP242, a selective mTOR kinase inhibitor²⁹(Figure 2B). We observed that this treatment completely abolished APA-induced AKT and S6RP phosphorylation.

Since AKT could be recruited to the membrane by Phosphoinositide-Dependent Protein kinase 1 (PDK1)³⁰, we investigated the phosphorylation status of AKT on Thr³⁰⁸. Interestingly, we observed that APA IgG induced a marked increase in the phosphorylation of AKT (Thr³⁰⁸), whereas NH IgG did not (Figure 2A). More importantly, pretreatment of HMEC with LY294002, a PI3K inhibitor³¹, was able to completely prevent the activation of the AKT pathway supporting the role of a PI3K dependent recruitment of AKT to cell membrane (Figure 2B).

Since sirolimus is a specific inhibitor of mTORC routinely used in clinics, we evaluate the effect of this drug on APA induced AKT activation (Figure 2B). Sirolimus inhibits mTORC1 by dissociating the mTORC1 complexes, but also depending of cell type and treatment duration, sirolimus has been shown to inhibit mTORC2, likely by preventing the assembly of novel mTORC2 complexes³²⁻⁴¹. Consistent with these findings, we observed that a short exposure of HMEC to sirolimus led to a complete inhibition of the APA-induced phosphorylation of S6RP but failed to prevent AKT phosphorylation on the residue Ser⁴⁷³. Interestingly, after a longer exposition, sirolimus blocked the APA-induced phosphorylation of both S6RP and AKT (Figure 2B).

Collectively these results indicate that APA activates mTORC2 and mTORC1 in endothelial cells in a PI3K dependent manner.

5/ Sirolimus inhibits endothelial mTORC pathway activation and prevents vascular lesions in transplant recipients with APA

Our results suggested that sirolimus could be a potential therapeutic for APSN. We took advantages of the use of this compound as an immunosuppressive drug in renal transplantation. We recently reported that patients with APA (Tx APA+) at the time of transplantation tend to develop severe vascular lesions on the grafted kidney resulting in a poor functional outcome compared to a control group of transplant recipients without APA (controls)¹⁵. Among the 37 Tx APA+ patients of our cohort, 10 received sirolimus therapy as an immunosuppressive regimen (Tx APA+ Siro+). Using protocol biopsies, we first observed that Tx APA+ Siro+ patients developed only very few chronic APSN lesions, such as intimal hyperplasia (Figure 3A), and less non-specific chronic allograft lesions of the vessels, interstitium and tubules, during the first year of transplantation compared to transplant recipients with APA but without sirolimus (Tx APA+ Siro-) (Figure 3B, Supplementary Figure 3 and 4A). Moreover, Tx APA+ Siro+ patients had a significantly better mGFR compared to APA+ Siro- patients (56 ± 10.8 vs. 39.6 ± 14.6 mL/min respectively) (Figure 3C). Importantly, after a median follow-up of 52.5 ± 23.5 months, Kaplan Meier survival analysis showed a significantly improved allograft survival rate in Tx APA+ Siro+ patients compared to Tx APA+ Siro- patients (Figure 3D).

We then evaluated using protocols biopsies, the state of endothelial mTORC activation. We observed that, either at 3- or 12-months post transplantation, a high number of P-AKT (Ser⁴⁷³) and P-S6RP positive renal vascular sections was present in biopsies from Tx APA+ Siro- patients whereas only very few vascular sections were positive in the Tx APA- group (Figure

4A and 4B, Supplementary Figure 4B and 4C). This observation corroborates the crucial role of APA to trigger mTOR pathway in endothelial cells. Importantly, we failed to detect any mTORC1 and also mTORC2 activity, in vascular section of Tx APA+ Siro+ patients (Figure 4A and 4B, Supplementary Figure 4B and 4C). Next, we analysed the rate of vascular cells proliferation on protocol biopsies to assess the impact of endothelial mTORC activation during the post transplant course. As on native kidneys, we observed that mTORC activation was associated with an increase of vascular cells proliferation in Tx APA+ Siro- patients compared to Tx APA- patients (Figure 4C, Supplementary Figure 4D). Strikingly, vascular cell proliferation was dramatically reduced in Tx APA+ Siro+ patients (Figure 4C, Supplementary Figure 4D).

Discussion

By combining *in vivo* observations in humans with *in vitro* studies, we were able to establish a pivotal role for the mTORC pathway in regulating the progression of vascular disease in APS. We demonstrate an activation of both mTORC1 and mTORC2 in the endothelial cells of APS patients with APS related chronic vascular remodelling. The direct causative role of APA in this setting is sustained by our finding that exposition of cultured human endothelial cells to APA elicits both mTORC1 and mTORC2 signalling. Taking advantage of the use of sirolimus as an immunosuppressive drug in transplanted patients, we demonstrated that mTORC activation acts as a growth-promoting factor that is instrumental in the constitution of the APS related chronic vascular lesions. Strikingly, we found that sirolimus therapy was associated with a preservation of the kidney architecture and function in transplanted patients with APA. As a whole, our results identified a new mechanism of antibody mediated vascular injury and point at mTORC inhibition as a potential, molecular targeted, therapeutic strategy in APS.

Although many studies have been conducted to elucidate the molecular mechanisms leading to thrombosis during APS, the signaling pathways that allow antiphospholipid antibodies to vascular cells proliferation and progressive occlusion were unknown. Our study points to mTORC as the kinase that induces endothelial cells activation and proliferation in this setting. In fact, we observed that mTORC is activated in endothelial cells in response to antiphospholipid antibodies binding consistent with previous *in vitro* studies reporting an activation of mTORC in cultured endothelial cells submitted to others type of antibodies such as anti-HLA antibodies⁴². More importantly, we demonstrated that, in human, the preclusion of such activation by sirolimus treatment led to prevention of vascular damage.

Our *in vitro* studies provided a direct link between APA and mTORC pathway activation. Interestingly, APA induced a rapid recruitment of mTORC1 and mTORC2 complexes. However, the mechanism by which mTORC is recruited by APA is not elucidated. APA have

been demonstrated to promote thrombosis in part through ligation with the domain I of β 2GPI on endothelial cell surface⁴³. This complex then cross-link many receptors including annexin A2, toll like receptor 4, calreticulin, apoER2 and nucleolin, leading to cell activation and thrombosis⁴⁴⁻⁴⁶. In our model, after APA ligation to its cellular receptors, AKT is rapidly recruited to the membrane and phosphorylated on residue Thr³⁰⁸ in a PI3K dependant step as assed by the impact of LY294002. Importantly, we observed, that endothelial mTORC2 could be sirolimus sensitive in some conditions. Indeed, a short time exposure of sirolimus led to a rapid blockage of mTORC1 but nor mTORC2. However, a more prolonged exposure led to a complete blockage of mTORC1 and mTORC2 pathways. This finding is in phase with recent results, obtain *in vitro* but also *in vivo*, where the mechanism of mTORC2 inhibition due to sirolimus is unclear, acting either by dissociating the mTORC2 complex or reducing RICTOR expression³²⁻⁴¹.

Our study revealed that, while mTORC activation is compartmentalized in endothelial cells, proliferation involved both, endothelial cells and VSMC. This observation supports that endothelial cells can lead to the release of a mitotic paracrine factor targeting VSMC, whom secretion is mTORC dependent. Endothelial cells play numerous physiological roles including the maintenance of vascular tone by release of molecules such as nitric oxide, endothelin-1 or prostacyclin⁴⁷, and normally inhibit VSMC proliferation^{48,49}. During mechanical injury, endothelial cells secrete many cytokines, such as platelet-derived growth factor (PDGF), that directly induce VSMC replication, deposition of extracellular matrix and may lead to the formation of a progressive obliterative neointima⁵⁰. Interestingly, similar findings have been done in the context of solid organ transplantation where endothelial injury is mediated by antibody⁵¹⁻⁵⁵. In this setting, anti-HLA antibodies are associated with chronic vascular remodelling and neointima information. This process has been linked to mTORC pathway activation^{42,56} and PDGF- β secretion⁵⁷.

Despite systemic anticoagulation, the standard treatment of patients with APS, this regimen failed to fully prevent the recurrence of arterial accidents. We provide here a new therapeutic option that is independent of haemostasis as we observed endothelial mTORC activation in spite of anticoagulation in patients with APA, and *in vitro* mTORC signalling elicited by APA in the absence of a functional coagulation cascade.

In conclusion, this work has established mTORC as a central axis in endothelial cell biology that modulates vascular injury mediated by APA. After kidney transplantation in patients with APA, disruption of this pathway prevents tissue damage, improved mGFR as well as allograft survival rate. Therefore, targeting mTORC pathway may represent an interesting strategy during APS or CAPS but is not devoid of potentially deleterious consequences. Particularly, mTORC inhibition in patients with compromised renal function may lead to proteinuria and renal deterioration. Thus, prospective studies are needed to delineate the precise therapeutic field of mTORC inhibition in APS.

References

1. Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *The New England journal of medicine* 2002;346:752-63.
2. Ruiz-Irastorza G, Khamashta MA, Hughes GR. Antiphospholipid antibodies and risk for recurrent vascular events. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2004;291:2701; author reply 2-3.
3. Espinosa G, Cervera R. Morbidity and mortality in the antiphospholipid syndrome. *Current opinion in pulmonary medicine* 2009;15:413-7.
4. Long BR, Leya F. The role of antiphospholipid syndrome in cardiovascular disease. *Hematology/oncology clinics of North America* 2008;22:79-94, vi-vii.
5. Alarcon-Segovia D, Cardiel MH, Reyes E. Antiphospholipid arterial vasculopathy. *The Journal of rheumatology* 1989;16:762-7.
6. Lie JT. Vasculopathy in the antiphospholipid syndrome: thrombosis or vasculitis, or both? *The Journal of rheumatology* 1989;16:713-5.
7. Reyes E, Alarcon-Segovia D. Leg ulcers in the primary antiphospholipid syndrome. Report of a case with a peculiar proliferative small vessel vasculopathy. *Clinical and experimental rheumatology* 1991;9:63-6.
8. Champion RH, Rook A. Cutaneous arteriolitis. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 1960;53:568.
9. Deffer TA, Berger TG, Gelinas-Sorell D. Sneddon's syndrome. A case report. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1987;16:1084-7.
10. Macucci M, Dotti MT, Battistini S, et al. Primary antiphospholipid syndrome: two case reports, one with histological examination of skin, peripheral nerve and muscle. *Acta neurologica* 1994;16:87-96.

11. Hughson MD, McCarty GA, Brumback RA. Spectrum of vascular pathology affecting patients with the antiphospholipid syndrome. *Human pathology* 1995;26:716-24.
12. Nochy D, Daugas E, Droz D, et al. The intrarenal vascular lesions associated with primary antiphospholipid syndrome. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:507-18.
13. Daugas E, Nochy D, Huong DL, et al. Antiphospholipid syndrome nephropathy in systemic lupus erythematosus. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:42-52.
14. Tektonidou MG, Sotsiou F, Nakopoulou L, Vlachoyiannopoulos PG, Moutsopoulos HM. Antiphospholipid syndrome nephropathy in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibodies: prevalence, clinical associations, and long-term outcome. *Arthritis and rheumatism* 2004;50:2569-79.
15. Canaud G, Bienaime F, Noel LH, et al. Severe vascular lesions and poor functional outcome in kidney transplant recipients with lupus anticoagulant antibodies. *Am J Transplant* 2010;10:2051-60.
16. Stone JH, Amend WJ, Criswell LA. Antiphospholipid antibody syndrome in renal transplantation: occurrence of clinical events in 96 consecutive patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Kidney Dis* 1999;34:1040-7.
17. Vaidya S, Gugliuzza K, Daller JA. Efficacy of anticoagulation therapy in end-stage renal disease patients with antiphospholipid antibody syndrome. *Transplantation* 2004;77:1046-9.
18. Ducloux D, Pellet E, Fournier V, et al. Prevalence and clinical significance of antiphospholipid antibodies in renal transplant recipients. *Transplantation* 1999;67:90-3.
19. Wagenknecht DR, Becker DG, LeFor WM, McIntyre JA. Antiphospholipid antibodies are a risk factor for early renal allograft failure. *Transplantation* 1999;68:241-6.
20. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012;149:274-93.

21. Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, et al. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation* 1999;99:2164-70.
22. Farb A, John M, Acampado E, Kolodgie FD, Prescott MF, Virmani R. Oral everolimus inhibits in-stent neointimal growth. *Circulation* 2002;106:2379-84.
23. Sousa JE, Costa MA, Abizaid AC, et al. Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up. *Circulation* 2001;104:2007-11.
24. Finn AV, John M, Nakazawa G, et al. Differential healing after sirolimus, paclitaxel, and bare metal stent placement in combination with peroxisome proliferator-activator receptor gamma agonists: requirement for mTOR/Akt2 in PPARgamma activation. *Circ Res* 2009;105:1003-12.
25. Stevens LA, Levey AS. Measured GFR as a confirmatory test for estimated GFR. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:2305-13.
26. Canaud G, Knebelmann B, Harris PC, et al. Therapeutic mTOR inhibition in autosomal dominant polycystic kidney disease: What is the appropriate serum level? *Am J Transplant* 2010;10:1701-6.
27. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008;8:753-60.
28. Viau A, El Karoui K, Laouari D, et al. Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *The Journal of clinical investigation* 2010;120:4065-76.
29. Janes MR, Limon JJ, So L, et al. Effective and selective targeting of leukemia cells using a TORC1/2 kinase inhibitor. *Nature medicine* 2010;16:205-13.

30. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007;129:1261-74.
31. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *The Journal of biological chemistry* 1994;269:5241-8.
32. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular cell* 2006;22:159-68.
33. Lamming DW, Ye L, Katajisto P, et al. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science (New York, NY)* 2012;335:1638-43.
34. Barilli A, Visigalli R, Sala R, et al. In human endothelial cells rapamycin causes mTORC2 inhibition and impairs cell viability and function. *Cardiovasc Res* 2008;78:563-71.
35. Wang Y, Mikhailova M, Bose S, Pan CX, deVere White RW, Ghosh PM. Regulation of androgen receptor transcriptional activity by rapamycin in prostate cancer cell proliferation and survival. *Oncogene* 2008;27:7106-17.
36. Zeng Z, Sarbassov dos D, Samudio IJ, et al. Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood* 2007;109:3509-12.
37. Shu L, Houghton PJ. The mTORC2 complex regulates terminal differentiation of C2C12 myoblasts. *Molecular and cellular biology* 2009;29:4691-700.
38. Chen XG, Liu F, Song XF, et al. Rapamycin regulates Akt and ERK phosphorylation through mTORC1 and mTORC2 signaling pathways. *Mol Carcinog* 2010;49:603-10.
39. Barlow AD, Xie J, Moore CE, et al. Rapamycin toxicity in MIN6 cells and rat and human islets is mediated by the inhibition of mTOR complex 2 (mTORC2). *Diabetologia* 2012;55:1355-65.

40. Letavernier E, Bruneval P, Vandermeersch S, et al. Sirolimus interacts with pathways essential for podocyte integrity. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:630-8.
41. Vollenbroeker B, George B, Wolfgart M, Saleem MA, Pavenstadt H, Weide T. mTOR regulates expression of slit diaphragm proteins and cytoskeleton structure in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;296:F418-26.
42. Lepin EJ, Zhang Q, Zhang X, et al. Phosphorylated S6 ribosomal protein: a novel biomarker of antibody-mediated rejection in heart allografts. *Am J Transplant* 2006;6:1560-71.
43. de Laat B, Derksen RH, van Lummel M, Pennings MT, de Groot PG. Pathogenic anti-beta2-glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta2-glycoprotein I only after a conformational change. *Blood* 2006;107:1916-24.
44. Allen KL, Hamik A, Jain MK, McCrae KR. Endothelial cell activation by antiphospholipid antibodies is modulated by Kruppel-like transcription factors. *Blood* 2011;117:6383-91.
45. Allen KL, Fonseca FV, Betapudi V, Willard B, Zhang J, McCrae KR. A novel pathway for human endothelial cell activation by antiphospholipid/anti-beta2 glycoprotein I antibodies. *Blood* 2012;119:884-93.
46. Ramesh S, Morrell CN, Tarango C, et al. Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via beta2GPI and apoER2. *The Journal of clinical investigation* 2011;121:120-31.
47. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
48. Peiro C, Redondo J, Rodriguez-Martinez MA, Angulo J, Marin J, Sanchez-Ferrer CF. Influence of endothelium on cultured vascular smooth muscle cell proliferation. *Hypertension* 1995;25:748-51.

49. Milliat F, Francois A, Isoir M, et al. Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation: implication in radiation-induced vascular damages. *The American journal of pathology* 2006;169:1484-95.
50. Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, Ross R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* (New York, NY 1991;253:1129-32.
51. Galvani S, Auge N, Calise D, et al. HLA class I antibodies provoke graft arteriosclerosis in human arteries transplanted into SCID/beige mice. *Am J Transplant* 2009;9:2607-14.
52. Amano J, Ishiyama S, Nishikawa T, et al. Proliferation of smooth muscle cells in acute allograft vascular rejection. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 1997;113:19-25.
53. Shi C, Feinberg MW, Zhang D, et al. Donor MHC and adhesion molecules in transplant arteriosclerosis. *The Journal of clinical investigation* 1999;103:469-74.
54. Geraghty JG, Stoltenberg RL, Sollinger HW, Hullett DA. Vascular smooth muscle cells and neointimal hyperplasia in chronic transplant rejection. *Transplantation* 1996;62:502-9.
55. Grimm PC, Nickerson P, Jeffery J, et al. Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *The New England journal of medicine* 2001;345:93-7.
56. Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R, et al. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *The New England journal of medicine* 2003;349:847-58.

57. Boersema M, Katta K, Rienstra H, et al. Local medial microenvironment directs phenotypic modulation of smooth muscle cells after experimental renal transplantation. *Am J Transplant* 2012;12:1429-40.

Figure 1: mTORC pathway is activated in kidney endothelial cells of patients with APS. (A) Colocalization between P-Akt (Ser⁴⁷³) and CD105 (endothelial cell marker) in biopsies of the four groups of patients (control, primary APS, SLE without APS and SLE with APS). (B) Colocalization between P-S6RP and α -SMA in biopsies of the four groups of patients (control, primary APS, SLE without APS and SLE with APS). (C) PCNA immunostaining and quantification of PCNA-positive vascular section (black arrow). (D) P-AKT (Ser⁴⁷³) and P-S6RP immunostaining on serial section of kidney biopsy from patient with APSN. (E) Quantification of positive vascular section for P-AKT (Ser⁴⁷³), P-S6RP and PCNA. Scale bar: 50 μ m. Data are means $\pm$ SEM. ANOVA followed by Tukey-Kramer test; APS/SLE APS+ *versus* Control: *** P < 0.001; APS/SLE APS+ *versus* SLE APS-: ### P < 0.001. APS: antiphospholipid syndrome; SLE: systemic lupus erythematosus

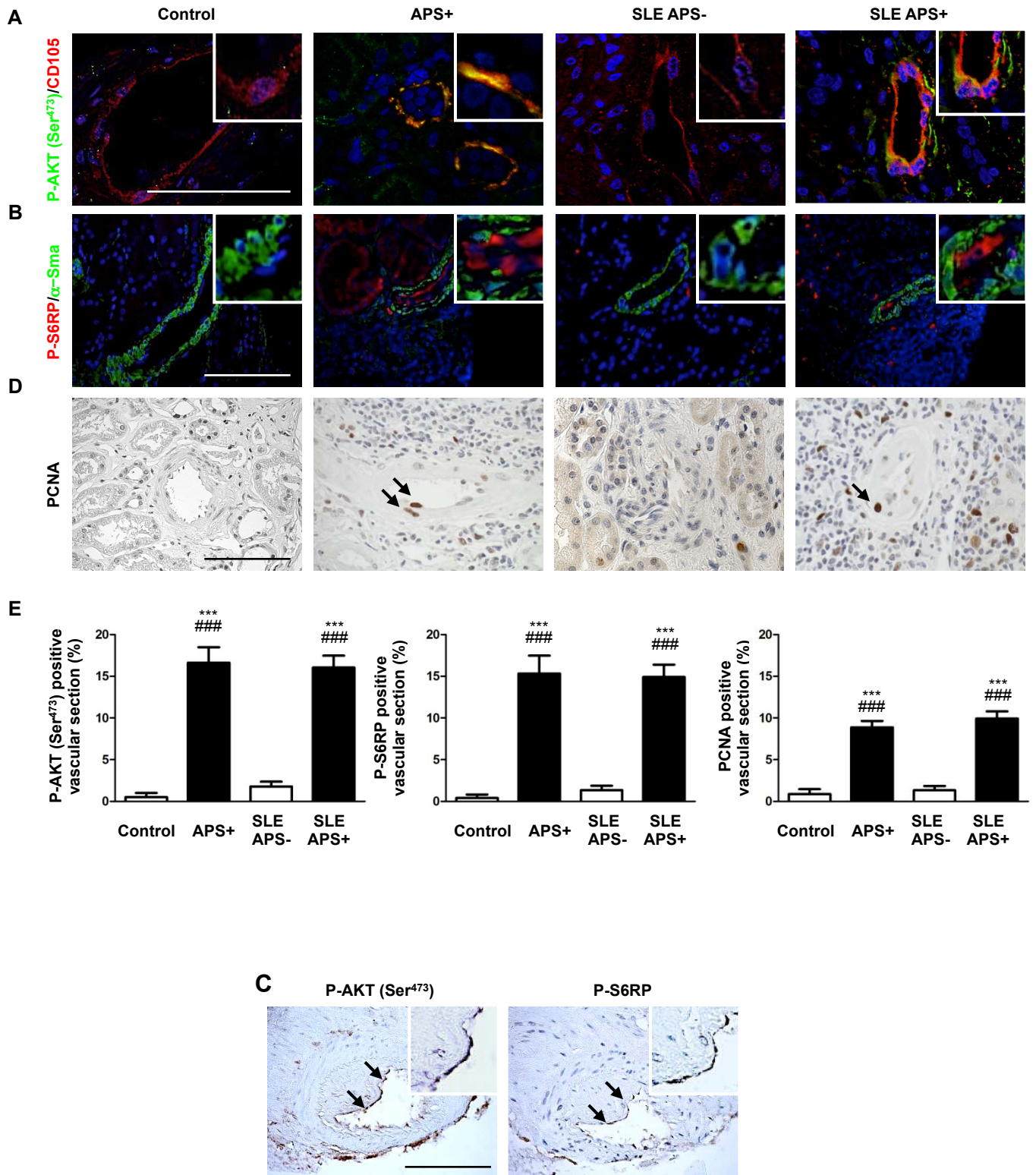


Figure 1

Figure 2: APA activate mTORC in endothelial cells *in vitro*. (A) Western blot and quantification of P-AKT (Ser⁴⁷³), P-S6RP, P-AKT (T³⁰⁸) and P-GSK3 α in HMEC five minutes after exposition to NH IgG or APA IgG. (B) Effect of different inhibitors on mTORC1 and mTORC2 pathway. Western blot of P-AKT (Ser⁴⁷³) and P-S6RP in HMEC five minutes after exposition to NH IgG or APA IgG after exposure to PP242, LY294002, a short or a long exposure to sirolimus. Data are means $\pm$ SEM. ANOVA followed by Tukey-Kramer test; ** P < 0.01; *** P < 0.001. n=12-14 for *in vitro* experiments.

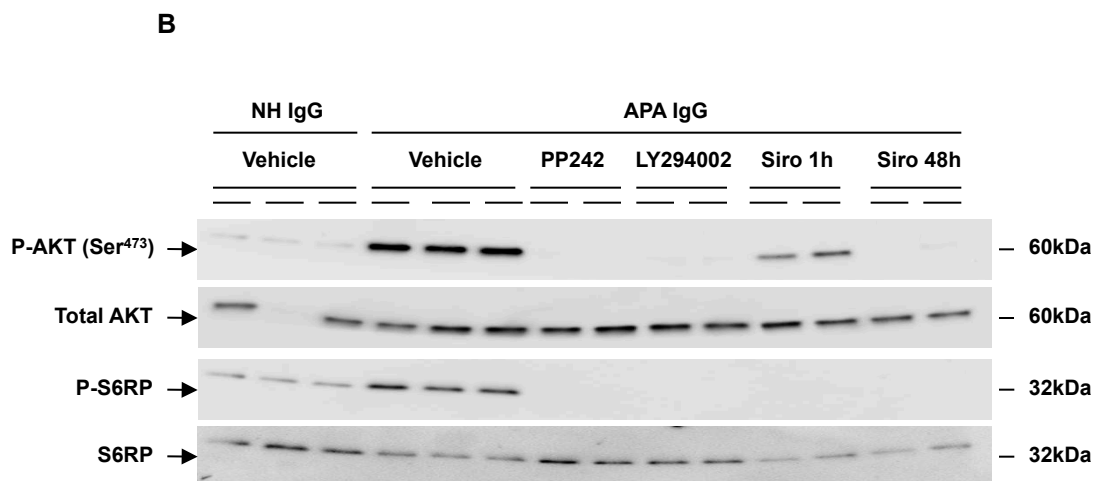
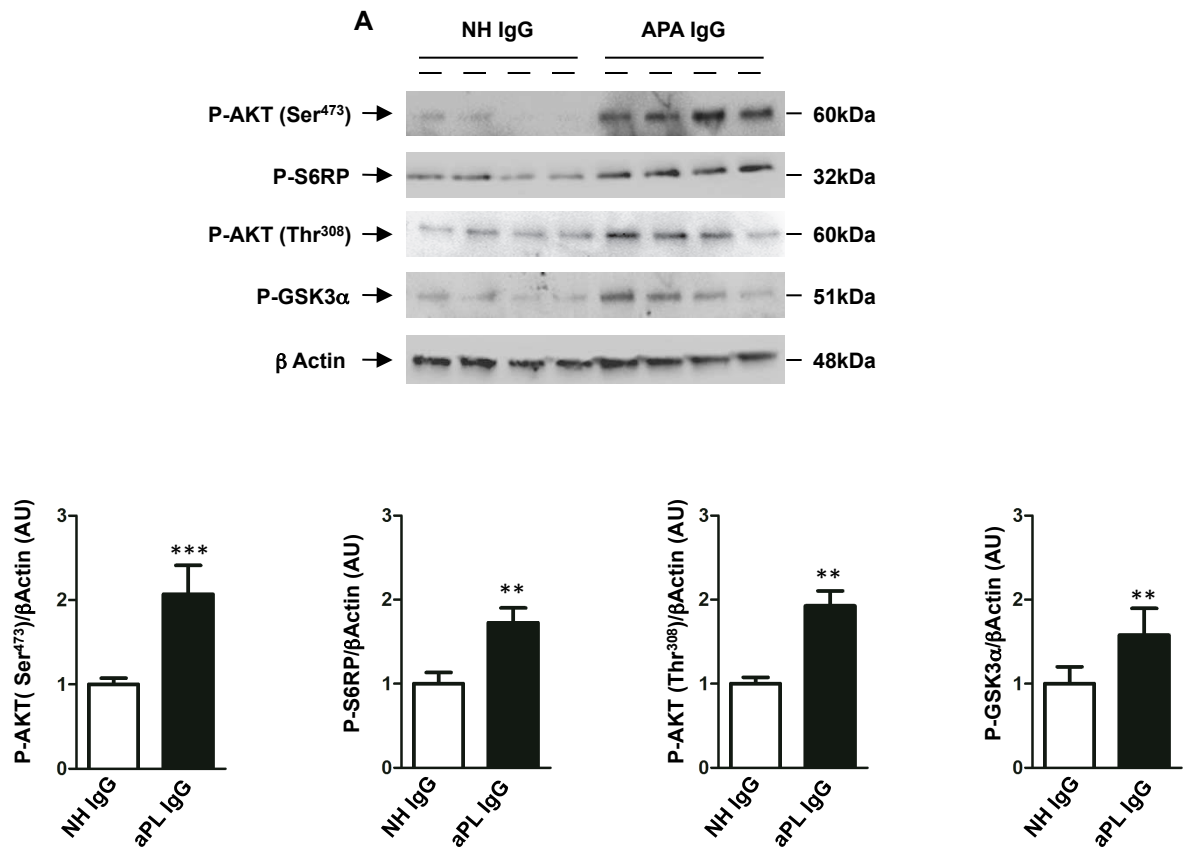
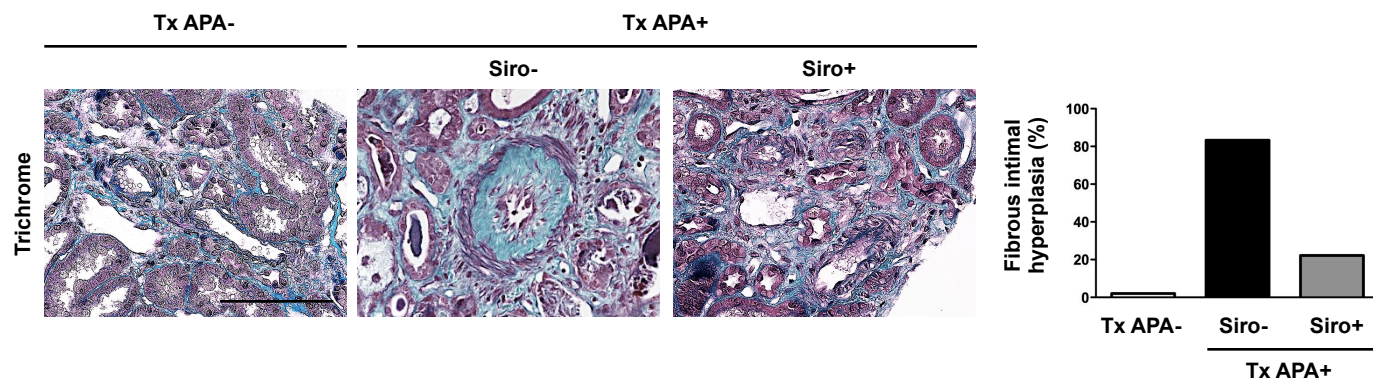


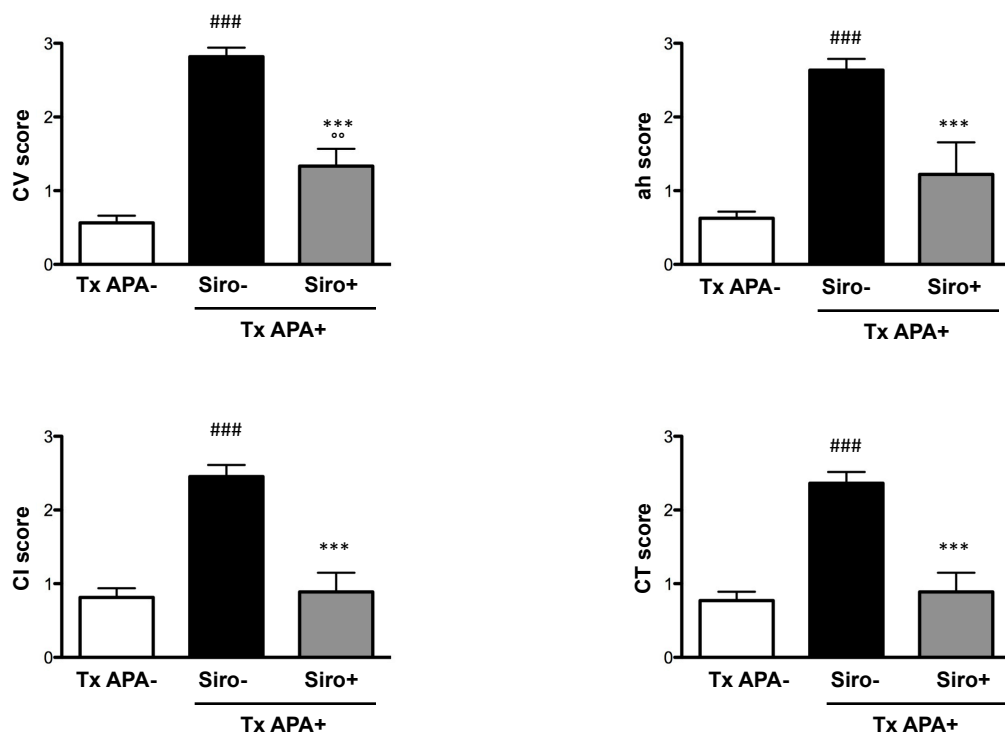
Figure 2

Figure 3: Sirolimus prevents vascular lesions in transplant recipients with APA at 12-months post transplantation. (A) Representative Trichrome of each group of patient and quantification of fibrous intimal hyperplasia. (B) Banff scoring of kidney transplants biopsies from APA-, APA+ Siro- and APA+ Siro+ groups at 12 months post transplantation. (C) Measured glomerular filtration rate (GFR) at 12 months post transplantation in the three groups of transplant recipients, APA-, APA+ Siro- and APA+ Siro+. (D) Allograft survival rate between the three groups of patients APA-, APA+ Siro- and APA+ Siro+. Data are means $\pm$ SEM. ANOVA followed by Tukey-Kramer test; Tx APA+ Siro- *versus* Tx APA-: ### $P < 0.001$; Tx APA+ Siro- *versus* Tx APA+ Siro+: *** $P < 0.001$, Tx APA+ Siro+ *versus* Tx APA-: °° $P < 0.01$. APA: antiphospholipid antibodies.

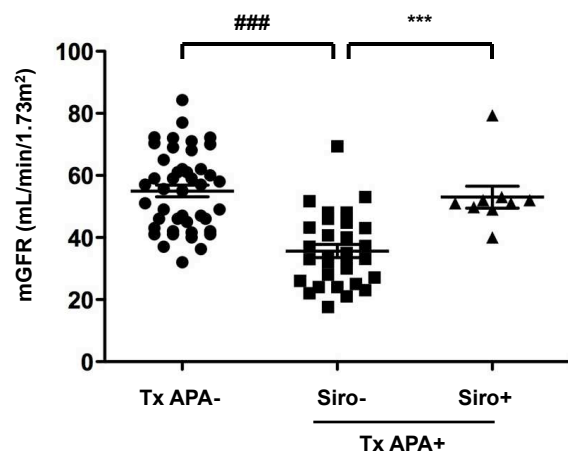
A



B



C



D

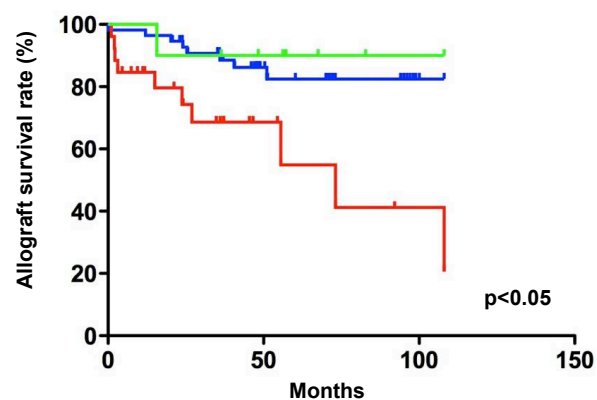


Figure 3

Figure 4: Sirolimus inhibits endothelial mTORC pathway activation. (A) Colocalization between P-Akt (Ser⁴⁷³) and CD105 (endothelial cell marker) in biopsies of the three groups of patients (Tx APA+ Siro-, Tx APA+ Siro+) and quantification at 12-months post transplantation. (B) Colocalization between P-S6RP and α -SMA in biopsies of the three groups of patients (Tx APA+ Siro-, Tx APA+ Siro+) and quantification at 12-months post transplantation. (C) PCNA immunostaining and quantification of PCNA-positive vascular section (black arrow) in biopsies of the three groups of patients (Tx APA+ Siro-, Tx APA+ Siro+) and quantification at 12-months post transplantation. Scale bar: 50 μ m. Data are means $\pm$ SEM. ANOVA followed by Tukey-Kramer test; Tx APA+ Siro- *versus* Tx APA-: ### P < 0.001; Tx APA+ Siro- *versus* Tx APA+ Siro+: *** P < 0.001.

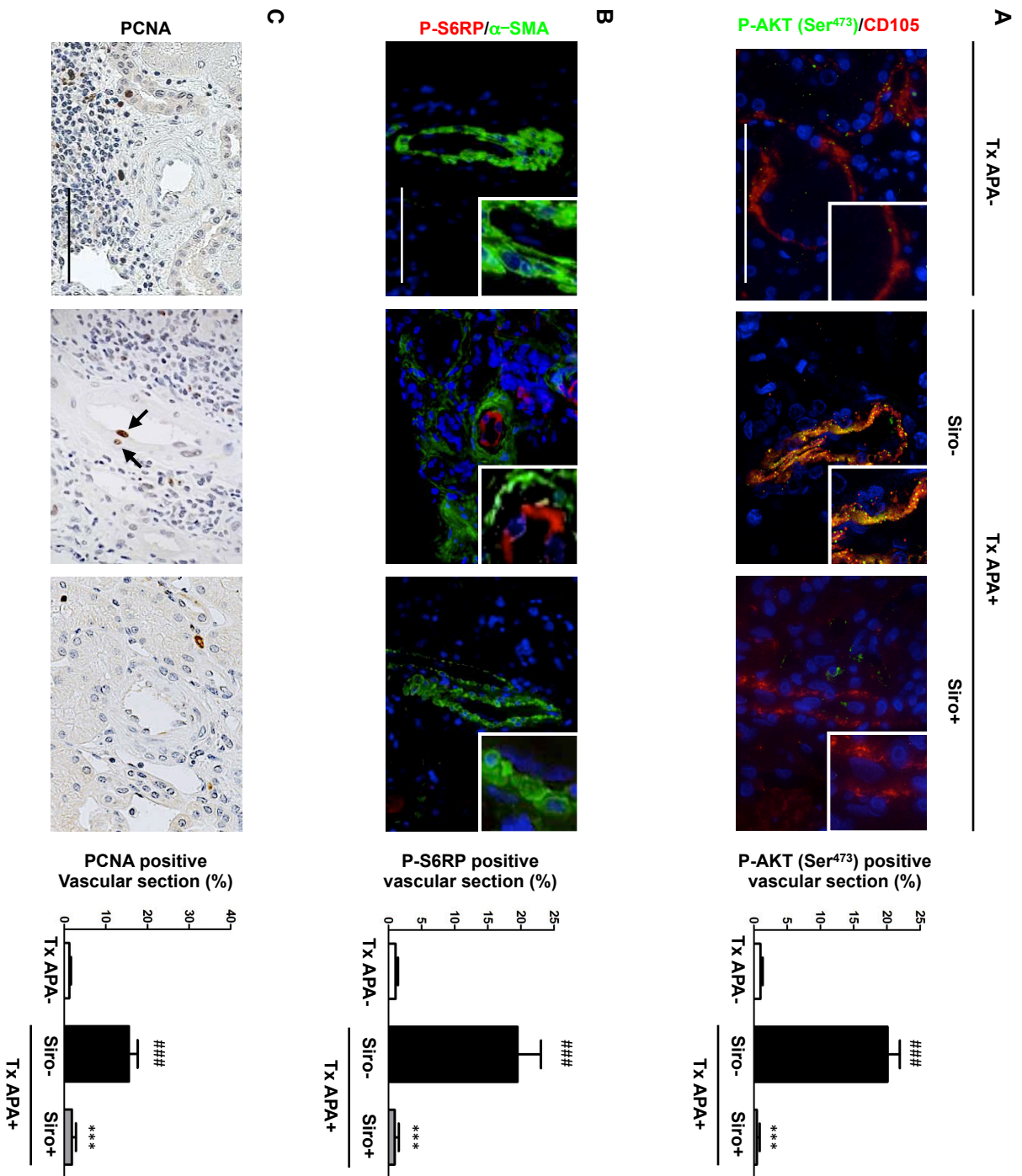
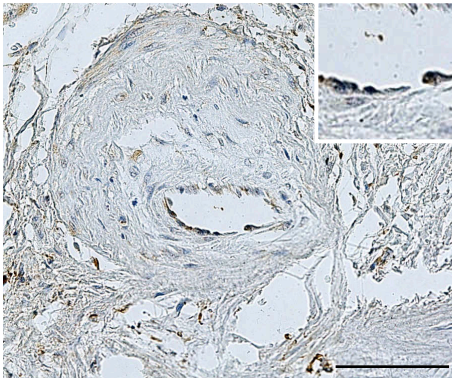


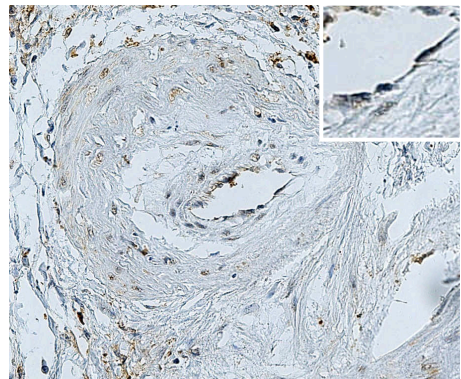
Figure 4

Supplementary Figure 1: mTORC pathway is activated in kidney endothelial cells of patients with APS. P-AKT (Ser⁴⁷³) and P-S6RP immunostaining on serial section of kidney biopsy from patient with APS. Scale bar: 50 μ m. APS: antiphospholipid syndrome. APS: Antiphospholipid syndrome

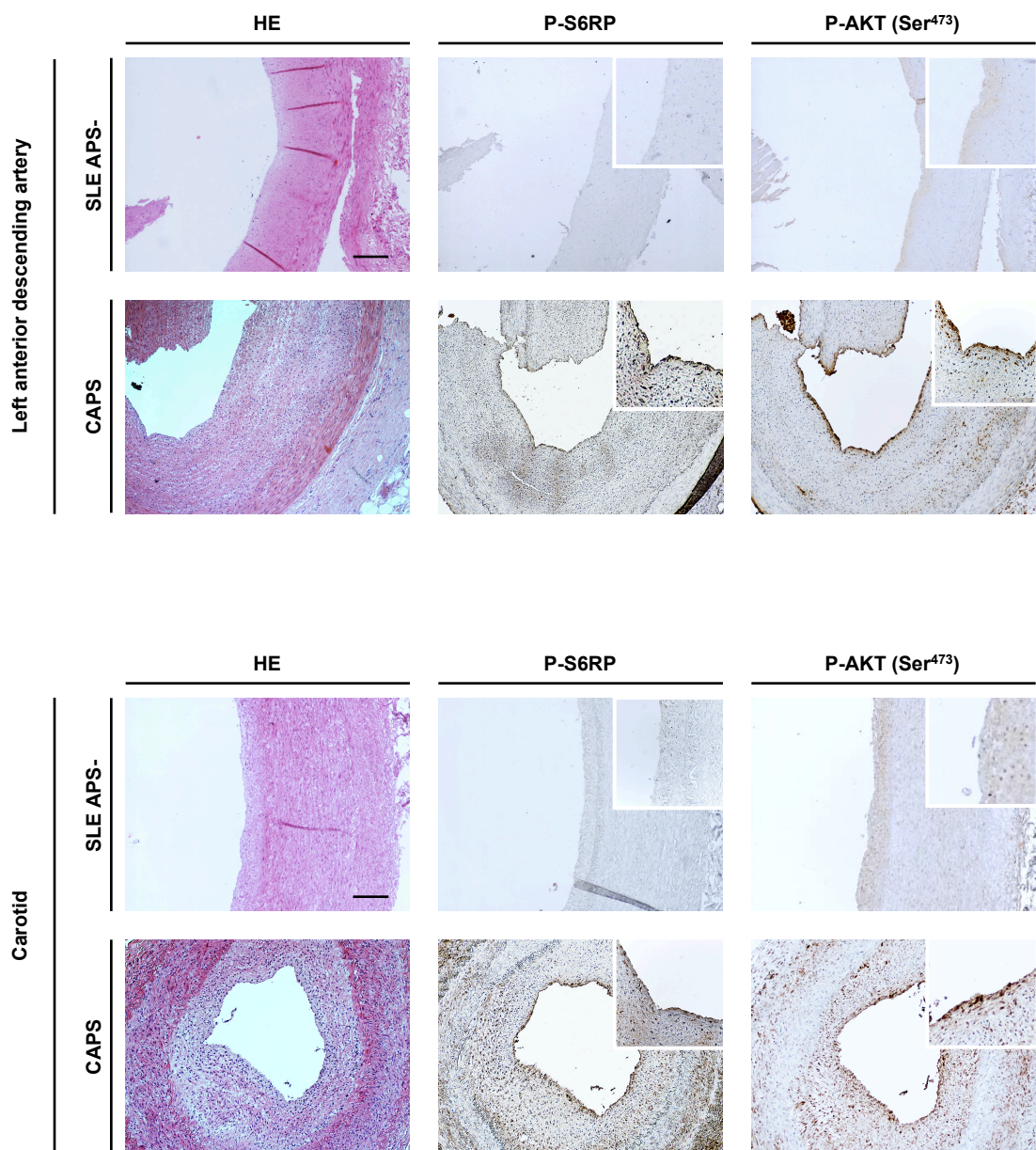
P-S6RP



P-AKT (Ser⁴⁷³)

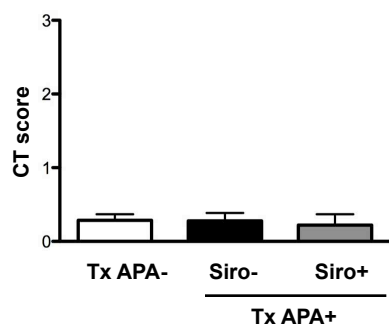
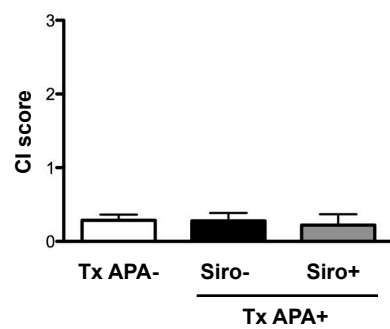
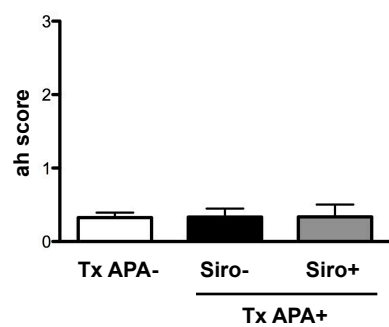
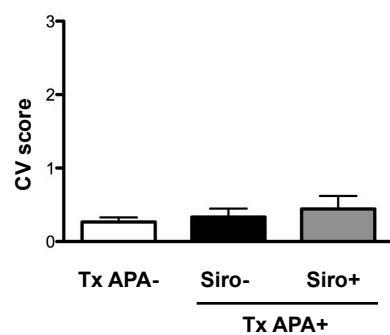


Supplementary Figure 2: mTORC pathway is activated in endothelial cells of patients with CAPS. Serial section of left descending arteries and carotids of patients with SLE but without APS and patients with CAPS: Hematoxylin Eosin (HE), P-AKT (Ser⁴⁷³) and P-S6RP immunostaining. Scale bar: 50 μ m. SLE: systemic lupus erythematosus; CAPS: catastrophic antiphospholipid syndrome.



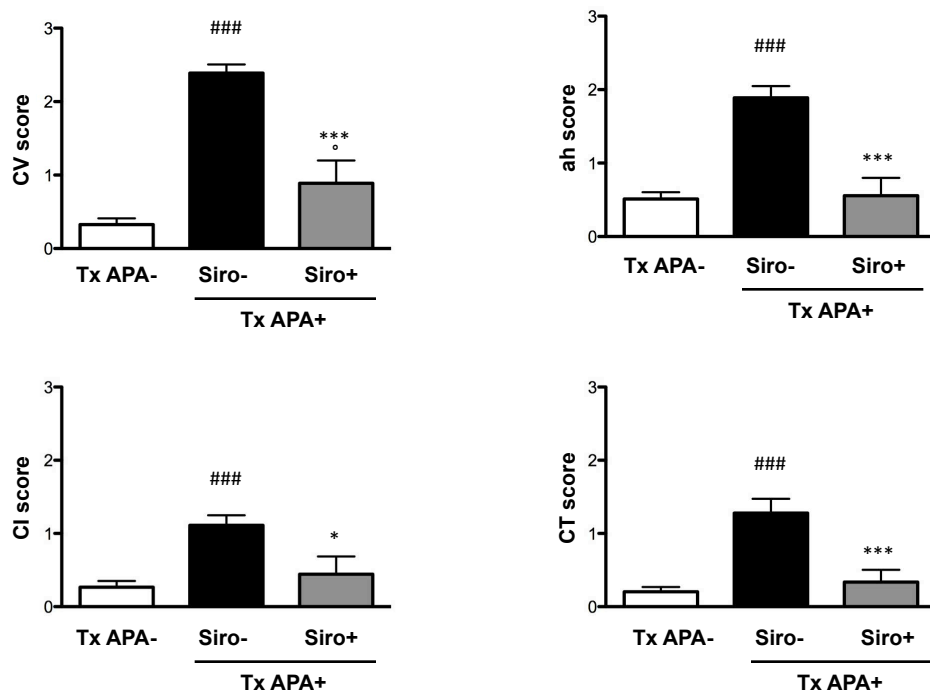
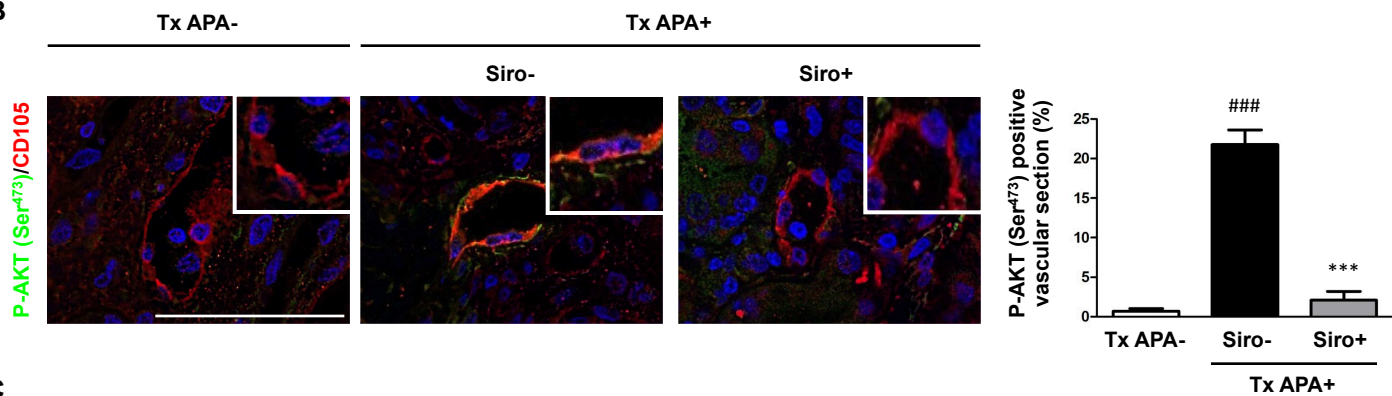
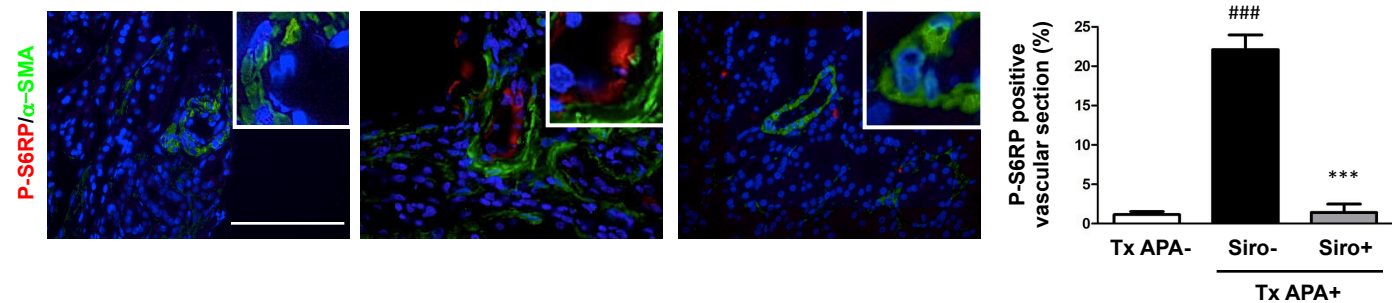
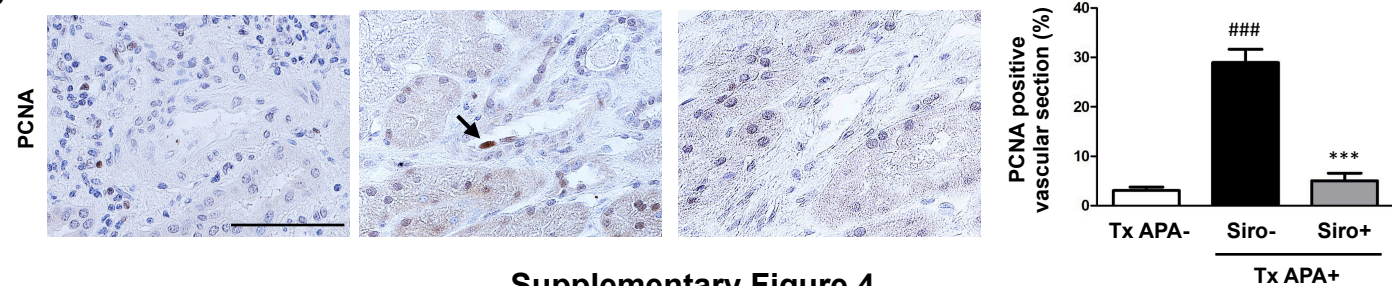
Supplementary Figure 2

Supplementary Figure 3: Banff scoring of chronic kidney lesion at day 0. Banff scoring of kidney transplants biopsies from APA-, APA+ Siro- and APA+ Siro+ groups at day 0 before kidney implantation.



Supplementary Figure 3

Supplementary Figure 4: Sirolimus prevents vascular lesions in transplant recipients with APA at 3-months post transplantation. (A) Banff scoring of kidney transplants biopsies from APA-, APA+ Siro- and APA+ Siro+ groups at 12 months post transplantation. (B) Colocalization between P-Akt (Ser⁴⁷³) and CD105 (endothelial cell marker) in biopsies of the three groups of patients (Tx APA+ Siro-, Tx APA+ Siro+) and quantification. (C) Colocalization between P-S6RP and α -SMA in biopsies of the three groups of patients (Tx APA+ Siro-, Tx APA+ Siro+) and quantification. (D) PCNA immunostaining and quantification of PCNA-positive vascular section (black arrow) in biopsies of the three groups of patients (Tx APA+ Siro-, Tx APA+ Siro+) and quantification. Data are means $\pm$ SEM. ANOVA followed by Tukey-Kramer test; Tx APA+ Siro- *versus* Tx APA-: ### P < 0.001; Tx APA+ Siro- *versus* Tx APA+ Siro+: *** P < 0.001, Tx APA+ Siro+ *versus* Tx APA-: ° P < 0.05. APA: antiphospholipid antibodies.

A**B****C****D****Supplementary Figure 4**

Supplementary Table 1: Patient demographic and clinical characteristics

Characteristics	Controls (n=10)	Primary APS (n=12)	SLE APS- (n=25)	SLE APS+ (n=20)
Age at biopsy (mean $\pm$ SD, years)	48 $\pm$ 13	43 $\pm$ 24	28 $\pm$ 12	27 $\pm$ 16
Female (%)	33	75	68	70
eGFR at the time of biopsy (mL/mn/1.73m ²)	88 $\pm$ 12	46 $\pm$ 5	47 $\pm$ 15	49 $\pm$ 23
Lupus anticoagulant (%)	0	100	0	80
Anti- β 2 GP1 antibodies (%)	0	83	0	85
Anti-cardiolipin antibodies (%)	0	83	0	100

eGFR: estimated Glomerular Filtration Rate.

Supplementary Table 2: Kidney transplant recipient demographic and clinical characteristics

Characteristics	APA- (n=59)	APA+ (n=37)	
		Sirolimus- (n=27)	Sirolimus+ (n=10)
Age at transplantation (mean $\pm$ SD, years)	54 $\pm$ 11	51 $\pm$ 11	47 $\pm$ 14
Female (%)	40	50	40
Age at time of ESRD (mean $\pm$ SD, years)	47 $\pm$ 12	40 $\pm$ 1	45 $\pm$ 22
Duration of HD (mean $\pm$ SD, months)	55 $\pm$ 37	51 $\pm$ 27	56 $\pm$ 16
Steroids (%)	88	92	90
Calcineurin inhibitors (%)	78	100	0
mTORC inhibitor (%)	22	0	100
MMF/MA/Aza (%)	67/21/12	44/37/19	100/0/0
12-Mo Tacrolimus trough levels (ng/mL)	10 $\pm$ 6	10.3 $\pm$ 5.9	-
12-Mo Cyclosporine peak levels (ng/mL)	642 $\pm$ 344	643 $\pm$ 365	-
12-Mo Sirolimus levels (ng/mL)	16 $\pm$ 2	-	18 $\pm$ 9
Lupus anticoagulant (%)	0	100	100
Anti- β 2 GP1 antibodies (%)	0	18	20
Anti-cardiolipin antibodies (%)	0	30	30

ESRD: End Stage Renal Disease; HD: Hemodialysis; MMF: Mycophenolate mofetil; MA: Mycophenolic acid; Aza: Azathioprine, 12-Mo: 12-months post transplantation.

Supplementary Table 3: Patient demographic and clinical characteristics

Group	Patients	Age (mean $\pm$ SD, years)	Gender	Death cause	Atherosclerosis on large vessels
SLE APS-	1	78	Male	Retroperitoneal hemorrhage	Yes
	2	49	Female	Aortic Dissection	No
	3	52	Female	Disseminated Tuberculosis	Yes
	4	37	Female	Septic shock	Yes
SLE APS+	1	46	Male	CAPS	No
	2	36	Female	CAPS	No
	3	31	Male	CAPS	No
	4	50	Female	CAPS	Yes

SLE APS-: systemic lupus erythematosus without antiphospholipid syndrome; SLE APS+: systemic lupus erythematosus with antiphospholipid syndrome; CAPS: catastrophic antiphospholipid syndrome.

DISCUSSION et PERSPECTIVES

L'objectif de mon travail de thèse consistait à mieux comprendre le rôle de la voie AKT/mTORC au cours de la progression de la MRC, voie pour laquelle les données de la littérature divergées. Ce travail a permis de mettre en évidence la complexité du rôle de cette voie ayant des conséquences opposées suivant le compartiment cellulaire impliqué. En effet, alors qu'AKT2 s'oppose à la progression des lésions en permettant l'adaptation du podocyte à la réduction néphronique, l'activation endothéliale d'AKT/mTORC au cours la néphropathie associée aux anticorps antiphospholipides participe activement au développement des lésions et à la détérioration rénale. Ainsi les thérapeutiques actuellement disponibles, telles que le sirolimus ou l'everolimus, peuvent être salvatrice dans certaines situations ou au contraire délétères dans d'autres. Le travail sur la physiopathologie des lésions vasculaires induites par la présence des anticorps antiphospholipides permet de dessiner en partie les mécanismes mis en jeu et d'envisager une perspective thérapeutique. Si ces travaux permettent de mieux dessiner le rôle de cette voie dans la physiopathologie des maladies rénales, de nombreuses interrogations subsistent.

Rôle(s) de la voie AKT dans les podocytes

Rôle de l'activation d'AKT dans l'adaptation podocytaire à la réduction néphronique

Les adaptations hémodynamiques et cellulaires induites par la réduction néphronique ont pour conséquence une augmentation de la charge de travail imposée aux cellules rénales¹⁸⁴. Comme nous l'avons vu précédemment, une zone particulière du néphron y est très exposé : le glomérule. L'augmentation à la fois de la pression de filtration et du diamètre glomérulaire, exacerbe la tension pariétale à laquelle les cellules glomérulaires sont soumises. Ces cellules doivent également faire face à une exposition plus importante aux facteurs circulants et aux forces de cisaillements mécaniques, corollaires de l'augmentation du débit plasmatique et du débit de filtration de chaque glomérule. Du fait de leur situation, de leur fonction, de leur sensibilité au flux³⁵⁷ et de leur faible potentiel prolifératif, les podocytes sont particulièrement exposés à l'augmentation des contraintes mécaniques et métaboliques associées à la réduction néphronique.

À la suite des études de *Brenner*³⁵⁸ mettant en évidence le rôle délétère de l'adaptation hémodynamique au cours de la réduction néphronique, la majorité des études se sont focalisées sur l'identification des voies de signalisation impliquées dans la progression des lésions rénales. En revanche, les mécanismes moléculaires permettant aux cellules rénales de s'adapter aux contraintes environnementales associées à la réduction néphronique ne sont que très peu connus. Singulièrement, nos résultats indiquent que l'activation de la voie AKT constitue un phénomène adaptatif limitant la perte podocytaire et la progression des lésions glomérulaires après réduction néphronique. Nous montrons, en effet, que la réduction néphronique induit une activation de cette voie dans les cellules podocytaires et que l'inhibition de cette activation, induite par la délétion du gène *Akt2*, entraîne un remodelage du cytosquelette et une raréfaction podocytaire favorisant la progression des lésions glomérulaires. La pertinence clinique de cette observation est fortement suggérée par la corrélation étroite qu'il existe entre l'inhibition podocytaire de la voie AKT et la survenue d'une protéinurie lors de l'introduction d'un inhibiteur de mTOR, chez les patients transplantés rénaux présentant une fonction rénale altérée. Au cours de cette étude nous nous sommes focalisés sur les cibles d'aval d'AKT et nous ne n'avons pas déterminé les mécanismes responsables de l'activation d'AKT au cours de la réduction néphronique. Plusieurs molécules podocytaires, potentiellement capables d'activer AKT, sont impliquées

dans le maintien de l'architecture glomérulaire et constituent, de ce fait, des candidats intéressants.

Le complexe protéique du diaphragme de fente pourrait constituer un intermédiaire permettant l'activation d'AKT en réponse à l'augmentation des contraintes mécaniques auxquelles sont soumis les podocytes. Ce complexe est capable d'activer AKT et est par ailleurs étroitement associé au réseau d'actine du pied des podocytes dont il régule la polymérisation³⁵⁹ ainsi qu'à des canaux potassiques BK (*big potassium*) qui sont capables de répondre à l'étirement^{360,361}. Ces interactions électives suggèrent que ce complexe protéique pourrait, en plus de son rôle structural, jouer un rôle important dans la mécanoreception podocytaire et permettre de répondre à l'étirement de ces cellules par une activation de différentes voies de signalisation et en particulier d'AKT.

Le récepteur à l'insuline pourrait également contribuer à l'activation d'AKT en réponse à la réduction néphronique. Des données récentes indiquent que ce récepteur est exprimé par les podocytes et active AKT en réponse à son ligand³⁶². De plus, l'invalidation podocytaire du récepteur à l'insuline entraîne l'apparition d'une glomérulosclérose progressive assez similaire à celle des souris *Akt2*^{-/-}. Il est bien établi que la diminution du débit de filtration glomérulaire entraîne une résistance à l'insuline des tissus périphériques qui est responsable d'une augmentation de la concentration d'insuline circulante³⁶³. Cette augmentation de la concentration d'insuline pourrait favoriser l'activation du récepteur à l'insuline podocytaire et ainsi d'AKT en réponse à la réduction néphronique.

La mise en évidence récente d'un lien fonctionnel entre le récepteur à l'insuline et les protéines du diaphragme de fente^{364,365} permet d'envisager leurs collaborations au cours de l'adaptation podocytaire.

Nous proposons de tester l'implication de ces candidats en soumettant à une réduction néphronique des souris présentant soit une délétion podocytaire du récepteur à l'insuline soit une perte d'un allèle du gène codant la podocine et d'évaluer la phosphorylation podocytaire d'AKT. Dans un deuxième temps, l'interaction fonctionnelle entre les gènes codant la podocine ou le récepteur de l'insuline et *Akt2* pourra être testée en analysant le phénotype des simples et des doubles hétérozygotes à la recherche d'une aggravation des lésions glomérulaires chez les doubles hétérozygotes (non complémentation non allélique).

Spécificité fonctionnelle des isoformes d'AKT dans la biologie podocytaire

Si la délétion d'*Akt2* a d'importantes conséquences sur la biologie podocytaire, la délétion d'*Akt1* apparaît sans conséquence sur l'évolution des lésions glomérulaires après néphrectomie. Les déterminants de cette fonction spécifique d'*Akt2* restent à établir.

Les différences fonctionnelles associées à des isoformes de la même protéine peuvent correspondre, soit à des profils d'expression différents, soit à des différences structurales sous-tendant des fonctionnalités spécifiques, soit, enfin, à une combinaison de ces deux aspects. Nos résultats indiquent un enrichissement spécifique de l'isoforme AKT2 dans les cellules podocytaires. Il est cependant peu probable que le rôle spécifique d'AKT2 dans l'adaptation podocytaire à la réduction néphronique soit la simple conséquence de l'expression préférentielle de cette isoforme dans les podocytes. En effet, la phosphorylation physiologique des cibles d'AKT ne paraît pas altérée dans les glomérules des souris *Akt2*^{-/-} suggérant que l'une ou l'autre des isoformes d'AKT compense la perte d'AKT2 en l'absence de stress. Ces données témoignent d'une redondance fonctionnelle des différentes isoformes podocytaires d'AKT en condition homéostatique. Cependant, après réduction néphronique, les autres isoformes d'*Akt* apparaissent incapables de compenser la perte d'*Akt2* indiquant l'existence de fonctions non-redondantes d'AKT2 dans la réponse adaptative à la réduction néphronique.

Bien qu'il existe une forte homologie structurale et fonctionnelle entre les deux principales isoformes d'AKT, certaines spécificités fonctionnelles ont pu être démontrées pour l'une ou l'autre de ces protéines. Ces différences concernent principalement le contrôle du cytosquelette et du trafic vésiculaire qui représentent deux aspects importants de la biologie du podocyte.

Les effets spécifiques d'AKT2 pourraient être la conséquence des effets propres de cette isoforme sur le cytosquelette d'actine. Le cytosquelette d'actine joue en effet un rôle important dans l'adaptation du podocyte aux contraintes mécaniques³⁶⁶ ainsi que dans le maintien de l'architecture de cette cellule³⁵⁹. Dans certains types cellulaires, AKT2 exerce des effets spécifiques sur le cytosquelette en inhibant RAC1, une petite protéine G impliquée dans la régulation dynamique du cytosquelette. La délétion d'AKT2 entraîne, dans ce cas, une hyperactivation de RAC1 aboutissant à une perte des fibres de stress¹⁴⁸. Plusieurs études suggèrent que la perte des fibres de stress podocytaire ou une activation excessive de RAC1 favorisent l'apparition de lésions glomérulaires³⁶⁷⁻³⁶⁹. Nous avons pu mettre en évidence, chez

les souris *Akt2*^{-/-} une hyperactivation de RAC1 associée à des remaniements du cytosquelette podocytaire. Ces données amènent à proposer qu'AKT2, en réponse aux contraintes environnementales, participe au maintien du cytosquelette podocytaire en inhibant spécifiquement RAC1.

AKT2 joue également un rôle spécifique dans le trafic vésiculaire. Cette isoforme est en effet spécifiquement responsable de l'acheminement à la membrane des vésicules porteuses du transporteur du glucose GLUT4 en réponse à l'insuline³⁷⁰. Quelques données suggèrent que le transport vésiculaire joue un rôle important dans la formation des pieds des podocytes³⁷¹. Par ailleurs, des données récentes indiquent que la stimulation du récepteur à l'insuline podocytaire entraîne l'insertion de GLUT4 et de GLUT1 dans la membrane plasmique, notamment au niveau des pieds des podocytes³⁷². Par ailleurs, la réduction néphronique semble entraîner une augmentation glomérulaire de GLUT1³⁷³. Une contribution des transporteurs GLUT à la genèse des lésions rénales a été suggérée. Il a pu être ainsi montré, dans un modèle de néphropathie diabétique, que des variations de l'expression de GLUT1 modulaient le développement des lésions rénales^{373,374}. Le rôle spécifique joué par AKT2 dans l'adressage membranaire des GLUT pourrait donc également contribuer à l'adaptation podocytaire à la réduction néphronique. Nous projetons donc d'évaluer *in vitro* l'impact de l'ablation de l'une ou de l'autre isoforme d'*Akt* par ARN interférence sur le trafic vésiculaire.

Considérant le rôle important de la voie AKT dans l'adaptation podocytaire à la réduction néphronique, la persistance de la phosphorylation physiologique des cibles d'AKT dans les podocytes des souris *Akt2*^{-/-} pose la question d'un potentiel rôle homéostatique de la voie AKT dans ces cellules. Pour tester cette hypothèse, nous allons, après avoir contrôlé l'absence d'expression rénale d'AKT3 chez les souris *Akt2*^{-/-}, croiser des souris présentant une invalidation podocytaire d'*Akt2* avec des souris *Akt1*^{-/-}. Nous obtiendrons ainsi des souris dans lesquelles les deux isoformes d'AKT seront absentes des podocytes. Cette approche nous permettra de palier la létalité embryonnaire liée à l'invalidation systémique conjointe d'*Akt1* et 2

Pertinence des mécanismes d'adaptation à la réduction néphronique : des souris et des hommes

Notre travail sur la voie AKT démontre l'importance des mécanismes moléculaires permettant l'adaptation des cellules rénales à la réduction néphronique. Alors que ces

mécanismes sont peu étudiés, leur compréhension représente un enjeu important dans le contexte actuel.

Nos données suggèrent en effet que la protéinurie induite par le sirolimus pourrait être, chez l'homme, liée à l'inhibition de cette réponse adaptative. Cette observation a d'importantes implications pratiques. En effet, les progrès effectués dans le domaine de la biologie structurale ou encore dans la fabrication d'anticorps monoclonaux ont pour conséquence une augmentation constante des thérapeutiques permettant une inhibition spécifique de voies de signalisation supposées délétères dans différentes situations pathologiques. Du fait de leur implication dans de nombreuses pathologies fréquentes et sévères, les molécules de la voie AKT/mTOR font l'objet d'une attention particulière et plusieurs inhibiteurs spécifiques de l'un ou l'autre des composants de cette voie sont actuellement testés³⁷⁵. L'identification du rôle important joué par AKT2 dans l'adaptation glomérulaire permet d'anticiper les effets potentiellement délétères de ces thérapeutiques chez les patients présentant une réduction néphronique significative. De plus, l'identification des spécificités d'isoformes et des cibles moléculaires responsables des effets délétères de ces inhibiteurs pourrait permettre, au travers d'un ciblage plus fin, de ne pas entraver l'adaptation podocytaire.

En lien plus immédiat avec la pratique, nos résultats suggèrent qu'une mesure de l'activation podocytaire d'AKT pourrait être utilisée pour prédire l'apparition d'une protéinurie sous inhibiteurs de mTOR et permettre ainsi une utilisation plus ciblée de cette classe thérapeutique notamment en transplantation rénale.

Rôle(s) de la voie AKT/mTORC dans les cellules endothéliales au cours de l'APSN

Prolifération des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire : évidence pour un crosstalk endothélium-cellules musculaires lisses?

Nos travaux ont montré que l'activation de la voie AKT/mTORC est strictement restreinte à l'endothélium, témoignant du contact avec les anticorps circulants. Cependant, nous avons mis en évidence une prolifération intense des cellules musculaires lisses composant la paroi vasculaire. Ainsi, si un certain nombre de section vasculaire comporte des cellules endothéliales en phase de prolifération, l'essentiel des cellules en phase de prolifération sont adjacentes à l'endothélium. Ceci plaide pour la synthèse par les cellules endothéliales d'un facteur paracrine ayant un effet mitogène sur les cellules musculaires lisses vasculaires. Le fait que le sirolimus prévienne la prolifération des cellules musculaires lisses chez le patient transplanté rénal ayant de anticorps antiphospholipides, suggère que la synthèse de ce facteur est dépendante de l'activation endothéliale de la voie AKT/mTORC. Ce phénomène est bien connu dans d'autres situations pathologiques où l'endothélium est agressé telles qu'au cours d'une lésion mécanique traumatique ou bien au cours du rejet vasculaire d'organe. Dans ces situations, de multiples facteurs, comme l'ENDOTHELIN-1, le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), TGF α (*transforming growth factor α*), TGF β (*transforming growth factor β*) ou encore l'activité NO (*nitric oxide*), ont pu être impliqués³⁷⁶⁻³⁷⁸.

Pour tenter d'identifier cette (ces) molécule (s), nous utiliserons deux types d'approches :

- 1) une approche candidate : pour cela nous utiliserons un système de co-cultures et de cultures simples où nous exposerons des cellules musculaires lisses au surnageant produit par les cellules endothéliales après avoir été stimulées par les anticorps antiphospholipides. Pour identifier le (s) facteur (s) nous incuberons le surnageant avec différents anticorps bloquant contre les molécules décrites ci-dessus (l'ENDOTHELIN-1, VEGF, PDGF, TGF α , TGF β , activité NO...) afin d'inhiber la prolifération.
- 2) une approche sans à priori : pour cela nous étudierons par spectrométrie de masse le surnageant produit par des les cellules endothéliales stimulées par les anticorps antiphospholipides et traitées ou non avec du sirolimus.

Recrutement de la voie AKT/mTORC par les anticorps antiphospholipides

Au cours de ce travail nous nous sommes focalisés sur les cibles d'aval de l'activation de la voie AKT/mTORC et n'avons donc pas étudié les mécanismes permettant de recruter ces voies. Comme nous l'avons vu, le complexe anticorps- β 2GPI se fixe à la surface de l'endothélium par le biais de nombreux récepteurs dont seulement certains ont été caractérisés. Ces récepteurs n'ont pour le moment été impliqués que dans le processus thrombotique lié au SAPL mais pourraient servir pour une approche candidate. Ainsi, l'ANNEXINE A2, localisée à la membrane des cellules endothéliales, lie directement, *in vitro* et *in vivo*, le complexe anticorps- β 2GPI et induit une signalisation intracellulaire via la voie p38-MAPK²³⁵. Cependant, cette protéine ne possède pas de domaine transmembranaire et doit donc impliquer d'autres protéines adaptatrices transmembranaires. Parmi celles-ci, TLR-2 ou TLR-4 pourraient jouer un rôle important. De même, les récepteurs de la famille des LDL-receptor ont été identifiés comme se liant directement à la β 2GPI et pouvant induire une signalisation intracellulaire³⁷⁹. Très récemment, il a été montré que les anticorps anti- β 2GPI pouvaient se lier au récepteur transmembranaire apoER2 (famille de LDL-receptor) présent sur la cellule endothéliale, et activer une phosphatase (PP2A) qui en déphosphorylant eNOS réduit son activité et favorise l'adhésion leucocytaire et la thrombose³⁸⁰. Si la plupart des études sur les voies de signalisations endothéliales se sont focalisées sur la voie p38-MAPK et le facteur de transcription NF κ B, il est intéressant de noter que le complexe anticorps- β 2GPI peut se fixer sur le récepteur GPIb α situé à la surface de la membrane plaquettaire et induire l'activation de la voie PI3K/AKT²³⁵. Le récepteur GPIb α ayant été récemment identifié comme exprimé sur l'endothélium³⁸¹, il paraît donc intéressant de tester son implication dans la physiopathologie de la maladie.

Nous projetons d'étudier l'interaction du complexe anticorps- β 2GPI avec son récepteur membranaire en utilisant une approche *in vitro*. Pour cela nous modulerons l'expression de récepteurs candidats que nous venons de citer ci-dessus (TLR2, TLR4, apoER2, GPIb α) avec des ARN interférences, puis évaluerons les conséquences de ces modulations sur la voie AKT/mTORC après stimulation par des anticorps antiphospholipides.

Mécanisme potentiel de développement accéléré des lésions vasculaires chez le transplanté ayant des anticorps antiphospholipides

La situation chez le patient transplanté rénal est tout à fait exceptionnelle. En effet, les patients ayant des anticorps antiphospholipides développent dans plus de 2/3 des cas des lésions de néphropathie liée au SAPL sur le greffon et en un laps de temps très court. La physiopathologie du SAPL reposant sur la nécessité d'un deuxième événement pour déclencher la séquence activatrice, il est probable que chez le patient transplanté du rein les altérations aiguës de l'endothélium liée à l'ischémie froide du greffon rénale (qui correspond à la période entre le prélèvement d'organe et la greffe de celui-ci) et au traitement immunosuppresseur par anticalcineurine entraîne des remaniements de la membrane cytoplasmique endothéliale favorable à l'adhésion du complexe anticorps- β 2GPI.

Ainsi, 1/3 des patients n'ont pas de récurrence après transplantation. Il nous paraît donc important d'étudier les déterminants qui affectent le risque de récurrence. Pour cela, nous comparerons la durée d'ischémie froide des greffons de patients ayant des anticorps antiphospholipides et affectés ou non par une récurrence sur le greffon. Puis nous évaluerons au sein de cette population l'impact d'un traitement par anticalcineurine sur le risque de récurrence, notamment le délai d'introduction et leurs concentrations. Enfin, il serait intéressant d'étudier chez les receveurs le polymorphisme de certains gènes de susceptibilité tel que celui de la β 2-GPI (VAL247LEU) mais aussi chez les donneurs. En effet, il a été suggéré que certains allèles HLA pourraient favoriser la survenue d'accident thrombotique au cours du SAPL^{382,383}.

Une nouvelle option thérapeutique : le sirolimus

Outre l'aspect mécanistique du développement des lésions, l'intérêt de ce travail réside dans l'identification d'une nouvelle arme thérapeutique dans cette affection. En effet, comme nous l'avons vu le sirolimus dans ce contexte a été capable de prévenir l'apparition des lésions vasculaires chez des patients transplantés rénaux ayant des anticorps antiphospholipides. L'effet bénéfique du sirolimus sur les vaisseaux est bien connu des cardiologues et des médecins s'occupant de la transplantation cardiaque. En effet, au cours des années 90, de nombreuses équipes avaient observé qu'une agression mécanique traumatique de l'endothélium chez le rat ou le lapin entraînait l'activation endothéliale de la voie AKT/mTORC et l'apparition secondaire d'une hyperplasie de l'intima progressivement occlusive. Ce fût donc en toute logique que le sirolimus fût testé dans cette indication. L'idée s'avéra bonne, puisque l'administration, soit par voie systémique soit par voie locale, de cette

molécule résultait en une réduction de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et une prévention de l'hyperplasie intinale². Cette découverte a conduit à une nouvelle génération d'endoprothèse coronarienne (encore appelée 'stent') recouvertes de sirolimus couramment utilisées maintenant et associées à une diminution des resténoses post angioplastie transluminale coronarienne.

Il existe également une autre situation où la voie AKT/mTORC endothéliale est activée par des anticorps et représente une cible thérapeutique, il s'agit du rejet d'organe à médiation humorale. En effet, des lésions morphologiquement semblables à celles que nous observons au cours du SAPL, associant hyperplasie intinale et accumulation de matrice extracellulaire, sont observées en transplantation rénale mais surtout en transplantation cardiaque³⁸⁴. Elles sont regroupées sous l'appellation générique de 'vasculopathie du transplant'. Plusieurs études, *in vitro* et *in vivo*, ont montré que les anticorps anti-HLA de classe I en se liant à leurs cibles induisent l'activation endothéliale des RHO GTPases et de la voie PI3K/AKT/mTORC^{385,386}. Chez l'homme, l'inhibition de cette voie par l'everolimus réduit la sévérité des lésions vasculaires du cœur transplanté et améliore la survie du greffon cardiaque³⁸⁷.

Bien que rétrospective, notre étude chez le transplanté rénal ayant des anticorps antiphospholipides, montre un effet spectaculaire du sirolimus sur la prévention de la récurrence de néphropathie liée au SAPL, le développement des lésions vasculaires et par voie de conséquence sur la survie du greffon rénale. Cet effet corrèle avec la physiopathologie en inhibant l'activation endothéliale de la voie AKT/mTORC. Ces données justifient la mise en place d'un essai prospectif chez le transplanté rénal avec anticorps antiphospholipides et le sirolimus pourrait représenter une thérapeutique de choix dans cette indication.

Pour les autres situations avec anticorps antiphospholipides, le syndrome catastrophique des antiphospholipides (CAPS) et la néphropathie liée au SAPL sur rein natif, l'effet bénéfique de cette classe médicamenteuse nécessite d'être évalué. Le CAPS est une affection gravissime qui se caractérise par l'apparition brutale de thromboses vasculaires dans différents territoires en peu de temps. La physiopathologie n'est pas élucidée et associe une activation diffuse de l'endothélium, des plaquettes, des cellules mononuclées et de la coagulation. Au cours de cette affection, seuls des traitements immunosuppresseurs associés à une anticoagulation et des échanges plasmatiques sont utilisés. Malheureusement, malgré ces traitements cette affection reste grevée d'une forte mortalité. Comme pour les vaisseaux

rénaux, nous avons observé au cours du CAPS un grand nombre de lésions vasculaires artérielles sub-occlusives touchant les vaisseaux de gros calibre et comportant une activation endothéliale de la voie AKT/mTORC. Cette hypertrophie intimale spectaculaire occlue rapidement la lumière des vaisseaux et pourrait constituer une explication séduisante de la persistance de thromboses chez ces patients ayant pourtant une anticoagulation efficace. Ainsi, il nous paraît donc envisageable qu'un traitement reposant sur du sirolimus puisse constituer une arme supplémentaire au cours de cette affection. La question suivante à laquelle nous n'avons pas de réponse pour le moment, sera celle de la réversibilité de lésions déjà installées.

CONCLUSION

Au total, ce travail de thèse a permis de mieux préciser le rôle de la voie de signalisation AKT/mTORC dans différents modèles de néphropathie, et de mieux discerner les effets tantôt bénéfiques de son recrutement ou au contraire tantôt délétères. Alors qu'AKT2 s'oppose à la progression des lésions en permettant l'adaptation du podocyte, l'activation d'AKT/mTORC endothéliale au cours la néphropathie associée aux anticorps antiphospholipides participe à la détérioration rénale. Les résultats de ce travail mettent en exergue la complexité des processus adaptatifs et délétères induits par cette voie et mis en œuvre dans différents compartiments du rein.

ANNEXE 1

La polykystose rénale est la plus fréquente des maladies génétiques rénales conduisant à l'insuffisance rénale terminale. Elle résulte, comme nous l'avons vu, soit d'une mutation du gène codant pour la polycystine-1 (PKD1, 85% des cas), soit pour la polycystine-2 (PKD2, 15% des cas). La physiopathologie de l'apparition des kystes est en partie liée à l'activation de la voie mTORC1.

Au cours de ma thèse j'ai pu rapporter l'observation exceptionnelle d'un jeune donneur de 30 décédé d'hémorragie méningée en 2004. Ses deux reins ont été attribués à deux centres de transplantations Français. Au cours du suivi post greffe nous avons observé l'apparition de kystes dans les greffons des 2 patients. L'analyse moléculaire des gènes *Pkd1* et *Pkd2* du donneur a permis de mettre en évidence une nouvelle mutation non décrite jusqu'alors dans le gène *Pkd1*: une délétion de 2 acides aminés, A3571-3572delAV, respectant le cadre de lecture, située dans le domaine transmembranaire de polycystine 1. Cette mutation pourrait correspondre à un allèle hypomorphe, associé à un phénotype peu sévère et expliquer ainsi l'absence de détection des kystes chez le donneur à l'âge de 30ans. En effet aucun kyste macroscopique n'était décelable lors du prélèvement, ni à l'échographie réalisée avant le prélèvement.

Les 2 patients transplantés avec ces 2 reins ont reçu en post greffe un traitement immunosuppresseur similaire se distinguant uniquement par l'administration de sirolimus (2mg/j) pour le patient 1.

Après quatre années de traitements continus, une évaluation des kystes par IRM montrait que le nombre de kystes était identique. Ce résultat contrastait avec les modèles murins de polykystose où le sirolimus était connu pour avoir un effet spectaculaire sur la réduction du volume et du nombre kystes. Interpellé par l'absence d'impact du sirolimus sur la progression kystique chez notre receveur, nous nous sommes posés la question de savoir si ce traitement avait bien inhibé la voie mTORC1 dans les cellules tubulaires.

L'étude immunohistochimique des marqueurs d'activation de mTORC1 (phospho-4EBP1 et phospho-S6RP) sur les biopsies de protocoles à M12 post greffe, montrait une activation de cette voie dans les cellules tubulaires (comparativement à des biopsies de transplants contrôles). Cette activation de mTORC1 tubulaire est similaire entre les 2 patients. Il est intéressant de noter par ailleurs que cette voie mTORC1 était pourtant bien inhibée dans les cellules mononuclées circulantes.

En conclusion, nous avons observé qu'un traitement par sirolimus ciblant des taux entre 2-4 ng/ml par jour ne permettait pas d'inhiber significativement la voie mTORC1 dans le rein et

de prévenir l'apparition des kystes au cours de la polykystose rénale autosomique dominante, alors qu'elle est suffisante pour inhiber cette voie dans les cellules mononuclées circulantes. Notre théorie a été reprise par *T. Watnick* et *G.G. Germino* comme pouvant être une des explications de l'absence d'effet de ces traitements au cours la polykystose rénale autosomique dominante^{307,308,388}.

Therapeutic mTOR Inhibition in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: What Is the Appropriate Serum Level?

G. Canaud^{a,b,c,*}, B. Knebelmann^{a,c,d},
P. C. Harris^e, F. Vrtovnik^f, J.-M. Correas^g,
N. Pallet^{b,c}, C. M. Heyer^e, E. Letavernier^f,
F. Bienaimé^{a,c}, E. Thervet^{b,c}, F. Martinez^{b,c},
F. Terzi^{a,c} and C. Legendre^{b,c}

^aINSERM U845, Centre de Recherche Croissance et
Signalisation, Hôpital Necker Rue de Sèvres, Paris

^bService de Transplantation et Unité de Soins Intensifs,
Hôpital Necker, APHP, Rue de Sèvres, Paris

^cUniversité Paris Descartes, Rue de l'Ecole de Médecine,
Paris

^dService de Néphrologie Adultes, Hôpital Necker, APHP,
Rue de Sèvres, Paris

^eDivision of Nephrology and Hypertension, Mayo Clinic,
Rochester, Minnesota, MN

^fService de Néphrologie, Hôpital Bichat, APHP, Rue
Henri-Huchard, Paris

^gService de Radiologie Adultes, Hôpital Necker, APHP,
Rue de Sèvres, Paris

*Corresponding author: Guillaume Canaud,
guillaume.canaud@nck.aphp.fr

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common inherited renal disease, and sirolimus, a mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor, has been shown to significantly retard cyst expansion in animal models. The optimal therapeutic dose of sirolimus is not yet defined. Here, we report the history of a previously unknown ADPKD deceased donor whose kidneys were engrafted in two different recipients. One of the two received an immunosuppressive regimen based on sirolimus for 5 years while the other did not. After transplantation, both patients developed severe transplant cystic disease. Donor DNA sequence identified a new hypomorphic mutation in *PKD1*. The rate of cyst growth was identical in the two patients regardless of the treatment. While sirolimus treatment reduced the activation of mTOR in peripheral blood mononuclear cells, it failed to prevent mTOR activation in kidney tubular cells, this could account for the inefficiency of treatment on cyst growth. Together, our results suggest that the dose of sirolimus required to inhibit mTOR varies according to the tissue.

Key words: Disease transmission, DNA sequencing, donor risk, mTOR inhibitor, peripheral blood, polycystic

kidney disease, renal allograft biopsies, renal medicine, sirolimus

Received 10 February 2010, revised 16 April 2010 and
accepted for publication 27 April 2010

Introduction

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common inherited renal disease, occurring in 1 out of every 1000 people in the general population (1). Mutations in two genes, *PKD1* (encoding polycystin-1, PC-1) and *PKD2* (encoding polycystin-2, PC-2), account for approximately 85% and 15% of all cases of ADPKD (2). The pathophysiology of polycystic kidney disease (PKD) is complex and remains largely unknown. Cystogenesis has been related to increased cell proliferation and apoptosis, abnormal secretion, remodeling of the extracellular matrix and abnormal planar cell polarity (1,3). Many signaling pathways have been shown to be activated in PKD, including the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway (3–6). Cumulative evidence in rodent models has shown that mTOR inhibitors (e.g. sirolimus and everolimus) can significantly retard cyst expansion (6,7). Furthermore, recent data from retrospective studies of ADPKD patients after kidney transplantation have shown a significant reduction in kidney and hepatic cyst volume in those treated with sirolimus as compared to those receiving calcineurin inhibitors (6,8). Accordingly, four randomized prospective clinical trials are in progress (NCT00346918, NCT00491517, NCT00286156 and NCT00414440). However, the optimal serum concentration of sirolimus or everolimus required to inhibit mTOR pathway in the kidney is not known.

Case Report

The probant was a 30-year-old male donor who died in January 2004 due to the rupture of an intracranial aneurysm. There was no clinical evidence of kidney disease in either the donor or his family. His kidneys and liver were engrafted in three different recipients. The left kidney was transplanted into a 42-year-old man who had been on hemodialysis for 3 years due to IgA nephropathy. At time of transplantation, the duration of cold ischemia was 16 h, and his immunosuppressive regimen included steroids, tacrolimus

and mycophenolate mofetil. This patient will be referred as patient 1 (Siro $-$). The right kidney was transplanted into a 40-year-old woman who had been on hemodialysis for 2.5 years due to interstitial nephritis. At time of transplantation, the duration of cold ischemia was 17 h, and her immunosuppressive regimen included steroids, tacrolimus and sirolimus at a daily dose of 2 mg. This patient will be referred as patient 2 (Siro $+$). Clinical and biological data (e.g. serum creatinine level and sirolimus concentration) were monitored every month the first year and every 3 months thereafter. The patients were followed over 5 years.

At the time of transplantation, macroscopic and ultrasonographic exams did not reveal any cyst formation in the kidney or liver. The early follow-up of both patients was successful and uneventful, except an acute cellular rejection episode that was successfully treated by steroid infusions in patient 2 (Siro $+$) at 3 months after transplantation. A few months after transplantation, we observed the development of a polycystic kidney phenotype in both kidneys. This phenotype in combination with the rupture of an intracranial aneurysm as the cause of death led us to hypothesize that the donor carried a PKD mutation.

Material and Methods

Clinical samples

The control group was composed of four kidney transplant recipients (two males, two females; mean age of 42.4 years, range 30–51 years) and four healthy volunteers (two males, two females; mean age of 31.8 years, range 23–38 years). All patients provided written informed consent.

DNA sequencing

DNA was extracted using standard techniques from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) taken from the patient at time of procurement. Mutation screening was performed by direct sequencing of all the *PKD1* and *PKD2* exons and flanking intronic regions as previously described (2).

Volumetric determination

Magnetic resonance imaging (MRI) was used to determine the volume of each kidney and total cyst volume calculated as described in the CRISP study (9). MRI was performed at 4 and 5 years after transplantation in both kidney transplant recipients. Kidney volume was measured using T_1 -weighted images as previously described (9–11). In brief, the volume was calculated by summing the products of the area measurements and slice thickness. A region-based threshold method was used to calculate cyst volume. In addition, the diameters of three randomly selected cysts were measured in both recipients.

Renal function and morphology

The serum creatinine level was measured monthly during the first year and every 3 months thereafter using a Synchron CX4 autoanalyser (Beckman Coulter, Villepinte, France). Glomerular filtration rate was evaluated by iohexol clearance, 4 years after transplantation as previously described (12). Sirolimus serum levels were determined monthly by high-performance liquid chromatography during the first year and every 3 months thereafter. Blood was taken 12 h after the previous dose.

Biopsies from patient 1 (Siro $-$) and 2 (Siro $+$) and the transplant recipient in the control group were all available for this study. Biopsies were routinely performed in all recipients 1 year after transplantation. The tumor-free pole of kidneys removed for carcinoma ($n = 4$) were used as controls. Kidney biopsies were fixed in alcohol–formalin–acetic acid solution and embedded paraffin, and 4- μ m sections were stained with periodic acid Schiff, Masson's trichrome, hematoxylin and eosin.

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry, 4- μ m sections were incubated with either a rabbit antihuman phospho-S6 ribosomal protein (Ser240/244) antibody (Cell Signaling Technologies) at 1:100 or a rabbit antimouse phospho-4E-BP1 (Thr 37/46) antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) at 1:100, followed by an antirabbit biotinylated antibody (Dako) at 1:200. The biotinylated antibody was detected using HRP-labeled streptavidin (Dako) at 1:500 and 3–3'-diamino-benzidine-tetrahydrochloride (DAB). Liver tumors from *PTEN*^{-/-} mice and kidneys from *S6 kinase 1 and 2*^{-/-} mice were used as positive and negative control, respectively, for the phospho-S6 ribosomal protein antibody. The phospho-4E-BP1 antibody was replaced by an unrelated antibody of the same subclass as an isotype control. *PTEN*^{-/-} and *S6 kinase 1 and 2*^{-/-} mice were kindly provided by Mario Pende (INSERM U845, Paris).

Western blot

PBMCs were isolated and western blot were performed as previously described (13,14), using a rabbit antibody to human phospho-p70 S6 kinase (Thr³⁸⁹) (Cell Signaling Technologies) at 1:1000 followed by a horseradish peroxidase-conjugated antirabbit secondary antibody at 1:10,000 (Dako). The phosphorylation status of the p70 S6 kinase at the Thr³⁸⁹ site is specific for mTOR phosphorylation (15). A mouse monoclonal anti- β -actin antibody (Sigma-Aldrich, Lyon, France) was used as control. Protein phosphorylation levels were normalized to the matching densitometric values of β -actin.

Results

A new PKD1 mutation

To test the hypothesis that the donor carried a PKD mutation, we sequenced *PKD1* and *PKD2* genes. This screening revealed a novel *PKD1* in-frame deletion A3571_3572delAV (10710_10715del6) as the only likely mutation (Figure 1A). This deletion is located in the fourth transmembrane (TM) region of polycystin-1 and is predicted to change the site of the TM domain to four amino acids earlier than normal.

Sirolimus impact on total kidney volume and renal function

To investigate the effect of long-term administration of sirolimus on cyst growth, we performed an MRI study at 4 years after transplantation in both patients. In patient 1 (Siro $-$), the total kidney volume was 255 cm³ and the total cyst volume was 23.5 cm³. One year later, the total kidney volume and total cyst volume had increased by 9.8% and 13.6%, respectively (Table 1 and Figure 1B). In patient 2 (Siro $+$), the total kidney volume and total cyst volume were essentially the same as in patient 1 (Siro $-$) 4 years after transplantation (246 cm³ and 21.4 cm³, respectively) (Table 1 and Figure 1B), and the MRI performed 1 year later showed the same rate of kidney and cyst growth (12.9%

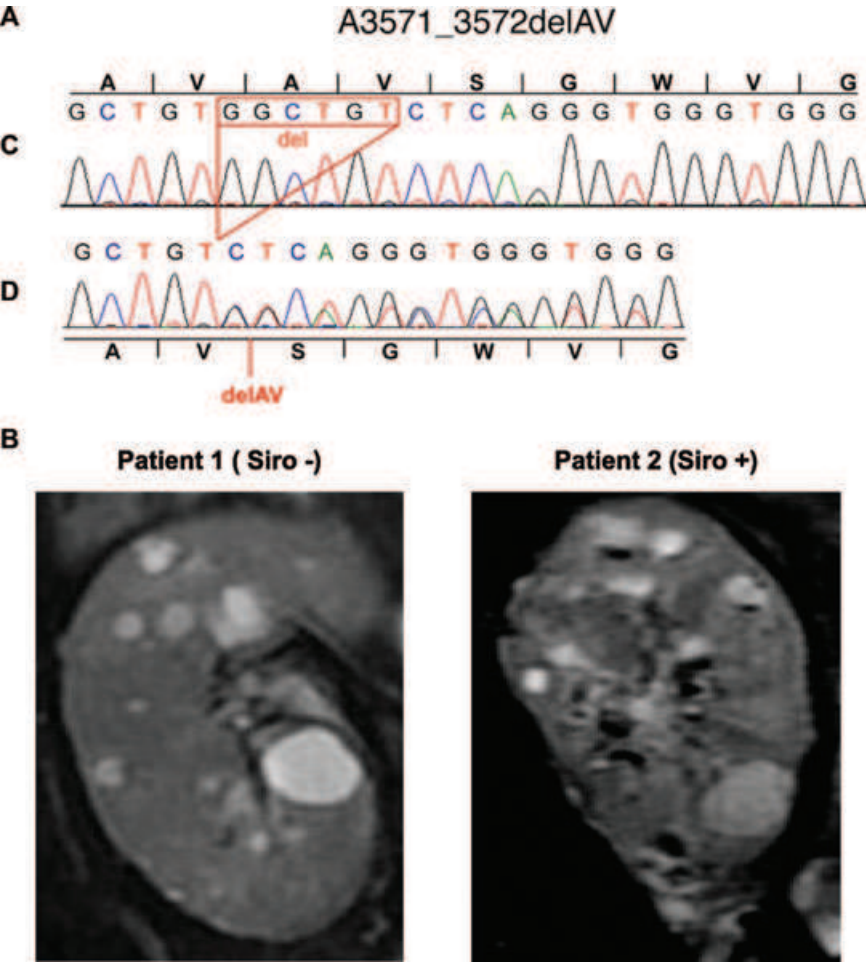


Figure 1: Molecular characterization and pathological consequence of the A3571_3572delAV PKD1 mutation. Panel A shows DNA sequencing of the control (C) and donor (D) alleles showing a six-nucleotide deletion resulting in the in-frame deletion of two amino acid, A3571_3572delAV. Panel B shows coronal T2-weighted MRI images of the two transplanted kidneys at 5 years after transplantation.

and 17.2%, respectively). In addition, the diameters of three randomly selected cysts were essentially the same in both patients (Table 1).

The serum creatinine level remained stable in both patients during the follow-up with a mean value of $89.8 \pm 14.1 \mu\text{mol/L}$ in patient 1 (Siro -) and $95.9 \pm 13.9 \mu\text{mol/L}$ in patient 2 (Siro +) (data not shown and Figure 2C). The glomerular filtration rate was $51 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ and $54 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ in patient 1 (Siro -) and patient 2 (Siro +) at 4 years after transplantation.

mTOR pathway activity

Given that the rates of total kidney volume and total cyst volume progression were identical in the two kidney recipients, we next investigated the efficacy of sirolimus in inhibiting the mTOR pathway. To that end, we studied the phosphorylation status of p70 S6 kinase in PBMCs. Western blot analysis showed that p70 S6 kinase was highly phosphorylated in healthy volunteers, but this phosphorylation was slightly decreased after transplantation ($19 \pm 5.2\%$, $p = \text{NS}$). More importantly, sirolimus treatment completely prevented the phosphorylation

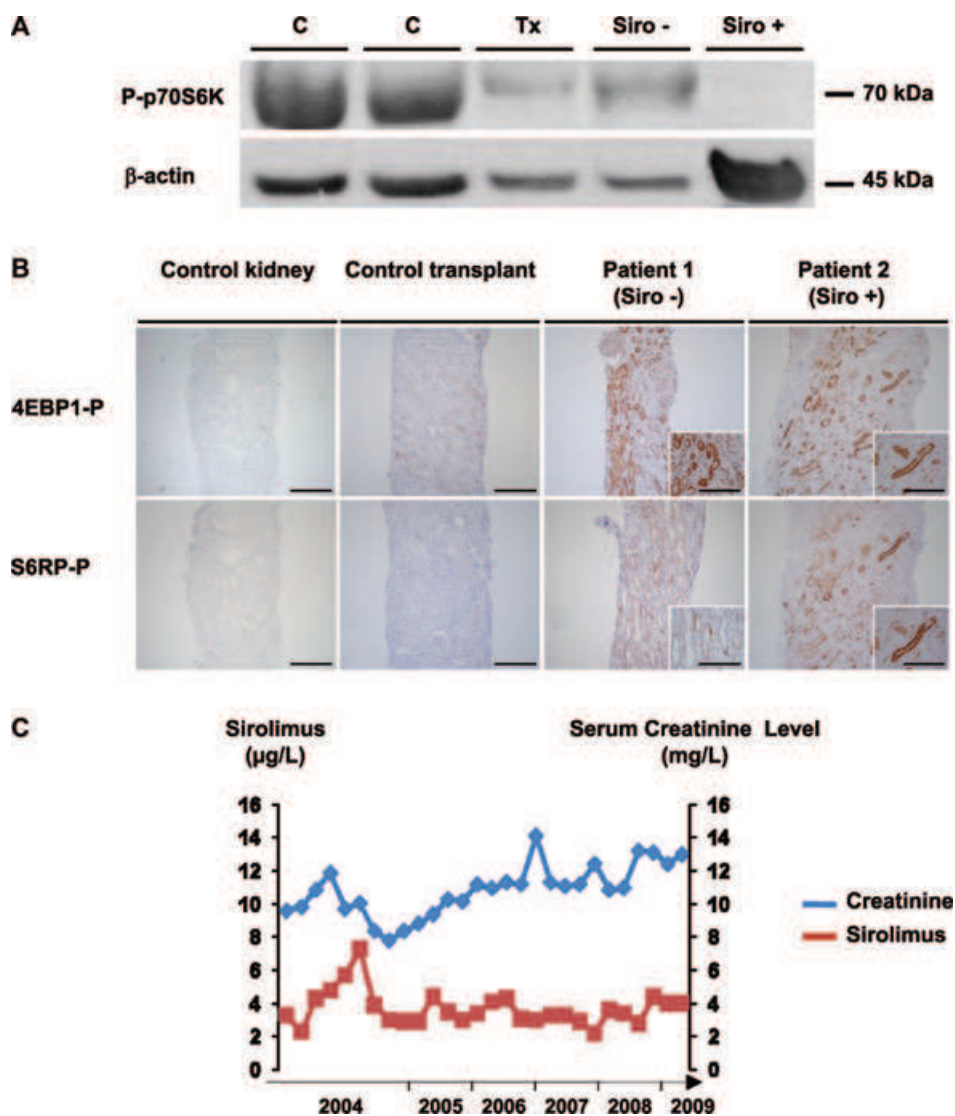
Table 1: Impact of sirolimus on kidney and cyst growth

Years post-Tx	Patient 1 (Siro -)		Patient 2 (Siro +)	
	4	5	4	5
Total kidney volume (cm3)	255	280	246	277.8
Total cyst volume (cm3)	23.5	26.7	21.4	25.1
Cyst 1 diameter (mm)	22.4 × 13	24 × 13.9	21 × 16	23.5 × 18
Cyst 2 diameter (mm)	18.4 × 11	19.5 × 11.7	13 × 9.3	15 × 10
Cyst 3 diameter (mm)	16.1 × 12	17.1 × 13	12.6 × 7.8	13.2 × 8.9

Tx: Transplantation.

Figure 2: Impact of sirolimus on mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway.

Panel A shows inhibition of mTOR pathway by sirolimus in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). A representative western blot of the phosphorylation status of p70 S6 kinase in PBMCs is shown for the control (C, $n = 4$), the transplant recipient without sirolimus (Tx, $n = 4$), patient 1 (Siro -) and patient 2 (Siro +). Panel B shows the activity of the mTOR pathway in the kidneys. Representative immunohistochemistry for two downstream targets of mTOR (phospho-S6 ribosomal protein and phospho-4E-BP1) is shown on serial section of samples derived from tumor-free pole of native kidneys (control kidney, $n = 4$), non-PKD control transplant biopsies ($n = 4$), and the transplant biopsies from patient 1 (Siro -) and 2 (Siro +). Scale bar 100 μm . Panel C shows the 5 years of follow-up for the serum creatinine and serum sirolimus levels of patient 2 (Siro +).



of p70 S6 kinase in PBMCs from patient 2 (Siro +) (Figure 2A).

To evaluate the impact of sirolimus on renal tissue, we analyzed the phosphorylation of two other downstream targets of mTOR, phospho-S6 ribosomal protein and phospho-4E-BP1. In the control kidneys, the antibodies failed to detect any phosphorylation (Figure 2B). Similarly, after transplantation in the non-PKD patients, the biopsies did not show a phosphorylation signal. In transplanted PKD kidney of patient 1 (Siro -) and 2 (Siro +), however, we observed intense cytoplasmic staining for both phospho-S6 ribosomal protein and phospho-4E-BP1, mainly localized in tubular cells. In addition, using serial sections, we were able to show that phospho-S6 ribosomal protein and phospho-4E-BP1 staining colocalized in the same tubular segments (data not shown). Notably, the intensity of the staining was identical in the two patients regardless of

sirolimus, indicating the absence of intratubular inhibition of mTOR. Of note, the interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA) scores assessed by the BANFF'05 classification were similar in patient 1 (IF/TA 1) and in patient 2 (IF/TA 1).

Serum sirolimus level

Finally, we retrospectively evaluated the serum concentration of sirolimus. During all 5 years follow-up, sirolimus was never interrupted and the mean serum sirolimus concentration was $3.68 \pm 1.04 \mu\text{g/L}$ (range: 2.3–7.3 $\mu\text{g/L}$) (Figure 2C). Of note, at the time of biopsy, sirolimus serum concentration was 4.1 $\mu\text{g/L}$.

Discussion

ADPKD is the most common inherited renal disease and is associated with intracranial aneurism. Thus, the

posttransplant discovery of ADPKD in a donor kidney is a rare but not exceptional event (16–21). Typically, the diagnosis is clinically evident and does not require confirmation at the molecular level. The occurrence of a polycystic kidney phenotype in the two recipients and the association with a cerebral aneurism suggest that our donor may have had a *PKD* mutation. By carrying out mutation screening, we identified a novel *PKD1* gene mutation involving the deletion of two amino acids, A3571_3572delAV, in the *PKD1* gene in the fourth TM domain. Since the TM domain is not predicted to be lost, simply moved, and considering that no cysts were detected by ultrasound up to 30 years, this could represent a hypomorphic mutation, as previously suggested (22).

After 5 years of uninterrupted treatment, the rates of total kidney and cyst volume progression assessed by MRI were similar in both patients. Interestingly, the rate of progression was within the range reported by the CRISP study (23 ± 22.2 mL/year) (9). In the last few years, several studies using experimental models of PKD have shown that proliferative burst favors cyst formation. In particular, it has been demonstrated that ischemia-reperfusion injury may promote tubular cell proliferation and cystogenesis (23,24). Thus, a longer time of cold ischemia in patient 2 (Siro +) could have explained the absence of cyst reduction/retardation. However, the cold ischemia times were similar for the two recipients, arguing against this hypothesis.

Cystogenesis in ADPKD is associated with dysregulation of multiple molecular pathways. Intact polycystins are essential to maintain the differentiated phenotype of tubular cells, and the reduction in either of these proteins leads to a polycystic phenotype (4). The mTOR pathway is inappropriately activated both in animal models of ADPKD and patients with PKD (6,25). Thus, beside vaptans and somatostatin agonist (3), mTOR inhibitors such as sirolimus or everolimus represent a promising therapeutic strategy. To date, the optimal serum concentration of these drugs able to simultaneously inhibit the mTOR pathway in kidney and avoid side effects is not known. Two small retrospective studies of ADPKD patients after transplantation have shown a significant reduction in the volume of the polycystic kidneys or polycystic liver in patients treated with sirolimus compared with patients treated with calcineurin inhibitors (6,8). However, none of them described the sirolimus dosages or sirolimus blood level used in these retrospective cohorts. For these reasons, the serum level used in the four ongoing clinical trials is extremely heterogeneous (ranging from 4 to 15 μ g/L) (3). Sirolimus is an immunosuppressive drug associated with a high risk for severe adverse events (e.g. myelosuppression, hyperlipidemia, impaired wound healing, proteinuria and serious infection) (26). In renal transplant recipients, the incidence of these side effects is quite high (up to 50%), leading to breaks in drug treatment in 10% of patients (26,27). Notably, adverse reactions to sirolimus and their

severity seem to be correlated with the dose (28). Thus a determination of the critical serum level of sirolimus and everolimus needed to completely inhibit the basal mTOR pathway in the kidneys of ADPKD is a crucial issue. A simple approach could be to measure mTOR pathway activity in PBMCs and to extrapolate these results to other tissues. Our study, however, argues against this method. In fact, we observed that, although a sirolimus serum level of 3 μ g/L resulted in mTOR inhibition in PBMCs, the pathway was still active in kidney. Interestingly, a previous study showed constant inhibition of mTOR pathway in PBMCs when the serum concentration of sirolimus was higher than 6 μ g/L (14). These disparate results could be due to our use of different downstream targets of mTOR to measure the pathway activity in PBMCs and the kidneys. The fact that 4E-BP1 and p70 S6 kinase are direct targets of mTOR, however, exclude this hypothesis (15).

One could also hypothesize that sirolimus/tacrolimus interaction in patient 2 is a confounding variable. At the molecular level both molecules bind and inhibit FBP12, which is also a known inhibitor of TGF- β receptor (29). The synergistic activation of TGF- β receptor could theoretically lead to more extracellular matrix production in patient 2. However, identical fibrosis scores (IF/TA 1) in graft biopsies argue against this hypothesis.

Taken together, our results suggest that kidney biopsies are required to predict inhibition of mTOR pathway in patients treated with sirolimus. Furthermore, they also suggest that the lack of efficacy of sirolimus with regard to cyst growth in our case was due to a low concentration of sirolimus. In the near future, ongoing clinical trials with sirolimus serum concentration ranging from 4 to 15 μ g/L, will be able to answer to this question.

References

1. Wilson PD. Polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 151–164.
2. Rossetti S, Consugar MB, Chapman AB et al. Comprehensive molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2143–2160.
3. Torres VE, Harris PC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: The last 3 years. *Kidney Int* 2009; 76: 149–168.
4. Harris PC, Torres VE. Polycystic kidney disease. *Annu Rev Med* 2009; 60: 321–337.
5. Edelstein CL. Mammalian target of rapamycin and caspase inhibitors in polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3: 1219–1226.
6. Shillingford JM, Murcia NS, Larson CH et al. The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 5466–5471.
7. Tao Y, Kim J, Schrier RW, Edelstein CL. Rapamycin markedly slows disease progression in a rat model of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 46–51.
8. Qian Q, Du H, King BF et al. Sirolimus reduces polycystic liver volume in ADPKD patients. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 631–638.

9. Grantham JJ, Torres VE, Chapman AB et al. Volume progression in polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 2006; 354: 2122–2130.
10. Chapman AB, Guay-Woodford LM, Grantham JJ et al. Renal structure in early autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD): The consortium for radiologic imaging studies of polycystic kidney disease (CRISP) cohort. *Kidney Int* 2003; 64: 1035–1045.
11. Bae KT, Commean PK, Lee J. Volumetric measurement of renal cysts and parenchyma using MRI: Phantoms and patients with polycystic kidney disease. *J Comput Assist Tomogr* 2000; 24: 614–619.
12. Stevens LA, Levey AS. Measured GFR as a confirmatory test for estimated GFR. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 2305–2313.
13. Boulay A, Zumbstein-Meeker S, Stephan C et al. Antitumor efficacy of intermittent treatment schedules with the rapamycin derivative RAD001 correlates with prolonged inactivation of ribosomal protein S6 kinase 1 in peripheral blood mononuclear cells. *Cancer Res* 2004; 64: 252–261.
14. Hartmann B, Schmid G, Graeb C et al. Biochemical monitoring of mTOR inhibitor-based immunosuppression following kidney transplantation: A novel approach for tailored immunosuppressive therapy. *Kidney Int* 2005; 68: 2593–2598.
15. Wulschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006; 124: 471–484.
16. Spees EK, Orlowski JP, Fitting KM, Temple DM, Reynolds CP. Successful use of cadaver kidneys from diabetic donors for transplantation. *Transplant Proc* 1990; 22: 378–379.
17. Mancini G, Comparini L, Salvadori M. Transplant of a polycystic kidney because of organ shortage. *Transplant Proc* 1990; 22: 376.
18. Siegal B. The polycystic kidney donor. *Transplantation* 1992; 54: 1131.
19. Shan YS, Lee PC, Sy ED, Hung CJ, Lin YJ. Polycystic kidney patient as a cadaveric donor: Is it appropriate? *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 410–411.
20. Powell CR, Tata S, Govani MV, Chien GW, Orvieto MA, Shalhav AL. Transplantation of a cadaveric polycystic kidney in a patient with autosomal dominant polycystic kidney disease: Long-term outcome. *Transplant Proc* 2004; 36: 1288–1292.
21. Howard RJ, Reed AI, Van Der Werf WJ, Silkensen JA, Patton PR, Scornik JC. Development of polycystic disease in a kidney 10 years after transplantation. *Transplantation* 1999; 68: 1620.
22. Rossetti S, Kubly VJ, Consugar MB et al. Incompletely penetrant PKD1 alleles suggest a role for gene dosage in cyst initiation in polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2009; 75: 848–855.
23. Piontek K, Menezes LF, Garcia-Gonzalez MA, Huso DL, Germino GG. A critical developmental switch defines the kinetics of kidney cyst formation after loss of PKD1. *Nat Med* 2007; 13: 1490–1495.
24. Verdeguer F, Le Corre S, Fischer E et al. A mitotic transcriptional switch in polycystic kidney disease. *Nat Med* 2010; 16: 106–110.
25. Wahl PR, Serra AL, Le Hir M, Molle KD, Hall MN, Wuthrich RP. Inhibition of mTOR with sirolimus slows disease progression in Han: SPRD rats with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 598–604.
26. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med* 2007; 357: 2562–2575.
27. Russ G, Segoloni G, Oberbauer R et al. Superior outcomes in renal transplantation after early cyclosporine withdrawal and sirolimus maintenance therapy, regardless of baseline renal function. *Transplantation* 2005; 80: 1204–1211.
28. Letavernier E, Bruneval P, Mandet C et al. High sirolimus levels may induce focal segmental glomerulosclerosis de novo. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2: 326–333.
29. Wang T, Li BY, Danielson PD et al. The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors. *Cell* 1996; 86: 435–444.

BIBLIOGRAPHIE

1. Pillebout, E., *et al.* Proliferation and remodeling of the peritubular microcirculation after nephron reduction: association with the progression of renal lesions. *The American journal of pathology* **159**, 547-560 (2001).
2. Gallo, R., *et al.* Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation* **99**, 2164-2170 (1999).
3. Sehgal, S.N., Baker, H. & Vezina, C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *The Journal of antibiotics* **28**, 727-732 (1975).
4. Martel, R.R., Klicius, J. & Galet, S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **55**, 48-51 (1977).
5. Eng, C.P., Sehgal, S.N. & Vezina, C. Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *The Journal of antibiotics* **37**, 1231-1237 (1984).
6. Albers, M.W., *et al.* An FKBP-rapamycin-sensitive, cyclin-dependent kinase activity that correlates with the FKBP-rapamycin-induced G1 arrest point in MG-63 cells. *Ann N Y Acad Sci* **696**, 54-62 (1993).
7. Jayaraman, T. & Marks, A.R. Rapamycin-FKBP12 blocks proliferation, induces differentiation, and inhibits cdc2 kinase activity in a myogenic cell line. *The Journal of biological chemistry* **268**, 25385-25388 (1993).
8. Morice, W.G., Brunn, G.J., Wiederrecht, G., Siekierka, J.J. & Abraham, R.T. Rapamycin-induced inhibition of p34cdc2 kinase activation is associated with G1/S-phase growth arrest in T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* **268**, 3734-3738 (1993).
9. Morice, W.G., Wiederrecht, G., Brunn, G.J., Siekierka, J.J. & Abraham, R.T. Rapamycin inhibition of interleukin-2-dependent p33cdk2 and p34cdc2 kinase activation in T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* **268**, 22737-22745 (1993).
10. Nourse, J., *et al.* Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* **372**, 570-573 (1994).
11. Chung, J., Kuo, C.J., Crabtree, G.R. & Blenis, J. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* **69**, 1227-1236 (1992).

12. Price, D.J., Grove, J.R., Calvo, V., Avruch, J. & Bierer, B.E. Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science (New York, N.Y)* **257**, 973-977 (1992).
13. Heitman, J., Movva, N.R. & Hall, M.N. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science (New York, N.Y)* **253**, 905-909 (1991).
14. Choi, J., Chen, J., Schreiber, S.L. & Clardy, J. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science (New York, N.Y)* **273**, 239-242 (1996).
15. Brown, E.J., *et al.* Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* **377**, 441-446 (1995).
16. Sabatini, D.M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P. & Snyder, S.H. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* **78**, 35-43 (1994).
17. Jacinto, E., *et al.* Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature cell biology* **6**, 1122-1128 (2004).
18. Kim, D.H., *et al.* GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Molecular cell* **11**, 895-904 (2003).
19. Peterson, T.R., *et al.* DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* **137**, 873-886 (2009).
20. Kaizuka, T., *et al.* Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *The Journal of biological chemistry* **285**, 20109-20116 (2010).
21. Hara, K., *et al.* Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* **110**, 177-189 (2002).
22. Kim, D.H., *et al.* mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110**, 163-175 (2002).
23. Sancak, Y., *et al.* PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Molecular cell* **25**, 903-915 (2007).
24. Sarbassov, D.D., *et al.* Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* **14**, 1296-1302 (2004).
25. Frias, M.A., *et al.* mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol* **16**, 1865-1870 (2006).

26. Jacinto, E., *et al.* SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* **127**, 125-137 (2006).
27. Pearce, L.R., *et al.* Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J* **405**, 513-522 (2007).
28. Pearce, L.R., Sommer, E.M., Sakamoto, K., Wullschleger, S. & Alessi, D.R. Protor-1 is required for efficient mTORC2-mediated activation of SGK1 in the kidney. *Biochem J* **436**, 169-179 (2011).
29. Zoncu, R., Efeyan, A. & Sabatini, D.M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 21-35 (2011).
30. Ma, X.M. & Blenis, J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 307-318 (2009).
31. Laplante, M. & Sabatini, D.M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274-293 (2012).
32. Montagne, J., *et al.* Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size. *Science (New York, N.Y)* **285**, 2126-2129 (1999).
33. Shima, H., *et al.* Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *Embo J* **17**, 6649-6659 (1998).
34. Ma, X.M., Yoon, S.O., Richardson, C.J., Julich, K. & Blenis, J. SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell* **133**, 303-313 (2008).
35. Richardson, C.J., *et al.* SKAR is a specific target of S6 kinase 1 in cell growth control. *Curr Biol* **14**, 1540-1549 (2004).
36. Hannan, K.M., *et al.* mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Molecular and cellular biology* **23**, 8862-8877 (2003).
37. Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X. & Grummt, I. mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes & development* **18**, 423-434 (2004).
38. Jorgensen, P., *et al.* A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes & development* **18**, 2491-2505 (2004).

39. Marion, R.M., *et al.* Sfp1 is a stress- and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 14315-14322 (2004).
40. Tang, H., *et al.* Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. *Molecular and cellular biology* **21**, 8671-8683 (2001).
41. Kantidakis, T., Ramsbottom, B.A., Birch, J.L., Dowding, S.N. & White, R.J. mTOR associates with TFIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 11823-11828 (2010).
42. Michels, A.A., *et al.* mTORC1 directly phosphorylates and regulates human MAF1. *Molecular and cellular biology* **30**, 3749-3757 (2010).
43. Laplante, M. & Sabatini, D.M. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr Biol* **19**, R1046-1052 (2009).
44. Ferre, P. & Foufelle, F. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Hormone research* **68**, 72-82 (2007).
45. Porstmann, T., *et al.* PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. *Oncogene* **24**, 6465-6481 (2005).
46. Hegarty, B.D., *et al.* Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 791-796 (2005).
47. Porstmann, T., *et al.* SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell metabolism* **8**, 224-236 (2008).
48. Brown, N.F., Stefanovic-Racic, M., Sipula, I.J. & Perdomo, G. The mammalian target of rapamycin regulates lipid metabolism in primary cultures of rat hepatocytes. *Metabolism: clinical and experimental* **56**, 1500-1507 (2007).
49. Peng, T., Golub, T.R. & Sabatini, D.M. The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Molecular and cellular biology* **22**, 5575-5584 (2002).

50. Mauvoisin, D., *et al.* Role of the PI3-kinase/mTor pathway in the regulation of the stearoyl CoA desaturase (SCD1) gene expression by insulin in liver. *Journal of cell communication and signaling* **1**, 113-125 (2007).
51. Peterfy, M., Phan, J., Xu, P. & Reue, K. Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Genet* **27**, 121-124 (2001).
52. Phan, J. & Reue, K. Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. *Cell metabolism* **1**, 73-83 (2005).
53. Kim, J.E. & Chen, J. regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes* **53**, 2748-2756 (2004).
54. Zhang, H.H., *et al.* Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway. *PLoS ONE* **4**, e6189 (2009).
55. Peterson, T.R., *et al.* mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* **146**, 408-420 (2011).
56. Brugarolas, J.B., Vazquez, F., Reddy, A., Sellers, W.R. & Kaelin, W.G., Jr. TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and -independent pathways. *Cancer Cell* **4**, 147-158 (2003).
57. Duvel, K., *et al.* Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Molecular cell* **39**, 171-183 (2010).
58. Hudson, C.C., *et al.* Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Molecular and cellular biology* **22**, 7004-7014 (2002).
59. Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P.C. & Semenza, G.L. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Molecular and cellular biology* **21**, 3995-4004 (2001).
60. Cunningham, J.T., *et al.* mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* **450**, 736-740 (2007).
61. Inoki, K., Kim, J. & Guan, K.L. AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **52**, 381-400 (2012).
62. Rubinsztein, D.C., Marino, G. & Kroemer, G. Autophagy and aging. *Cell* **146**, 682-695 (2011).

63. Mizushima, N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 132-139 (2010).
64. Chan, E.Y. & Tooze, S.A. Evolution of Atg1 function and regulation. *Autophagy* **5**, 758-765 (2009).
65. Kamada, Y., *et al.* Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *The Journal of cell biology* **150**, 1507-1513 (2000).
66. Kamada, Y., *et al.* Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. *Molecular and cellular biology* **30**, 1049-1058 (2010).
67. Hara, T., *et al.* FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *The Journal of cell biology* **181**, 497-510 (2008).
68. Koren, I., Reem, E. & Kimchi, A. DAP1, a novel substrate of mTOR, negatively regulates autophagy. *Curr Biol* **20**, 1093-1098 (2010).
69. Hsu, P.P., *et al.* The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science (New York, N.Y)* **332**, 1317-1322 (2011).
70. Settembre, C., *et al.* TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science (New York, N.Y)* **332**, 1429-1433 (2011).
71. Garcia-Martinez, J.M. & Alessi, D.R. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J* **416**, 375-385 (2008).
72. Guertin, D.A., *et al.* Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell* **11**, 859-871 (2006).
73. Alessi, D.R., Pearce, L.R. & Garcia-Martinez, J.M. New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. *Science signaling* **2**, pe27 (2009).
74. Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. & Sabatini, D.M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y)* **307**, 1098-1101 (2005).
75. Lang, F., Artunc, F. & Vallon, V. The physiological impact of the serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **18**, 439-448 (2009).
76. Ring, A.M., *et al.* An SGK1 site in WNK4 regulates Na⁺ channel and K⁺ channel activity and has implications for aldosterone signaling and K⁺ homeostasis.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 4025-4029 (2007).
77. Lang, F., *et al.* (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol Rev* **86**, 1151-1178 (2006).
 78. Kim, M.J., *et al.* Negative regulation of SEK1 signaling by serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase 1. *Embo J* **26**, 3075-3085 (2007).
 79. Menniti, M., *et al.* Serum and glucocorticoid-regulated kinase Sgk1 inhibits insulin-dependent activation of phosphomannomutase 2 in transfected COS-7 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C148-155 (2005).
 80. Helms, M.N., *et al.* Role of SGK1 in nitric oxide inhibition of ENaC in Na⁺-transporting epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C717-726 (2005).
 81. David, S. & Kalb, R.G. Serum/glucocorticoid-inducible kinase can phosphorylate the cyclic AMP response element binding protein, CREB. *FEBS Lett* **579**, 1534-1538 (2005).
 82. Tai, D.J., Su, C.C., Ma, Y.L. & Lee, E.H. SGK1 phosphorylation of IkappaB Kinase alpha and p300 Up-regulates NF-kappaB activity and increases N-Methyl-D-aspartate receptor NR2A and NR2B expression. *The Journal of biological chemistry* **284**, 4073-4089 (2009).
 83. Dehner, M., Hadjihannas, M., Weiske, J., Huber, O. & Behrens, J. Wnt signaling inhibits Forkhead box O3a-induced transcription and apoptosis through up-regulation of serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1. *The Journal of biological chemistry* **283**, 19201-19210 (2008).
 84. Wulff, P., *et al.* Impaired renal Na(+) retention in the sgk1-knockout mouse. *The Journal of clinical investigation* **110**, 1263-1268 (2002).
 85. Nakashima, S. Protein kinase C alpha (PKC alpha): regulation and biological function. *Journal of biochemistry* **132**, 669-675 (2002).
 86. Efeyan, A., Zoncu, R. & Sabatini, D.M. Amino acids and mTORC1: from lysosomes to disease. *Trends in molecular medicine* (2012).
 87. Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. & Guan, K.L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology* **4**, 648-657 (2002).
 88. Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Pandolfi, P.P. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* **121**, 179-193 (2005).

89. Manning, B.D., Tee, A.R., Logsdon, M.N., Blenis, J. & Cantley, L.C. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Molecular cell* **10**, 151-162 (2002).
90. Potter, C.J., Pedraza, L.G. & Xu, T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nature cell biology* **4**, 658-665 (2002).
91. Roux, P.P., Ballif, B.A., Anjum, R., Gygi, S.P. & Blenis, J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 13489-13494 (2004).
92. Lee, D.F., *et al.* IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* **130**, 440-455 (2007).
93. Inoki, K., *et al.* TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* **126**, 955-968 (2006).
94. Gwinn, D.M., *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell* **30**, 214-226 (2008).
95. Brugarolas, J., *et al.* Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes & development* **18**, 2893-2904 (2004).
96. DeYoung, M.P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D. & Ellisen, L.W. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes & development* **22**, 239-251 (2008).
97. Reiling, J.H. & Hafen, E. The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in Drosophila. *Genes & development* **18**, 2879-2892 (2004).
98. Feng, Z., Zhang, H., Levine, A.J. & Jin, S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 8204-8209 (2005).
99. Stambolic, V., *et al.* Regulation of PTEN transcription by p53. *Molecular cell* **8**, 317-325 (2001).
100. Budanov, A.V. & Karin, M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* **134**, 451-460 (2008).

101. Blommaart, E.F., Luiken, J.J., Blommaart, P.J., van Woerkom, G.M. & Meijer, A.J. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* **270**, 2320-2326 (1995).
102. Hara, K., *et al.* Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *The Journal of biological chemistry* **273**, 14484-14494 (1998).
103. Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T.P. & Guan, K.L. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature cell biology* **10**, 935-945 (2008).
104. Sancak, Y., *et al.* The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science (New York, N.Y)* **320**, 1496-1501 (2008).
105. Zoncu, R., *et al.* mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science (New York, N.Y)* **334**, 678-683 (2011).
106. Pena-Llopis, S., *et al.* Regulation of TFEB and V-ATPases by mTORC1. *Embo J* **30**, 3242-3258 (2011).
107. Findlay, G.M., Yan, L., Procter, J., Mieulet, V. & Lamb, R.F. A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling. *Biochem J* **403**, 13-20 (2007).
108. Nobukuni, T., *et al.* Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 14238-14243 (2005).
109. Kim, S., *et al.* Amino acid signaling to mTOR mediated by inositol polyphosphate multikinase. *Cell metabolism* **13**, 215-221 (2011).
110. Huang, J., Dibble, C.C., Matsuzaki, M. & Manning, B.D. The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Molecular and cellular biology* **28**, 4104-4115 (2008).
111. Dibble, C.C., Asara, J.M. & Manning, B.D. Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Molecular and cellular biology* **29**, 5657-5670 (2009).
112. Treins, C., Warne, P.H., Magnuson, M.A., Pende, M. & Downward, J. Rictor is a novel target of p70 S6 kinase-1. *Oncogene* **29**, 1003-1016 (2010).
113. Sarbassov, D.D., *et al.* Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular cell* **22**, 159-168 (2006).

114. Zeng, Z., *et al.* Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood* **109**, 3509-3512 (2007).
115. Barilli, A., *et al.* In human endothelial cells rapamycin causes mTORC2 inhibition and impairs cell viability and function. *Cardiovasc Res* **78**, 563-571 (2008).
116. Wang, Y., *et al.* Regulation of androgen receptor transcriptional activity by rapamycin in prostate cancer cell proliferation and survival. *Oncogene* **27**, 7106-7117 (2008).
117. Shu, L. & Houghton, P.J. The mTORC2 complex regulates terminal differentiation of C2C12 myoblasts. *Molecular and cellular biology* **29**, 4691-4700 (2009).
118. Chen, X.G., *et al.* Rapamycin regulates Akt and ERK phosphorylation through mTORC1 and mTORC2 signaling pathways. *Mol Carcinog* **49**, 603-610 (2010).
119. Barlow, A.D., *et al.* Rapamycin toxicity in MIN6 cells and rat and human islets is mediated by the inhibition of mTOR complex 2 (mTORC2). *Diabetologia* **55**, 1355-1365 (2012).
120. Lamming, D.W., *et al.* Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science (New York, N.Y)* **335**, 1638-1643 (2012).
121. Letavernier, E., *et al.* Sirolimus interacts with pathways essential for podocyte integrity. *Nephrol Dial Transplant* **24**, 630-638 (2009).
122. Vollenbroeker, B., *et al.* mTOR regulates expression of slit diaphragm proteins and cytoskeleton structure in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* **296**, F418-426 (2009).
123. Staal, S.P. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 5034-5037 (1987).
124. Staal, S.P., Hartley, J.W. & Rowe, W.P. Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 3065-3067 (1977).
125. Coffey, P.J. & Woodgett, J.R. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem* **201**, 475-481 (1991).

126. Jones, P.M., Persaud, S.J. & Howell, S.L. Protein kinase C and the regulation of insulin secretion from pancreatic B cells. *Journal of molecular endocrinology* **6**, 121-127 (1991).
127. Kumar, C.C. & Madison, V. AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene* **24**, 7493-7501 (2005).
128. Staveley, B.E., *et al.* Genetic analysis of protein kinase B (AKT) in *Drosophila*. *Curr Biol* **8**, 599-602 (1998).
129. Verdu, J., Buratovich, M.A., Wilder, E.L. & Birnbaum, M.J. Cell-autonomous regulation of cell and organ growth in *Drosophila* by Akt/PKB. *Nature cell biology* **1**, 500-506 (1999).
130. Cho, H., *et al.* Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science (New York, N.Y)* **292**, 1728-1731 (2001).
131. Easton, R.M., *et al.* Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Molecular and cellular biology* **25**, 1869-1878 (2005).
132. Manning, B.D. & Cantley, L.C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261-1274 (2007).
133. Zhou, B.P., *et al.* HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nature cell biology* **3**, 973-982 (2001).
134. Liang, J., *et al.* PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nature medicine* **8**, 1153-1160 (2002).
135. Shin, I., *et al.* PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nature medicine* **8**, 1145-1152 (2002).
136. Viglietto, G., *et al.* Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nature medicine* **8**, 1136-1144 (2002).
137. Heron-Milhavet, L., *et al.* Only Akt1 is required for proliferation, while Akt2 promotes cell cycle exit through p21 binding. *Molecular and cellular biology* **26**, 8267-8280 (2006).
138. Welcker, M., *et al.* Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation. *Molecular cell* **12**, 381-392 (2003).

139. Wei, W., Jin, J., Schlisio, S., Harper, J.W. & Kaelin, W.G., Jr. The v-Jun point mutation allows c-Jun to escape GSK3-dependent recognition and destruction by the Fbw7 ubiquitin ligase. *Cancer Cell* **8**, 25-33 (2005).
140. Schmidt, M., *et al.* Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Molecular and cellular biology* **22**, 7842-7852 (2002).
141. Skeen, J.E., *et al.* Akt deficiency impairs normal cell proliferation and suppresses oncogenesis in a p53-independent and mTORC1-dependent manner. *Cancer Cell* **10**, 269-280 (2006).
142. Sakamoto, K. & Holman, G.D. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **295**, E29-37 (2008).
143. Zhou, Q.L., *et al.* Akt substrate TBC1D1 regulates GLUT1 expression through the mTOR pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* **411**, 647-655 (2008).
144. Taha, C., *et al.* Opposite translational control of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter mRNAs in response to insulin. Role of mammalian target of rapamycin, protein kinase b, and phosphatidylinositol 3-kinase in GLUT1 mRNA translation. *The Journal of biological chemistry* **274**, 33085-33091 (1999).
145. Robey, R.B. & Hay, N. Is Akt the "Warburg kinase"?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Seminars in cancer biology* **19**, 25-31 (2009).
146. Sundqvist, A., *et al.* Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF(Fbw7). *Cell metabolism* **1**, 379-391 (2005).
147. Irie, H.Y., *et al.* Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of cell biology* **171**, 1023-1034 (2005).
148. Zhou, G.L., *et al.* Opposing roles for Akt1 and Akt2 in Rac/Pak signaling and cell migration. *The Journal of biological chemistry* **281**, 36443-36453 (2006).
149. Alessi, D.R., *et al.* Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* **7**, 261-269 (1997).
150. Williams, M.R., *et al.* The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr Biol* **10**, 439-448 (2000).

151. Carracedo, A., Baselga, J. & Pandolfi, P.P. Deconstructing feedback-signaling networks to improve anticancer therapy with mTORC1 inhibitors. *Cell Cycle* **7**, 3805-3809 (2008).
152. Salmena, L., Carracedo, A. & Pandolfi, P.P. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* **133**, 403-414 (2008).
153. Kawase, T., *et al.* PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt. *Cell* **136**, 535-550 (2009).
154. Brognard, J., Sierrecki, E., Gao, T. & Newton, A.C. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Molecular cell* **25**, 917-931 (2007).
155. Liu, J., Stevens, P.D., Li, X., Schmidt, M.D. & Gao, T. PHLPP-mediated dephosphorylation of S6K1 inhibits protein translation and cell growth. *Molecular and cellular biology* **31**, 4917-4927 (2011).
156. Suizu, F., *et al.* The E3 ligase TTC3 facilitates ubiquitination and degradation of phosphorylated Akt. *Dev Cell* **17**, 800-810 (2009).
157. Liao, Y., *et al.* Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase Pin1 is critical for the regulation of PKB/Akt stability and activation phosphorylation. *Oncogene* **28**, 2436-2445 (2009).
158. Stambolic, V. & Woodgett, J.R. Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration. *Trends in cell biology* **16**, 461-466 (2006).
159. Tschopp, O., *et al.* Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development (Cambridge, England)* **132**, 2943-2954 (2005).
160. George, S., *et al.* A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2. *Science (New York, N.Y)* **304**, 1325-1328 (2004).
161. Maroulakou, I.G., Oemler, W., Naber, S.P. & Tschlis, P.N. Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV-polyoma middle T transgenic mice. *Cancer Res* **67**, 167-177 (2007).
162. Bae, S.S., Cho, H., Mu, J. & Birnbaum, M.J. Isoform-specific regulation of insulin-dependent glucose uptake by Akt/protein kinase B. *The Journal of biological chemistry* **278**, 49530-49536 (2003).

163. Gonzalez, E. & McGraw, T.E. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* **8**, 2502-2508 (2009).
164. Garofalo, R.S., *et al.* Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *The Journal of clinical investigation* **112**, 197-208 (2003).
165. Peng, X.D., *et al.* Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes & development* **17**, 1352-1365 (2003).
166. Yang, Z.Z., *et al.* Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Balpha (PKBalpha) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice. *Molecular and cellular biology* **25**, 10407-10418 (2005).
167. Dummler, B., *et al.* Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Molecular and cellular biology* **26**, 8042-8051 (2006).
168. Quaggin, S.E. & Kreidberg, J.A. Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences. *Development (Cambridge, England)* **135**, 609-620 (2008).
169. Greka, A. & Mundel, P. Cell biology and pathology of podocytes. *Annual review of physiology* **74**, 299-323 (2012).
170. Paulsson, M. Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **27**, 93-127 (1992).
171. Schlondorff, D. & Banas, B. The mesangial cell revisited: no cell is an island. *J Am Soc Nephrol* **20**, 1179-1187 (2009).
172. Bariety, J., Mandet, C., Hill, G.S. & Bruneval, P. Parietal podocytes in normal human glomeruli. *J Am Soc Nephrol* **17**, 2770-2780 (2006).
173. Ohse, T., *et al.* A new function for parietal epithelial cells: a second glomerular barrier. *Am J Physiol Renal Physiol* **297**, F1566-1574 (2009).
174. Ronconi, E., *et al.* Regeneration of glomerular podocytes by human renal progenitors. *J Am Soc Nephrol* **20**, 322-332 (2009).
175. Gekle, M. Renal tubule albumin transport. *Annual review of physiology* **67**, 573-594 (2005).

176. Couchoud, C., Lassalle, M., Stengel, B. & Jacquelinet, C. [Renal Epidemiology and Information Network: 2007 annual report]. *Nephrologie & therapeutique* **5 Suppl 1**, S3-144 (2009).
177. Meguid El Nahas, A. & Bello, A.K. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet* **365**, 331-340 (2005).
178. Keith, D.S., Nichols, G.A., Gullion, C.M., Brown, J.B. & Smith, D.H. Longitudinal follow-up and outcomes among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization. *Archives of internal medicine* **164**, 659-663 (2004).
179. Go, A.S., Chertow, G.M., Fan, D., McCulloch, C.E. & Hsu, C.Y. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *The New England journal of medicine* **351**, 1296-1305 (2004).
180. Wen, C.P., *et al.* All-cause mortality attributable to chronic kidney disease: a prospective cohort study based on 462 293 adults in Taiwan. *Lancet* **371**, 2173-2182 (2008).
181. Mitch, W.E., Walser, M., Buffington, G.A. & Lemann, J., Jr. A simple method of estimating progression of chronic renal failure. *Lancet* **2**, 1326-1328 (1976).
182. Brenner, B.M., Troy, J.L. & Daugharty, T.M. The dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat. *The Journal of clinical investigation* **50**, 1776-1780 (1971).
183. 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).
184. Hostetter, T.H. Progression of renal disease and renal hypertrophy. *Annual review of physiology* **57**, 263-278 (1995).
185. Meyer, T.W., Anderson, S., Rennke, H.G. & Brenner, B.M. Converting enzyme inhibitor therapy limits progressive glomerular injury in rats with renal insufficiency. *Am J Med* **79**, 31-36 (1985).
186. 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. *The Journal of cell biology* **75**, 573-585 (1977).
187. Seyer-Hansen, K., Gundersen, H.J. & Osterby, R. Stereology of the rat kidney during compensatory renal hypertrophy. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. Section A, Pathology* **93**, 9-12 (1985).

188. Shea, S.M., Raskova, J. & Morrison, A.B. A stereologic study of glomerular hypertrophy in the subtotaly nephrectomized rat. *The American journal of pathology* **90**, 201-210 (1978).
189. Luyckx, V.A. & Brenner, B.M. The clinical importance of nephron mass. *J Am Soc Nephrol* **21**, 898-910 (2010).
190. Lee, G.S., *et al.* Differential response of glomerular epithelial and mesangial cells after subtotal nephrectomy. *Kidney international* **53**, 1389-1398 (1998).
191. 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).
192. 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 international* **60**, 243-248 (2001).
193. Hoy, W.E., *et al.* The natural history of renal disease in Australian Aborigines. Part 2. Albuminuria predicts natural death and renal failure. *Kidney international* **60**, 249-256 (2001).
194. Hoang, K., *et al.* Determinants of glomerular hypofiltration in aging humans. *Kidney international* **64**, 1417-1424 (2003).
195. Kwoh, C., Shannon, M.B., Miner, J.H. & Shaw, A. Pathogenesis of nonimmune glomerulopathies. *Annual review of pathology* **1**, 349-374 (2006).
196. Kriz, W., Gretz, N. & Lemley, K.V. Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney international* **54**, 687-697 (1998).
197. Machuca, E., Benoit, G. & Antignac, C. Genetics of nephrotic syndrome: connecting molecular genetics to podocyte physiology. *Human molecular genetics* **18**, R185-194 (2009).
198. 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).
199. Pagtalunan, M.E., *et al.* Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *The Journal of clinical investigation* **99**, 342-348 (1997).
200. 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).

201. Lemley, K.V., *et al.* Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy. *Kidney international* **61**, 1475-1485 (2002).
202. 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).
203. Dalla Vestra, M., *et al.* Is podocyte injury relevant in diabetic nephropathy? Studies in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**, 1031-1035 (2003).
204. Shankland, S.J. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney international* **69**, 2131-2147 (2006).
205. Petermann, A. & Floege, J. Podocyte damage resulting in podocyturia: a potential diagnostic marker to assess glomerular disease activity. *Nephron. Clinical practice* **106**, c61-66 (2007).
206. 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).
207. 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).
208. Appel, D., *et al.* Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* **20**, 333-343 (2009).
209. Marshall, C.B. & Shankland, S.J. Cell cycle and glomerular disease: a minireview. *Nephron Exp Nephrol* **102**, e39-48 (2006).
210. Sugimoto, H., *et al.* Bone-marrow-derived stem cells repair basement membrane collagen defects and reverse genetic kidney disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 7321-7326 (2006).
211. 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).
212. 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. *The American journal of pathology* **178**, 494-499 (2011).

213. Miyazaki, M., *et al.* Regulation of renal extracellular matrix metabolism. *Contributions to nephrology* **139**, 141-155 (2003).
214. Tang, W.W., Van, G.Y. & Qi, M. Myofibroblast and alpha 1 (III) collagen expression in experimental tubulointerstitial nephritis. *Kidney international* **51**, 926-931 (1997).
215. 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. *The American journal of pathology* **173**, 1617-1627 (2008).
216. 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).
217. 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).
218. Humphreys, B.D., *et al.* Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *The American journal of pathology* **176**, 85-97 (2010).
219. Kriz, W., Kaissling, B. & Le Hir, M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *The Journal of clinical investigation* **121**, 468-474 (2011).
220. Sanz, A.B., Santamaria, B., Ruiz-Ortega, M., Egido, J. & Ortiz, A. Mechanisms of renal apoptosis in health and disease. *J Am Soc Nephrol* **19**, 1634-1642 (2008).
221. Nishio, S., *et al.* Pkd1 regulates immortalized proliferation of renal tubular epithelial cells through p53 induction and JNK activation. *The Journal of clinical investigation* **115**, 910-918 (2005).
222. 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. *Nature medicine* **16**, 535-543, 531p following 143 (2010).
223. Remuzzi, G., Benigni, A. & Remuzzi, A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *The Journal of clinical investigation* **116**, 288-296 (2006).
224. 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).

225. Abbate, M., Zoja, C. & Remuzzi, G. How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol* **17**, 2974-2984 (2006).
226. Lemley, K.V. & Kriz, W. Glomerular injury in analbuminemic rats after subtotal nephrectomy. *Nephron* **59**, 104-109 (1991).
227. Okuda, S., *et al.* Albuminuria is not an aggravating factor in experimental focal glomerulosclerosis and hyalinosis. *J Lab Clin Med* **119**, 245-253 (1992).
228. 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).
229. 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).
230. Ishidoya, S., Morrissey, J., McCracken, R., Reyes, A. & Klahr, S. Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction. *Kidney international* **47**, 1285-1294 (1995).
231. Levine, J.S., Branch, D.W. & Rauch, J. The antiphospholipid syndrome. *The New England journal of medicine* **346**, 752-763 (2002).
232. Alarcon-Segovia, D., Perez-Vazquez, M.E., Villa, A.R., Drenkard, C. & Cabiedes, J. Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus. *Seminars in arthritis and rheumatism* **21**, 275-286 (1992).
233. Wilson, W.A., *et al.* International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis and rheumatism* **42**, 1309-1311 (1999).
234. Hartmann, R.C. & Conley, C.L. Studies on the initiation of blood coagulation, III. The clotting properties of canine platelet-free plasma. *The Journal of clinical investigation* **31**, 685-691 (1952).
235. de Groot, P.G. & Urbanus, R.T. The significance of auto-antibodies against beta2-Glycoprotein I. *Blood* (2012).
236. Ruiz-Irastorza, G., Crowther, M., Branch, W. & Khamashta, M.A. Antiphospholipid syndrome. *Lancet* **376**, 1498-1509 (2010).
237. McNeil, H.P., Simpson, R.J., Chesterman, C.N. & Krilis, S.A. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding

- inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 4120-4124 (1990).
238. Galli, M., *et al.* Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* **335**, 1544-1547 (1990).
239. Matsuura, E., Igarashi, Y., Fujimoto, M., Ichikawa, K. & Koike, T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* **336**, 177-178 (1990).
240. Iverson, G.M., Victoria, E.J. & Marquis, D.M. Anti-beta2 glycoprotein I (beta2GPI) autoantibodies recognize an epitope on the first domain of beta2GPI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 15542-15546 (1998).
241. de Laat, B., Derksen, R.H., van Lummel, M., Pennings, M.T. & de Groot, P.G. Pathogenic anti-beta2-glycoprotein I antibodies recognize domain I of beta2-glycoprotein I only after a conformational change. *Blood* **107**, 1916-1924 (2006).
242. Ioannou, Y., *et al.* In vivo inhibition of antiphospholipid antibody-induced pathogenicity utilizing the antigenic target peptide domain I of beta2-glycoprotein I: proof of concept. *J Thromb Haemost* **7**, 833-842 (2009).
243. de Laat, B., Derksen, R.H., Urbanus, R.T. & de Groot, P.G. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta 2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. *Blood* **105**, 1540-1545 (2005).
244. Chamorro, A.J., Marcos, M., Miron-Canelo, J.A., Cervera, R. & Espinosa, G. Val247Leu beta2-glycoprotein-I allelic variant is associated with antiphospholipid syndrome: Systematic review and meta-analysis. *Autoimmunity reviews* **11**, 705-712 (2012).
245. Yasuda, S., *et al.* Significance of valine/leucine247 polymorphism of beta2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome: increased reactivity of anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies to the valine247 beta2-glycoprotein I variant. *Arthritis and rheumatism* **52**, 212-218 (2005).
246. Forastiero, R., Martinuzzo, M., de Larranaga, G., Vega-Ostertag, M. & Pierangeli, S. Anti-beta2glycoprotein I antibodies from leprosy patients do not show thrombogenic effects in an in vivo animal model. *J Thromb Haemost* **9**, 859-861 (2011).
247. Andreoli, L., *et al.* Anti-beta(2)-glycoprotein I IgG antibodies from 1-year-old healthy children born to mothers with systemic autoimmune diseases preferentially target

- domain 4/5: might it be the reason for their 'innocent' profile? *Annals of the rheumatic diseases* **70**, 380-383 (2011).
248. Pangborn, M.C. A simplified preparation of cardiolipin, with note on purification of lecithin for serologic use. *The Journal of biological chemistry* **161**, 71-82 (1945).
 249. Harris, E.N., *et al.* Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* **2**, 1211-1214 (1983).
 250. Gharavi, A.E., Mellors, R.C. & Elkon, K.B. IgG anti-cardiolipin antibodies in murine lupus. *Clin Exp Immunol* **78**, 233-238 (1989).
 251. Vianna, J.L., *et al.* The heart and antiphospholipid antibodies in MRL-lpr/lpr mice. *Lupus* **1**, 357-361 (1992).
 252. Branch, D.W., *et al.* Immunoglobulin G fractions from patients with antiphospholipid antibodies cause fetal death in BALB/c mice: a model for autoimmune fetal loss. *American journal of obstetrics and gynecology* **163**, 210-216 (1990).
 253. Girardi, G., Redecha, P. & Salmon, J.E. Heparin prevents antiphospholipid antibody-induced fetal loss by inhibiting complement activation. *Nature medicine* **10**, 1222-1226 (2004).
 254. Pierangeli, S.S. & Harris, E.N. Antiphospholipid antibodies in an in vivo thrombosis model in mice. *Lupus* **3**, 247-251 (1994).
 255. Fischetti, F., *et al.* Thrombus formation induced by antibodies to beta2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood* **106**, 2340-2346 (2005).
 256. Pierangeli, S.S., *et al.* Functional analyses of patient-derived IgG monoclonal anticardiolipin antibodies using in vivo thrombosis and in vivo microcirculation models. *Thrombosis and haemostasis* **84**, 388-395 (2000).
 257. Arad, A., Proulle, V., Furie, R.A., Furie, B.C. & Furie, B. beta(2)-Glycoprotein-1 autoantibodies from patients with antiphospholipid syndrome are sufficient to potentiate arterial thrombus formation in a mouse model. *Blood* **117**, 3453-3459 (2011).
 258. Ioannou, Y. The Michael Mason Prize: Pathogenic antiphospholipid antibodies, stressed out antigens and the deployment of decoys. *Rheumatology (Oxford)* **51**, 32-36 (2012).
 259. de Groot, P.G. & Urbanus, R.T. The significance of autoantibodies against beta2-glycoprotein I. *Blood* **120**, 266-274 (2012).

260. Marciniak, E. & Romond, E.H. Impaired catalytic function of activated protein C: a new in vitro manifestation of lupus anticoagulant. *Blood* **74**, 2426-2432 (1989).
261. Oosting, J.D., *et al.* Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood* **81**, 2618-2625 (1993).
262. Galli, M., Ruggeri, L. & Barbui, T. Differential effects of anti-beta2-glycoprotein I and antiprothrombin antibodies on the anticoagulant activity of activated protein C. *Blood* **91**, 1999-2004 (1998).
263. Pierangeli, S.S., *et al.* Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis and rheumatism* **52**, 2120-2124 (2005).
264. Lonze, B.E., Singer, A.L. & Montgomery, R.A. Eculizumab and renal transplantation in a patient with CAPS. *The New England journal of medicine* **362**, 1744-1745 (2010).
265. Hadaya, K., *et al.* Eculizumab in acute recurrence of thrombotic microangiopathy after renal transplantation. *Am J Transplant* **11**, 2523-2527 (2011).
266. Long, B.R. & Leya, F. The role of antiphospholipid syndrome in cardiovascular disease. *Hematology/oncology clinics of North America* **22**, 79-94, vi-vii (2008).
267. Alarcon-Segovia, D., Cardiel, M.H. & Reyes, E. Antiphospholipid arterial vasculopathy. *The Journal of rheumatology* **16**, 762-767 (1989).
268. Lie, J.T. Vasculopathy in the antiphospholipid syndrome: thrombosis or vasculitis, or both? *The Journal of rheumatology* **16**, 713-715 (1989).
269. Reyes, E. & Alarcon-Segovia, D. Leg ulcers in the primary antiphospholipid syndrome. Report of a case with a peculiar proliferative small vessel vasculopathy. *Clinical and experimental rheumatology* **9**, 63-66 (1991).
270. Champion, R.H. & Rook, A. Cutaneous arteriolitis. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* **53**, 568 (1960).
271. Deffer, T.A., Berger, T.G. & Gelinas-Sorell, D. Sneddon's syndrome. A case report. *Journal of the American Academy of Dermatology* **16**, 1084-1087 (1987).
272. Macucci, M., *et al.* Primary antiphospholipid syndrome: two case reports, one with histological examination of skin, peripheral nerve and muscle. *Acta neurologica* **16**, 87-96 (1994).

273. Hughson, M.D., McCarty, G.A. & Brumback, R.A. Spectrum of vascular pathology affecting patients with the antiphospholipid syndrome. *Human pathology* **26**, 716-724 (1995).
274. D'Agati, V., Kunis, C., Williams, G. & Appel, G.B. Anti-cardiolipin antibody and renal disease: a report three cases. *J Am Soc Nephrol* **1**, 777-784 (1990).
275. Kincaid-Smith, P., Fairley, K.F. & Kloss, M. Lupus anticoagulant associated with renal thrombotic microangiopathy and pregnancy-related renal failure. *The Quarterly journal of medicine* **68**, 795-815 (1988).
276. Nochy, D., *et al.* The intrarenal vascular lesions associated with primary antiphospholipid syndrome. *J Am Soc Nephrol* **10**, 507-518 (1999).
277. Daugas, E., *et al.* Antiphospholipid syndrome nephropathy in systemic lupus erythematosus. *J Am Soc Nephrol* **13**, 42-52 (2002).
278. Tektonidou, M.G., Sotsiou, F., Nakopoulou, L., Vlachoyiannopoulos, P.G. & Moutsopoulos, H.M. Antiphospholipid syndrome nephropathy in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibodies: prevalence, clinical associations, and long-term outcome. *Arthritis and rheumatism* **50**, 2569-2579 (2004).
279. Canaud, G., *et al.* Severe vascular lesions and poor functional outcome in kidney transplant recipients with lupus anticoagulant antibodies. *Am J Transplant* **10**, 2051-2060 (2010).
280. Frances, C., *et al.* Sneddon syndrome with or without antiphospholipid antibodies. A comparative study in 46 patients. *Medicine (Baltimore)* **78**, 209-219 (1999).
281. Westerman, E.M., Miles, J.M., Backonja, M. & Sundstrom, W.R. Neuropathologic findings in multi-infarct dementia associated with anticardiolipin antibody. Evidence for endothelial injury as the primary event. *Arthritis and rheumatism* **35**, 1038-1041 (1992).
282. Godel, M., *et al.* Role of mTOR in podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice. *The Journal of clinical investigation* **121**, 2197-2209 (2011).
283. Chen, J.K., Chen, J., Thomas, G., Kozma, S.C. & Harris, R.C. S6 kinase 1 knockout inhibits uninephrectomy- or diabetes-induced renal hypertrophy. *Am J Physiol Renal Physiol* **297**, F585-593 (2009).
284. Inoki, K., *et al.* mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. *The Journal of clinical investigation* **121**, 2181-2196 (2011).

285. Gourtsoyiannis, N., Prassopoulos, P., Cavouras, D. & Pantelidis, N. The thickness of the renal parenchyma decreases with age: a CT study of 360 patients. *AJR. American journal of roentgenology* **155**, 541-544 (1990).
286. Young, A. Ageing and physiological functions. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **352**, 1837-1843 (1997).
287. Wetzels, J.F., Kiemeney, L.A., Swinkels, D.W., Willems, H.L. & den Heijer, M. Age- and gender-specific reference values of estimated GFR in Caucasians: the Nijmegen Biomedical Study. *Kidney international* **72**, 632-637 (2007).
288. 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. *Scandinavian journal of urology and nephrology* **38**, 73-77 (2004).
289. Esposito, C., *et al.* Renal function and functional reserve in healthy elderly individuals. *J Nephrol* **20**, 617-625 (2007).
290. Baylis, C. & Corman, B. The aging kidney: insights from experimental studies. *J Am Soc Nephrol* **9**, 699-709 (1998).
291. Harrison, D.E., *et al.* Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* **460**, 392-395 (2009).
292. Um, S.H., *et al.* Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* **431**, 200-205 (2004).
293. Hartleben, B., *et al.* Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. *The Journal of clinical investigation* **120**, 1084-1096 (2010).
294. Izzedine, H., Brocheriou, I. & Frances, C. Post-transplantation proteinuria and sirolimus. *The New England journal of medicine* **353**, 2088-2089 (2005).
295. Letavernier, E., Pe'raldi, M.N., Pariente, A., Morelon, E. & Legendre, C. Proteinuria following a switch from calcineurin inhibitors to sirolimus. *Transplantation* **80**, 1198-1203 (2005).
296. Letavernier, E., *et al.* High sirolimus levels may induce focal segmental glomerulosclerosis de novo. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **2**, 326-333 (2007).
297. Aliabadi, A.Z., *et al.* Development of proteinuria after switch to sirolimus-based immunosuppression in long-term cardiac transplant patients. *Am J Transplant* **8**, 854-861 (2008).

298. Fervenza, F.C., *et al.* Acute rapamycin nephrotoxicity in native kidneys of patients with chronic glomerulopathies. *Nephrol Dial Transplant* **19**, 1288-1292 (2004).
299. Diekmann, F., *et al.* Mammalian target of rapamycin inhibition halts the progression of proteinuria in a rat model of reduced renal mass. *J Am Soc Nephrol* **18**, 2653-2660 (2007).
300. Vogelbacher, R., Wittmann, S., Braun, A., Daniel, C. & Hugo, C. The mTOR inhibitor everolimus induces proteinuria and renal deterioration in the remnant kidney model in the rat. *Transplantation* **84**, 1492-1499 (2007).
301. Torras, J., *et al.* Rapamycin has dual opposing effects on proteinuric experimental nephropathies: is it a matter of podocyte damage? *Nephrol Dial Transplant* **24**, 3632-3640 (2009).
302. Wu, M.J., *et al.* Rapamycin attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis. *Kidney international* **69**, 2029-2036 (2006).
303. Wilson, P.D. Polycystic kidney disease. *The New England journal of medicine* **350**, 151-164 (2004).
304. Shillingford, J.M., *et al.* The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 5466-5471 (2006).
305. Qian, F., Watnick, T.J., Onuchic, L.F. & Germino, G.G. The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell* **87**, 979-987 (1996).
306. Tao, Y., Kim, J., Schrier, R.W. & Edelstein, C.L. Rapamycin markedly slows disease progression in a rat model of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **16**, 46-51 (2005).
307. Serra, A.L., *et al.* Sirolimus and kidney growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *The New England journal of medicine* **363**, 820-829 (2010).
308. Walz, G., *et al.* Everolimus in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *The New England journal of medicine* **363**, 830-840 (2010).
309. Canaud, G., *et al.* Therapeutic mTOR inhibition in autosomal dominant polycystic kidney disease: What is the appropriate serum level? *Am J Transplant* **10**, 1701-1706 (2010).

310. Zhou, J., Brugarolas, J. & Parada, L.F. Loss of Tsc1, but not Pten, in renal tubular cells causes polycystic kidney disease by activating mTORC1. *Human molecular genetics* **18**, 4428-4441 (2009).
311. Crino, P.B., Nathanson, K.L. & Henske, E.P. The tuberous sclerosis complex. *The New England journal of medicine* **355**, 1345-1356 (2006).
312. Ehninger, D., *et al.* Reversal of learning deficits in a Tsc2^{+/-} mouse model of tuberous sclerosis. *Nature medicine* **14**, 843-848 (2008).
313. Krueger, D.A., *et al.* Everolimus for subependymal giant-cell astrocytomas in tuberous sclerosis. *The New England journal of medicine* **363**, 1801-1811 (2010).
314. Bissler, J.J., *et al.* Sirolimus for angiomyolipoma in tuberous sclerosis complex or lymphangioleiomyomatosis. *The New England journal of medicine* **358**, 140-151 (2008).
315. Baba, M., *et al.* Folliculin encoded by the BHD gene interacts with a binding protein, FNIP1, and AMPK, and is involved in AMPK and mTOR signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 15552-15557 (2006).
316. Baba, M., *et al.* Kidney-targeted Birt-Hogg-Dube gene inactivation in a mouse model: Erk1/2 and Akt-mTOR activation, cell hyperproliferation, and polycystic kidneys. *J Natl Cancer Inst* **100**, 140-154 (2008).
317. Thadhani, R., Pascual, M. & Bonventre, J.V. Acute renal failure. *The New England journal of medicine* **334**, 1448-1460 (1996).
318. Lieberthal, W., *et al.* Rapamycin impairs recovery from acute renal failure: role of cell-cycle arrest and apoptosis of tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**, F693-706 (2001).
319. Frew, I.J., *et al.* pVHL and PTEN tumour suppressor proteins cooperatively suppress kidney cyst formation. *Embo J* **27**, 1747-1757 (2008).
320. Huber, T.B., *et al.* Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling. *Molecular and cellular biology* **23**, 4917-4928 (2003).
321. Verma, R., *et al.* Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin. *The Journal of biological chemistry* **278**, 20716-20723 (2003).

322. Verma, R., *et al.* Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *The Journal of clinical investigation* **116**, 1346-1359 (2006).
323. Zhu, J., *et al.* Nephrin mediates actin reorganization via phosphoinositide 3-kinase in podocytes. *Kidney international* **73**, 556-566 (2008).
324. Xiao, H., *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) prevents puromycin aminonucleoside-induced apoptosis of glomerular podocytes by activating the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-signaling pathway. *Am J Nephrol* **30**, 34-43 (2009).
325. Tejada, T., *et al.* Failure to phosphorylate AKT in podocytes from mice with early diabetic nephropathy promotes cell death. *Kidney international* **73**, 1385-1393 (2008).
326. Zhang, S.Y., *et al.* c-mip impairs podocyte proximal signaling and induces heavy proteinuria. *Science signaling* **3**, ra39 (2010).
327. Jones, N., *et al.* Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature* **440**, 818-823 (2006).
328. Takano, Y., *et al.* Transcriptional suppression of nephrin in podocytes by macrophages: roles of inflammatory cytokines and involvement of the PI3K/Akt pathway. *FEBS Lett* **581**, 421-426 (2007).
329. Bu, L., *et al.* Enhanced angiotensin-converting enzyme 2 attenuates angiotensin II-induced collagen production via AT1 receptor-phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway. *Endocrine* **39**, 139-147 (2011).
330. Perlman, A., *et al.* Angiotensin II regulation of TGF-beta in murine mesangial cells involves both PI3 kinase and MAP kinase. *Annals of clinical and laboratory science* **34**, 277-286 (2004).
331. Huang, S., Zhang, A., Ding, G. & Chen, R. Aldosterone-induced mesangial cell proliferation is mediated by EGF receptor transactivation. *Am J Physiol Renal Physiol* **296**, F1323-1333 (2009).
332. Mahimainathan, L., Das, F., Venkatesan, B. & Choudhury, G.G. Mesangial cell hypertrophy by high glucose is mediated by downregulation of the tumor suppressor PTEN. *Diabetes* **55**, 2115-2125 (2006).
333. Wu, D., *et al.* PKC-beta1 mediates glucose-induced Akt activation and TGF-beta1 upregulation in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* **20**, 554-566 (2009).
334. Dey, N., *et al.* PRAS40 acts as a nodal regulator of high glucose-induced TORC1 activation in glomerular mesangial cell hypertrophy. *J Cell Physiol* **225**, 27-41 (2010).

335. Kato, M., *et al.* TGF-beta activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN. *Nature cell biology* **11**, 881-889 (2009).
336. Gao, L., *et al.* Sublytic complement C5b-9 complexes induce thrombospondin-1 production in rat glomerular mesangial cells via PI3-k/Akt: association with activation of latent transforming growth factor-beta1. *Clin Exp Immunol* **144**, 326-334 (2006).
337. Krepinsky, J.C., *et al.* Akt mediates mechanical strain-induced collagen production by mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* **16**, 1661-1672 (2005).
338. Petermann, A.T., *et al.* Mechanical stress reduces podocyte proliferation in vitro. *Kidney international* **61**, 40-50 (2002).
339. Shimamura, H., *et al.* The PI3-kinase-Akt pathway promotes mesangial cell survival and inhibits apoptosis in vitro via NF-kappa B and Bad. *J Am Soc Nephrol* **14**, 1427-1434 (2003).
340. Hubchak, S.C., Sparks, E.E., Hayashida, T. & Schnaper, H.W. Rac1 promotes TGF-beta-stimulated mesangial cell type I collagen expression through a PI3K/Akt-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* **297**, F1316-1323 (2009).
341. Arai, H., Nagai, K. & Doi, T. Role of growth arrest-specific gene 6 in diabetic nephropathy. *Vitamins and hormones* **78**, 375-392 (2008).
342. Kato, M., *et al.* Role of the Akt/FoxO3a pathway in TGF-beta1-mediated mesangial cell dysfunction: a novel mechanism related to diabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **17**, 3325-3335 (2006).
343. Stylianou, K., *et al.* The PI3K/Akt/mTOR pathway is activated in murine lupus nephritis and downregulated by rapamycin. *Nephrol Dial Transplant* **26**, 498-508 (2011).
344. Feliers, D., Duraisamy, S., Barnes, J.L., Ghosh-Choudhury, G. & Kasinath, B.S. Translational regulation of vascular endothelial growth factor expression in renal epithelial cells by angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol* **288**, F521-529 (2005).
345. Sautin, Y.Y., Lu, M., Gaugler, A., Zhang, L. & Gluck, S.L. Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated effects of glucose on vacuolar H⁺-ATPase assembly, translocation, and acidification of intracellular compartments in renal epithelial cells. *Molecular and cellular biology* **25**, 575-589 (2005).
346. Chuang, T.D., *et al.* Phosphoinositide 3-kinase is required for high glucose-induced hypertrophy and p21WAF1 expression in LLC-PK1 cells. *Kidney international* **71**, 867-874 (2007).

347. Mariappan, M.M., Shetty, M., Sataranatarajan, K., Choudhury, G.G. & Kasinath, B.S. Glycogen synthase kinase 3 β is a novel regulator of high glucose- and high insulin-induced extracellular matrix protein synthesis in renal proximal tubular epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* **283**, 30566-30575 (2008).
348. Feliers, D., Gorin, Y., Ghosh-Choudhury, G., Abboud, H.E. & Kasinath, B.S. Angiotensin II stimulation of VEGF mRNA translation requires production of reactive oxygen species. *Am J Physiol Renal Physiol* **290**, F927-936 (2006).
349. Deng, B., *et al.* Focal adhesion kinase mediates TGF- β 1-induced renal tubular epithelial-to-mesenchymal transition in vitro. *Mol Cell Biochem* **340**, 21-29 (2010).
350. Zeng, R., *et al.* Biliverdin reductase mediates hypoxia-induced EMT via PI3-kinase and Akt. *J Am Soc Nephrol* **19**, 380-387 (2008).
351. Nishino, T., Pusey, C.D. & Domin, J. Elevated Akt phosphorylation as an indicator of renal tubular epithelial cell stress. *The Journal of biological chemistry* **277**, 33943-33949 (2002).
352. Choi, I.J., Kim, S.Y., Kwon, C.H. & Kim, Y.K. Rosiglitazone inhibits proliferation of renal proximal tubular cells via down-regulation of ERK and Akt. *Renal failure* **32**, 103-111 (2010).
353. Zhuang, S. & Schnellmann, R.G. H₂O₂-induced transactivation of EGF receptor requires Src and mediates ERK1/2, but not Akt, activation in renal cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**, F858-865 (2004).
354. Wahl, P.R., *et al.* Mitotic activation of Akt signalling pathway in Han:SPRD rats with polycystic kidney disease. *Nephrology (Carlton)* **12**, 357-363 (2007).
355. Fischer, D.C., *et al.* Activation of the AKT/mTOR pathway in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Nephrol Dial Transplant* **24**, 1819-1827 (2009).
356. Belibi, F., Ravichandran, K., Zafar, I., He, Z. & Edelstein, C.L. mTORC1/2 and rapamycin in female Han:SPRD rats with polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* **300**, F236-244 (2011).
357. Friedrich, C., Endlich, N., Kriz, W. & Endlich, K. Podocytes are sensitive to fluid shear stress in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol* **291**, F856-865 (2006).
358. 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).

359. 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).
360. Morton, M.J., *et al.* Human podocytes possess a stretch-sensitive, Ca²⁺-activated K⁺ channel: potential implications for the control of glomerular filtration. *J Am Soc Nephrol* **15**, 2981-2987 (2004).
361. Kim, E.Y., Choi, K.J. & Dryer, S.E. Nephrin binds to the COOH terminus of a large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel isoform and regulates its expression on the cell surface. *Am J Physiol Renal Physiol* **295**, F235-246 (2008).
362. Welsh, G.I., *et al.* Insulin signaling to the glomerular podocyte is critical for normal kidney function. *Cell metabolism* **12**, 329-340 (2010).
363. Chauveau, P., Rigalleau, V. & Aparicio, M. [Insulin resistance and chronic kidney disease]. *Nephrologie & thérapeutique* **4**, 568-574 (2008).
364. Coward, R.J., *et al.* Nephrin is critical for the action of insulin on human glomerular podocytes. *Diabetes* **56**, 1127-1135 (2007).
365. Kim, E.Y., Anderson, M. & Dryer, S.E. Insulin increases surface expression of TRPC6 channels in podocytes: role of NADPH oxidases and reactive oxygen species. *Am J Physiol Renal Physiol* **302**, F298-307 (2012).
366. Endlich, N., *et al.* Podocytes respond to mechanical stress in vitro. *J Am Soc Nephrol* **12**, 413-422 (2001).
367. Wei, C., *et al.* Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nature medicine* **14**, 55-63 (2008).
368. Reiser, J., *et al.* Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *The Journal of clinical investigation* **113**, 1390-1397 (2004).
369. Shibata, S., *et al.* Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: implication in proteinuric kidney disease. *Nature medicine* **14**, 1370-1376 (2008).
370. Klip, A. The many ways to regulate glucose transporter 4. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquée, nutrition et métabolisme* **34**, 481-487 (2009).
371. Simons, M., Saffrich, R., Reiser, J. & Mundel, P. Directed membrane transport is involved in process formation in cultured podocytes. *J Am Soc Nephrol* **10**, 1633-1639 (1999).

372. Coward, R.J., *et al.* The human glomerular podocyte is a novel target for insulin action. *Diabetes* **54**, 3095-3102 (2005).
373. Wang, Y., *et al.* Nephron-deficient Fvb mice develop rapidly progressive renal failure and heavy albuminuria involving excess glomerular GLUT1 and VEGF. *Lab Invest* **90**, 83-97 (2010).
374. Zhang, H., *et al.* Podocyte-specific overexpression of GLUT1 surprisingly reduces mesangial matrix expansion in diabetic nephropathy in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* **299**, F91-98 (2010).
375. Guertin, D.A., *et al.* mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice. *Cancer Cell* **15**, 148-159 (2009).
376. Ivey, M.E., Osman, N. & Little, P.J. Endothelin-1 signalling in vascular smooth muscle: pathways controlling cellular functions associated with atherosclerosis. *Atherosclerosis* **199**, 237-247 (2008).
377. Aziz, T., *et al.* Transforming growth factor beta in relation to cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* **119**, 700-708 (2000).
378. Bayliss, J., *et al.* Late onset antibody-mediated rejection and endothelial localization of vascular endothelial growth factor are associated with development of cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation* **86**, 991-997 (2008).
379. de Groot, P.G., *et al.* Beta2-glycoprotein I and LDL-receptor family members. *Thrombosis research* **114**, 455-459 (2004).
380. Ramesh, S., *et al.* Antiphospholipid antibodies promote leukocyte-endothelial cell adhesion and thrombosis in mice by antagonizing eNOS via beta2GPI and apoER2. *The Journal of clinical investigation* **121**, 120-131 (2011).
381. Monteiro, M.R., Shapiro, S.S., Takafuta, T., Menezes, D.W. & Murphy, G.F. Von Willebrand factor receptor GPIb alpha is expressed by human factor XIIIa-positive dermal dendrocytes and is upregulated by mast cell degranulation. *The Journal of investigative dermatology* **113**, 272-276 (1999).
382. Asherson, R.A., Doherty, D.G., Vergani, D., Khamashta, M.A. & Hughes, G.R. Major histocompatibility complex associations with primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis and rheumatism* **35**, 124-125 (1992).

383. Arnett, F.C., Olsen, M.L., Anderson, K.L. & Reveille, J.D. Molecular analysis of major histocompatibility complex alleles associated with the lupus anticoagulant. *The Journal of clinical investigation* **87**, 1490-1495 (1991).
384. Gouldesbrough, D.R. & Axelsen, R.A. Arterial endothelialitis in chronic renal allograft rejection: a histopathological and immunocytochemical study. *Nephrol Dial Transplant* **9**, 35-40 (1994).
385. Valenzuela, N.M. & Reed, E.F. The link between major histocompatibility complex antibodies and cell proliferation. *Transplant Rev (Orlando)* **25**, 154-166 (2011).
386. Zhang, X. & Reed, E.F. Effect of antibodies on endothelium. *Am J Transplant* **9**, 2459-2465 (2009).
387. Avery, R.K. Cardiac-allograft vasculopathy. *The New England journal of medicine* **349**, 829-830 (2003).
388. Watnick, T. & Germino, G.G. mTOR inhibitors in polycystic kidney disease. *The New England journal of medicine* **363**, 879-881 (2010).

Progressions des maladies rénales chroniques : rôle de la voie AKT/mTORC

Résumé

La maladie rénale chronique (MRC) par ses conséquences organiques et psychologiques représente un enjeu majeur de santé publique. Sa physiopathologie reste mal connue, mais il est établi que toute atteinte rénale, quelle qu'en soit la cause, aboutit à une réduction du nombre de néphrons fonctionnels. Cette réduction néphronique est responsable de processus adaptatifs complexes des néphrons sains restants pour maintenir une fonction rénale satisfaisante. Si la perte néphronique est suffisamment importante, le parenchyme rénal va s'altérer progressivement aboutissant au remplacement des néphrons sains par un tissu fibreux puis au déclin de la fonction rénale. Les mécanismes moléculaires impliqués, tant dans l'adaptation à la réduction néphronique, que dans la dégradation progressive du parenchyme rénal sont mal connus et les possibilités d'interventions thérapeutiques limitées.

La voie AKT/mTOR est une voie de signalisation intracellulaire ubiquitaire, très conservée, jouant un rôle central dans l'homéostasie cellulaire par sa fonction de régulation de la croissance, de l'apoptose et du cycle cellulaire. L'extraordinaire complexité de son mode de recrutement témoigne du rôle de carrefour de cette voie. Elle intègre des signaux multiples et très variés (facteurs de croissance, acides-aminés, niveau énergétique cellulaire, disponibilité de l'oxygène) modulant l'anabolisme cellulaire. Notre compréhension du rôle de cette voie dans la progression de la MRC est encore très limitée et les données sont peu nombreuses et controversées.

Mon travail de thèse a consisté à évaluer, en utilisant un modèle expérimental de réduction néphronique chez la souris, le rôle de la voie AKT/mTORC au cours de la progression des MRC.

Nos résultats démontrent que AKT, et plus précisément AKT2, est une molécule essentielle à l'adaptation podocytaire aux contraintes imposées par la réduction néphronique. En appliquant plusieurs modèles de réduction néphronique à des souris génétiquement modifiées, nous avons pu établir la fonction cruciale de cette isoforme. En effet, l'inactivation d'*Akt2*, soit systémique soit conditionnelle dans le podocyte, est responsable d'une hyporéactivité de la voie AKT podocytaire, d'un remodelage du cytosquelette, d'une augmentation de l'apoptose glomérulaire avec raréfaction podocytaire et de lésions de glomérulosclérose. Transposant nos données à la pathologie humaine, nous avons mis en évidence une activation podocytaire d'AKT2 après transplantation rénale chez les patients présentant une altération importante de la fonction rénale. De façon marquante, la survenue d'une protéinurie en réponse à un traitement par sirolimus s'associait à une perte de cette activation et à une augmentation de l'apoptose glomérulaire.

Parallèlement, nous avons évalué le rôle de cette voie chez l'homme au cours d'une MRC très particulière secondaire à la présence d'anticorps antiphospholipides. Cette néphropathie est caractérisée par la présence de lésions vasculaires sévères prolifératives, hypertrophiques et progressivement obstructives aboutissant à la destruction du parenchyme rénal. Jusqu'à maintenant, aucun lien formel n'avait été établi entre la présence de ces anticorps et le développement des lésions vasculaires, et aucune thérapeutique n'était disponible. Nos résultats indiquent que ces anticorps sont directement pathogènes pour l'endothélium induisant l'activation de la voie AKT/mTORC. L'activation de cette voie stimule la prolifération des cellules endothéliales mais aussi des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire. Point crucial de ce travail, nous avons observé que l'inhibition de cette voie chez l'homme par le sirolimus permettait de prévenir le développement de cette néphropathie chronique et représentait une thérapeutique extrêmement prometteuse dans cette indication.

En conclusion, mon travail illustre la complexité de cette voie pouvant avoir des effets bénéfiques mais aussi délétères au cours de la MRC. En effet, nous avons démontré que cette voie de signalisation jouait un rôle crucial au sein du podocyte au cours de la réduction néphronique lui permettant de s'adapter à la surcharge de travail et dont l'inhibition est particulièrement néfaste. Mais, nous avons également démontré que cette voie était directement impliquée dans la physiopathologie de la néphropathie liée à la présence d'anticorps antiphospholipides et que son inhibition jouait au contraire un rôle protecteur.

Mots clés : Maladie rénale chronique, AKT, mTOR, podocytes, cellules endothéliales, anticorps antiphospholipides.