



Etude des dysfonctions lymphocitaires T dans le syndrome néphrotique idiopathique

Pauline Vachin

► To cite this version:

Pauline Vachin. Etude des dysfonctions lymphocitaires T dans le syndrome néphrotique idiopathique. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2018. Français. NNT : 2018PESC0044 . tel-01945257

HAL Id: tel-01945257

<https://theses.hal.science/tel-01945257>

Submitted on 5 Dec 2018

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.

UNIVERSITE PARIS EST

Ecole doctorale : Science de la Vie et de la Santé

Thèse présentée le 19 Janvier 2018 par :

Pauline Vachin

**pour l'obtention du titre de Docteur en Sciences de la vie
et de la Santé de l'Université Paris Est**

Spécialité : Immunologie

Etude des dysfonctions lymphocytaires T dans le syndrome néphrotique idiopathique

Thèse dirigée par André PAWLAK

Unité Inserm U955 Equipe 21

Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Créteil

Membres du Jury :

Hans Kristian Lorenzo

Rapporteur

Ignacio Garcia-Verdugo

Rapporteur

Sabine le Gouvelho

Examineur

Nabila Seddiki

Examineur

Aleksander Edelman

Président du jury

André Pawlak

Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury :

Monsieur le Docteur Hans Kristian Lorenzo et Monsieur le Docteur Ignacio Garcia-Verdugo d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je vous remercie pour le temps que vous avez consacré pour juger ce travail. Merci de l'intérêt que vous avez porté à cette thèse.

Madame le Professeur Sabine Le Gouvelho, Madame le Docteur Nabila Seddiki et Monsieur le Professeur Aleksander Eldman d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineur.

Monsieur le Professeur Dil Sahali et Monsieur le Docteur André Pawlak de m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude pour votre gentillesse, tous vos conseils ainsi que pour votre soutien tout au long de ces années.

Merci à la team de choc, passée et actuelle : Mélanie, Violaine, Shao Yu, Julie, Anissa, Carole, Mario, Kelhia, Cérina, Franck, Sato, Nezha.

Merci à tous les membres de l'IMRB, ceux avec lesquels j'ai collaboré ou juste échangé des idées ou fous rires, Céline, Adrien, Mom's, Allan, Anthula, Fatima, Fouad, Imene, Marie-Noëlle, Jérémy, tous les personnels de plateforme mais plus particulièrement Marjory et Damien, Xavier, Adeline et Aurélie, Natacha.

Merci à tous mes proches de m'avoir soutenu dans les moments euphoriques comme dans les moments de doute.

Enfin, je dédicace ce mémoire à ma mère dont la disparition a assombri cette dernière année. Elle a toujours été à mes côtés pour m'aider à accomplir mes projets.

Résumé

La pathogénie du syndrome néphrotique idiopathique (SNI) est inconnue, mais de nombreux arguments cliniques et expérimentaux favorisent l'hypothèse d'une pathogénie dys-immunitaire à expression immunologique et rénale, au cours de laquelle on observerait une altération des lymphocytes T. Cependant, le mécanisme exact reste encore mal connu. Récemment, le Rituximab, un anticorps dirigé contre l'antigène CD20, a montré une efficacité à induire une rémission à moyen et long terme suggérant l'implication d'une dysfonction des lymphocytes B et/ou un défaut de coopération T-B. Notre laboratoire a isolé un nouveau gène C-MIP dont l'expression est induite dans certaines sous-populations lymphocytaires T et B, ainsi que dans les podocytes de patients atteints de SNI en phase de poussée mais quasiment indétectable chez les sujets sains.

Dans ces travaux, ancillaires au PHRC NEPHRUTIX, nous avons étudié les perturbations lymphocytaires T, avant, au moment de la rechute et en période de rémission au cours de syndrome néphrotique à lésions glomérulaires minimes et l'effet du traitement par le Rituximab. Dans cette étude, nous avons mis en évidence que la rechute était associée à un effondrement des lymphocytes T régulateurs, une baisse profonde de l'interleukine-2 ainsi qu'à une surexpression significative de C-mip, précédant la survenue de la rechute. Ces modifications se restaurent en rémission. Enfin, la rémission obtenue dans le bras Rituximab, entraîne une diminution des lymphocytes T folliculaires (Tfh), des iNKT (T Natural Killer invariant) et des cellules double-négatives DN-TCR V α 24, suggérant que le SNLGM (Syndrome Néphrotique à Lésions Glomérulaires Minimes) implique un défaut des réponses immunitaires innées et adaptatives, qui peut être stabilisé par un traitement par Rituximab.

Afin d'étudier le rôle de C-mip, nous avons généré des souris transgéniques sur-exprimant ce gène dans les lymphocytes T matures périphériques. Cette surexpression est à l'origine d'un phénotype lymphocytaire altéré marqué par une accumulation de lymphocytes T naïfs, un effondrement des cytokines activatrices de type Th1 et Th2 et une accumulation des formes inactives des Src kinases. Ces résultats suggèrent que C-mip, en inhibant les Src kinases, est un régulateur négatif de l'activation T impliqué dans la signalisation proximale et pourrait être impliqué dans l'hypo-réactivité lymphocytaire T observée chez les patients atteints de SNLGM actif.

Mots clés : C-mip, syndrome néphrotique à lésions glomérulaires minimes, Rituximab, signalisation proximale, lymphocyte T.

Abstract

The pathogenesis of minimal-change nephrotic syndrom (MCNS) is unknown, but, supported by many clinical and experimental arguments, it was suggested that MCNS is a dys-immune disorder with immunological and renal expression, during which T-cell alteration would be observed. However, the exact mechanism remains unknown. Recently, Rituximab, a B-cell depleting agent, is effective in inducing mid- and long-term remission suggesting involvement of B-cell dysfunction and/or lack of T-B cooperation. Our laboratory identified a new gene: C-MIP. We have shown that C-mip abundance is increased in some T and B lymphocyte subpopulations, as well as in podocytes of MCNS patients during relapse phase but undetectable in healthy subjects.

In this work, ancillary to the NEPHRUTIX PHRC, we studied T-cell disturbances before and during the relapse or during the remission time in MCNS and the effect of Rituximab therapy. In this study, we found that relapses were associated with significant decrease in regulatory T cell and interleukin-2 expression, while C-mip abundance was significantly increased. These changes are restored during remission time. Finally, remission after Rituximab therapy leads to a decrease in follicular T cells (Tfh), iNKT and double-negative ($CD4^- CD8^-$) T cells expressing the invariant $V\alpha 24$ chain, suggesting that MCNS involves a disorder of innate and adaptive immune response, which can be stabilized by Rituximab treatment.

In order to study the C-mip role, we generated transgenic mice overexpressing this gene in the peripheral mature T-cells. This overexpression leads to an altered lymphocyte phenotype with an accumulation of naive T lymphocytes, a significant decrease of Th1 and Th2 activating cytokines and accumulation of inactive Src kinases. These results suggest that, by inhibiting Src kinases, C-mip is a negative regulator of activation T involved in proximal signalling and may be responsible of the lymphocyte T hypo-reactivity observed in patients with active MCNS.

Keywords: C-mip, Minimal Change Nephrotic Syndrom, Rituximab, proximal signalling, T lymphocyte.

Abréviations

Ac : Anticorps

ACAMP : Apoptotic Cells Associated Molecular Pattern

Ag : Antigène

AID : Activation

BAFF : B Cell Activator Factor of the TNF family

Bcl-6 : B-cell Lymphoma 6

BCR : B Cell Receptor

CD : Cluster de Différenciation

CG : Centre germinatif

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CSR : Class Switch Recombination

DC : Cellule Dendritique

DN : Double-négative (CD4- CD8-)

FDC : Cellule Dendritique Folliculaire

Foxp3 : Forkhead box P3

Hprt : Hypoxanthine phospho-ribosyl-transférase

HSF : Hyalinose segmentaire et focale

HSFP : Hyalinose segmentaire et focale primitive

ICOS : Inducible T cell COStimulator

Ig : Immunoglobuline

IL : interleukine

iNKT : T Natural Killer invariant

IPEX : Immune-dysregulation Polyendocrinopathy- Enteropathy-X-linked-Syndrom

iTreg : Lymphocytes T régulateurs induits

kDa : Kilodalton

LAT : Linker pour l'activation des cellules T

LB : Lymphocyte B

LGM : Lésions Glomérulaires Minimales

LPS : Lipopolysaccharide

LRR : Leucine Rich Repeats

LT : Lymphocyte T

MBG : Membrane basale glomérulaire

NK : Natural Killer

NKT : T Natural Killer

nTreg : Lymphocytes T régulateurs naturels

PALS : gaine lymphatique périartérielle

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

PH : domaine plekstrine

PHRC : Programme Hospitalier de Recherche Clinique

PNN : Polynucléaires neutrophiles

PRR : Pattern Recognition Receptor

RLR : Retinoic acid-inducible gene I-like receptor

RT-qPCR : Reverse Transcription-quantitative Polymerisation Chaine Reaction

SHM : Somatic Hypermutation

SNI : Syndrome Néphrotique Idiopathique

SNLGM : Syndrome Néphrotique à Lésions Glomérulaires Minimales

T_{CM} : Lymphocyte T de mémoire centrale

TCR : T Cell Receptor

TD_T : Lymphocyte T de différenciation terminale

T_{EM} : lymphocyte T de mémoire effectrice

T_{fh} : T Follicular Helper

T_h : T helper

TLR : Toll-like receptor

Treg : Lymphocytes T régulateurs

ZM : Zone Marginale

αGalCer : α-galactosylcéramide

βGlcCer : β-glucopyranosylcéramide

Liste des figures

Fig. 1. Développement des lymphocytes B	12
Fig. 2. Différenciation des LB.	14
Fig. 3. Maturation des LB en présence de Tfh.....	15
Fig. 4. Principales étapes du développement thymique des lymphocytes T conventionnels ..	16
Fig. 5 : Polarisation des lymphocytes T auxiliaires : un précurseur, plusieurs destinées	17
Fig. 6: Modèle de la différenciation des lymphocytes effecteurs et mémoires	20
Fig. 7 : Représentation schématique des signaux nécessaires à l'activation T	22
Fig. 8: Représentation schématique de la signalisation proximale	23
Fig. 9 : intersections entre l'immunité innée et adaptative	24
Fig. 10 : Rôle des cellules dendritiques à l'interface entre immunité innée et adaptative.....	26
Fig. 11 : Classification des syndromes néphrotiques idiopathiques	29
Fig. 12: Hypothèses pathogéniques concernant le lien potentiel entre l'atteinte du système immunitaire et l'atteinte podocytaire au cours du syndrome néphrotique idiopathique cortico-sensible à rechute.....	30
Fig. 13: Organisation structurale et fonctionnelle de C-MIP.....	32
Fig. 14 : Rôles de C-MIP dans la pathogénie du SNI.....	102

Table des matières

Introduction.....	10
I-Immunité adaptative.....	11
I-A Les cellules de l'immunité adaptative.....	11
I-A.1 Les lymphocytes B.....	11
I-A.2- Les lymphocytes T : sous-populations et fonctions	15
1-B: Activation lymphocytaire T.....	22
II-Immunité innée	24
III-Contrôle de l'immunité adaptative par l'immunité innée.....	26
IV-Le podocyte : une cellule immunitaire ?	27
IV-A Généralités.....	27
IV-B Podocytes et système immunitaire	27
V-Syndrome néphrotique idiopathique.....	28
V-A Généralités	28
V-B. Bases immunopathologiques du SNI corticosensible	29
VI- Connaissances actuelles sur le gène C-MIP	31
VI-A. Rôle de C-MIP dans le podocyte.....	32
VI-B : Rôle de C-MIP dans les lymphocytes T	33
VII- Objectifs des travaux de la thèse	33
Résultats.....	35
NEPHRUTIX: A randomized, double-blind, placebo vs Rituximab- controlled trial assessing T-cell subset changes in Minimal Change Nephrotic Syndrome	36
CMIP inhibits lipid rafts signaling and inactivates cofilin-1 in T- lymphocytes	50
Discussion.....	95
Bibliographie.....	103

Introduction

Mon projet de thèse porte essentiellement sur les perturbations immunologiques du syndrome néphrotique à lésions glomérulaires minimes (SNLGM) qui ont pu être mises en évidence dans ce travail lequel s'appuie sur deux études de recherches translationnelles. La première est une étude ancillaire d'un PHRC intitulé "NEPHRUTIX" qui visait à étudier les perturbations lymphocytaires chez des patients atteints de SNLGM caractérisé par de fréquentes rechutes requérant de multiples thérapies de deuxième ligne associées aux corticoïdes. La deuxième étude était consacrée à préciser le rôle de C-mip dans le compartiment lymphocytaire par une approche transgénique chez la souris. La génération de ce modèle était justifiée par l'absence de connaissances du rôle *in vivo* de ce nouveau gène, initialement identifié dans une sous-population lymphocytaire T de patients atteints de SNLGM, et dont on a pu montrer son implication dans différents systèmes biologiques (1). Pour mieux appréhender les résultats rapportés dans ce travail, il m'a semblé utile de faire un bref rappel de l'immunité adaptative et innée et des liens les unissant à l'origine d'une réponse immunitaire appropriée. Ce bref rappel permettra de mieux comprendre les profondes perturbations immunologiques observées *ex vivo* chez les patients atteints de SNLGM et de nous éclairer sur la relevance en pathologie humaine du modèle murin sur-exprimant C-mip dans le Lymphocyte T. Les données obtenues ouvrent des pistes de recherches intéressantes susceptibles d'améliorer nos connaissances dans la physiopathologie de cette maladie.

I-Immunité adaptative

L'immunité adaptative se caractérise par la spécificité de la réponse à une sollicitation antigénique grâce à des récepteurs clonaux et par l'établissement d'une mémoire immunitaire (2). Les principaux acteurs de l'immunité adaptative sont les lymphocytes B et T qui expriment des récepteurs spécifiques d'un seul déterminant antigénique donné : le récepteur des cellules B (BCR) et le récepteur des cellules T (TCR) respectivement.

I-A Les cellules de l'immunité adaptative

I-A.1 Les lymphocytes B

La caractéristique principale du lymphocyte B (LB) est la présence, à sa surface, d'un récepteur membranaire (BCR) de structure type immunoglobuline, capable de reconnaître un antigène différent pour chaque LB. Le LB se différencie dans la moelle osseuse à partir d'un progéniteur lymphoïde commun (3) et mature en plusieurs étapes (Figure 1): **(i)** cellule pro-B exprimant le premier marqueur de différenciation B (CD19) ; **(ii)** cellule pré-B avec l'acquisition de plusieurs

clusters de différenciation (CD20, CD21, CD24); (iii) cellule B immature ($CD19^+CD20^+CD21^+CD22^+CD24^+$) qui exprime un BCR fonctionnel (immunoglobuline de type IgM). Le LB immature va alors subir sa première étape de sélection négative, au sein de la moelle osseuse.

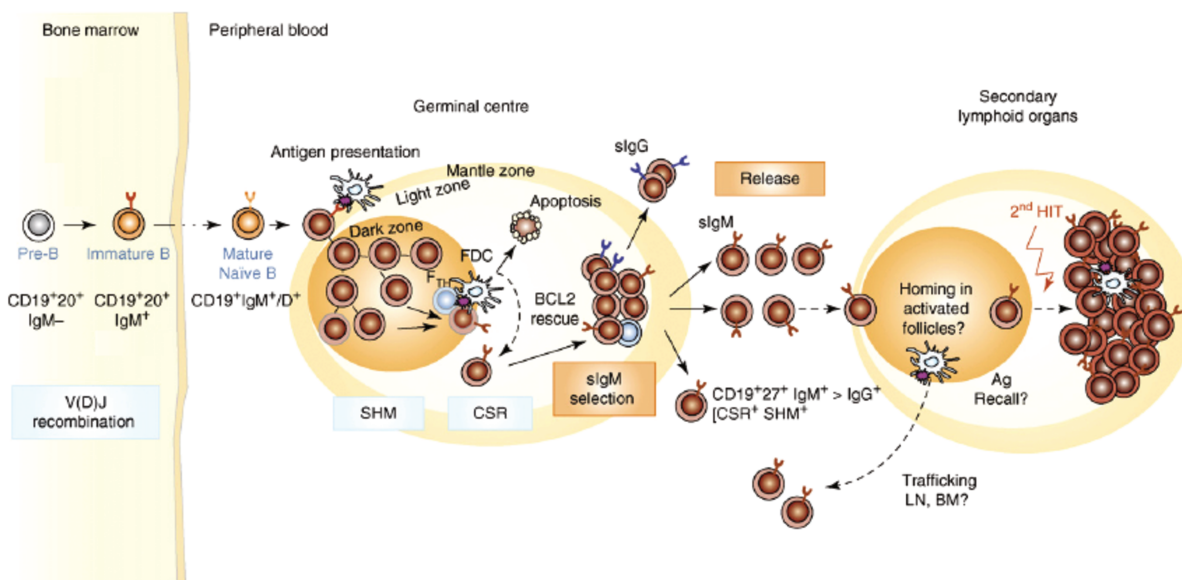


Fig. 1. Développement des lymphocytes B (4)

Les lymphocytes immatures ayant survécu à cette sélection négative centrale au regard de la reconnaissance du soi, quittent ensuite la moelle sous forme de LB transitionnels qui sont caractérisées par un phénotype particulier $CD38^{++}CD24^{++}IgM^+IgD^+$. Ces lymphocytes transitionnels vont subir une nouvelle étape de maturation et de sélection pour passer d'un stade T1 ($CD21^{low}$, $CD23^{low}$, $CD24^{high}$, IgM^{high} , IgD^{low}) à un stade T2 ($CD21^{high}$, $CD23^{high}$, $CD24^{high}$, IgM^{high} , IgD^{high}) en fonction de l'affinité de leur BCR pour les antigènes du soi. L'un des facteurs majeurs contrôlant l'évolution vers le stade T2 est BAFF (B Cell Activator Factor of the TNF Family). Il permet notamment la survie et la poursuite de la différenciation vers le stade T2 (5,6). Les LB ayant survécu à cette nouvelle sélection (et donc peu aptes à réagir avec les antigènes du soi) sont alors des LB matures naïfs, dont l'avenir à court terme est corrélé avec la rencontre d'un antigène exogène.

On distingue alors deux populations lymphocytaires B :

(a) les Lymphocytes de la **zone marginale (ZM)** qui peuvent reconnaître un antigène exogène, directement ou exprimé par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), et ensuite proliférer et se différencier rapidement en plasmocytes sécréteurs d'anticorps de basse affinité (principalement d'isotype IgM). Grâce à cet état « pré-activé », ils constituent la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes tels que les bactéries encapsulées provenant du sang (7), avant même que la réponse adaptative soit assurée par les LB folliculaires (8).

Bien que les LB de la ZM soient considérés comme des cellules sentinelles immobiles, ils interagissent avec d'autres populations cellulaires telles que les cellules dendritiques folliculaires (FDC), les lymphocytes T et les cellules T Natural Killer (NKT) et ont la capacité de migrer vers les follicules et se différencier en plasmocytes ou d'engager une réponse immune T-dépendante via différents récepteurs de surface. Les LB de la ZM peuvent se comporter comme des CPA en présentant de façon directe des antigènes protéiques aux lymphocytes T via l'action coordonnée de leur complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II et des molécules de co-stimulation de la famille B7 : CD80 et CD86 (9). Enfin la molécule CD1d (CMH de classe I non polymorphique), fortement exprimée à la surface des lymphocytes B de la ZM, interagit avec les antigènes lipidiques pour les présenter aux cellules NKT (10). Cette interaction est consolidée par le complexe CD40-CD40l et stimule la production d'anticorps (11).

(b) Les lymphocytes B de la zone folliculaire. En fonction de la qualité des signaux du BCR, la cellule B transitionnelle peut se différencier en **LB folliculaire**. Ces LB matures et naïfs sont localisés dans les follicules primaires des organes lymphoïdes secondaires grâce à l'action de la chémokine CXCL13 sécrétée par l'environnement stromal folliculaire. Les LB folliculaires vont alors migrer au travers du réseau réticulaire des follicules pour faciliter la rencontre avec son antigène (Ag). Si l'activation du BCR n'a pas lieu, les LB quittent le follicule et retrouvent la circulation sanguine. En revanche, si l'activation du BCR a lieu, les LB folliculaires vont alors augmenter l'expression du récepteur CCR7 ce qui permettra leur migration vers la zone T, et ainsi se localiser dans la zone T-B (12). Cette nouvelle distribution va permettre l'interaction des LB avec des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ (Th) exprimant le récepteur CXCR5, aussi nommés lymphocyte Th pré-folliculaire (pré-Tfh) (cf partie 1A2b). Cette interaction va conditionner différents destins pour le LB folliculaires (Figure 2): (i) elle induit la différenciation des LB en **plasmocytes extra-folliculaires de courte durée de vie**, sécréteurs d'IgM principalement (13); (ii) elle entraîne la migration des LB vers les follicules secondaires grâce à l'expression de Bcl6 (*B-cell lymphoma 6*) et ainsi former le **centre germinatif** (CG). Dans la zone sombre du CG localisée près de la zone T, ces cellules vont alors exprimer le CXCR4, inhiber l'expression du BCR et proliférer en tant que **centroblastes**. Ces derniers vont exprimer l'enzyme déaminase AID (*Activation-induced cytidine deaminase*) et initier le programme de maturation de l'affinité via le processus d'hypermutation **somatique** (*Somatic hypermutation*, SHM) des domaines variables des chaînes L et H des immunoglobulines (Ig).

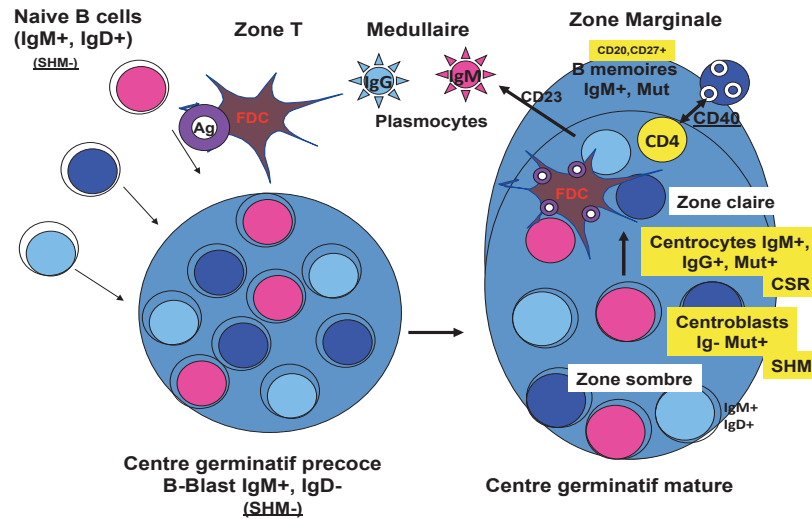


Fig. 2. Différenciation des LB.

Le plus souvent, le processus de mutations hypersomatiques (SHM) conduit à une diminution de l'affinité du BCR pour les auto-Ag. Ce phénomène constitue une nouvelle étape dans le contrôle de l'auto-réactivité. Après la réexpression membranaire du BCR « modifié », la mobilisation des centroblastes vers les zones claires des CG et leur activation par les FDC va induire l'arrêt du cycle cellulaire et la transition vers le stade de **centrocyte**. Ces derniers peuvent alors interagir et activer les lymphocytes Th folliculaires (T_{FH}) (Figure 3). En fonction de la « nouvelle » affinité de leur BCR, les T_{FH} peuvent induire l'apoptose des centrocytes par l'expression de la molécule Fas (BCR forte affinité, sélection négative) ou induire la survie des centrocytes par l'intermédiaire de CD40L et la sécrétion de l'IL-4 et l'IL-21 (sélection positive). La majorité des centrocytes qui bénéficie de la sélection positive, va alors subir une commutation isotypique (*Class switch recombination*, CSR) qui conduit à la production d'anticorps (Ac) de classe IgG, IgA ou IgE (14). Ils quittent le CG comme étant des **LB mémoires** qui constituent un groupe de cellules minoritaires à **très longue durée de vie**. Lors d'une réponse immune secondaire (*Antigen recall*), certains de ces LB mémoires peuvent présenter rapidement et efficacement l'Ag aux lymphocytes T et se différencier en **plasmocytes**.

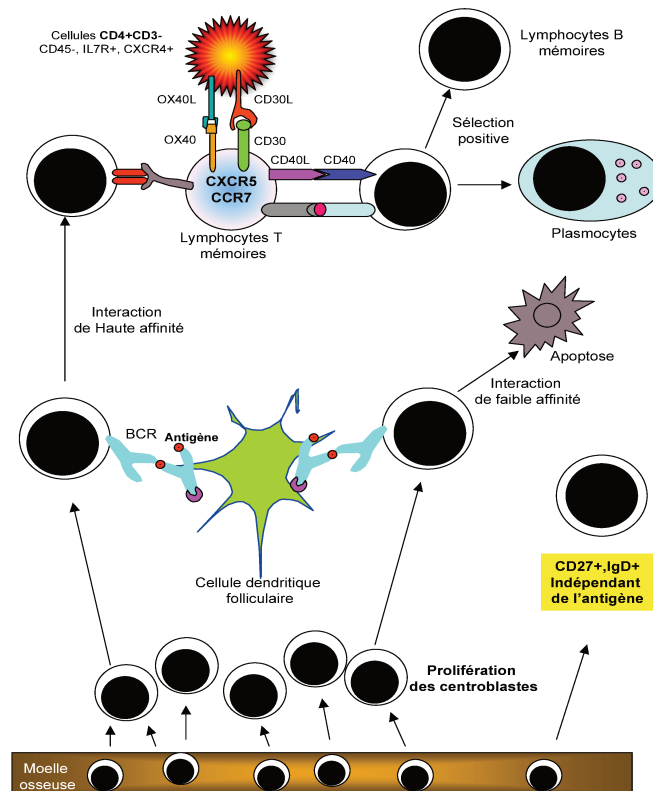


Fig. 3. Maturation des LB en présence de Tfh.

Les LB mémoires peuvent aussi recommencer de nouveaux cycles de sélection et de SHM dans les CG, permettant d'élargir le répertoire et ainsi d'optimiser la mémoire immunitaire de l'individu avant de se différencier en plasmocytes. À la fin de la réponse immunitaire, certains plasmocytes vont se localiser au niveau de la ZM des PALS (gaine lymphatique périartérielle) et au niveau de la moelle osseuse. Leur fonction consistera à sécréter des Ac qui seront distribués dans l'ensemble de l'organisme.

I-A.2- Les lymphocytes T : sous-populations et fonctions

Les lymphocytes T (LT) dérivent d'un progéniteur lymphoïde commun qui migre de la moelle osseuse vers la jonction cortico-médullaire thymique pour y poursuivre son processus de différenciation (Figure 4). Cette phase de différenciation en cellule pro-T permet de constituer un stock de thymocytes immatures. Ces thymocytes vont migrer du cortex à la médulla en subissant une sélection drastique puisque que seuls 2% d'entre eux rejoindront la circulation sanguine.

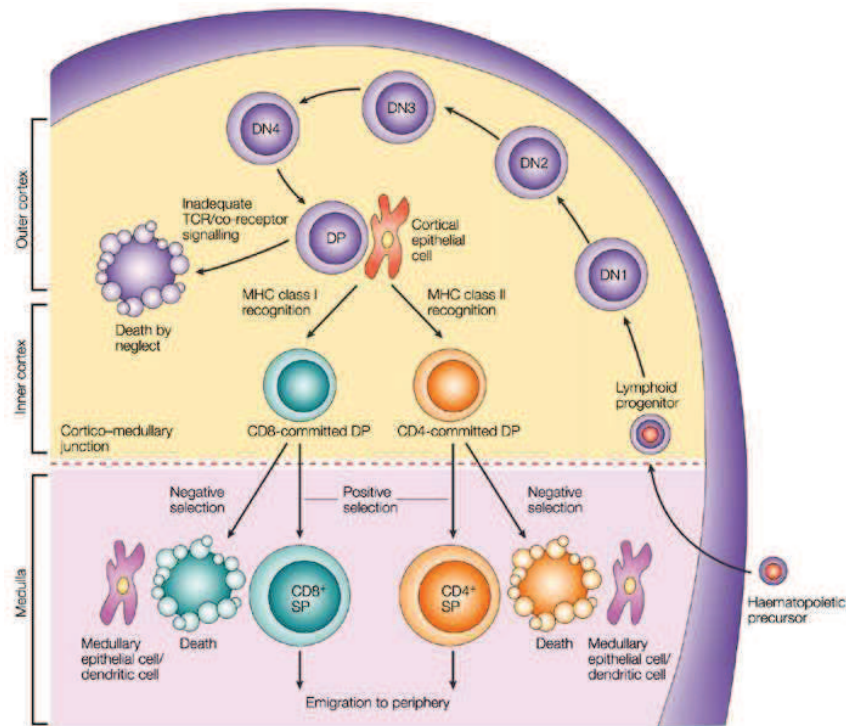


Fig. 4. Principales étapes du développement thymique des lymphocytes T conventionnels (15)

Cette sélection s'opère via deux processus : (i) une sélection positive dans la partie corticale du thymus, qui permet d'éliminer 90% des thymocytes en raison d'une trop faible affinité de leur TCR pour les complexes CMH/peptides antigéniques ; (ii) une sélection négative qui élimine les cellules ayant une trop forte affinité pour les complexes CMH/peptides du soi : ces cellules possèdent un TCR potentiellement auto-réactif. Les thymocytes ayant survécu à cette double sélection se retrouvent dans la circulation sanguine sous la forme de LT simple-positifs CD4+ ou CD8+ dits « naïfs » car n'ayant jamais été en contact avec l'antigène dont ils sont spécifiques. Ces lymphocytes T $\alpha\beta$ rejoignent les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques) et circulent continuellement entre ces différents organes. La migration de ces cellules vers les zones T des organes lymphoïdes secondaires leur permet de rencontrer et interagir avec une cellule dendritique (DC) qui peut leur présenter un peptide spécifique associé à une molécule de CMH.

Les principales sous-populations LT sont (Figure 5) : **(1) LT cytotoxiques** impliqués dans la défense contre les antigènes infectieux ; **(2) LT auxiliaires ou "helpers"** qui permettent une réponse effectrice en aidant au développement de la réponse lymphocytaire B.

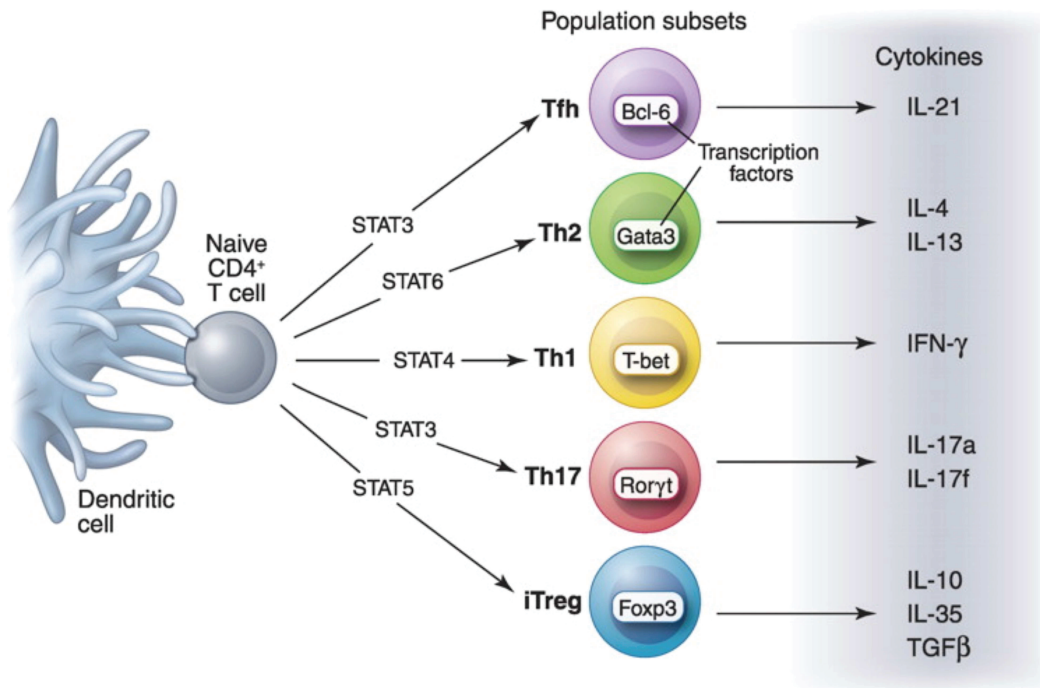


Fig. 5 : Polarisation des lymphocytes T auxiliaires : un précurseur, plusieurs destinées (16)

La différenciation des lymphocytes CD4⁺ naïfs aboutit à l'émergence de diverses sous-populations lymphocytaires T caractérisées par l'expression d'un facteur de transcription spécifique par lignée (T-bet, Gata3, RORγt...) et la production de cytokines cibles.

Selon le microenvironnement qui prévaut au moment de l'activation lymphocytaire (composition cytokinique, nature, dose et affinité de l'antigène), les LT auxiliaires développent un programme génétique spécifique pour se différencier en plusieurs sous-types avec des fonctions distinctes :

(2.1) les LT-Th1 qui dépendent de la sécrétion d'IL12, de l'IFNγ et de l'expression du facteur de transcription T-bet requis pour la polarisation Th1 via STAT1 (17). Les Th1 vont, via la sécrétion d'IFNγ permettre la commutation isotypique en IgG2a, qui fixeront le complément. Les cellules Th1 sont également caractérisées par l'expression des récepteurs aux chémokines CXCR3 et CCR5 (18).

(2.2) les LT-Th2 dont la différenciation dépend de la sécrétion de l'IL-4 et de l'induction des facteurs de transcription Gata-3 et STAT6. Les LT-Th2 favorisent la commutation isotypique en IgE et IgG1. Ces immunoglobulines produites par les LB vont être impliquées dans des réponses atopiques ainsi que dans les réactions allergiques. Les marqueurs associés aux cellules Th2 incluent les récepteurs aux chémokines CCR3, CCR4 et CCR8 (18).

(2.3) Les LT-Th17 sont élaborés en présence d'IL-6 et de TGFβ qui permettent l'induction du facteur de transcription RORγt (19). Les LT-Th17 secrètent l'IL-17 et l'IL-23 tandis qu'ils expriment à leur surface le récepteur de chémokine CCR6 (20). Leur rôle dans la protection de l'hôte contre les pathogènes et dans certaines pathologies auto-immunes (21).

(2.4) Les LT régulateurs (Treg) Les lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg) sont générés au niveau du thymus au sein d'un lignage séparé et effectuent leur différenciation dans cet organe lymphoïde primaire (22). Ce processus débute par l'induction de Foxp3 (*Forkhead box P3*) dans une sous-population de thymocytes possédant un TCR $\alpha\beta$ à haute affinité pour les complexes CMH/peptides du soi. Après être sortis du thymus, les nTreg sont anergiques et ne prolifèrent qu'en présence d'IL-2 sécrétée par les populations T effectrices. La signalisation via la chaîne commune des cytokines (γc) et la co-stimulation via le CD28 favorisent l'induction de l'expression de Foxp3 dans les thymocytes (23). La fonction physiologique des Treg est la tolérance périphérique au soi et la prévention du développement des maladies auto-immunes. Ainsi, la mutation de FoxP3 est responsable d'un syndrome auto-immun lymphoprolifératif appelé syndrome IPEX (*Immune-dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy-X-linked syndrom*) (24,25). L'équivalent de ce syndrome a été décrit chez la souris Scurfy une dizaine d'année auparavant (26). Le gène codant pour FoxP3 est porté par le chromosome X. Il a été découvert que la stimulation de lymphocytes T $CD4^+CD25^-$ conventionnels naïfs en présence d'IL-2 et de $TGF\beta$, *in vitro*, induisait leur conversion en lymphocytes T $CD25^+$ régulateurs exprimant FoxP3 et présentant des propriétés suppressives (27). Des études, réalisées sur des modèles murins, ont, par la suite, mis en évidence que ce phénomène de conversion pouvait également se produire *in vivo*. Ces Treg induits (iTreg) permettraient d'induire une tolérance aux antigènes produits par les micro-organismes de la flore commensale ainsi qu'aux antigènes alimentaires et joueraient un rôle protecteur contre le développement de désordres auto-immuns tels que la maladie de Crohn (28,29). Bien qu'ayant des origines distinctes, les nTreg et les iTreg sont phénotypiquement très similaires.

(2.5) Les lymphocytes T folliculaires helpers (Tfh) régulent la différenciation des LB spécifiques de l'antigène en cellules sécrétrices d'anticorps. Les Tfh ont la particularité d'exprimer le récepteur spécifique CXCR5 (tout comme les LB) et vont ainsi migrer au niveau des follicules, et plus particulièrement vers les centres germinatifs. En effet, ces zones sont riches en CXCL13 et son récepteur spécifique CXCR5. Cette co-localisation des LB et des Tfh va permettre de favoriser leur contact. Dans la zone T des ganglions, la reconnaissance de l'antigène par les CD4 naïfs ainsi que l'engagement de la molécule de co-stimulation ICOS (*Inducible T cell COStimulator*), induit l'expression du facteur de transcription Bcl-6, essentielle à la différenciation des CD4 naïfs en Tfh, et du récepteur CXCR5. Chez l'Homme, l'augmentation de l'expression de Bcl-6 est favorisée par les cytokines IL-6, IL-12 et IL-21 (30). L'IL-2 est un régulateur majeur de la différenciation des Tfh. En effet, l'IL-2 est un puissant inhibiteur de la différenciation en Tfh et peut agir très précocement durant l'activation des cellules T. Récemment, il a été montré, dans le modèle murin, que l'axe IL-2/STAT5

coopère avec le facteur de transcription Blimp-1 (un antagoniste de Bcl-6) pour inhiber la différenciation en Tfh. L'activation de STAT5 par l'IL-2 au sein des cellules Treg active Blimp-1 et inhibe la différenciation des Tfh en supprimant l'expression de CXCR5, Bcl-6, c-Maf, Baf et l'IL-21 (31). La cytokine IL-21 produite par les Tfh a un rôle complexe : elle est déterminante pour la différenciation des LB en plasmocytes. Mais, l'IL-21 sécrétée par les Tfh permet également d'augmenter l'expression du facteur de transcription Bcl-6, ce qui lui conférerait un rôle dans la prolifération des LB.

(2.6) Les lymphocytes T mémoires sont l'une des caractéristiques fondamentales et spécifiques de l'immunité adaptative. Lors d'un premier contact antigénique, l'organisme développe une réponse primaire. Les LT et B possédant des immuno-récepteurs spécifiques de l'antigène (TCR/BCR) prolifèrent et génèrent des cellules qui garderont la spécificité antigénique de cette rencontre. Ceci permettra à leurs cellules-filles de mieux réagir lors d'un nouveau contact antigénique, en développant une réponse secondaire qui sera à la fois plus rapide, plus intense et généralement plus efficace que la réponse primaire. Les LT mémoires possèdent un TCR de forte affinité pour l'antigène, une réactivité accrue et des capacités fonctionnelles modifiées. Chez l'Homme, une classification reposant sur la présence ou l'absence des molécules membranaires CCR7, CD62L (ou L-Sélectine), CD45RO et CD45RA permet de distinguer trois grandes catégories de cellules ayant survécu à la contraction clonale : **(i)** les cellules T de mémoire centrale (**T_{CM}**), caractérisées par un phénotype $CCR7^+CD45RO^+CD45RA^-CD62L^{high}$ et un fort potentiel prolifératif permettant une génération rapide de cellules T effectrices en cas de nouvelle exposition à l'antigène (Figure 6); **(ii)** Les cellules T mémoire effectrices (**T_{EM}**) sont $CCR7^-CD45RO^+CD45RA^-$ et n'expriment en général pas le CD62L. Elles agissent immédiatement en cas de réinfection.

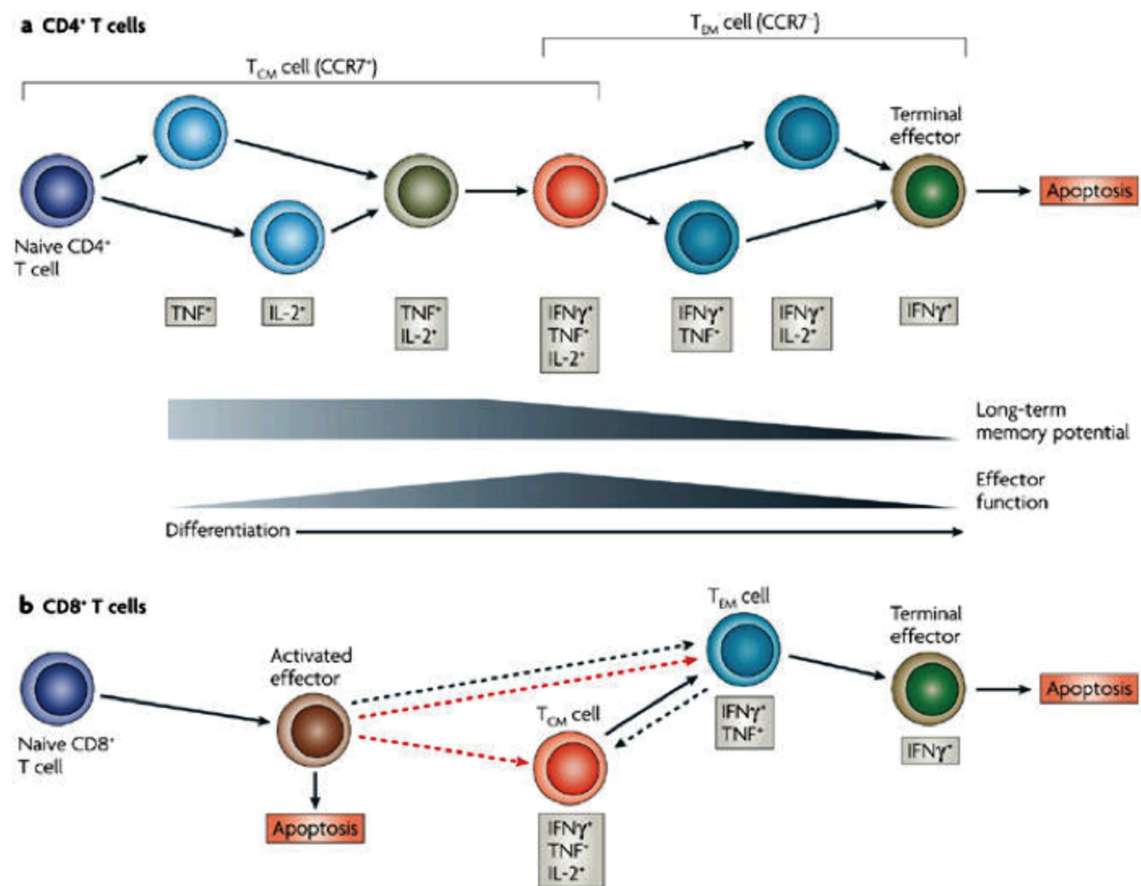


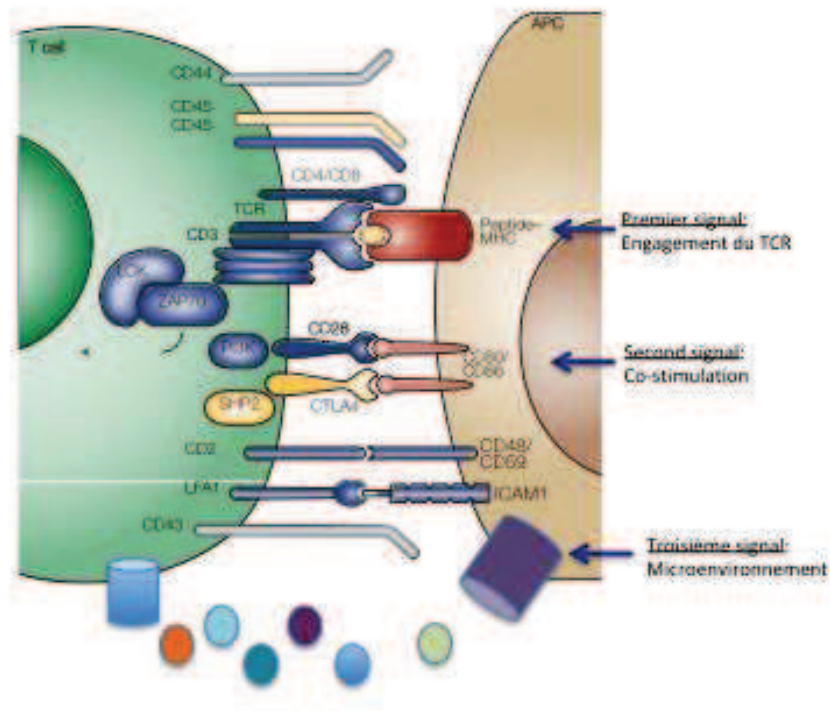
Fig. 6: Modèle de la différenciation des lymphocytes effecteurs et mémoires (32)

Elles sont présentes dans la circulation sanguine et lymphatique mais également dans des tissus non-lymphoïdes ce qui favorise une action rapide au plus près de la source d'infection. Elles possèdent une grande capacité proliférative et sécrètent rapidement des cytokines dès leur activation. Elles peuvent également déjà renfermer des granules cytotoxiques ; (iii) Les LT de différenciation terminale (TDT) sont CCR7⁻ CD45RA⁺, ont des capacités effectrices immédiates mais une capacité proliférative limitée. Ces cellules, très minoritaires au sein des LT-CD4⁺, sont surtout présentes au sein du compartiment T CD8⁺ mémoire chez l'adulte et le sujet âgé. La préservation de la mémoire T à moyen et long terme est cruciale. Le turnover des T_{CM} et T_{EM} est estimé respectivement à 45 et 15 jours alors qu'il atteint un an et plus pour les cellules T naïves. Les LT-mémoires s'auto-renouvellent régulièrement contrairement aux lymphocytes T naïfs qui ont une durée de vie longue.

(2.7) Les Lymphocytes iNKT Elles sont définies par l'expression des récepteurs de la famille NK et un TCR $\alpha\beta$ semi-invariant restreint par la molécule du CMH de classe I non polymorphe CD1d. Ce TCR porte un réarrangement V α 24-J α 18/V β 11 chez l'Homme (33). CD1d est conservée chez les mammifères et est exprimée de façon constitutive par les CPA (cellules dendritiques, LB et macrophages) ainsi que sur les thymocytes (34). Le premier ligand de CD1d

identifié est un composé exogène actif extrait d'une éponge marine, l' α -galactosylcéramide (α GalCer). La recherche d'un ligand endogène a permis d'identifier le β -glucopyranosylcéramide (β GlcCer) dans les organes lymphoïdes (34). Chez l'Homme, les cellules iNKT en périphérie possèdent un phénotype mémoire car elles expriment constitutivement le CD45RO et n'expriment pas le CD62L. Elles peuvent être CD4⁺, CD8⁺ ou doubles négatives (DN). Enfin, les cellules iNKT expriment des marqueurs de la famille des Natural Killers (NK) comme le CD161, CD56, CD16, NKG2D, CD2 et DNAM-1. Le nombre de cellules iNKT circulantes peut varier d'un facteur 1000 entre individus mais reste identique chez un même individu. Contrairement aux LT classiques, les cellules iNKT se comportent comme des "cellules effectrices" présentant un phénotype effecteur et mémoire inhabituel caractérisé par une libération rapide de grandes quantités de cytokines Th1 et Th2 lors de la stimulation, contribuant ainsi à des réponses immunitaires innées et adaptées (35). Les cellules iNKT peuvent interagir avec les lymphocytes T régulateurs et moduler leurs fonctions selon un mécanisme IL-2-dépendant. En retour, les Treg inhibent l'activité des iNKT (36). Les cellules iNKT ont également un rôle important dans la réponse humorale, elles peuvent induire la prolifération des LB et leur production d'anticorps. Il est connu que les iNKT favorisent la réponse B en réponse à un antigène lipidique.

Une activation complète et effectrice des lymphocytes T requière au moins deux signaux simultanés et indépendants (Figure 7). Le premier signal est délivré par l'engagement du TCR qui se lie à un peptide antigénique présenté par une molécule de CMH de type I ou II.



Une activation complète et effectrice du lymphocyte T nécessite plusieurs signaux :

- Le premier résulte de l'engagement du TCR
- Le second, appelé signal de co-stimulation, dépend de la liaison des corécepteurs du LT à leurs ligands. En l'absence de ce signal, les lymphocytes T entrent en anergie.
- Le troisième signal est sous la dépendance du microenvironnement cytokinique.

22

présent dans le domaine cytosolique (ITAM) des chaînes du complexe TCR (41,42) (Figure 8). Les ITAM phosphorylés servent de sites de liaison pour la ZAP-70 kinase, qui est activée par phosphorylation par la Src kinase Lck, ce qui entraîne la stabilité de l'interaction ITAM-ZAP 70. Le groupement du TCR actif et le recrutement des Src kinases, Lck et Fyn dans les LT et ZAP-70 se produisent dans des radeaux lipidiques (lipid rafts) qui sont des micro-domaines de membranes plasmiques enrichies en cholestérol et glycosphingolipides et servent de plateformes de signalisation (43).

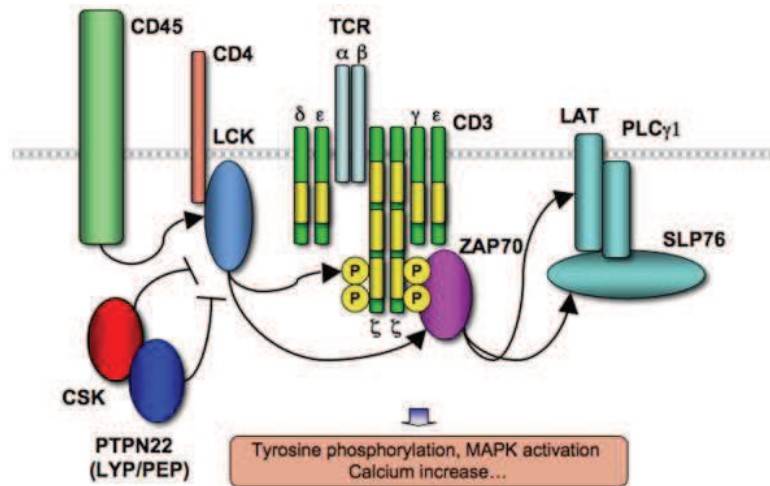


Fig. 8: Représentation schématique de la signalisation proximale (44)

L'activation de ZAP-70 induit la phosphorylation de plusieurs résidus tyrosine de la molécule adaptatrice transmembranaire LAT (linker pour l'activation des cellules T) et de la phosphoprotéine leucocytaire de 76 kDa (SLP-76) contribuant à générer à travers des interactions protéine-protéine ou protéine-lipide un complexe de signalisation dans les radeaux lipidiques. L'activation de molécules co-stimulatrices telles que CD28 favorise le recrutement de kinases et de protéines adaptatrices dans les radeaux lipidiques, ce qui induit une réorganisation du cytosquelette conduisant à la formation de synapse immunologique. L'immobilisation de molécules de signalisation par des filaments d'actine cytosquelettiques et des protéines d'échafaudage peut faciliter la transmission du signal des radeaux aux cascades de signalisation en aval, entraînant l'activation de facteurs de transcription tels que NFAT, AP-1 et NF-kB (45). Afin de limiter une sur-activation du lymphocyte T, différentes voies de régulations négatives peuvent être mises en place. L'une d'entre elle est la déphosphorylation des résidus activateurs de Lck et Fyn par des phosphatases cytosoliques telles que CD45 (46,47).

II-Immunité innée

L'immunité innée regroupe des mécanismes rapides de reconnaissance et d'élimination des pathogènes ou des tumeurs. Ces mécanismes sont dits « non spécifiques » et sont présents chez les végétaux comme chez les animaux. Chez les Vertébrés, l'immunité innée constitue la première ligne de défense à l'infection, en attendant la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative spécifique. L'immunité innée est présente au niveau des barrières naturelles de l'organisme au contact de l'environnement extérieur (épithélium, épiderme), ou intérieur (protéines sériques et cellules résidant dans le sang ou autres milieux biologiques naturels. Les principaux effecteurs cellulaires sont les cellules polynucléaires dont les polynucléaires neutrophiles (PNN), les macrophages, certaines cellules de l'épithélium muqueux, les cellules dendritiques (ou DC) et les cellules Natural Killer (NK) (Figure 9).

La rapidité de la réponse innée repose sur la reconnaissance de motifs antigéniques conformationnels présents chez les organismes infectieux, les "*Pathogen Associated Molecular Pattern*" (**PAMP**) (48). Le terme de "PAMP" est en réalité impropre, car ces structures sont également exprimées par les micro-organismes non-pathogènes de la flore commensale.

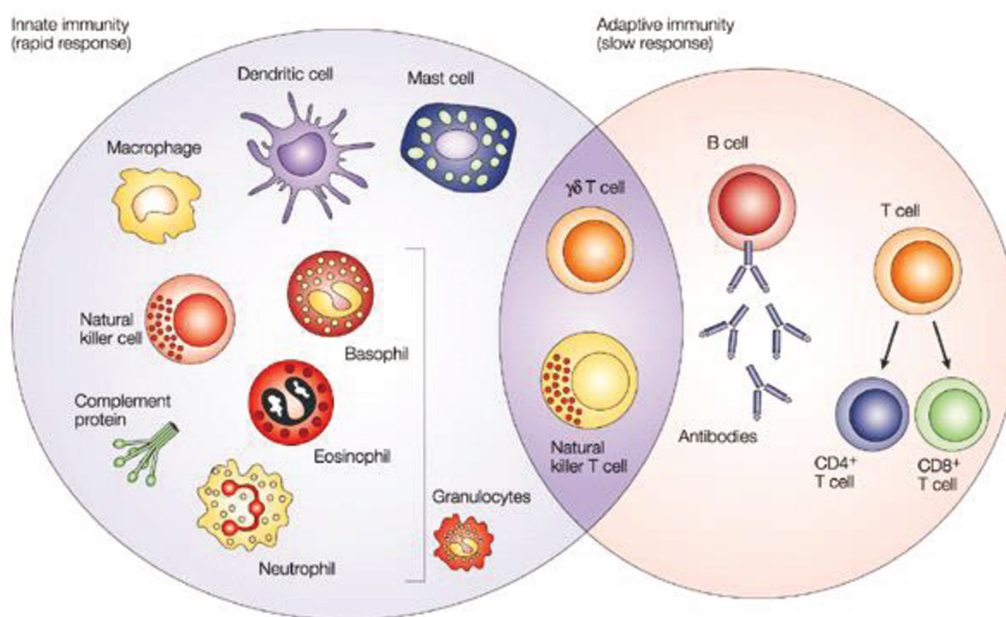


Fig. 9 : intersections entre l'immunité innée et adaptative (49)

Certaines cellules de l'immunité innée (cercle violet) ont des fonctions dans l'immunité adaptative (cercle rose) : les LT $\gamma\delta$ ou les NKT

Les PAMPs correspondent à des structures invariantes, présentes sur l'enveloppe des procaryotes et des champignons, mais absentes de l'hôte. Cette caractéristique fait des PAMPs une signature de l'infection. Parmi les PAMPs, on peut citer le lipopolysaccharide (LPS), les

peptidoglycanes et les mannanes que l'on trouve à la surface de nombreux micro-organismes, mais aussi l'ARN double-brin ou l'ADN bactérien, les virus, parasites et champignons.

L'immunité innée sert également à dégrader les cellules du soi apoptotiques. Ces cellules subissent en effet une mort cellulaire programmée qui a pour conséquence de modifier les propriétés de leur membrane plasmique, notamment dans la répartition des phospholipides entre le feuillet interne et le feuillet externe. Cela conduit à l'exposition de la phosphatidylsérine à l'extérieur de la cellule (50), à une modification des sucres exposés en surface, voire à l'exposition de certaines protéines comme la calréticuline.

Ces motifs nouvellement exposés sont appelés **ACAMPs** pour « *Apoptotic Cells Associated Molecular Pattern* ».

Les récepteurs capables de reconnaître la présence d'agents infectieux via les PAMPs sont appelés les "*Pattern Recognition Receptor*" (**PRR**) dont trois familles ont été décrites (48): **(i)** les PRR solubles (opsonines) se fixent aux micro-organismes et facilitent leur élimination par les cellules phagocytaires ; il s'agit notamment des facteurs du complément et des molécules de la famille des pentraxines (dont la protéine C-réactive ou CRP, marqueur de l'inflammation aiguë) ; **(ii)** les récepteurs d'endocytose, membranaires, sont impliqués dans la reconnaissance et l'internalisation des micro-organismes. Ces récepteurs, parmi lesquels figurent la famille des récepteurs scavenger et les lectines de type C, sont exprimés sélectivement par les cellules à forte activité d'endocytose, telles que les monocytes et les macrophages ; **(iii)** les récepteurs de signalisation sont, quant à eux, impliqués dans l'activation des cellules ayant rencontré un micro-organisme. Ils appartiennent à 4 grandes familles : les *Toll-like Receptor*, les NLR, les hélicases et les RLR (*retinoic acid-inducible gene I-like receptors*) qui reconnaissent les ARN intracellulaires et les DNA sensors cytosoliques. Ces récepteurs sont exprimés à la surface de la cellule (TLR1, 2, 4, 6), dans les endosomes/lysosomes (TLR3, 7, 8, 9), ou dans le cytosol (NLR, hélicases, RLR). Les PRR, notamment les TLR, jouent un rôle prépondérant dans l'activation des cellules de l'immunité innée et constituent des interfaces moléculaires entre immunité innée et immunité adaptative.

III- Contrôle de l'immunité adaptative par l'immunité innée

De plus en plus de données s'accumulent démontrant que la distinction entre immunité innée et immunité adaptative, qui a certes l'avantage d'être simpliste, ne correspond pas à la réalité. Il existe en effet des « ponts majeurs » dont on commence seulement à comprendre l'importance (Figure 9). Parmi les cellules de l'immunité innée, les cellules dendritiques vont jouer également un rôle essentiel en assurant la présentation de l'antigène aux lymphocytes, permettant ainsi le développement d'une immunité adaptative spécifique (Figure 10).

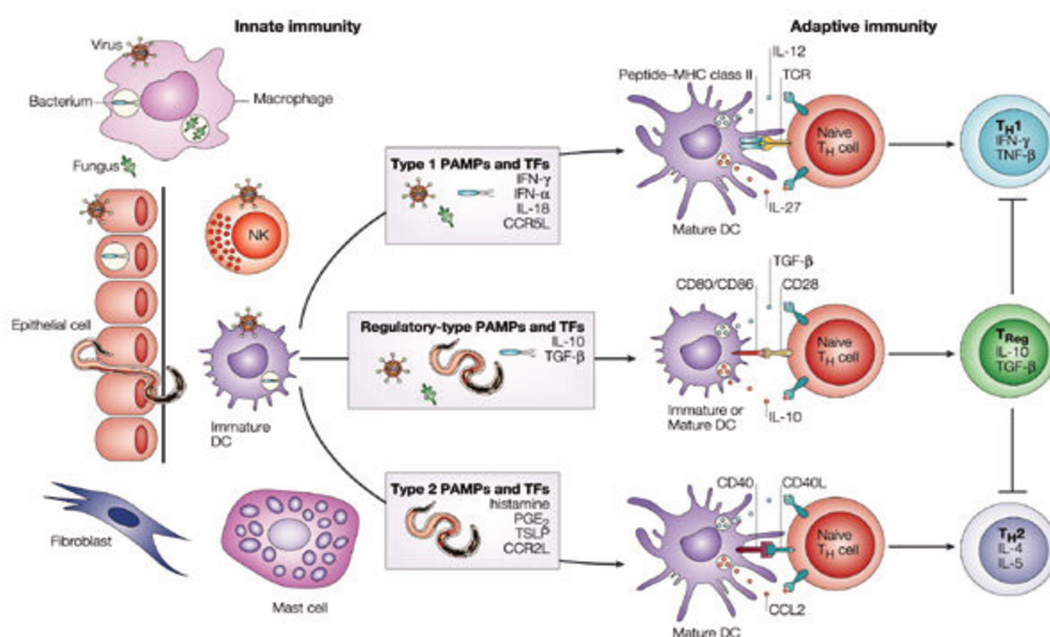


Fig. 10 : Rôle des cellules dendritiques à l'interface entre immunité innée et adaptative (51)

En effet, les cellules dendritiques immatures sont attirées par des chimokines produites par les macrophages et les cellules résidentes : MIP-1 α , 1 β , IP-10 qui interagissent avec leurs récepteurs CCR1, CCR5, CXCR3. Elles sont stimulées par les interactions PAMP/PRR au niveau extracellulaire (TLR2, 4, 5, intégrines, récepteurs du C, du mannose) ou intracellulaire (TLR3, 7, 8, 9, NLR) et vont migrer par voie lymphatique vers les ganglions régionaux où elles vont présenter des peptides antigéniques aux lymphocytes T CD4 et lymphocytes T CD8 et les activer. En effet, au cours de cette migration, les cellules dendritiques subissent un processus de maturation qui va leur permettre d'exprimer de fortes quantités de molécules de classe II du CMH, de molécules de co-stimulation, CD80, CD86, CD40 et des molécules d'adhésion (ICAM 1, 2, LFA-1, CD58). Elles sécrètent également des chimokines qui vont leur permettre d'attirer les lymphocytes T (CCL18). Elles perdent toutefois leur activité d'endocytose et de phagocytose par répression de l'expression de CdC42. La capacité d'un antigène à déclencher une réponse

immunitaire spécifique est donc essentiellement liée à sa capacité à initier le programme de maturation des cellules dendritiques. Les cellules dendritiques constituent donc un chaînon indispensable dans le développement d'une réponse immunitaire spécifique.

IV- Le podocyte : une cellule immunitaire ?

IV-A Généralités

Les podocytes, qui forment la paroi interne de la chambre urinaire, sont des cellules polarisées attachées à la membrane basale par une expansion membrano-cytoplasmique appelée semelle podocytaire ou pédicelle (52). Le podocyte est une cellule épithéliale très spécialisée possédant une structure unique et une fonction essentielle au maintien de la barrière de filtration glomérulaire. En raison de son rôle crucial dans la filtration glomérulaire, de sa structure complexe et de sa faible capacité de régénération et de réparation, le podocyte est considéré comme une cible d'altération glomérulaire critique et vulnérable. Les altérations des interactions anatomiques entre les pédicelles adjacents ou entre les pédicelles et la membrane basale glomérulaire (MBG) sont les premiers signes d'une altération glomérulaire dont la protéinurie est le marqueur.

IV-B Podocytes et système immunitaire

De récentes études tendent à penser que les podocytes possèdent des voies de signalisation impliquées dans les réponses immunitaires innées et que ces réponses induisent souvent une altération podocytaire. Les podocytes expriment certains gènes caractéristiques des cellules immunitaires :

- Les Toll-like récepteurs :

La plupart des membres de la famille des TLRs peuvent être détectés au niveau du transcrit dans les glomérules murins isolés mais le TLR 4 est constitutivement exprimé au niveau protéique (53). Des analyses immuno-histochimiques ont montré que la protéine TLR 4 était localisée au niveau du podocyte. Le traitement par un ligand PAMP du TLR4 (le LPS ou le fibrinogène) induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires (CCL2, CCL7, CXCL1 et CXCL5) ainsi qu'une activation systématique de la voie NFκB.

- Rôle de B7-1

La rapide induction de B7-1 (ou CD80) sur les podocytes et le développement d'une protéinurie chez les souris après administration de LPS ou de puromycine fournissent d'avantages d'arguments en faveur de la capacité des podocytes à acquérir un phénotype pro-inflammatoire.

B7-1 est plus connue comme étant une molécule de co-stimulation impliquée dans la présentation d'antigène aux lymphocytes mais il a été démontrée que son implication dans l'induction d'une protéinurie est indépendante des lymphocytes T (54). Des travaux récents ne retrouvent pas d'induction de B7.1 dans les podocytes humains ou murins en dépit de l'expression de TLR4. En outre, en présence de LPS, l'expression de TLR4 est significativement accrue mais contraste avec l'absence d'expression de CD80 (55). Ces résultats sont en accord avec l'absence d'effet bénéfique d'une biothérapie (Abatacept) ciblant cette molécule dans le SNI (56).

- Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS)

Les podocytes amplifient les altérations glomérulaires immunes comme non-immunes grâce à leur capacité à produire et à relâcher des dérivés réactifs de l'oxygène. La production augmentée de ROS a été observée aussi bien dans divers modèles murins expérimentaux protéinuriques.

Les ROS stimulent la production podocytaire de la cytokine pro-inflammatoire GM-CSF, induit l'apoptose des podocytes et altère la membrane basale glomérulaire (57).

V-Syndrome néphrotique idiopathique

V-A Généralités

Le syndrome néphrotique idiopathique (SNI) est une néphropathie glomérulaire définie par une protéinurie sélective massive (>3gr/24 heures) associée à une hypoalbuminémie (<30gr/l) sans lésions inflammatoires rénales ni dépôts de complexes immuns circulants. Le SNI traduit une pathologie podocytaire qui se manifeste histologiquement sous deux formes principales: le syndrome néphrotique à lésions glomérulaires minimales (SNLGM, néphrose lipoïdique) ; et la hyalinose segmentaire et focale primitive (HSFP). Le SNI représente 85% des néphropathies d'origine glomérulaire de l'enfant et 25-30% de celles de l'adulte, avec une incidence de 2-4 cas et une prévalence de 16 cas pour 100 000 habitants chez l'enfant (58).

Les formes génétiques du SNI sont liées à des anomalies structurales de la barrière de filtration glomérulaires et représentent moins de 10% du SNI. Comme elles ne relèvent pas de cause immunologique, elles ne seront pas évoquées dans ce travail. A l'inverse, la physiopathologie des formes corticosensibles, le plus souvent à rechutes, reste incomprise. Des arguments cliniques et expérimentaux suggèrent que ces formes seraient liées à des perturbations immunologiques primaires responsables secondairement d'une altération podocytaire et d'une désorganisation de la barrière de filtration glomérulaire (1). Des études récentes réalisées dans les formes familiales de SNI corticosensibles n'ont pas permis d'identifier une cause génétique,

hormis une association avec l'antigène HLA DQA1 (59).

La réponse au traitement par corticoïdes permet donc de distinguer les formes sensibles et les formes résistantes au traitement (Figure 11). Indépendamment de la classification histologique, les formes corticosensibles jouissent d'un bon pronostic, tandis que les formes corticorésistantes ont un pronostic plus réservé, qu'il s'agisse de SNLGM ou de HSF. Environ 80% des SNLGM et 50% des HSFP sont corticosensibles, mais les rechutes s'observent dans les deux tiers des cas lorsque les doses de corticoïdes sont réduites ou après l'arrêt du traitement, nécessitant chez certains patients l'introduction de drogues immunosuppressives telles que la ciclosporine ou des agents alkylants (cyclophosphamide, chloraminophène).

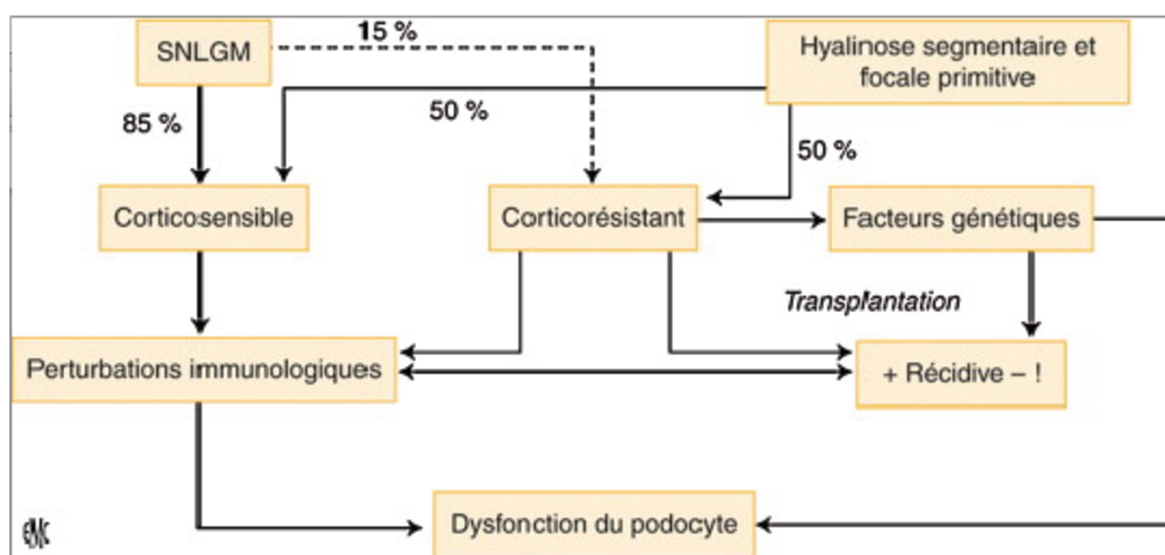


Fig. 11 : Classification des syndromes néphrotiques idiopathiques (60)

Le traitement des formes cortico- et anticalcineurine-dépendantes a récemment bénéficié d'une biothérapie ciblant le récepteur CD20 exprimé par les lymphocytes B (Rituximab). Le mécanisme par lequel le rituximab permet d'entretenir des rémissions malgré l'arrêt des corticoïdes et des immunosuppresseurs reste inconnu. Toutefois, le rituximab n'a qu'un effet suspensif puisque dans près de 90% des cas, une rechute survient après la reconstitution du compartiment B (61).

De manière sporadique, le SNI peut être associé à des proliférations lymphoïdes malignes telles que les lymphomes T ou la maladie de Hodgkin (62).

V-B. Bases immunopathologiques du SNI corticosensible

Depuis environ cinquante ans, le concept de pathologie dysimmunitaire repose sur les arguments cliniques et expérimentaux suivants (Figure 12): (i) le SNLGM survient dans environ deux tiers

des cas dans un contexte d'activation du système immunitaire déclenché par une infection banale, ou une agression (vaccination, piqure d'insecte ...) (62,63); **(ii)** Chez environ un tiers des patients, un terrain atopique est observé (62). **(iii)** Le syndrome est sensible aux corticoïdes seuls ou associés, dans les formes corticodépendantes, aux immunosuppresseurs (Endoxan, Cellcept et anticalcineurines). Depuis une dizaine d'années, le traitement immunosuppresseur s'est enrichi avec les médicaments visant la déplétion des lymphocytes B (essentiellement Rituximab) qui permet de maintenir la phase de rémission en l'absence de tout traitement adjuvant. Cependant, cet argument doit être pris avec précaution puisque certains de ces traitements seraient susceptibles d'agir directement au niveau rénal et/ou glomérulaire. En effet les podocytes et les cellules endothéliales glomérulaires expriment des récepteurs aux glucocorticoïdes au travers desquels les corticostéroïdes pourraient agir sur la barrière de filtration (64).

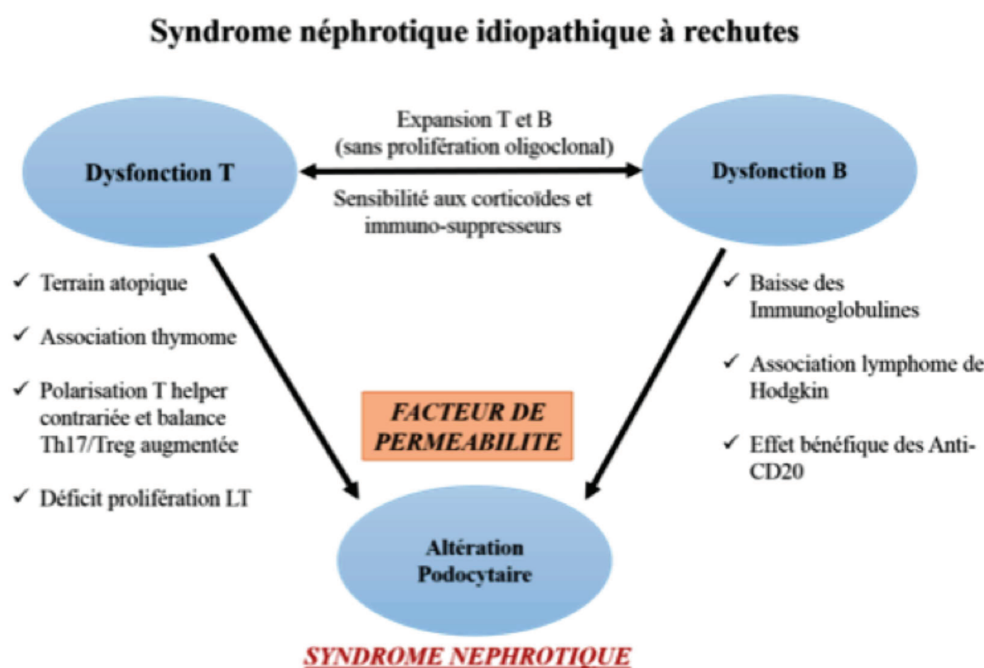


Fig. 12: Hypothèses pathogéniques concernant le lien potentiel entre l'atteinte du système immunitaire et l'atteinte podocytaire au cours du syndrome néphrotique idiopathique cortico-sensible à rechute

Les perturbations immunologiques rapportées dans le SNI cortico-sensible sont nombreuses et varient selon les études avec des divergences notables liées aux méthodes d'analyse et à l'hétérogénéité de la maladie (62). Il n'existe pas de preuve formelle que les perturbations cytokiniques décrites dans le SNLGM soient responsables du phénotype rénal mais les podocytes peuvent exprimer certains récepteurs cytokiniques comme ceux de l'IL-4, IL-10 et IL-13 ou du $TNF\alpha$ (65–67). Il a été montré sur des cultures de podocytes que l'exposition à l'IL4 ou l'IL13 déclenchait l'activation de STAT6 et réduisait la résistance électrique trans-

épithéliale (64).

L'implication des LB dans la pathogénie est également supportée par les observations de l'effet bénéfique du traitement par des anticorps anti-CD20 au cours des SNI à rechutes (68,69). Bien que les altérations lymphocytaires B au cours des poussées du SNI aient été peu étudiées, l'expansion significative de cette population a également été observée. La différenciation B paraît également être affectée puisqu'une baisse fréquente des taux sériques de certaines fractions d'immunoglobulines (Ig: IgG1 et IgG2) est observée sans qu'elle ne puisse être expliquée par la fuite urinaire seule (70,71). Le défaut de synthèse des Ig ne semble pas affecter de manière équivalente les différentes sous-classes d'Ig et pourrait être lié à des anomalies intrinsèques des LB ainsi qu'à un défaut de la commutation isotypique et ce d'autant plus que les taux d'IgM sont normaux voire élevés durant les phases de poussée de la maladie (72).

L'hypothèse d'un facteur de perméabilité sécrété altérant la barrière de filtration glomérulaire repose sur diverses observations. Tout d'abord la transmission materno-foetale transitoire du syndrome néphrotique peut être observée (73). Puis certaines rechutes immédiates de SNI après transplantation peuvent être mises en rémission après échanges plasmatiques ou immunoadsorption du plasma (74,75). Un argument clé réside dans la transplantation de rein de donneur atteint de SNI chez des receveurs indemnes de cette pathologie : le SNI disparaît en moins d'une semaine (76). Enfin, les surnageants de LT périphériques isolés chez des patients atteints de SNI et activés in vitro, de même que le plasma prélevé au cours des rechutes ou lors des récives après greffe rénale, sont capables d'induire une protéinurie chez le rat (77–79). Plusieurs facteurs de perméabilité potentiels ont été incriminés tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (80), l'IL13 (81), la cardiotrophine-like cytokine-1 (CLC-1) (82) et le récepteur soluble de l'urokinase (83).

VI- Connaissances actuelles sur le gène C-MIP

Le gène *C-MIP* humain code pour un ARNm de 4,5 Kb et est constitué de 21 exons localisés sur

le chromosome 16 en position q24, codant pour une protéine de 86 kDa qui possède plusieurs domaines et sites d'interactions protéiques (Figure 13). Cette structure originale souligne son rôle potentiel dans la signalisation cellulaire. La partie N-terminale contient un domaine pleckstrine (PH) codé par les exons 1, 2, 3 et 4, situé entre les acides aminés 72 et 162. Le domaine PH est une séquence conservée de 100 acides aminés retrouvée dans certaines protéines impliquées dans la signalisation proximale nécessaire à l'activation de la cellule T.

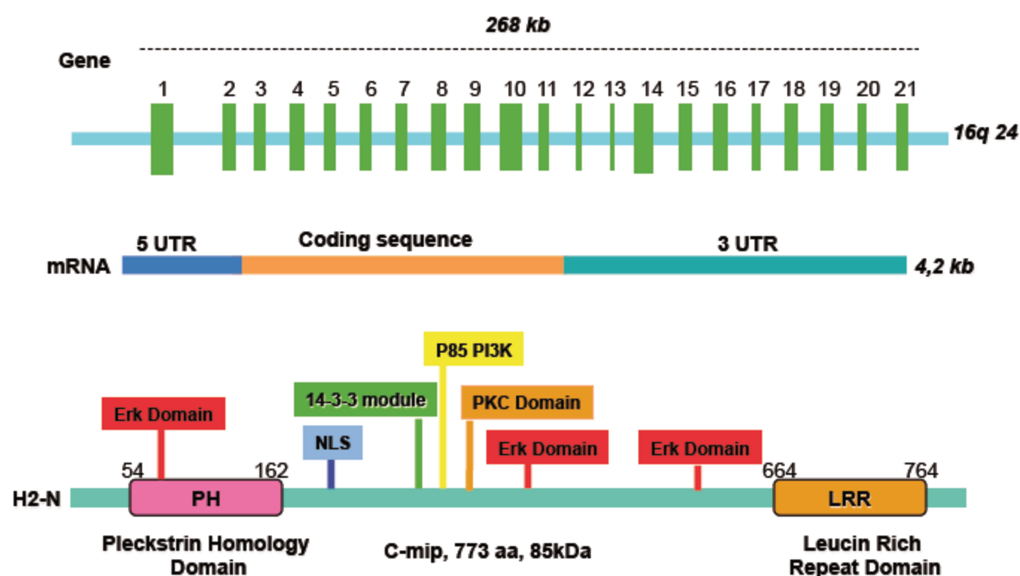


Fig. 13: Organisation structurale et fonctionnelle de C-mip

La région centrale est caractérisée par la présence de sites d'interaction avec les protéines 14-3-3, PKC, ERK et par la présence d'un domaine SH3 similaire à celui de la sous-unité p85 de la PI3K. La région C-terminale contient un domaine riche en leucine (LRR, Leucine Rich Repeats) codé par les exons 18, 19, 20 et 21 et localisé entre les acides aminés 664 et 763. Les motifs LRR sont des séquences répétitives de 20 à 29 résidus impliqués dans les interactions protéine-protéine. Les protéines à domaine LRR participent à de nombreux processus biologiques importants, tels que l'interaction hormone-récepteur, l'inhibition enzymatique, l'adhésion et le trafic cellulaire. En aval du domaine PH, à partir du 164ème acide aminé, se situe une séquence répétée de trois lysines (KKK) correspondant à un signal d'adressage nucléaire, ainsi en fonction des situations, physiologiques ou pathologiques, C-mip peut être retrouvé dans le compartiment nucléaire, mais sa localisation n'est pas restreinte à un sous-compartiment cellulaire en particulier.

VI-A. Rôle de C-mip dans le podocyte

La protéine C-mip est spécifiquement surexprimée dans les podocytes des patients atteints de

SNLGM, alors que le transcrit et la protéine sont peu ou non détectés en situation physiologique. Elle est également surexprimée dans certaines formes de HSF et dans les modèles expérimentaux de néphropathies induites chez le rat ou la souris par injection d'Adriamycine. En revanche, C-mip est indétectable chez les patients atteints d'une autre glomérulopathie telle que la néphropathie diabétique, la néphropathie à IgA ou des glomérulopathies prolifératives (84). Ces observations suggèrent que C-mip serait un marqueur des podocytopathies primitives sans lésions inflammatoires prolifératives. Un modèle murin de surexpression de C-mip dans les podocytes a montré l'induction d'une protéinurie néphrotique en quelques semaines. L'étude de ce modèle a montré que C-mip interférerait avec les étapes clé de la signalisation proximale en bloquant en particulier l'activation de Fyn, une Src kinase essentielle à l'activation et à la réorganisation du cytosquelette podocytaire (84).

VI-B : Rôle de C-mip dans les lymphocytes T

Bien qu'initialement identifié dans les LT d'un patient en phase de poussée d'un SNLGM, le rôle de C-mip dans les LT reste largement méconnu. Notre équipe a montré un « *cross-talk* » entre C-mip et NF- κ b mais qui n'est pas spécifique au LT : **(i)** Il a été démontré que RelA, le régulateur clé du complexe NF- κ b, se lie à une séquence consensus palindromique localisé dans la région promotrice proximale de C-mip et inhibe son activation transcriptionnelle *in vitro* et *in vivo* (85) ; **(ii)** L'étude de modèles cellulaires *in vitro* et de souris transgéniques ont montré que C-mip n'interfère pas avec la régulation transcriptionnelle de RelA mais lie RelA via son domaine LRR et facilite sa dégradation par le protéasome (86). Ce « *cross-talk* » entre C-mip et NF- κ b semble avoir des conséquences fonctionnelles en conditions physiologiques comme pathologiques mais son importance reste encore loin d'être élucidée. NF- κ b prévient l'entrée des cellules en apoptose (87), alors que C-mip facilite le processus pro-apoptotique en augmentant l'expression des protéines kinases associées à la mort cellulaire (telles que la MAPK p38 et la DAPK), de Bax et en inhibant les protéines anti-apoptotiques Bcl2 et Akt (84,86). Ce « *cross-talk* » entre C-mip et NF- κ b peut également influencer l'expression cytokinique car RelA se fixe sur le promoteur de l'IL-4 et empêche son activation transcriptionnelle par C-maf (88). Ce mécanisme, appelé interférence transcriptionnelle, a été très peu étudié dans le SNLGM.

VII- Objectifs des travaux de la thèse

La pathogénie du syndrome néphrotique idiopathique (SNI) est inconnue, mais de nombreux arguments cliniques et expérimentaux favorisent l'hypothèse d'une pathologie dys-immunitaire à expression immunologique et rénale (1), au cours de laquelle on observerait une altération des

sous-populations de lymphocytes T (LT). Cependant, le mécanisme exact reste encore mal connu. Récemment, le Rituximab, un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène CD20, a montré une efficacité à induire une rémission à moyen et long terme, suggérant l'implication d'une dysfonction des lymphocytes B et/ou un défaut de coopération T-B. Notre laboratoire a isolé un nouveau gène C-MIP dont l'expression est induite dans certaines sous-populations lymphocytaires T et B, ainsi que dans les podocytes de patients atteints de SNI en phase de poussée mais quasiment indétectable chez les sujets sains .

Ainsi l'objectif de ma thèse fut double :

- Le premier objectif a été d'**étudier les perturbations lymphocytaires T** avant et au moment de la rechute ainsi qu'en période de rémission **au cours du SNLGM** afin de mieux appréhender la physiopathologie de la maladie. Dans le cadre du PHRC NEPHRUTIX, nous avons mené une étude multicentrique, en double aveugle, randomisée testant l'effet d'un placebo *versus* le Rituximab chez de fréquents rechuteurs d'âge pédiatrique où nous avons analysé différents paramètres immunologiques ainsi que le profil cytokinique de patients en phase de rechute et suivis après traitement par Rituximab. Cette étude nous a également permis de comprendre l'impact du Rituximab, anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène CD20, sur le répertoire T.

- Le deuxième objectif a été d'appréhender **le rôle de C-mip dans le lymphocyte T**. En effet, l'ensemble des données recueillies sur le rôle potentiel de C-mip dans le lymphocyte, a été obtenu *in vitro* uniquement (89,90). C'est pourquoi nous avons généré un modèle de souris transgéniques qui sur-expriment spécifiquement C-mip dans le lymphocyte T mature périphérique, la séquence codant pour C-mip humain étant sous le contrôle du promoteur distal Lck majoritairement actif dans les LT périphériques.

Résultats

NEPHRUTIX: A randomized, double-blind, placebo vs Rituximab-controlled trial assessing T-cell subset changes in Minimal Change Nephrotic Syndrome

Le syndrome néphrotique idiopathique (SNI) résulte de dysfonctions lymphocytaires et podocytaires, de cause inconnue. De nombreux travaux menés pour identifier la nature et le mécanisme des perturbations immunitaires ont été principalement focalisés sur l'analyse cytokinique et les perturbations de sous populations lymphocytaires malheureusement, ils ont été pour la plupart conduits sur des patients cliniquement peu caractérisés et non appariés, générant ainsi des données contradictoires. La découverte récente de l'effet bénéfique de la déplétion B par le Rituximab (ciblant l'antigène CD20), chez des patients rechuteurs fréquents dépendants à une corticothérapie à long terme et/ou à d'autres agents immunosuppresseurs (inhibiteurs de calcineurine, mycophénolate mofétil ou cyclophosphamide) a permis de suggérer l'implication d'une dysfonction des lymphocytes B et/ou un défaut de coopération T-B. Dans cette étude, nous avons analysé l'influence du Rituximab sur les compartiments lymphocytaires T au cours du SNLGM.

Nous avons mené une étude multicentrique, en double-aveugle, randomisée testant l'effet d'un placebo *versus* le Rituximab chez de fréquents rechuteurs d'âge pédiatrique (PHRC NEPHRUTIX), présentant une dépendance thérapeutique à un seuil élevé de corticoïdes et/ou d'immunosuppresseurs. Les patients ont reçu deux perfusions (Rituximab ou placebo) à une semaine d'intervalle, durant la phase de rémission, puis, les stéroïdes ont été progressivement diminués et les immunosuppresseurs arrêtés. Chaque patient a été suivi mensuellement et revu immédiatement en cas de rechute. A chaque visite, des prélèvements sanguins ont été réalisés afin d'étudier les variations intra-individuelles de populations cellulaires par cytométrie de flux et d'expression de cytokines par RT-qPCR à l'inclusion, avant et au moment de la rechute et en rémission.

Ce travail a permis d'apporter des réponses innovantes sur la physiopathologie du SNI et son traitement par le Rituximab:

- Le suivi de chaque patient aux différentes phases de la maladie permet de s'affranchir des variations interindividuelles : chaque patient est son propre contrôle.
- La présence d'un groupe placebo nous a donné l'opportunité d'analyser les paramètres cliniques, biologiques et immunologiques des patients, avant et pendant au moment de la rechute ainsi qu'en phase de rémission.

- Cette étude a également permis d'étudier d'éclairer certains effets du Rituximab sur le compartiment T.

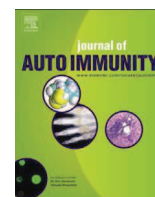
Ainsi, nous avons pu observer que les rechutes surviennent habituellement dans un délai court (quelques jours à semaines) après le début du sevrage chez les patients ayant reçu le placebo. Elles sont marquées par un effondrement des sous-populations Treg naturels ($CD4^+ CD25^{high} Foxp3^{high} CD127^{low}$), ainsi qu'une baisse profonde de l'IL-2. Ces perturbations sont restaurées en rémissions pendant toute la durée du suivi. De plus, ces modifications sont corrélées à une surexpression significative de C-mip, précédant la survenue de la rechute.

En revanche, la rémission obtenue dans le bras Rituximab entraîne une diminution de la fréquence des lymphocytes T folliculaires (Tfh), des iNKT et des cellules double-négatives DN-TCR Va24.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Autoimmunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jautimm

NEPHRUTIX: A randomized, double-blind, placebo vs Rituximab-controlled trial assessing T-cell subset changes in Minimal Change Nephrotic Syndrome

Ahmed Boumediene ^{a,1}, Pauline Vachin ^{b,c,1}, Kelhia Sendeyo ^{b,c}, Julie Oniszczyk ^{b,c}, Shao-yu Zhang ^{b,c}, Carole Henique-Greciet ^{b,c}, Andre Pawlak ^{b,c}, Vincent Audard ^{b,c,d,e}, Mario Ollero ^{b,c}, Vincent Guignonis ^f, Djillali Sahali ^{b,c,d,e,*}

^a Centre de Biologie et de Recherche en Santé, Hôpital universitaire Limoges Dupuytren, 87000, Limoges, France

^b Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 955, Equipe 21, Créteil, F-94010, France

^c Université Paris-Est-Créteil (UPEC), Faculté de Médecine, UMRS 955, Equipe 21, Créteil, F-94010, France

^d Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP), Groupe Henri-Mondor Albert-Chenevier, Service de Néphrologie-Transplantation, Créteil, F-94010, France

^e Institut francilien de recherche en néphrologie et transplantation, France

^f Département de Pédiatrie, Hôpital universitaire Limoges Dupuytren, 87000, Limoges, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 August 2017

Received in revised form

9 October 2017

Accepted 11 October 2017

Available online xxx

ABSTRACT

Minimal-change nephrotic syndrome (MCNS) is an immune-mediated glomerular disease. We have analyzed the modifications on T-cell subsets in twenty-three patients who were highly steroid/calcineurin inhibitor and/or mycophenolate mofetil-dependent for frequently relapsing nephrotic syndrome (FRNS) and who were enrolled in a multicenter, double-blind, randomized, placebo vs Rituximab-controlled trial. Patients with FRNS entered the trial at remission and were randomly assigned to receive either Rituximab or placebo. In both groups, patient blood samples were analyzed at inclusion and then monthly until six months post-perfusion. Disclosure of patient's allocation code occurred in relapse or at the end of the trial. All patients under placebo displaying relapse were subsequently treated with Rituximab.

Despite the significant decrease of immunosuppressive drugs, remission was maintained in all patients included in the Rituximab group, except one ($n = 9/10$). On the other hand, relapses occurred within a few weeks (means ≈ 7.3 weeks) in all patients receiving placebo ($n = 13$).

At inclusion, before rituximab therapy, the frequency of different T-cell subsets were highly similar in both groups, except for $CD8^+$ and invariant $TCRV\alpha 24$ T-cell subsets, which were significantly increased in patients of the Placebo group ($p = 0.0414$ and $p = 0.0428$, respectively). Despite the significant decrease of immunosuppressive drugs, remission was maintained in all patients included in the Rituximab group ($n = 10$), except one. Relapses were associated with a significant decrease in $CD4^+CD25^{high}FoxP3^{high}$ Tregulatory cells ($p = 0.0005$) and IL2 expression ($p = 0.0032$), while *CMIP* abundance was significantly increased ($p = 0.03$). Remissions after Rituximab therapy were associated in both groups with significant decrease in the frequency of $CD4^+CD45RO^+CXCR5^+$, invariant natural killer T-cells (iNKT) and $CD4^-CD8^-$ (double-negative, DN) T-cells expressing the invariant $V\alpha 24$ chain (DN-TCR $V\alpha 24$) T-cells, suggesting that MCNS involves a disorder of innate and adaptive immune response, which can be stabilized by Rituximab treatment.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Minimal change nephrotic syndrome (MCNS) is considered as a disease of immune origin, in which the hallmark is the sudden onset of massive proteinuria. MCNS is most frequent in children

* Corresponding author. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 955, Equipe 21, Créteil, F-94010, France.

E-mail address: dil.sahali@inserm.fr (D. Sahali).

¹ BA and PV contributed equally to this work.

and young adults. The nature of immune disorders involved in MCNS pathogenesis remains incompletely elucidated [1]. Several decades ago, it was suggested that MCNS is a systemic disorder of T-cell function [2]. This hypothesis was supported by several clinical observations such as the rapid occurrence of relapses upon antigen challenge (infections or immunization). Allergic manifestations such as contact dermatitis, rhinitis, and asthma might be observed, particularly in MCNS children. Several T-cell populations have been found perturbed during the active phase of the disease [3,4]. Studies on genetic polymorphisms in the variable region of the T-cell receptor (TCR) β -chain have revealed a selective recruitment of some variable β gene families in peripheral CD8⁺ T cells from nephrotic patients with frequent relapses [5]. Perturbations of immune system have been described during active MCNS including hyporesponsiveness of lymphocytes to mitogens, a decrease of delayed hypersensitivity [6], an increased suppressive cell activity, defective opsonization and abnormal immunoglobulin production [7]. Reactive oxygen species (ROS) production by polymorphonuclear cells (PMN) was found increased in MCNS relapse and restored to normal levels in remission [8].

Recently, the finding that Rituximab, a B-cell-depleting agent, maintains long-lasting MCNS remission points out a role for B lymphocyte in the mechanisms of the disease and adds complexity about the origin of immune disturbances [9,10]. Remission following B-cell depletion suggests that glomerular disease could be induced by some B lymphocyte subsets such as autoreactive B-cells but some arguments advocate a more intricate mechanism: (i) immunofluorescence studies on renal biopsies consistently show the absence of Ig deposits in MCNS relapse and (ii) remission can be maintained despite complete recovery of peripheral B-cell compartment, while relapses can occur in presence of sustained depletion of B cells [11,12]. Beside their role in antibody-mediated mechanisms, B cells are also involved in antigen presentation, T-cell activation/regulation and production of cytokines and growth factors. Thus, B cells may facilitate disease activity by sustaining pathogenic T-cell responses through antibody-independent mechanisms. Rituximab is effective in autoimmune diseases primarily mediated by T-cells, such as type1 diabetes [13], immune thrombocytopenia [14] and autoimmune hepatitis [15]. Therefore, although Rituximab may be considered as an innovative therapeutic agent in frequent relapsing, steroid-dependent MCNS, the mechanisms by which it interferes with T-cell disorders remain unclear. Different immune cell types recirculate between the peripheral blood and secondary lymphatic organs such as lymph nodes. They include CD4⁺/CD8⁺ T cells, natural killer T (NKT) cells, B cells, T follicular helper cells and T regulatory cells (Tregs), which interact together in a complex network of innate-adaptive immunity able to provide an adapted immune response. Because these interactions are thought to be disrupted by B-cell depletion, we have addressed the question of which T-cell subsets are particularly affected by Rituximab therapy in patients with frequent relapses and highly dependent on steroids, mycophenolate mofetil (MMF) and calcineurin inhibitors (CAI).

2. Patients and methods

2.1. Patients

Patients were enrolled in a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial (NEPHRUTIX trial, NCT01268033). Two patients were excluded because of wrongly inclusion (they were steroid-resistant) and one patient lost to follow up and excluded by decision of the investigator. Clinical characteristics of patients and diverse treatment that were administrated before and after inclusion were summarized in Tables 1A and B. The strategy of

randomization is outlined in Fig. 1. Peripheral blood was obtained from patients at inclusion and during follow-up, at the time of relapse or every month until the end of the observation study (six months). Complete remission (CR) was defined as a return of urinary protein concentration to values within the normal range (UPCR <30 mg/mmol or trace or negative results on repeat urine albumin dipstick tests) associated with an albumin level > 30 gr/L. Relapse of MCNS in patients previously in CR was defined as an increase in proteinuria to above 3 g/24 h or a urine protein/creatinine ratio (UPCR) > 300 mg/mmol and a serum albumin level below 30 gr/L.

2.2. Cell staining

Cell membrane staining was performed with appropriate combinations of monoclonal conjugated antibodies. Four different panels were designed. For panel 1, cells were stained with the following monoclonal antibodies (Mab): CD3-V500, CD4-APC-H7, CD30-FITC, CD45RO-PECy7, CD57-APC, CD134-PECy5 (BD Bioscience, France) and CXCR5-PE (R&D systems, France). For panel 3, cell membrane staining was performed with the following Mabs: CD4-APC-H7, CD8-PerCP/Cy5.5, CD45-V500, CD161-APC, iNKT-PE [Mabs 6B11, BD Bioscience, (France) and V α 24-PECy7 (Beckman coulter, France)]. In panel 1 and 3, 100 μ L of peripheral blood were incubated with Mabs for 20 min in the dark. Red cells were lysed with ammonium chloride lysis solution. After 7 min incubation in the dark, samples were washed and centrifuged and cell pellets were then resuspended in 500 μ L of phosphate-buffered saline (PBS) and analyzed on flow cytometer. For panel 2, 100 μ L of peripheral blood were added to 2 ml of PBS and centrifuged for 5 min at 300 g. The pellet was washed two times in PBS, then suspended in 100 μ L of PBS and cells were labeled with the following antibodies: CD3-APCH7, CD19-PECy7, CD27-FITC, CD45⁺ PerCP/Cy5.5, IgD-PE and IgM-APC (BD Bioscience). After 20 min incubation in the dark, cells were washed once with 500 μ L of PBS, then centrifuged for 5 min at 300 g. The supernatant was removed and cells were suspended in 500 μ L of PBS and analyzed on fluorescence-activated cell sorting (FACS). In order to obtain consistent and reproducible results over time, specific applications (called application settings in BD FACS Diva software) were created using BD cytometer setup and tacking beads. The following isotypic antibody controls were appropriately included in each labeling experiment to define properly the expression of the different markers: mouse IgG1 kappa PE-Cy5, mouse IgG1 kappa-FITC, mouse IgG1 kappa-APC, mouse IgG1 kappa-PE (BD bioscience), and mouse IgG2b-PE (R&D Systems France) and mouse IgG1-PC7 (Beckman coulter).

2.3. Monitoring of regulatory T-cells (Treg cells)

Both membrane and intracellular labeling were used to quantify Treg cell population. For membrane staining, peripheral blood (50 μ L) was incubated for 15 min at room temperature in the dark with the following antibodies: CD3-PerCP-Cy5.5, CD4-FITC, CD25-APC and CD127-PE (BD Bioscience, France). After staining, cells were incubated for 7 min with 3.5 ml of BD FACS Lysing solution (BD Biosciences), then centrifuged for 5 min at 350 g. The cell pellet was suspended in 500 μ L of PBS and analyzed on flow cytometer. For intracellular FoxP3 staining, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from peripheral blood samples by density gradient centrifugation on Ficoll-Hypaque for 20 min at room temperature (Eurobio-AbCys). Cells were washed twice in RPMI Medium 1640 supplemented with 25 mM HEPES and GlutaMAXTM (Life Technologies), then suspended at a concentration of 10⁶ cells/mL in fetal bovine serum (FBS) buffer (BD Pharmingen). One hundred μ L of this cell suspension was used for the following

Table 1A

Clinical characteristics of patients randomized in the Rituximab group.

Patient IC ^a	Age (years)	Gender	Renal biopsy	Rel. number	Interval last relapse-inclusion (weeks)	Treatment at inclusion ^b	UP/Alb ^c at inclusion	Follow-up (6 months-Post RTX) ^d
M22	7	M	MCNS	10	28	P: 50 mg/2d Tac: 6 mg/d	0.07/34	CR
M01	9	M	no	>10	8	P:40 mg/2d MMF:1 g/d Tac:3 mg/d	0.07/43	CR
G19	11	M	MCNS	>10	20	P:15/2d CsA: 180 mg/d MMF: 2 g/d	0.15/41	CR
T04	14	M	MCNS	>10	3	P:60 mg/2d MMF:2 g/d	0.08	CR
L18	11	M	MCNS	>10	7	P: 50 mg/d CsA: 200 mg/d MMF: 2.8 g/d	0.08/40	CR
A13	16	M	MCNS	10	6	P:30/2d CsA: 240 mg/d	0.9/38	CR
B10	16	M	MCNS	>10	9	P: 30 mg/2d CsA: 220 mg/d MMF: 1,25 g/d	0.08/42	CR
K12	9	M	MCNS	>10	4	P:45 mg/2d Tac:6 mg/d	0.07/33	CR
M05	5	M	MCNS	10	5	P: 20 mg/2d Tac: 5 mg/d MMF: 0.5 g/d	0.08/40	Relapse 2d after the first injection (Up22 g/l; Alb = 20 g/l)
L16	13	M	MCNS	>10	8	P: 30 mg/2d CsA: 200 mg/d MMF: 1,5 g/d	0.2/36	CR

^a IC: identification code.^b d: day; mg: milligram; Tac: tacrolimus; P: prednisone; CsA: cyclosporin; MMF: mycophenolate mofetil; RTX: Rituximab.^c UP: urinary proteinuria (gr/L); Alb: albuminemia (gr/L).^d CR: complete remission.

membrane staining with CD3-PerCP-cy5.5, CD4-FITC and CD25-APC Mabs, followed by an intra-cytoplasmic staining of FoxP3 or isotypic control antibodies with the human FoxP3 buffer set from BD Pharmingen.

2.4. Flow cytometry analysis

Lymphocytes were selected according to forward and side scatter parameters or CD45 and side scatter.

For panel 1, lymphocytes were selected according to forward and side scatter parameters and T cells were gated on CD3 positive cells. Expression of CD45RO CXCR5 positive cells were obtained by gating on total CD4⁺ T cells. For panel 2, lymphocytes were also separated according to their expression of CD45 and the SSC parameter. For panel 3, Lymphocytes were gated according to SSC and CD45 expression. TCR V α 24 positive cells were calculated over total lymphocytes and then gated on CD4 and CD8 double negative cells. The invariant natural killer T cell (iNKT) antibody was used in this panel to identify a subset of all V α 24 positive cells. CD161 expression was set on different subsets of T cells. Expression of FoxP3 was set up on CD3 CD4 CD25 bright cells. The cursor separating negative from positive cells was placed according to the isotypic control (negative control). Expression of Treg cells was defined as CD3⁺CD4⁺CD25^{high} FoxP3^{high} CD127^{low}.

2.5. Extraction of total RNA and reverse transcription (RT), quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

In this study, the profile of signature cytokines for Th1 (IFN γ), Th2 (IL4) and Treg (IL2, TGF β) subsets was assessed in RNA from PBMC at different time points of the follow-up aiming to investigate whether some stages of the disease was associated with a particular T-cell polarization and differentiation. IL2 produced by

activated T-cells is required for Treg expansion, while IL10 is mostly produced by Th2 and Treg [16]. PBMC were collected at different time points as indicated above and total RNA was prepared, using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, California, USA) according to the manufacturer's instructions. All PCR reactions were carried out at the same time on frozen mRNA samples. The primer sequences and main PCR characteristics are summarized in Table 2. Primers were designed so that amplicons spanned intron/exon boundaries to avoid amplification of genomic DNA (Eurofins Genomics, France). Reverse transcription (RT) was performed with 2 μ g of total RNA, using random hexamer primers and SuperScript[®] III reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technology, CA). Amplification was carried out in a total volume of 20 μ L containing 10 ng of cDNA (except for 18S amplification where 1 ng of cDNA was used), 2 μ M of each primer and 1x Quantitect Sybr Green PCR mix, for 40 cycles of 15 s at 95 °C, 1 min at 60 °C. PCR product was detected using SYBR Green I dye (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Real-time qPCR reactions were performed as recommended by the manufacturer in triplicate in a Light Cycler 480 apparatus (Roche Applied Biosystems, France). All PCR data were normalized to 18S ribosomal RNA (rRNA) expression. Values above 32 cycles are not considered. Quantification was performed using the comparative C_T method (Applied Biosystems). Before using the $\Delta\Delta$ C_T method for quantitation, a validation experiment was performed to verify that efficiencies of target and control were similar. Relative expression was determined by normalizing expression of each target to 18S rRNA, and then comparing this normalized value to the normalized expression in a reference sample (P1, corresponding to the first value for each patient before perfusion of placebo or Rituximab) to calculate a -fold change value. Relative quantification and calculation of the range of confidence was performed by using the comparative threshold cycle ($\Delta\Delta$ CT) method.

Table 1B

Clinical characteristics of patients randomized in the Placebo group.

Patient IC ^a	Age (years)	Gender	Renal biopsy	Relapse number	Interval last relapse-inclusion (weeks)	Treatment at inclusion ^b	UP/Alb ^c at inclusion	Interval P 2-relapse (weeks)	UP/Alb ^c at relapse	Treatment at the time of relapse	Interval relapse –RTX (weeks)	Follow-up (6 months-Post RTX) ^d
S9	15	F	FSGS	>10	6	P:60 mg/d MMF:1 g/d Tac:6 mg/d	0.13/43	3	12/19	P: 50 mg/2d Tac: 4 mg/d	3	CR
R20	12	M	MCNS	>10	28	P:20 mg/d Tac: 8 mg/d MMF:1.5 g/d	0.06/42	11	8/29	P: 20 mg/d	6	CR
M3	11	F	MCNS	10	8	P:60 mg/2d CsA: 160 mg/d	0.04/28	15	23/24	P: 15 mg/2d	3	CR
T11	17	M	MCNS	>10	10	P: 60 mg/2d CsA: 140 mg/d MMF: 2 g/d	0.48/38	11	30/12	P: 45 mg/2d	12	CR
J17	11	F	MCNS	>10	4	P: 60 mg/2d CsA: 200 mg/d MMF:1.5 g/d	0.07/33	3	28/29	P: 60 mg/2d CsA: 150 mg/d	3	CR
C2	15	M	MCNS	>10	16	CsA: 250 mg/d MMF: 3 g/d	0.5/44	8	22/27	CsA: 60 mg/d	4	CR
V14	17	M	MCNS	>10	9	CsA: 220 mg/d MMF: 2 g/d	0.3/36	15	30/24	P: 10 mg/2d CsA: 60 mg/d	4	CR
L6	8	F	MCNS	>10	8	P: 60 mg/2d Tac: 4 mg/d	0.07/37	7	9/29	P: 60 mg/2d Tac: 1.5 mg/d	6	CR
S7	13	F	MCNS	>10	2	P: 30 mg/2d MMF:1.5 g/d	0.09/31	4	3/29	P: 30 mg/2d	3	CR
A15	16	M	no	>10	18	P:30/2d MMF:2 g/d	0.23/35	2	5/28	P: 22 mg/2d	12	CR
L24	7	F	MCNS	10	8	P: 20 mg/2d CsA: 120 mg/d	0.7/33	2	9/26	P: 22 mg/2d	5	CR
L25	8	M	MCNS	10	4	P: 50 mg/2d MMF: 1.2 g/d	0.06/36	8	30/11	P: 50 mg/2d CsA: 100 mg/d	8	CR
F26	10	F	MCNS	10	6	P: 50 mg/2d MMF:2 g/d	0.09/38	4	64/22	P: 37 mg/2d	4	CR

^a IC: identification code.^b d: day; mg: milligram; Tac: tacrolimus; P: prednisone; CsA: cyclosporin; MMF: mycophenolate mofetil; RTX: Rituximab.^c UP: urinary proteinuria (gr/L); Alb: albuminemia (gr/L).^d CR: complete remission.

2.6. Statistical analysis

To identify potential bias at the inclusion, both groups were compared to assess significant baseline difference for each objective data using the Mann-Whitney test. During the follow-up, each group was analyzed separately. An average value was calculated corresponding to the five values obtained for each patient during remission (between M1 and M5) and was named M1-M5. Similarly, an average value was calculated during the period “before relapse”, which may include up to three blood samples. Paired tests or one-way ANOVA with the Tukey's multiple comparisons test were used to evaluate statistical significance, within each group. Values of $P < 0.05$ were considered significant. Data represent the means $\pm$ SEM. and were prepared using the GraphPad Prism software, version 6.0 (San Diego, CA).

3. Results

3.1. Characteristics of patients and clinical course following rituximab therapy vs placebo

Twenty-three patients who were highly steroid/calcineurin inhibitor and/or mycophenolate mofetil-dependent and displaying frequently relapsing nephrotic syndrome (FRNS), were enrolled in this multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial (NEPHRITUX trial, NCT01268033). Renal biopsy was performed in all patients except one patient in each group. MCNS diagnosis was confirmed in all, except one patient who exhibited focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS) lesion. One patient

displayed minimal changes associated with mesangial proliferation (Table 1A–B). After randomization, patients were included in the Rituximab ($n = 10$) or the placebo arm ($n = 13$) (Fig. 1). The mean age at the time of randomization was not significantly different in both groups (Placebo: mean $\pm$ SEM: 12.31 ± 0.97 ; Rituximab: 11.1 ± 1.169 years). All patients were male in the Rituximab group, while 7/13 were female in the Placebo (Table 1A–B). The relapse number before inclusion was ≥ 10 in both groups. The interval between the last relapse and inclusion was not significantly different between both groups (9.8 vs 9.77 weeks).

Treatment at inclusion consisted of a triple therapy (steroids/CAI/MMF) in 6 (Rituximab) and 4 (Placebo) patients, steroids plus CAI in 3 patients from each group, steroids plus MMF in one (Rituximab) and 4 (Placebo) patients, and CAI plus MMF in 2 (Placebo) patients (Table 1A–B).

Patients received in remission either Rituximab or placebo (two infusions at one week-interval of Rituximab or isotonic serum saline). MMF was discontinued one week after the first infusion. CAI were progressively tapered by 25% of the baseline dose (at inclusion), every two weeks, starting after the second infusion (placebo or rituximab) and was stopped eight weeks later. Steroids were decreased every two weeks by 25% of the of the baseline dose until a minimal dose ranging from 5 to 7 mg every other day. Steroid tapering began two weeks after CAI discontinued.

Complete remission persisted in 9/10 patients under Rituximab, at least six months following infusion. One Rituximab patient displayed relapse two days after the first infusion of Rituximab and was excluded from further analysis.

The code disclosure was performed in patients exhibiting a

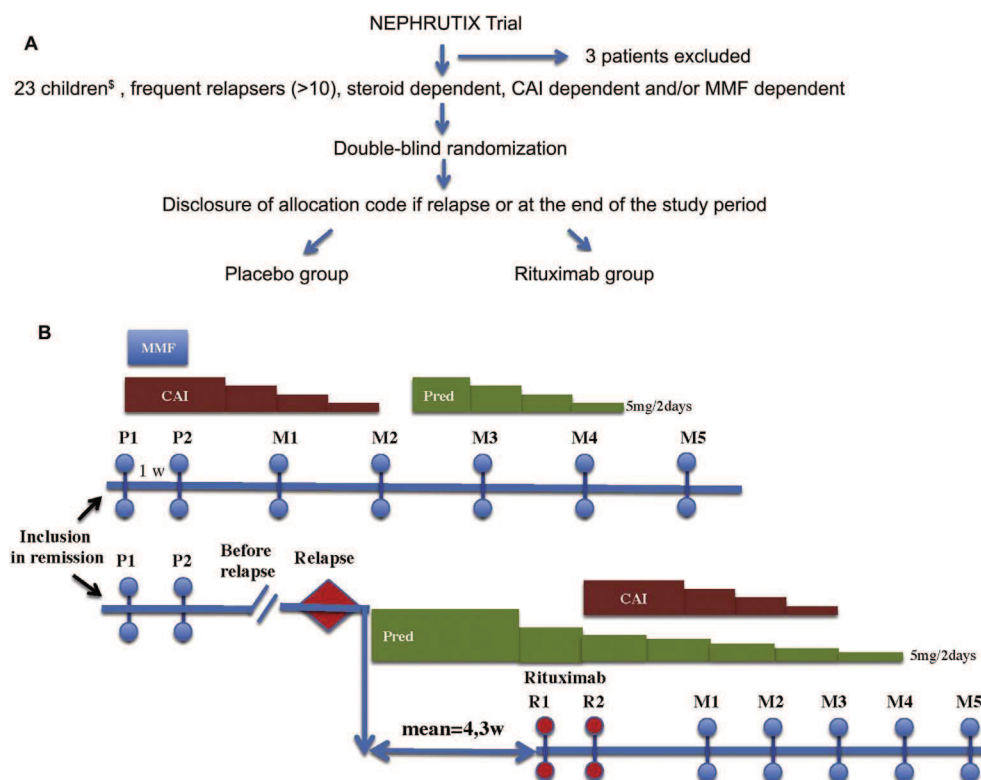


Fig. 1. (A) Flow chart of Nephrotic trial. ^s, Twenty-six patients were initially enrolled in this study. Two patients were excluded because of wrongly inclusion (they were steroid-resistant) and one patient lost to follow up and excluded by decision of the investigator. (B) Study protocol. Patients fulfilling the inclusion criteria were enrolled during the remission phase and were double-blind randomized to receive two perfusions (P) at 1-week interval. Blood samples were obtained from patients at inclusion and during follow-up, at the time of relapse or every month (M) until the end of the observation study (six months). The allocation code was disclosed after study completion or if relapse or severe adverse effect occurred. MMF (Mycophenolate mofetil) was discontinued at P2 infusion. Calcineurin inhibitors (CAI) dosage was reduced by 25% every two weeks starting 2 weeks after P2 infusion and then stopped. Prednisone (Pred) was tapered off by 25% every two weeks starting at M2 until to reach 5 mg every two days, which was maintained during the follow up. Patients who relapsed under placebo were treated by steroids to achieve remission, according to standard protocols. Subsequently, they were given Rituximab (R) with an average delay of 4,3 weeks from relapse. Then, the same tapering protocol (as in the first phase) was used except that tapering began with steroids followed by anticalcineurin (if cyclosporin or tacrolimus were not withdrawn during the blinded phase of the study).

Table 2
Oligonucleotides used for transcript amplification.

Cytokine	Accession number	Forward primer	Reverse primer	Annealing T°	Amplicon Size
IL-2	NM_000586.3	GAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAG	TCAGAAATTCACAATGGTTGCTGTCTC	55	172
IFN γ	NM_000619.2	TGGCTTAATCTCTCGGAACG	AAAAGAGTTCCATTATCCGCTACATC	56	176
IL-10	NM_000572.2	TCCTTGCTGGAGGACTTTAAGGGT	TGCTGGGTCTTGGTTCTCAGCTT	56	108
IL4	NM_000589.3	CTGCTCCCCCTCTGTCTCTCTGCTAG	CACAGTCGCAGCCCTGCAGAAGGT	60	206
TGF β	NM_000660.5	AAGTGGACATCAACGGGTTC	GTCCTTGCGGAAGTCAATGT	57	217
CMIP	NM_198390.2	CACCTAACGCTGGCCGACAACAG	GGTCTCGCAGGTAGCTATTGGCAG	58	189
18S	NR_003286.2	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCAATCGGTAGTAGCG	55	151

relapse during the study. All patients under placebo relapsed. Relapses occurred with a mean delay of 7.2 weeks after infusion. Seven patients relapsed under Prednisone alone with an average dose of 29.9 mg every other day (range: 15–45). Three patients relapsed under Prednisone (mean dose: 40 mg every other day) and Cyclosporine (mean dose: 103 mg/day) and two patients under Prednisone (mean dose: 55 mg every other day) and Tacrolimus (2.75 mg/day). The last patient relapsed within 8 weeks post infusion, immediately after discontinuation of Cyclosporine. Relapses were treated by Prednisone (60 mg/m²/day) alone in five patients, Prednisone and Cyclosporine (4 mg/kg/day) in five patients, Prednisone and Tacrolimus (0.2 mg/kg/day) in three patients.

All patients who relapsed were assigned to Rituximab therapy after attaining remission. The mean delay between relapse and the first Rituximab infusion was 5.9 weeks (range: 3–13). The protocol

of steroid decrease and immunosuppressive drugs tapering similar to that used above was adopted. Complete remission was achieved until the end of study (six months).

Patients included in this study are frequent relapsers and highly dependent on steroids, CAI and/or MMF. Remission was maintained in 9 out of 10 patients, despite tapering or discontinuation of immunosuppressive drugs. On the other hand, all patients receiving placebo relapsed during the follow-up. A monthly control was undertaken during the study period aiming to analyze the phenotype of T-cell changes and cytokine profiles.

3.2. Relapse modifies T-cell compartments, whereas rituximab affects mainly the CD4 CD45RO CXCR5 subset

The distribution of different T-cell compartments at inclusion between the two groups was analyzed to ascertain whether there

was a potential bias prior to initiation of treatment protocol. At inclusion, the frequency of CD3 and CD4 positive T-cells was not significantly different between both groups [P1-Placebo (P1-PL) vs P1-Rituximab (P1-Rtx): $p = 0.0535$ and $p = 0.2848$, respectively] but the percentage of CD8 T-cells was significantly lower in patients included in Placebo group ($p = 0.0414$) (Fig. 2A). In the latter, the proportion of CD3⁺T cells decreased in relapse ($p = 0.011$, one-way ANOVA), which mainly resulted from the reduction of CD8⁺T cells, while both subsets increased significantly in remission (CD3⁺: $p = 0.006$ relapse vs remission; CD8⁺: $p < 0.0001$ relapse vs remission) (Fig. 2A–C). In the Rituximab group, no significant difference between CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets was found at inclusion and after anti-CD20 therapy (Fig. 2A–C).

Memory T cells are classically defined by the expression of CD45RO isoform and the absence of CD45RA expression [17]. The global frequency of memory T cells was not altered in both groups (Fig. 3A). However, memory T cells exhibit extensive phenotypic complexity among subsets, which likely correspond to functional heterogeneity [17,18]. CD30 is a cell-surface molecule, member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and is expressed in a subset of circulating memory T cells. In placebo group (Fig. 3B), the frequency of CD4⁺CD45RO⁺CD30⁺ progressively increased, reaching a peak in relapse (P1 vs relapse: $p = 0.013$), then slightly decreased after Rituximab but remained above the values observed at the inclusion (P1 vs M1-M5: $p = 0.028$). No significant difference

was observed in their frequency between P1 and M1-M5 in Rituximab group.

Circulating memory T cells expressing the receptor CXCR5 (CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺) are a subset of non-polarized CD4⁺ follicular cells (T_{FH} cell) that drive naïve and memory B cells to differentiate into antibody-secreting cells. Previous reports suggest that MCNS patients exhibit a defect in antibody production [19,20], which prompted us to investigate whether this T-cell subset was altered during the follow-up. While no difference was found at inclusion, the proportion of T_{FH}-cell was significantly reduced after Rituximab therapy in both groups (P1 vs M1-M5: Placebo, $p = 0.013$; Rituximab, $p = 0.023$) (Fig. 3C).

Among the CD4⁺CD45RO⁺ memory T cells, CD134 defines the activated/effector memory T-cell subpopulation [21]. In this study, the frequency of CD134⁺ memory T cells did not differ between relapse and remission, before and after Rituximab therapy in both groups (Fig. 3D).

3.3. Rituximab affects selectively the double negative (DN) invariant T-cell subset

MCNS relapses often occur quickly following immunogenic challenges (viral infections, immunizations or allergens), suggesting the possible involvement of innate T cells like NKT cells in the pathogenesis. Depending on phenotype and cytokine profile,

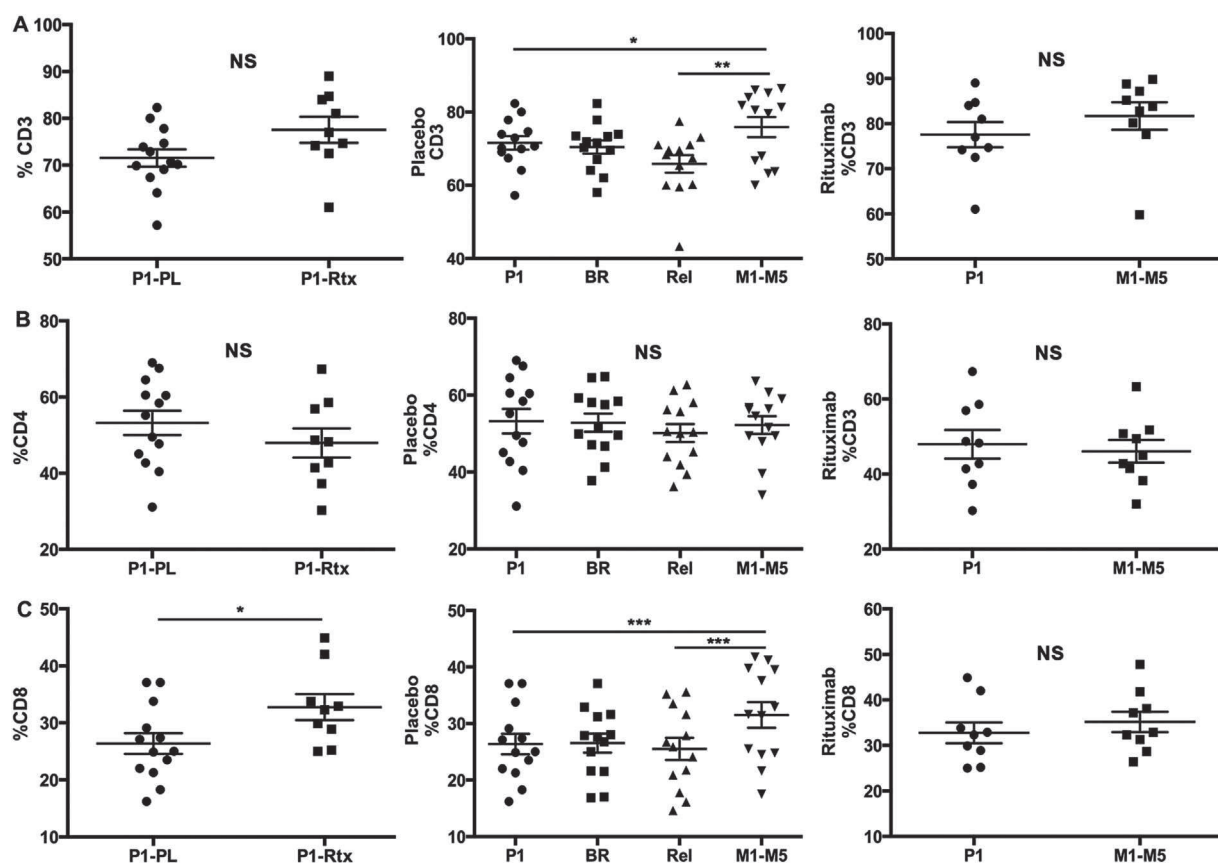


Fig. 2. Frequency of CD3⁺ (A), CD4⁺ (B) and CD8⁺ (C) subpopulations in Placebo and Rituximab groups. Plots indicate percentage values for each patient. Left panels (A–C) represent values at inclusion (P1) between placebo (P1-PL) and Rituximab (P1-Rtx). Data are presented with means $\pm$ SEM. No significant (NS) difference was observed at inclusion for CD3⁺ and CD4⁺ T-cell subsets (Mann-Whitney tests, $p = 0.055$ and $p = 0.2848$, respectively). The frequency of CD8⁺ T-cell subset is significantly lower in Placebo group (Mann-Whitney tests, $p = 0.04$). Middle and right panels show the modifications of CD3⁺ (one-way ANOVA, * $p = 0.0118$; paired test, ** $p = 0.069$) CD4⁺ (NS) and CD8⁺ T-cell subset during the follow-up (one-way ANOVA, *** $p < 0.001$; paired test, ** $p < 0.001$). Abbreviations: P1 (analysis obtained at the inclusion, before the first infusion (placebo or Rituximab); BR (before relapse); Rel (relapse) and M1-M5 [post Rituximab, analyses including month-1 (M1) to month-5 (M5) after Rituximab therapy (M1-M5)]. The value in BR corresponds to the average of all samples for each patient obtained during this period. In the same way, the M1-M5 period correspond to the average of all samples for each patient during the remission phase.

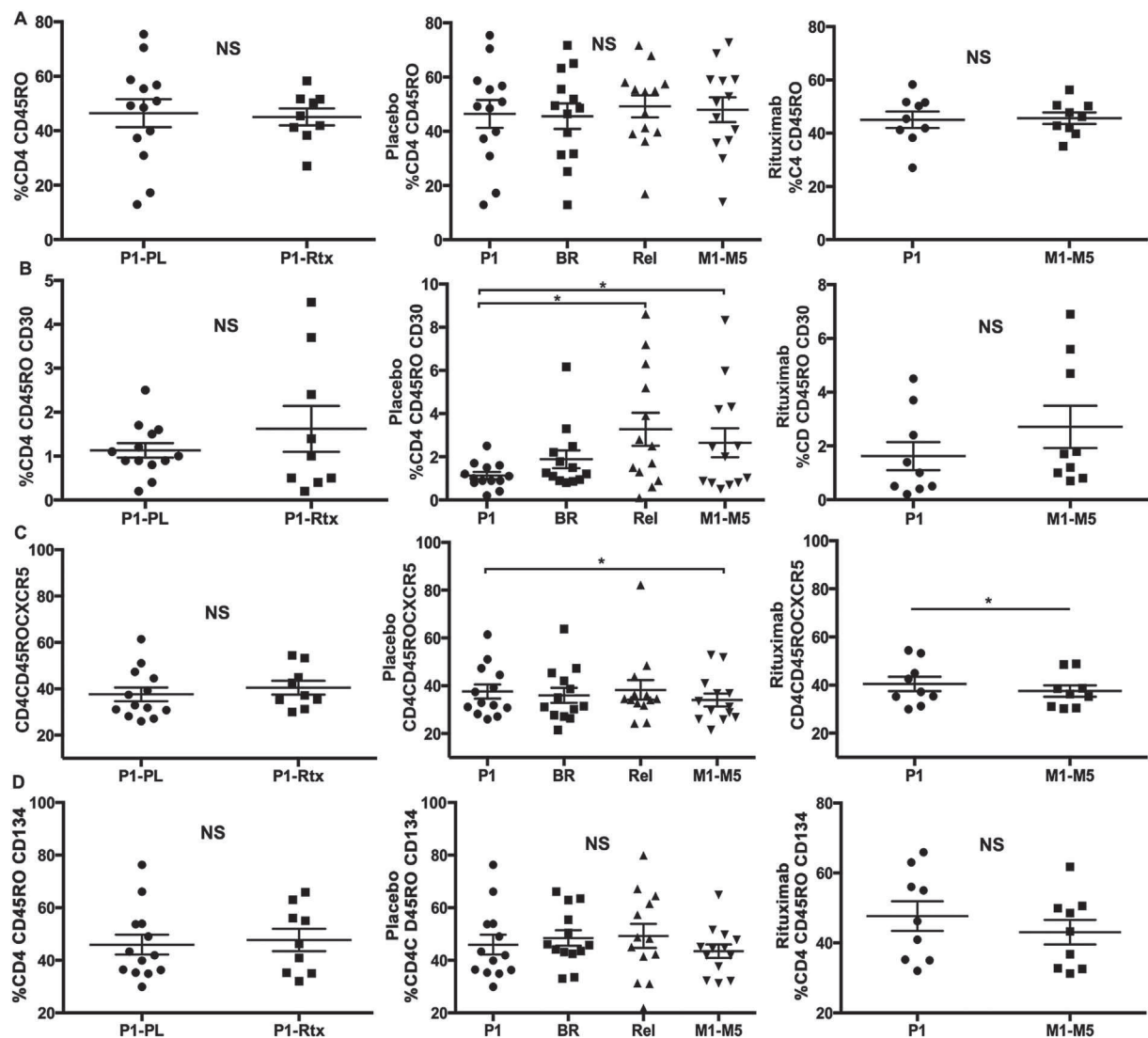


Fig. 3. Frequency of CD4⁺CD45RO⁺ (A), CD4⁺CD45RO⁺CD30⁺ (B), CD4⁺CD45RO⁺CXCR5⁺ (C) and CD4⁺CD45RO⁺CD134⁺ (D) T-cell subsets in patients of Placebo and Rituximab groups. Data are presented with means $\pm$ SEM [B, Rel vs P1 * p = 0.013 and M1-M5 vs P1 * p = 0.028; C, Placebo, M1-M5 vs P1 * p = 0.026; Rituximab, M1-M5 vs P1 * p = 0.023, paired tests].

several NKT-cell subsets have been identified [22,23]. The best characterized NKT cell population is the invariant NKT (iNKT) cells, also referred to as type-I NKT cells, which is a subset of invariant T cells co-expressing NK receptors together with invariant TCR α -chain (V α 24) mainly paired with V β 11 chain. In human, invariant T cells and iNKT may express either CD4 or CD8 antigen, or be CD4 CD8 double negative (DN: CD3⁺CD4[−]CD8[−]) and recognize lipid antigens presented in the context of the non-polymorphic MHC class I-like CD1d molecules. They represent a small population of PBMC with some degree of individual variability (0.01–0.5% of PBMC), but their frequency seems remarkably stable in each healthy subject over time and is not influenced by gender [24,25].

We analyzed the frequency of T cells bearing the NK receptor CD161 (also named NKR1A), which is expressed by the majority of NKT cells. We did not observe any difference between CD4⁺CD161⁺ and CD8⁺CD161⁺ T-cell subsets within both groups (data not shown). Invariant T cells were identified with an anti-V α 24 Mab, while the 6B11 Mab recognizing the invariant complementarity-determining region 3 (CDR3) loop of V α 24/J α 18 TCR α -chain was used to specifically analyze the iNKT cell subpopulation [26], as specified in material and methods. Although relapses occurred

concomitantly with an infectious event in 5/13 patients in the Placebo group, we did not observe any significant difference in iNKT distribution at inclusion and during relapse (Fig. 4A). However, their frequency was significantly diminished after Rituximab in both groups (Placebo: P1 vs M1-M5, p = 0.015, and BR vs M1-M5, p = 0.020; Rituximab: P1 vs M1-M5, p = 0.039). The proportion of DN-iNKT subset decreased after rituximab in placebo group, without reaching a statistical significance (Fig. 4B). The frequency of T cells recognized by V α 24 alone (TCR α 24) was slightly higher than iNKT cells and did not exhibit significant difference in both groups at several time points, albeit this subpopulation was higher in placebo group at inclusion (Fig. 4C). Conversely, the proportion of DN-TCR α 24 T-cells was significantly downregulated by Rituximab (Fig. 4D) in both groups (Placebo: P1 vs M1-M5, p = 0.0026; BR vs M1-M5, p = 0.004, and Rel vs M1-M5, p < 0.0001; Rituximab: P1 vs M1-M5, p = 0.02).

3.4. Depletion of CD4⁺CD25^{high}FoxP3^{high} T cells (Treg) in relapse

Previous studies on MCNS have suggested a quantitative and/or qualitative defect in Treg cell population [27,28], while MCNS may

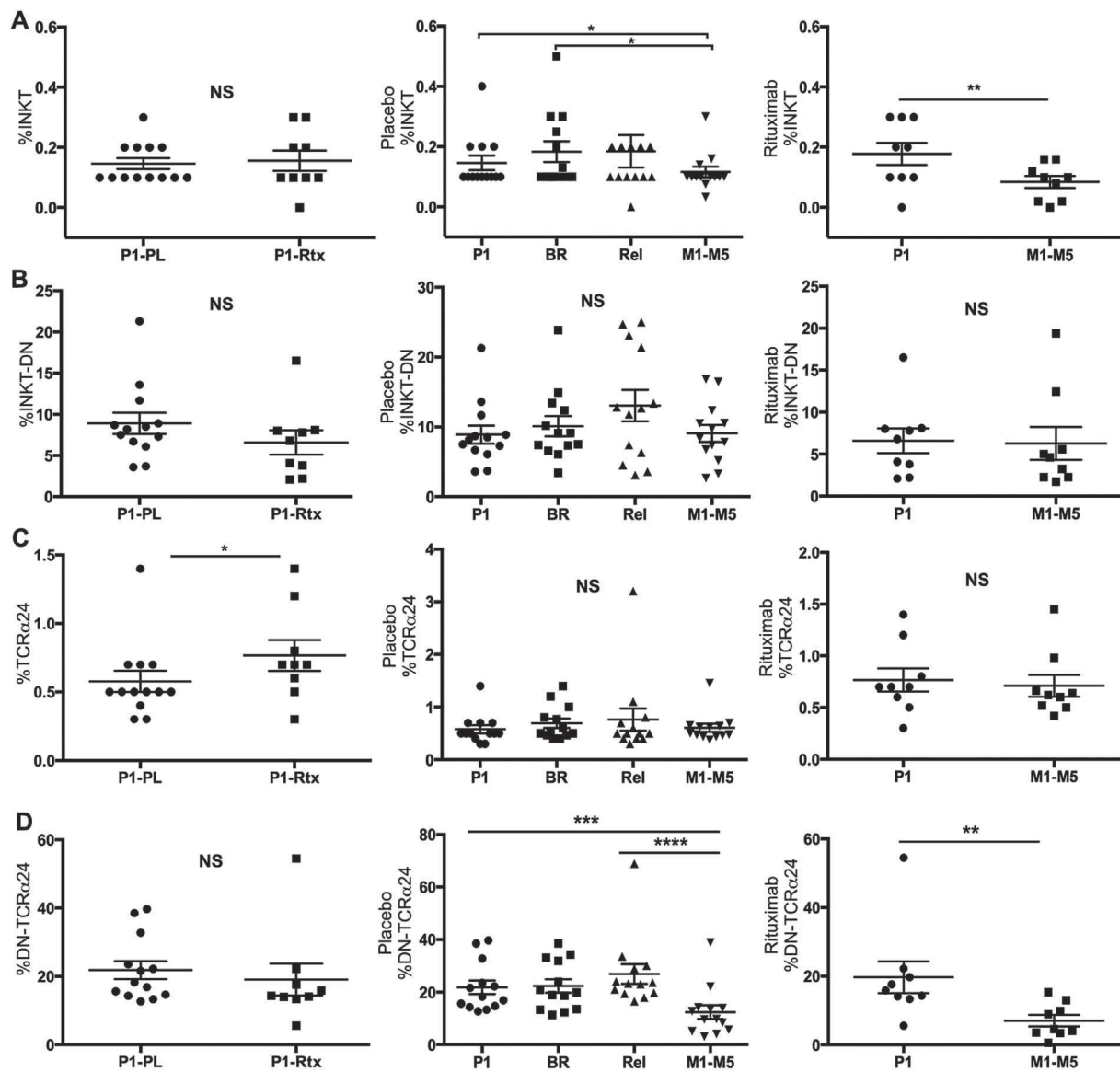


Fig. 4. Frequency of total INKT (A), DN-INKT (B), TCRα24 (C) and DN-TCRα24 (D), in patients included in Placebo or Rituximab group. Data are presented with means $\pm$ SEM (A, Placebo: P1 vs M1-M5 * p = 0.015, BR vs M1-M5 * p = 0.020; Rituximab group, ** p = 0.0039, Paired tests; C, Placebo: P1-PL vs P1-Rtx * p < 0.042, Mann-Whitney test; D, Placebo: one-way ANOVA, **** p < 0.0001; paired test, M1-M5 vs Rel **** p < 0.0001; Rituximab: paired test, P1 vs M1-M5 **, p = 0.0065).

occur in patients with FoxP3 mutations [29,30]. However, no study has documented the frequency as well as the natural course of Treg subset in the same patients before, at the time of relapse and remission phases, as well as following B-cell depletion. The percentage of FoxP3^{high} was measured on CD4⁺CD25^{high} subset as indicated in Fig. 5A. A representative monitoring of CD4⁺CD25^{high}FoxP3^{high}T-cell in a patient of the placebo group is shown in Fig. 5B. At inclusion, the proportion of Treg was not significantly different between both groups (p = 0.068) (Fig. 5C). In patients receiving placebo, the frequency of CD4⁺CD25^{high}FoxP3^{high} sharply declined in relapse but increased again in remission (BR vs Rel; p = 0.0001, M1-M5 vs Rel, p = 0.0005) (Fig. 5C). In the Rituximab group, a significant difference was observed between P1 and after rituximab therapy (p = 0.0078) (Fig. 5C).

3.5. Monitoring of cytokine changes during disease course and rituximab therapy

We analyzed by real time quantitative PCR the expression of

several cytokines at inclusion and during the course of disease. The For each cytokine, the value at inclusion (P1) in each group was considered as a reference from which the fold change was determined at different time-points of the follow up (Fig. 6). Variations of IFN γ expression were not noticeable in any group. In the Placebo group, TGF β was increased in relapse and remained at similar levels after Rituximab, while no significant change was observed in the Rituximab group. By contrast, IL4 decreased during relapse and increased in remission. IL-10 mRNA abundance was significantly increased in the placebo group at M1-M5 comparatively to BR, but not in Rituximab group. Noteworthy, IL-2 mRNA abundance was significantly decreased in relapse when compared with the remission phases (relapse vs BR, p = 0.0032, and relapse vs M1-M5, p = 0.0031, paired tests), but no significant difference was observed in the Rituximab group (P1 vs M1-M5, p = 0.09, paired tests).

The expression of CMIP has been found increased in T cells from MCNS relapse [4], but the influence of Rituximab on its regulation has not been reported yet. In this work, we took advantage of the multiple samples available from each patient for CMIP analysis by

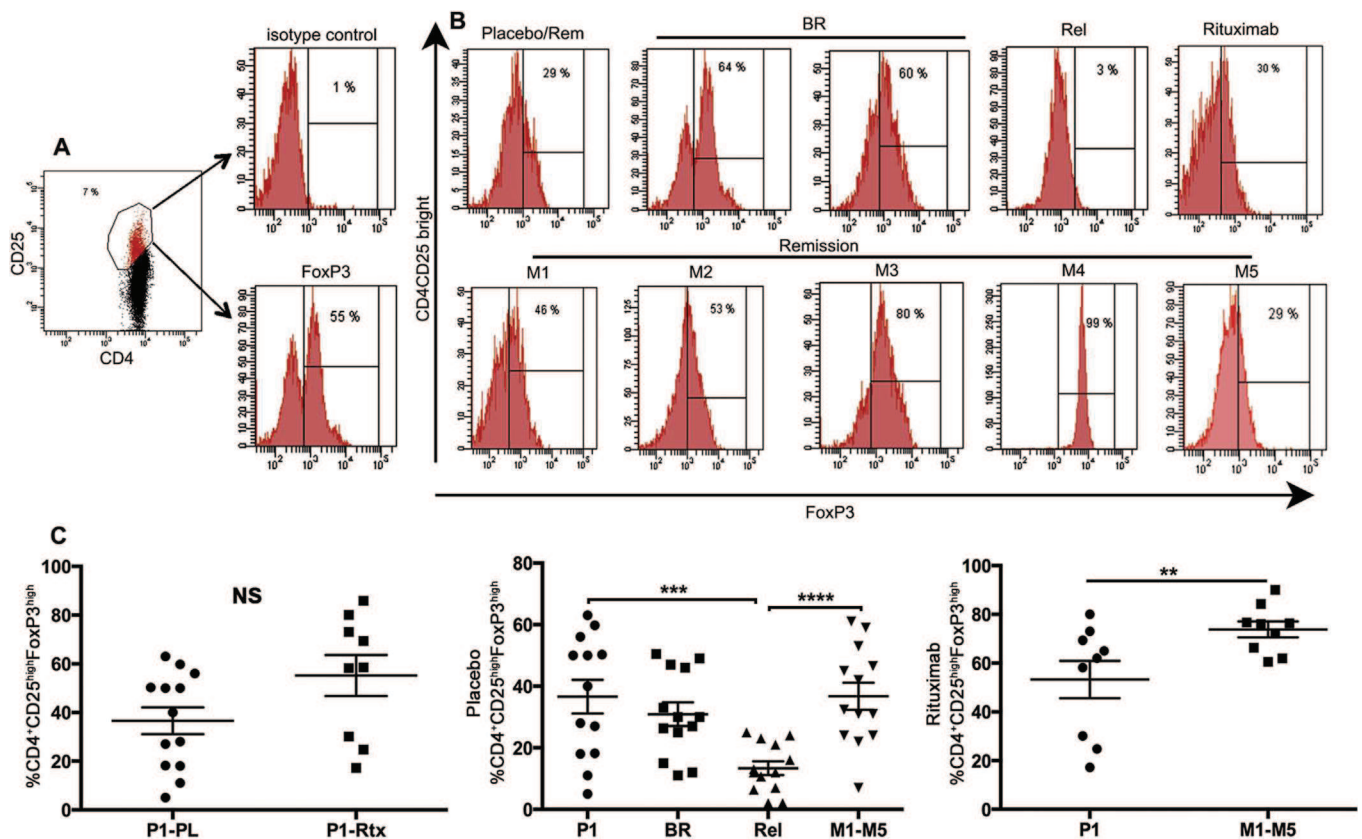


Fig. 5. (A) Flow cytometric analysis of FoxP3 expression in CD4⁺CD25⁺ cells. Positive cells were determined according to appropriate isotype control. Numbers indicate the percentage of positive cells. (B) FoxP3 expression and fluctuation of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-cells in the course of the disease. Numbers indicate the percentage of positive cells. (C) Frequency of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells. Data are presented with means $\pm$ SEM (Placebo: Rel vs P1, ***, $p = 0.0009$; Rel vs M1-M5, ****, $p < 0.0001$, paired tests; Rituximab: ** $p = 0.0078$).

real time-PCR. Because all patients who initially received placebo relapsed within a few weeks, we had the opportunity to study *CMIP* expression at several times of disease. We found *CMIP* expression increased in relapse and downregulated in remission ($p = 0.03$) (Fig. 6). A similar trend was observed in the Rituximab group, except in two patients who displayed a higher level than that at inclusion, but no statistical significance was observed.

4. Discussion

Rituximab has become an essential alternative for MCNS patients who exhibit frequent relapses requiring sustained steroid and/or immunosuppressive drugs to achieve remission [9,10]. In many instances, Rituximab allows tapering or withdrawal of therapy, while it maintains long-lasting remissions. The immune mechanisms underlying the effect of B-cell depletion in MCNS are unclear, especially as the disease is not associated with antibody production and some arguments suggest as T-cell mediated [1,31,32]. Indirectly, B-cell depletion can affect T-cell subsets interacting with B cells in lymphoid follicles [33].

We took advantage of this randomized trial to study the influence of Rituximab on T-cell disorders in these patients with highly active disease, without any preconceptions. We have also focused our attention on T-cell subsets known to be involved in T-B-cell cooperation. This study is original by several aspects. First, the double-blind randomization controlled trial avoids confounding variables and biased patient selection. Second, the placebo group gives us the opportunity to analyze many clinical, biological and immunological parameters before, at the time of relapse and during

remission. Third, as B and T cells cross talk, this study may unveil some immunological effects on T-cell compartments underlying the clinical benefit of Rituximab. This is especially interesting inasmuch that Rituximab can maintain remission of relapse even occurring in the absence of peripheral B cells [12].

In the placebo group, Rituximab was introduced after steroid-induced remission. Therefore, the contribution of steroids to the normalization of T-cell perturbations should be considered. Nevertheless, there are several arguments suggesting a potential effect of Rituximab. First, on inclusion, patients were under high doses of steroids and immunosuppressive drugs, but this did not prevent relapses in the placebo group. Second, the most statistically significant data were observed between relapse and remission. Third, several T-cell subsets display significant differences between both remission phases, preceding relapse and after rituximab therapy. However, an additional effect of steroids in sustained remission is credible, despite decreased doses of steroids and immunosuppressive drugs.

Our results suggest that Rituximab does not interfere with CD4⁺ T-cell, CD8⁺ T-cell or CD45RO⁺ T-cell frequencies, while relapse is associated with downregulation of CD8⁺ T-cell subset and an increase in the frequency of CD4⁺CD45RO⁺CD30⁺ circulating memory T-cell subset, which are involved in recall memory antibody responses [34]. On the other hand, Rituximab, but not relapse, reduces specifically the frequency of T_H cells. Since disturbances in antibody production in relapse have been reported several decades before the introduction of rituximab in MCNS [19,20,35], this result suggests that the involvement of T_H cell, if any, may result from qualitative rather than quantitative alterations of this subset.

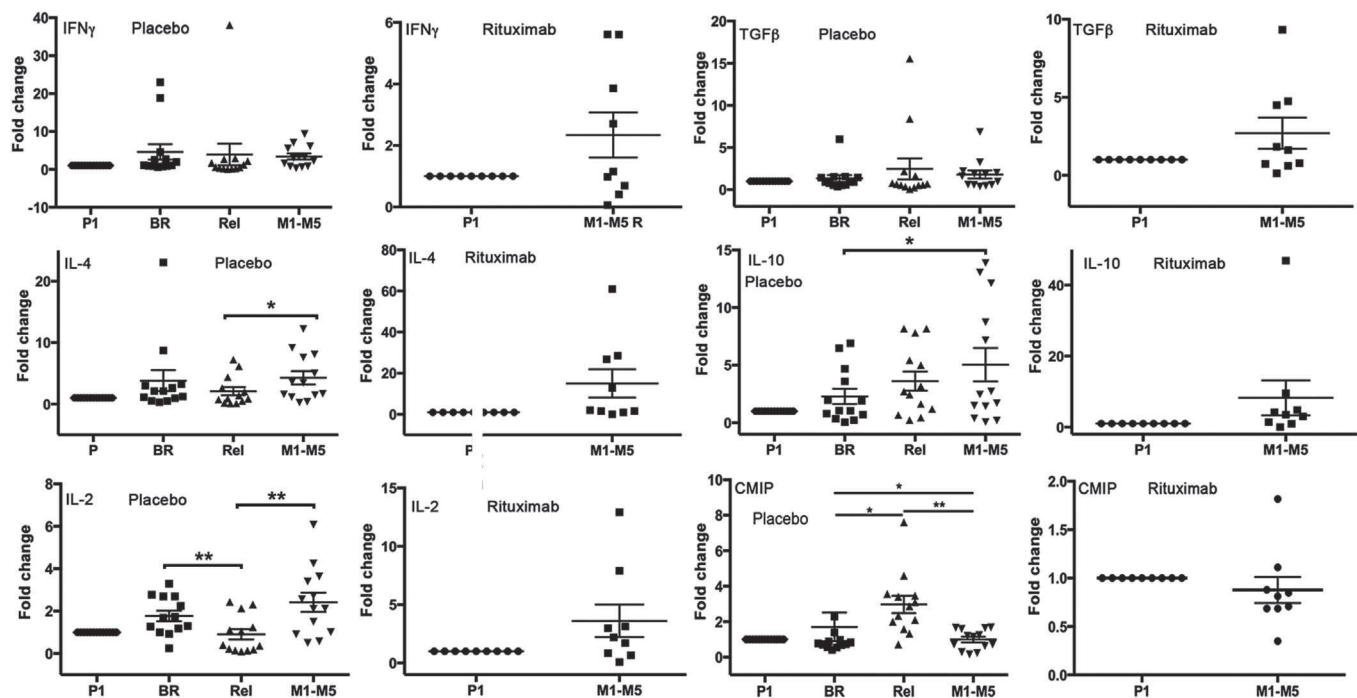


Fig. 6. Monitoring of IFN γ , TGF β , IL4, IL2 and IL10 and CMIP transcripts by real time quantitative PCR. The expression of IFN γ did not significantly change at several time points (Placebo: BR vs Rel, $p = 0.53$, and Rel vs M1-M5, $p = 0.72$; Rituximab: P1 vs M1-M5, $p = 0.10$, paired tests), as well as for TGF β (Placebo: BR vs Rel, $p = 0.43$, and Rel vs M1-M5, $p = 0.75$; Rituximab group: P1 vs M1-M5, $p = 0.13$, paired tests). IL4 decreased during relapse and increased significantly in remission (Placebo: BR vs Rel, $p = 0.383$, BR vs M1-M5, $p = 0.199$, and Rel vs M1-M5, $p = 0.027$; Rituximab: P1 vs M1-M5, $p = 0.07$, paired tests). IL10 expression (Placebo) was significantly increased in remission ($p = 0.033$, BR vs M1-M5, paired test). Note that IL2 displayed the most significant decrease during relapse (Rel vs BR, $**p = 0.0032$, and M1-M5 vs Rel, $**p = 0.0031$, paired tests). Expression of CMIP. In placebo group, the transcript level was significantly increased in relapse as compared with BR (*, $p = 0.030$ Rel vs BR) and remission following Rituximab therapy (***, $p = 0.0002$ Rel vs M1-M5).

A study analyzing the T-cell profile in children with primary FSGS has recently been reported [36]. The authors have included twenty-two patients who were treated bimonthly with rituximab (375 mg/m²), between two and four infusions. At inclusion, 10 patients (45.4%) were nephrotic, 15 (68.2%) displayed not otherwise specified-type FSGS and 18 (81.8%) were steroid resistant. Patients were divided into two groups depending on their response to rituximab. It was found that responders display lower response to *in vitro* PMA/ionomycin activation, characterized by lower percentage of CD3⁺CD4⁺CD154⁺, IFN γ ⁺CD3⁺ and IL-2⁺CD3⁺ T-cell subsets compared with non-responders [36]. These results suggest that hyporesponsiveness to T-cell stimulation could be used to identify FSGS patients susceptible to respond to rituximab. Our study is different with respect to several aspects: (i) our cohort included patients with MCNS proven biopsy (21 MCNS and 1 FSGS) and were all in remission at inclusion; (ii) our patients were steroid-sensitive albeit highly dependent; (iii) only two rituximab infusions at weekly intervals have been used in our study and (iv) it is currently unclear whether non-genetic FSGS and MCNS share similar or distinct immunopathological pathogenesis. However, a low reactivity of lymphocytes to mitogens has also been reported in MCNS relapse, highlighting a possible immunological link between both diseases [6]. Regardless of immune perturbations, the beneficial effect of Rituximab in twelve pediatric patients with FSGS displaying early resistance to steroids (75%) is clearly documented in this study and very promising for the management of this entity.

As for T cells, the role of B cells in MCNS pathogenesis remains to be clarified. The frequency of B-cell subpopulations before and after rituximab therapy has recently been investigated in 28 pediatric patients [37]. This study shows that memory B cell recovery is faster in patients who relapse compared to non-relapsers. More

specifically, relapses were associated with more rapid reconstitution of switched memory B cells [37]. Rituximab is thought to erase germinal center B cells in human lymph nodes, without affecting the T_{HH}-cell population [38]. This raises the possibility that the delayed reconstitution of switched memory B cells could result from qualitative alterations of T_{HH} cells induced by B-cell depletion. Indeed, expansion of switched memory B cells requires cognate T_{HH} cells since it is abrogated in the absence of IL-21 receptor or CD40 ligand [39].

As reported by other investigators [27,28], MCNS relapses are associated with a significant decrease of Treg, but our data show that their frequency before relapse (in the absence of Rituximab) and after Rituximab therapy are not significantly different, suggesting that Treg restoration occurred in remission regardless of the type of therapy. The downregulation of Treg cells in relapse was correlated with a significant decrease in IL-2, which is crucial to the development and maintenance of Treg cells [16,40]. Experimental evidence suggests that Treg cells contribute to control of humoral response by limiting expansion of T_{HH} and B cells [41]. Depletion of Treg cells increases switched B cells, while adoptive transfer of Treg cells suppress *in vivo* B-cell response. Interestingly, Treg cells prevent expansion of autoreactive B cells and induce their apoptosis by a Fas-Fas ligand- or by granzyme/perforin-mediated mechanisms [42–44]. Thereby, downregulation of Treg may lead to escapement of autoreactive, potentially switched memory B, which may contribute to the development of autoimmune diseases in susceptible individuals [45].

Inasmuch that the decrease in Treg subset during relapse is associated with a reduction of IL2 production, it was postulated that administration of exogenous IL2 may increase the generation of Treg from naive effector T cells and could induce remission [46]. In a

pilot study, IL2 was given in five patients (3 FSGS and 2 MCNS) who were resistant to both steroid and immunosuppressive drugs [46]. Unfortunately, although circulating Treg increased in 4 patients, notably in two MCNS, no effect on glomerular syndrome was observed. Because these patients displayed apparently an early resistance to different immunosuppressive drugs, the possibility that disease results from a primary genetic podocyte defect cannot be ruled out even though mutations of NPHS1, NPHS2 and WT1 have been excluded.

Clinical remissions in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus are associated with an increase in INKT cell frequency following Rituximab therapy [47,48]. In contrast, our findings show a significant depletion of global INKT cells, particularly the DN-TCR V α 24 T cell subset. The INKT cells behave as “poised effector cells” displaying an unusual effector and memory phenotype at steady state, characterized by rapid release of high amounts of Th1 and Th2 cytokines upon stimulation, thus contributing to innate and adapted immune responses [49]. In addition, INKT cells interact with B cells and enhance antibody responses in a CD1d and CD40-restricted mechanism [48,50,51].

Although our trial is double-blind randomized study, we acknowledge that it has certain limitations, mainly due to small sample size in each group and the shorter duration of follow up. Nonetheless, INS is a rare glomerular disease and because the limited number of rituximab indications in these patients, it remains deeply difficult to design a larger prospective study. In addition, this study includes only patients with severe chronic disease who are highly dependent of multiple therapies including steroids, anticalcineurines and mycophenolate Mofetil and most of them have received during the disease course cyclophosphamide or Chlorambucil. A long-term study is required to determine whether some T-cell perturbations identified in this trial could be anticipate the risk of relapse.

In conclusion, this clinical trial gave us the opportunity to monitor patients and study changes in different T-cell compartments before and after rituximab therapy. Our results suggest that relapse are associated with inhibition of IL2 production and a loss of Treg cells, alongside with an expansion of a particular memory T-cell subset (CD4⁺CD45RO⁺CD30⁺), while remissions in both groups are associated with downregulation of a T-cell subset involved in innate immunity (DN-TCR α 24). The new T-cell subsets identified in this study might have a potential impact in T cell-B cell cooperation. This latter could be targeted by Rituximab therapy and highlights this disease as a disorder of innate and adaptive immune response.

Competing interests

The authors declare that they do not have any competing financial, personal, or professional interests.

Conflict of interest

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the French Ministry of Health (PHRC, project number 16-03/2009). P Vachin was supported by grants from the Ministère de la Recherche.

References

- [1] M. Colucci, G. Corpetti, F. Emma, M. Vivarelli, Immunology of idiopathic nephrotic syndrome, *Pediatr. Nephrol.* (2017), <https://doi.org/10.1007/s00467-017-3677-5> [Epub ahead of print].
- [2] R.J. Shalhoub, Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function, *Lancet* 2 (1974) 556–560.
- [3] K. Yan, K. Nakahara, S. Awa, Y. Nishibori, N. Nakajima, S. Kataoka, et al., The increase of memory T cell subsets in children with idiopathic nephrotic syndrome, *Nephron* 79 (1998) 274–278.
- [4] D. Sahali, A. Pawlak, S. Le Gouvello, P. Lang, A. Valanciute, P. Remy, et al., Transcriptional and post-transcriptional alterations of IkappaBalpha in active minimal-change nephrotic syndrome, *J. Am. Soc. Nephrol.* 12 (2001) 1648–1658.
- [5] C. Frank, M. Herrmann, S. Fernandez, D. Dirnecker, M. Boswald, W. Kolowos, et al., Dominant T cells in idiopathic nephrotic syndrome of childhood, *Kidney Int.* 57 (2000) 510–517.
- [6] P. Fodor, M.T. Saitua, E. Rodriguez, B. Gonzalez, L. Schlesinger, T-cell dysfunction in minimal-change nephrotic syndrome of childhood, *Am. J. Dis. Child.* 136 (1982) 713–717.
- [7] S. Zhang, V. Audard, Q. Fan, A. Pawlak, P. Lang, D. Sahali, Immunopathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome, *Contrib. Nephrol.* 169 (2011) 94–106.
- [8] R. Bertelli, A. Trivelli, A. Magnasco, M. Cioni, M. Bodria, A. Carrea, et al., Failure of regulation results in an amplified oxidation burst by neutrophils in children with primary nephrotic syndrome, *Clin. Exp. Immunol.* 161 (2010) 151–158.
- [9] V. Guignon, A. Dallochio, V. Baudouin, M. Dehennault, C. Hachon-Le Camus, M. Afanetti, et al., Rituximab treatment for severe steroid- or cyclosporine-dependent nephrotic syndrome: a multicentric series of 22 cases, *Pediatr. Nephrol.* 23 (2008) 1269–1279.
- [10] K. Iijima, M. Sako, K. Nozu, R. Mori, N. Tsuchida, K. Kamei, et al., Rituximab for childhood-onset, complicated, frequently relapsing nephrotic syndrome or steroid-dependent nephrotic syndrome: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial, *Lancet* 384 (2014) 1273–1281.
- [11] A.L. Sellier-Leclerc, V. Baudouin, T. Kwon, M.A. Macher, V. Guerin, H. Lapillonne, et al., Rituximab in steroid-dependent idiopathic nephrotic syndrome in childhood—follow-up after CD19 recovery, *Nephrol. Dial. Transpl.* 27 (2012) 1083–1089.
- [12] I.M. Rood, J. Huussen, J.F. Wetzels, J.K. Deegens, Rituximab can induce remission of nephrotic syndrome in the absence of peripheral B-cells, *Nephrol. Carlt.* 20 (2015) 667–668.
- [13] L. Yu, K. Herold, H. Krause-Steinrauf, P.L. McGee, B. Bundy, A. Pugliese, et al., Rituximab selectively suppresses specific islet antibodies, *Diabetes* 60 (2011) 2560–2565.
- [14] L. Guo, R. Kapur, R. Aslam, E.R. Speck, A. Zufferey, Y. Zhao, et al., CD20+ B-cell depletion therapy suppresses murine CD8+ T-cell-mediated immune thrombocytopenia, *Blood* 127 (2016) 735–738.
- [15] K. Beland, G. Marceau, A. Labardy, S. Bourbonnais, F. Alvarez, Depletion of B cells induces remission of autoimmune hepatitis in mice through reduced antigen presentation and help to T cells, *Hepatology* 62 (2015) 1511–1523.
- [16] E.M. Shevach, A.M. Thornton, tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences, *Immunol. Rev.* 259 (2014) 88–102.
- [17] D.L. Farber, N.A. Yudanin, N.P. Restifo, Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis, *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 24–35.
- [18] M. Pepper, M.K. Jenkins, Origins of CD4(+) effector and central memory T cells, *Nat. Immunol.* 12 (2011) 467–471.
- [19] B.L. Warshaw, I.J. Check, IgG subclasses in children with nephrotic syndrome, *Am. J. Clin. Pathol.* 92 (1989) 68–72.
- [20] M.J. Kemper, H. Altrogge, R. Ganschow, D.E. Muller-Wiefel, Serum levels of immunoglobulins and IgG subclasses in steroid sensitive nephrotic syndrome, *Pediatr. Nephrol.* 17 (2002) 413–417.
- [21] T. Damayanti, T. Kikuchi, J. Zaini, H. Daito, M. Kanehira, K. Kohu, et al., Serial OX40 engagement on CD4+ T cells and natural killer T cells causes allergic airway inflammation, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 181 (2010) 688–698.
- [22] A. Bendelac, P.B. Savage, L. Teyton, The biology of NKT cells, *Annu. Rev. Immunol.* 25 (2007) 297–336.
- [23] E.E. Hillhouse, S. Lesage, A comprehensive review of the phenotype and function of antigen-specific immunoregulatory double negative T cells, *J. Autoimmun.* 40 (2013) 58–65.
- [24] P.T. Lee, A. Putnam, K. Benlagha, L. Teyton, P.A. Gottlieb, A. Bendelac, Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis, *J. Clin. Invest* 110 (2002) 793–800.
- [25] K. Bienemann, K. Iouannidou, K. Schoenberg, F. Krux, S. Reuther, O. Feyen, et al., iNKT cell frequency in peripheral blood of Caucasian children and adolescent: the absolute iNKT cell count is stable from birth to adulthood, *Scand. J. Immunol.* 74 (2011) 406–411.
- [26] C.J. Montoya, D. Pollard, J. Martinson, K. Kumari, C. Wasserfall, C.B. Mulder, et al., Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11, *Immunology* 122 (2007) 1–14.
- [27] C. Araya, L. Diaz, C. Wasserfall, M. Atkinson, W. Mu, R. Johnson, et al., T regulatory cell function in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome, *Pediatr. Nephrol.* 24 (2009) 1691–1698.
- [28] L.L. Liu, Y. Qin, J.F. Cai, H.Y. Wang, J.L. Tao, H. Li, et al., Th17/Treg imbalance in adult patients with minimal change nephrotic syndrome, *Clin. Immunol.* 139 (2011) 314–320.
- [29] Y. Hashimura, K. Nozu, H. Kanegane, T. Miyawaki, A. Hayakawa, N. Yoshikawa, et al., Minimal change nephrotic syndrome associated with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome, *Pediatr. Nephrol.* 24 (2009) 1181–1186.
- [30] E. Park, H.J. Chang, J.I. Shin, B.J. Lim, H.J. Jeong, K.B. Lee, et al., Familial IPEX

- syndrome: different glomerulopathy in two siblings, *Pediatr. Int. Off. J. Jpn. Pediatr. Soc.* 57 (2015) e59–61.
- [31] P.W. Mathieson, Minimal change nephropathy and focal segmental glomerulosclerosis, *Semin. Immunopathol.* 29 (2007) 415–426.
 - [32] A.A. Eddy, J.M. Symons, Nephrotic syndrome in childhood, *Lancet* 362 (2003) 629–639.
 - [33] C. King, S.G. Tangye, C.R. Mackay, T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses, *Annu. Rev. Immunol.* 26 (2008) 741–766.
 - [34] F.M. Gaspal, M.Y. Kim, F.M. McConnell, C. Raykundalia, V. Bekiaris, P.J. Lane, Mice deficient in OX40 and CD30 signals lack memory antibody responses because of deficient CD4 T cell memory, *J. Immunol.* 174 (2005) 3891–3896.
 - [35] J. Giangiacomo, T.G. Cleary, B.R. Cole, P. Hoffsten, A.M. Robson, Serum immunoglobulins in the nephrotic syndrome. A possible cause of minimal-change nephrotic syndrome, *N. Engl. J. Med.* 293 (1975) 8–12.
 - [36] C.Y. Chan, I.D. Liu, L.P. Resontoc, K.H. Ng, Y.H. Chan, P.Y. Lau, et al., T lymphocyte activation markers as predictors of responsiveness to rituximab among patients with FSGS, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 11 (2016) 1360–1368.
 - [37] M. Colucci, R. Carsetti, S. Cascioli, F. Casiraghi, A. Perna, L. Rava, et al., B cell reconstitution after rituximab treatment in idiopathic nephrotic syndrome, *J. Am. Soc. Nephrol.* 27 (2016) 1811–1822.
 - [38] E.F. Wallin, E.C. Jolly, O. Suchanek, J.A. Bradley, M. Espeli, D.R. Jayne, et al., Human T-follicular helper and T-follicular regulatory cell maintenance is independent of germinal centers, *Blood* 124 (2014) 2666–2674.
 - [39] F. Zabel, A. Fettelschoss, M. Vogel, P. Johansen, T.M. Kundig, M.F. Bachmann, Distinct T helper cell dependence of memory B-cell proliferation versus plasma cell differentiation, *Immunology* 150 (2017) 329–342.
 - [40] R. Sharma, S.M. Fu, S.T. Ju, IL-2: a two-faced master regulator of autoimmunity, *J. Autoimmun.* 36 (2011) 91–97.
 - [41] C.M. Alexander, L.T. Tygrett, A.W. Boyden, K.L. Wolniak, K.L. Legge, T.J. Waldschmidt, T regulatory cells participate in the control of germinal centre reactions, *Immunology* 133 (2011) 452–468.
 - [42] D.M. Zhao, A.M. Thornton, R.J. DiPaolo, E.M. Shevach, Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes, *Blood* 107 (2006) 3925–3932.
 - [43] W. Janssens, V. Carlier, B. Wu, L. VanderElst, M.G. Jacquemin, J.M. Saint-Remy, CD4+CD25+ T cells lyse antigen-presenting B cells by Fas-Fas ligand interaction in an epitope-specific manner, *J. Immunol.* 171 (2003) 4604–4612.
 - [44] R.S. Bystry, V. Aluvihare, K.A. Welch, M. Kallikourdis, A.G. Betz, B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4, *Nat. Immunol.* 2 (2001) 1126–1132.
 - [45] T. Tiller, M. Tsuiji, S. Yurasov, K. Velinzon, M.C. Nussenzweig, H. Wardemann, Autoreactivity in human IgG+ memory B cells, *Immunity* 26 (2007) 205–213.
 - [46] A. Bonanni, R. Bertelli, R. Rossi, M. Bruschi, A. Di Donato, P. Ravani, et al., A pilot study of IL2 in drug-resistant idiopathic nephrotic syndrome, *PLoS One* 10 (2015), e0138343.
 - [47] V. Parietti, H. Chiffot, J. Sibilia, S. Muller, F. Monneaux, Rituximab treatment overcomes reduction of regulatory iNKT cells in patients with rheumatoid arthritis, *Clin. Immunol.* 134 (2010) 331–339.
 - [48] A. Bosma, A. Abdel-Gadir, D.A. Isenberg, E.C. Jury, C. Mauri, Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells, *Immunity* 36 (2012) 477–490.
 - [49] P.J. Brennan, M. Brigl, M.B. Brenner, Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013) 101–117.
 - [50] G. Galli, P. Pittoni, E. Tonti, C. Malzone, Y. Uematsu, M. Tortoli, et al., Invariant NKT cells sustain specific B cell responses and memory, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 3984–3989.
 - [51] G.A. Lang, T.S. Devera, M.L. Lang, Requirement for CD1d expression by B cells to stimulate NKT cell-enhanced antibody production, *Blood* 111 (2008) 2158–2162.

CMIP inhibits lipid rafts signaling and inactivates cofilin-1 in T-lymphocytes

La pathogénie du syndrome néphrotique idiopathique (SNI) reste inconnue, mais de nombreux arguments cliniques et expérimentaux semblent montrer que c'est une pathologie dys-immunitaire, à expression immunologique et rénale. Notre laboratoire a isolé un nouveau gène C-MIP dont l'expression est induite dans certaines sous-populations lymphocytaires T et B, ainsi que dans les podocytes de patients atteints de SNI en phase de poussée mais quasiment indétectables chez les sujets sains.

Le gène C-MIP code pour une protéine de 86 kDa qui possède un domaine plekstrine et un domaine riche en leucine. Des données récentes laissent supposer que C-mip est une protéine adaptatrice impliquée dans la régulation négative de l'activation T (89).

Afin de comprendre son rôle, un modèle de souris transgénique a été créé. La séquence codant pour C-mip humain a été introduite par recombinaison homologe dans le locus de l'hypoxanthine phospho-ribosyl-transférase (Hprt), sous le contrôle du promoteur distal Lck, majoritairement exprimé dans les LT matures.

Ces souris transgéniques présentent un profil phénotypique altéré avec une accumulation de LT naïfs associé à une inhibition de la synthèse des cytokines de type TH1 (IFN γ), TH2 (IL-4) mais également du marqueur d'activation IL-2. *In vivo*, nous avons observé une hypo-réactivité des lymphocytes T transgéniques, corrigée après ajout d'IL-2. Ces résultats suggèrent que la surexpression de C-mip est associée à une inhibition de l'activation des lymphocytes T.

Nous avons émis l'hypothèse d'une anomalie de phosphorylation des protéines impliquées dans la signalisation proximale. En Western blot, les lysats protéiques des souris transgéniques présentent une hypo-phosphorylation des protéines de poids moléculaire apparent compris entre 60 et 70 kDa. Cette région comprend, entre autres, les membres de la famille des Src kinases qui sont impliqués dans les premières étapes de l'activation T. Comparés aux souris sauvages, les souris transgéniques présentent une diminution de pTyr⁴¹⁸-Src, spécifique des Src kinases actives. Cette baisse est associée à une augmentation de pTyr⁵⁰⁵-Lck (forme inactive), de pTyr⁵²⁸-Fyn (forme inactive) et à une diminution de pTyr³¹⁹-Zap70. Ces formes inactives sont de plus augmentées dans les lipids rafts. Ces données suggèrent que C-mip inhibe la signalisation proximale.

Après co-activation CD3/CD28, le double marquage immuno-fluorescent par la toxine

cholérique et l'anticorps anti-Src kinase sur les LT de souris sauvages et transgéniques montre que C-mip altère le regroupement des micro-domaines lipidiques et la relocalisation des Src dans ces micro-domaines. L'étude dynamique par vidéo-microscopie a montré que l'expression de C-mip dans les LT transgéniques s'oppose à la formation de la synapse immunologique indispensable à l'activation T.

En conclusion, la surexpression de C-mip induit une régulation négative des cytokines activatrices de type TH1 et TH2 et est à l'origine d'une altération des phases précoces de l'activation T. D'autre part, les souris transgéniques présentent un phénotype lymphocytaire altéré marqué par une accumulation de LT naïfs. Il est probable qu'en inhibant les Src kinases et plus spécifiquement Lck, C-mip s'oppose à la fois à l'activation effectrice des LT mais également à leur maturation. Ces résultats suggèrent donc que C-mip est un régulateur négatif de l'activation T impliqué dans la signalisation proximale lymphocytaire et pourrait être impliqué dans l'hypo-réactivité lymphocytaire observée chez les patients atteints de SNLGM en phase de poussée.

CMIP inhibits lipid raft signaling and inactivates cofilin-1 in T-lymphocytes

Pauline Vachin^{1,2*}, Kelhia Sendeyo^{1,2*}, Cerina Chhuon³, Julie Oniszczyk^{1,2}, Anissa Moktefi^{1,2}, Shao-yu Zhang^{1,2}, Vincent Audard^{1,2,4,5}, Ida Chiara Guerrero³, Giuseppe Astarita⁶, Andre Pawlak^{1,2}, Dil Sahali^{1,2,4,5†} and Mario Ollero^{1,2}

1, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMRS 955, Equipe 21, Créteil, F-94010, France.

2, Université Paris Est, Faculté de Médecine, UMRS 955, Equipe 21, Créteil, F-94010, France.

3, Proteomic Platform Necker, PPN-3P5, Structure Fédérative de Recherche SFR Necker US24, 75015, Paris, France.

4, AP-HP, Groupe Henri-Mondor Albert-Chenevier, Service de Néphrologie, Créteil, F-94010 France.

5, Institut francilien de recherche en néphrologie et transplantation.

6, Department of Biochemistry and Molecular & Cellular Biology, Georgetown University, Washington, DC, USA.

*These authors contributed equally to this work.

†Address correspondence to Dil Sahali, INSERM U 955. Phone : 33149812537 ; Fax : 33149812539 ; email : dil.sahali@inserm.fr

Running title: CMIP inhibits T cell signaling

Abstract

Upon interaction with cognate antigen, T cells integrate different extra and intracellular signals, involving basal and induced protein–protein interactions as well as binding of proteins to lipids, which can lead to activation or inhibition of the cells. We show that selective T-cell expression of CMIP, a new adaptor protein, by targeted transgenesis drives T-cell toward a naïve phenotype. We found that CMIP inhibits activation of Src kinases Fyn and Lck after CD3/CD28 costimulation, and their subsequent localization in lipid rafts. Video microscopy analysis shows that CMIP blocks the recruitment of LAT and the lipid raft marker cholera toxin B at the site of TCR engagement. Proteomic analysis identified several protein clusters differentially modulated by CMIP and notably Cofilin-1, which is inactivated in CMIP- expressing T-cells, suggesting that CMIP negatively impacts proximal signaling and cytoskeletal rearrangement. These results suggest that CMIP defines a new mechanism of negative regulation of T-cells, which could be considered as a potential therapeutic target.

Introduction

T-cells play a central role in adaptive immunity through a close interplay with humoral and cellular sensors of innate immunity (1). T-cell activation is initiated by ligation of the TCR by an appropriate peptide bound to a major histocompatibility (MHC) complex molecule, which triggers rapid Src kinases-mediated phosphorylation of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a conserved domain of signal transducing chains of the TCR complex (2). Phosphorylated ITAMs serve as binding sites for ZAP-70 kinase, which is activated by phosphorylation by the Src kinase Lck resulting in stability of the ITAM-ZAP 70 interaction. The clustering of active TCR and the recruitment of Src kinases, Lck and Fyn in T-cells, and ZAP-70 occurs in lipid rafts, which are plasma membranes microdomains enriched in cholesterol and glycosphingolipids and serve as signaling platforms (3). Activation of ZAP-70 induces phosphorylation at multiple tyrosine residues of the transmembrane adapter molecule LAT (linker for activation of T-cells) and leukocyte phosphoprotein of 76 kDa (SLP-76) contributing to generate through protein-protein or protein-lipid interactions a multicomplex signaling within lipid rafts. Activation of costimulatory molecules such as CD28 promotes the recruitment of kinases and adaptors proteins within lipid rafts, which induce cytoskeletal reorganization leading to formation of immunological synapse. Immobilization of signaling molecules by cytoskeletal actin filaments and scaffold proteins may facilitate more efficient signal transmission from rafts to downstream signaling cascades, ultimately resulting in activation of transcription factors such as NFAT, AP-1 and NF- κ B (4).

The predicted structure of the 86-kDa natural isoform of CMIP includes an N-terminal region containing a pleckstrin homology domain (PH), a middle region characterized by the presence of several interacting docking sites, including a 14-3-3 module, a PKC domain, three potential ERK domains and an SH3 domain similar to the p85 regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), as well as a C-terminal region containing a leucine-rich repeat (LRR) domain.

Sequence analysis of CMIP coding regions shows strong identity (99%) between human, mice and rat species. The basal expression of CMIP transcript is very low in adult tissues and the protein is scarcely detectable physiological conditions. Conversely, CMIP is upregulated at the mRNA and protein levels in some diseases associated with immune disorders. Therefore, we generated transgenic mice overexpressing CMIP selectively in mature lymphocytes aiming to understand the role of CMIP in T cell signaling.

Results

Generation of CMIP transgenic mice

To analyze the functional consequences of CMIP overexpression *in vivo*, we used a targeting system in which a construct containing a single copy of the human CMIP coding sequence downstream of the Lck distal promoter was inserted into the X-linked hypoxanthine phosphoribosyltransferase (Hprt) locus by homologous recombination (Fig. 1A). It has been established that Lck distal promoter drives transgene expression in peripheral T-cells (5). We obtained six founders, which were crossed with wild-type BALB /c mice and backcrossed repeatedly to obtain a homogeneous BALB /c genetic background. Because the transgene is expressed in the X chromosome, all mice analyzed within the current study were hemizygous males from F10 to F18 generation and confirmed by tail genotyping (Fig. 1B). The expression of the transgene was demonstrated at the transcriptional level in splenic T- cells (Fig. 1C). Although the endogenous CMIP transcript was detected in wild-type splenic T-cells, immunofluorescence labeling using two different polyclonal antibodies detected a significant signal in transgenic mice, but scarcely in control littermates (Fig. 1D). Examination of thymus, node and spleen during the follow-up showed that the basal phenotype of transgenic mice was substantially normal and no lymphoproliferative syndrome was observed until one year of age (data not shown).

CMIP transgenic mice exhibit a “naïve” T-cell phenotype

To assess the influence of CMIP expression on T-cell compartments, we determined by FACS analysis the frequency of main peripheral T-cell subsets. Splenocytes from 12 week- old mice were purified and stained with CD4, CD8, CD44 and CD62L antibodies. Although the number of CD3 T-cells and the percentage of either CD4⁺ or CD8⁺ T-cells was comparable between wild-type and transgenic mice (n= 5 mice for each group) (Fig. 2, A and B), the frequency of naïve CD4⁺ T-cells (CD4⁺CD44^{low}CD62L^{high}) and naïve CD8⁺ T-cells

(CD8⁺CD44^{low}CD62L^{high}) were significantly increased in Tg mice, whereas the frequency of memory and effector T-cells (CD44^{high}CD62L^{high} and CD44^{high}CD62L^{low}, respectively) was decreased in both Tg CD4⁺ and CD8⁺ T-cells (Fig. 2, *C* and *D*). We next analyzed T-cell proliferative ability following CD3/CD28 stimulation. T-cells were cultured *ex-vivo* in quiescent conditions (six hours in the presence of 2% FCS), and then incubated in 10% FCS complete medium in the presence of anti-CD3/CD28 antibodies (1 μ g/ml each). After staining with CFSE at day 0, T-cells were allowed to proliferate for 5-6 days, then analyzed by flow cytometry. As attested by CFSE dilution, the percentage of dividing T-cells was lower in transgenic T-cells as compared with control littermates (Fig. 2*E*). The addition of IL-2 in the medium culture restores the proliferative capacity of transgenic T-cells to control levels (Fig. 2*F*).

Transgenic T-cells display an impaired response to CD3-CD28 stimulation

To examine the effects of CMIP on T-cells, we first studied the CMIP transgene expression in T-cells isolated by negative immunoselection, under resting and stimulating conditions. T-cells were starved in RPMI medium containing 2% FCS for six hours at 37°C, then activated with anti-CD3/CD28 (1 μ g/ml each). The abundance of the endogenous CMIP transcript quantified by real time RT-qPCR, rapidly fell upon CD3/CD28 stimulation (Fig. 3*A*) and the endogenous protein was scarcely detected by Western-blot (Fig. 3*B*). On the other hand, the CMIP transgene was significantly increased at the mRNA and protein level at the early stages and reached a peak one hour after activation (Fig. 3, *A* and *B*). We next analyzed whether the expression of CMIP transgene was associated with a particular pattern of cytokine production in T-cells isolated by negative immunoselection. Because the transgene abundance started a decline from 2h post-activation, we analyzed cytokine expression during the first hours following CD3/CD28 activation by real time RT-qPCR in five mice of each group. As compared with T-cells from control littermates, transgenic T-cells exhibited a lower amount of

IL-2, IL-4 and IFN γ , whereas IL-10 was increased (Fig. 3C). Altogether, these results suggest that overproduction of CMIP is mainly associated with an inhibition of T-cell activation.

CMIP expression is associated with inactivation of Src kinases

In physiological situations, activation of T-cell results in a series of phosphorylation cascades that ultimately result in cellular proliferation, differentiation and cytokine production. The lower reactivity of transgenic T-cells in response to CD3-CD28 stimulation led us to investigate whether they display a phosphorylation defect in some components playing a key role in early signaling. T-cells were synchronized (six hours in the presence of 2% FCS), then stimulated with anti-CD3/CD28 antibodies, and total protein lysates were collected at one hour post-activation, and analyzed by Western blotting using anti-phosphotyrosine monoclonal antibody 4G10. Control T-cells exhibited a major phosphorylation within a region spanning 60-70 kDa, which was barely detected in Tg T-cells (Fig. 4A). This region includes, among others, the members of the Src kinase family, which are involved in the early steps of T-cell activation (6). Src kinase family comprises nine members of which, Lck and Fyn are most abundant in T-cells and play a crucial role in immune response (7). Therefore, we tested the reactivity of protein lysates with an anti-Src antibody that recognizes the phosphotyrosine (pTyr) site at the 418 residue, specific of active Src kinases. A decrease of pTyr⁴¹⁸-Src in transgenic T-cells was clearly observed, culminating 15 min after activation (Fig. 4B). The early events of T-cell activation involve the clustering of T-cell receptor and costimulator molecules, as well as the recruitment of Src kinases Fyn and Lck into lipid rafts (3). Lck phosphorylates the ITAM motifs at intracellular CD3 domains and induces ZAP70 recruitment (8). We evaluated the levels of pTyr⁵⁰⁵-Lck, specific of inactive form, after T-cell stimulation. The abundance of pTyr⁵⁰⁵-Lck was increased in transgenic T-cells at baseline and persisted until 60 min after CD3/CD28 stimulation, when compared with control T-cells (Fig. 4C). This event was associated with an accumulation of inactive Fyn (pTyr⁵²⁸ Fyn) and a

lower abundance of active Zap 70 (pTyr³¹⁹- Zap 70) (Fig. 4, *D* and *E*). Interestingly, immunofluorescence analysis showed that pTyr⁴¹⁸-Src was confined to a compartment of plasma membrane at 30 and 60 min post-activation in control T-cells, this formation was not detected in Tg T-cells (Fig. 4*F*).

Transgenic T cells show accumulation of inactive Fyn and Lck in lipid rafts

We investigated whether the clustering of lipid rafts is compromised by a possible defect in activation of Src kinases Fyn and Lck in transgenic T-cells. We purified lipid rafts by the detergent-free OptiPrep method, in resting conditions and 30 min following activation by anti-CD3/CD28 antibodies (1 μ g/ml each). We tested the distribution of flotillin-1 and cholesterol by Western blotting and found them enriched in lipid raft fractions (Fig. 5*A*). Both total forms of Fyn and Lck were found mostly localized to lipid rafts with similar amounts, except in transgenic T-cells where total Lck level was reduced in lipid rafts after 30 min activation. In resting conditions, the relative abundance of pTyr⁵²⁸-Fyn (inactive form) in lipid rafts was twice higher in transgenic T-cells as compared to control littermates (Fig. 5*B*). In activated T-cells, the relative abundance of pTyr⁵²⁸-Fyn was dramatically increased in transgenic T-cells, whereas it remained at low levels in control littermates (Fig. 5*B*). Although we found no difference in its abundance in resting conditions, pTyr⁵⁰⁵-Lck was significantly increased in lipid rafts in activated transgenic T-cells as compared to control littermates (Fig. 5, *A* and *C*). These results suggest that the lower reactivity of transgenic T-cells may result from an inactivation of Src kinases in lipid raft linked to CMIP-mediated inhibition of proximal signaling.

CMIP alters the the glyco/ganglio-sphingolipid metabolism

To examine whether CMIP overexpression modifies the dynamics and the lipid composition of cell membranes, we performed a lipidomic analysis using an independent cellular model, mouse podocytes stably transfected with the CMIP coding sequence. Principal component

analysis (PCA) of our lipidomic data showed a clear clustering of our samples into two groups, discriminating CMIP-transfected from control empty vector-transfected cells (EV). Fig. 6A shows a PCA in which both positive and negative ions are combined. The lipids that contributed most to the variance between groups were isolated using ANOVA $p < 0.001$ and fold change > 5 . Pathway topology analysis searching among KEGG pathways using Metabolomics Pathway Analysis (MetPA) showed that CMIP expression had a strong impact on sphingolipid metabolism (Fig. 6B). Additionally, an independent over-representation analysis across multiple pathways sources using IMPaLa confirmed that the most significant alteration affected the glyco/ganglio-sphingolipid metabolism (Data file *S1*). Consistently, the levels of GM3 and GM2 species showed a significant decrease, whereas the levels of GM1 species increased in CMIP-expressing compared to control cells (Fig. 6C).

Transgenic T cells fail to polarize during CD3/CD28 costimulation

T-cell polarization after CD3/CD28 stimulation involves the migration and aggregation of lipid raft microdomains at the site of immunological synapse formation (9).

We evaluated whether the distribution of lipid rafts in transgenic T-cells was affected using the lipid raft marker cholera toxin B (CTB), which binds the ganglioside M1 (GM1) glycosphingolipid. We performed double immunofluorescence labeling with anti-Src antibody and CTB. Wild-type T-cells exhibited a polarized colocalization of both markers after 30 min post-activation (Fig. 7A). However, we did not detect any polarization in transgenic T-cells, suggesting that CMIP interferes with lipid raft migration. Then, we analyzed the linker for activation of T-cells (LAT), an adaptor protein that is recruited in plasma membrane and segregates into lipid rafts upon engagement of T-cell receptor and costimulatory signaling. The membrane localization and distribution of LAT and CTB (coupled with Alexa Fluor 555) were examined by immunofluorescence staining 30 min after T-cell activation by anti-CD3/CD28 (1 μ g/ml each). While LAT and CTB were clustered in plasma membrane microdomains in wild-type T-cells, they were spread along the plasma

membrane in transgenic T-cells (Fig. 7B). We next monitored the dynamics of lipid rafts following costimulation with anti-CD3/CD28. T-cells from transgenic and control littermate mice were isolated by negative immunoselection and stained with AF555-CTB, then incubated in the presence of anti-CD3-coated beads and soluble anti-CD28 (1 μ g/ml). The time-dependent distribution of fluorescence was evaluated by videomicroscopy. We observed that CTB moved from the periphery and formed a cluster at the contact point between T-cell and CD3-bead (Fig. 7C and movies S1). Conversely, CTB did not move towards CD3-beads in transgenic T-cells suggesting that they were unable to reorganize the GM1 positive microdomains. Collectively, these results suggest that CMIP prevents the clustering of lipid rafts that is required for the formation of immunological synapse and effective T-cell activation.

Proteomic analysis of T-cells isolated from wild-type and transgenic mice

To evaluate the impact of CMIP expression on T-cell signaling, we performed differential proteomic analysis of T-cells from 12 week-old transgenic and control littermate mice (twelfth generation, n=3 each). T-cells were purified by negative immunoselection, then activated by anti-CD3/CD28 antibodies (1 μ g/ml each). At 0 and 60 min post-stimulation (corresponding to higher expression of the transgene), total proteins were extracted, trypsin digested, and peptides quantified on three parallel technical replicates per sample. The expression levels of the 2660 identified proteins were compared in the four conditions (Data file S2). As a result, 46 proteins were found differentially expressed between transgenic and wild-type as a function of T-cell activation (two-way ANOVA interaction, $p < 0.05$) (Data file S3). Hierarchical clustering displayed four major clusters, grouping those proteins varying comparatively in the different experimental conditions (Fig. 8A and Table 1). In basal conditions, a cluster of 9 proteins (cluster 1) was found highly expressed in wild-type T-cells while it was strongly downregulated in transgenic T-cells. This cluster includes two proteins

involved in lipid remodeling, namely the HRAS-like suppressor 3 (Pla2g16) and ethanolamine phosphate cytidylyltransferase (Pcyt2). In activated T-cells, a cluster of 13 proteins (cluster 2) that were found depleted in wild-type but increased or unchanged in transgenic mice. This cluster includes proteins involved in the organization of actin cytoskeleton, like cofilin-1 (Cfl1), and in nucleotide metabolism, like creatine kinase B-type (Ckb), nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt), guanylate kinase (Guk1). Cluster 3 encompassed 10 proteins that were significantly downregulated in wild-type relatively to transgenic T-cells, in basal conditions. This cluster includes two proteins involved in lipid uptake and metabolism, namely cell cycle control protein 50A (Tmeme30a) and monoacylglycerol lipase (Abhd6). Most remarkably, a fourth cluster (cluster 4) comprised 14 proteins undergoing a dramatic increase after stimulation in wild-type, but being depleted in transgenic T-cells under the same conditions. Representative members of this cluster were, most notably, the inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon (Ikbke), casein kinase II subunit alpha (Csnk2a2), the cPLA2 inhibitor annexin-1 (Anxa1), as well as the lipid remodeling factor lysophosphatidic acid phosphatase 6 (Acp6). These results, along with other data obtained from the transgenic mouse model, point at a defect in T-cell activation associated with CMIP expression. Based on these findings, we further analyzed by Western blotting the expression of Cofilin-1, a major actor of dynamic rearrangement of actin cytoskeleton (10). We found that phosphorylation of Cofilin-1, corresponding to its inactive form, was dramatically increased in transgenic T-cells at 60 min post-stimulation as compared to wild-type T-cells (Fig. 8B). Likewise, Cofilin-1 was found hyperphosphorylated in HEK cells overexpressing CMIP compared to cells transfected with a control vector (data not shown), suggesting a functional connection between CMIP overexpression and Cofilin-1 inactivation.

Discussion

Little is known about the role of this new gene in T-cells *in vivo*, which led us to generate a transgenic mouse model in which CMIP is selectively induced in peripheral T-cells. We show for the first time that CMIP: (i) interferes with the early events of T-cell signaling by inhibiting the activation of Src kinases Fyn and Lck and Zap-70 and their localization to lipid rafts; (ii) inhibits lipids raft clustering, which is required for immunological synapse formation; and (iii) transgenic T-cells exhibit a lower proliferative capacity and are less prone to producing cytokines after stimulation. In addition, transgenic mice display a higher percentage of T-cells with a naïve T-cell phenotype, as well as a lower reactivity to CD3/CD28 stimulation, as reflected by a decrease in IL-2 production. The inability to produce sufficient amounts of IL-2 may explain why transgenic T-cells fail to proliferate and to differentiate like control T-cells. However, the addition of recombinant IL-2 to medium culture restores their proliferative capacity. These findings suggest that CMIP is a negative regulator of T-cell signaling.

The most proximal signaling events occurring following T-cell engagement involve the Src family tyrosine kinases Lck and Fyn. The abundance of inactive Src kinases Fyn and Lck is significantly increased following CD3/CD28 stimulation in transgenic T-cells, whereas the active Src kinase forms assessed by ph-Src 418 are reduced. These findings suggest that the early molecular events leading to recruitment and activation of Src kinases in lipid rafts are altered in the presence of CMIP. Activation of T-cells by CD3/CD28 results in the polarization of lipid rafts enriched in many proteins such as Src kinases, GPI-linked proteins and adaptor proteins, which function together as signaling platforms. Inasmuch as Lck is required for the tyrosine phosphorylation of CD28 and the recruitment of Zap70, its

Inactivation affects the early events of proximal signaling, which are critical for migration of T-cell receptors into the lipid rafts (11). Our results suggest that in transgenic T-cells, Lck is maintained in its inactive conformation, thus preventing Zap 70 activation and the recruitment of LAT into lipid rafts. We show here that polarization of T-cells, as visualized by CTB, is inhibited after CD3/CD28 stimulation in transgenic T-cells, while it is clearly observed in control T-cells. Altogether, these results suggest that CMIP inhibits proximal signaling and prevents the recruitment of lipid rafts to the immunological synapse.

Our lipidomic analysis revealed the ganglio-series of glycosphingolipids as the main metabolic pathway impacted by CMIP expression in a cell line model. This finding was consistent with the alterations in membrane raft signaling induced by CMIP expression in T-cells. GM3 is the most abundant class of gangliosides in T-cells (12), where they seem to play a key role in activation and signal transduction, notably colocalizing with the protein-tyrosine kinase ZAP70 (13). Our results show a defect in CTB clustering at the anti-CD3/anti CD28 contact point, but also a decrease in the CTB staining intensity. Even though CTB is generally used as a marker of GM1 and lipid rafts, it has been demonstrated its binding to GM3 at a lesser affinity (14). The lower CTB intensity is therefore consistent with the observed GM3 depletion due to CMIP overexpression. Hence, the observed depleting effect of CMIP expression on GM2 and GM3 cell content could be fundamental in the inhibition of the immunological synapse formation suggested by our results. The precise mechanism responsible for GM3 and GM2 depletion remains to be unveiled.

The importance of lipid rafts in T cell activation lies on their ability to promote an efficient recruitment of membrane receptors and proximal protein partners by serving as a signaling platform and to coordinate the rearrangement of actin cytoskeleton, which is required to

enable sustained T cell response activation (15). We sought to understand the impact of CMIP on these molecular events by differential proteomics and found four protein clusters that display significant changes in transgenic T-cells, as compared with control T-cells. We confirmed that cofilin-1, a major mediator of actin dynamics is inactivated in transgenic T-cells. It has been shown that T cell stimulation in the presence of cell-permeable cofilin peptide homologs that inhibit the interaction of cofilin with F-actin filaments results in impaired formation of the immune synapse, reduced production of T helper 1 (Th1) and Th2 cell cytokines, and reduced cell proliferation (10).

CMIP is a new PH and LRR domains-containing protein originally identified in T-cells of patients with MCNS disease (16). Several investigations carried out during the last decade shed new light on its structural and functional characteristics (17). Regardless of idiopathic MCNS, the recent observation that CMIP is overproduced in tumor cell environment in patients who develop MCNS in the context of cancer disease, raises intriguing questions and point out a possible implication of CMIP in the pathophysiological process (18). Until now, we found that CMIP interacts with multiple partners and interferes with cytoskeletal dynamics, downregulates NF- κ B activity and promotes apoptosis (19). Its ability to be involved in different signaling pathways suggests that CMIP is coupled to multiple complexes that regulate the response to intracellular and membrane receptors. The present study adds new insight on CMIP function, suggesting a negative regulatory role on T-cell signaling. Negative regulation is critical for the termination of immune responses, for peripheral tolerance, and to prevent inflammation-induced tissue damage. Sustained activation of T lymphocytes resulting from a lack of feedback control can lead to autoimmune diseases, transplant rejection and cancer. Conversely, an excess of negative regulation may impede appropriate T-cell activation in response to pathogens and may lead to chronic infection. In addition, the inability to engage appropriate T-cell response against tumoral neoantigens results in cellular proliferation and metastasis. Indeed, induction of inhibitory molecules such

as CTLA-4 and PD-1 is found correlated with the viral load (20), as well as in cancer (21), while their blockade provides a clear survival benefit (22). Thus, a better understanding of the role of CMIP in the negative regulation of T-cell signaling may open new therapeutic perspectives for manipulation of the immune system.

Experimental procedures

Generation of CMIP transgenic mice

A mouse transgenic model was constructed by a targeting system based on reconstitution of functional X-linked hypoxanthine-guanine-phosphorybosyltransferase (Hprt) locus, as previously described (19). The full-length coding sequence of human CMIP was inserted downstream of the distal Lck promoter allowing CMIP expression only in peripheral T-lymphocytes (5). The *HPRT* PCR product was amplified in wild-type and heterozygous transgenic female (Tg^{+/-}), but not in reconstituted HPRT allele such as in homozygous transgenic female (Tg^{+/+}) or hemizygous transgenic male (Tg⁺) mice. The size of *CMIP* and *HPRT* PCR products were 309 and 301 base pairs, respectively (Table S1).

All experiments were conducted with approval from the INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) research ethics committee in accordance to international ethics codes and guidelines.

Flow cytometry analysis

Splenocytes were incubated for 10 min at room temperature (RT) with TruStain fcXTM (BioLegend), then stained with anti-mouse fluorochrome-conjugated mAbs against CD4,

CD8, CD44, CD62L, 20 min at RT. The CD4-FITC and CD62L-PE antibodies were purchased from Miltenyi Biotec and the CD8-APC and CD44-Pecy7 antibodies were purchased from eBiosciences (Table S2A). Splenocytes were then fixed for 7 min with 4% paraformaldehyde and analyzed by flow cytometry on a FACS analyzer Cyan ADP (Beckman Coulter), using the FlowJo software (Tree Star, San Carlos, CA, USA).

T-cell isolation

Spleens were harvested, gently minced with scalpel and passed through a 40 μ M nylon mesh filter. Mononuclear cells were isolated by Ficoll® 400 (Eurobio) density gradient. Purified T-cells were isolated by negative selection using the Pan T Cell isolation kit (Miltenyi Biotec GmbH, Germany).

T lymphocyte stimulation ex vivo

Before stimulation, T-cells were systematically synchronized at the G1 phase of cell cycle by serum starvation in 2% fetal calf serum (FCS) for 6 (mouse T-cells) or 12 hours (Jurkat-cells). Synchronized T-cells were then activated for the indicated time with soluble anti-CD3 and anti-CD28 (eBiosciences, San Diego, CA, USA) at 1 μ g/ml in RPMI complete medium supplemented with 10% FCS.

Western blot analysis

All primary antibodies used in this study are referenced in Table S2B. Western blots were performed as previously described (19).

Quantification of transcripts by reverse transcription and real time quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA was extracted and purified using the RNeasy kit (QIAGEN Inc., Germantown, USA), following the supplier's protocol. The sequences of primers are indicated in Table S1. Quantitative RT-PCR was performed as previously described (23). All qPCRs were

performed in duplicate and normalized to 18S rRNA expression. Cycle thresholds (CT) were calculated using the relative quantification method (Applied Biosystems). Relative copy numbers were calculated by determining the difference in the CT between the target and control probes ($\Delta CT = CT_{\text{gene of interest}} - CT_{18S}$). Cycle thresholds greater than 32 were excluded from analyses. Fold induction of mRNA was evaluated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

T lymphocyte proliferation assay

T-cell proliferation was determined by the extent of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) dye dilution on culture at day 5 in the presence of soluble anti-CD3/anti-CD28 (1 μ g/ml each). For CFSE labeling, T-cells were resuspended at 10^7 cells/ml in PBS containing 1 μ M CFSE (eBioscience) and incubated for 10 min at RT. The labeling reaction was stopped by addition of 3 volumes of cold PBS. Then, cells were washed thrice and the incorporation of CFSE was measured by flow cytometry.

Immunocytochemistry

T-cells were plated at 10^4 cells/slide using a cytospin centrifuge and fixed in 4% PFA for 10 min at RT, then permeabilized by incubation with 0.3% Triton X-100 for 10 min. Endogenous biotin and avidin were blocked using Avidin-Biotin Blocking kit (Vector Laboratories). Membranous ganglioside GM1 was visualized by direct incubation for 25 min at RT with Alexa fluor555-conjugated cholera toxin subunit B (Molecular Probes, 8 μ g/ml in PBS1X, 50 μ l/slide) and washed (3 x 5 min) before being covered with Vectashield mounting

containing DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories) and viewed under a fluorescence microscope (Zeiss, Germany) with the appropriate filters. To ensure the specificity of each signal, IgG isotype control (Cell Signaling) was used instead of primary antibody in control samples.

Confocal and videomicroscopy

All fluorescent images were collected on a Zeiss LSM510 confocal microscope. For live studies, synchronized T-cells were stained with AF555-CTB (Molecular Probes, 8 μ g/ml) and settled onto 8-well ibitreat μ -Slides (Ibidi, Biovalley S.A. France), then stimulated with CD-coated beads (human Dyneabeads CD3, Invitrogen) and soluble anti-CD28 (1 μ g/ml, eBiosciences) at a 2 :1 ratio. One image every 15s was collected. The samples were maintained at 37°C.

Lipid raft preparation

Lipid raft-like microdomains were obtained by a detergent-free method based on the one described by McDonald and Pike (24). Between 15 and 30 million cells per sample were washed twice in cold PBS, resuspended in 800 μ l of MBS/Na₂CO₃ buffer (25mM MES, 150mM NaCl, 250mM Na₂CO₃, pH6; supplemented with 1mM PMSF and phosphatase and protease inhibitor cocktails) and lysed by passage 20 times through a 21G needle, followed by sonication 3 times for 60 seconds in a Vibra Cell 75022 sonicator. The homogenate was mixed with two volumes of 60% OptiPrepTM (Axis Shield) for a final volume of 2ml of 40% OptiPrepTM. A three-step discontinuous density gradient was made by placing 2ml of 30% OptiPrepTM in MBS/Na₂CO₃ buffer, and 1ml of 5% OptiPrepTM sequentially on top of the homogenate. The mixture was spun in a TL-100 rotor at 268,000 $\times$ g for 2h in an Optima MAX-XP ultracentrifuge (Beckman Coulter). After spinning, 8 fractions of 600 μ l and a pellet were recovered from top to bottom. For most studies, fractions 2, 3 and 4 and fractions 6, 7 and 8 were pooled separately and labeled as R (raft) and NR (non-rafts). These pools were

characterized using established lipid and protein raft markers, namely Flotillin-1 and cholesterol, respectively. For western blot studies, proteins from R and NR fractions were precipitated by addition of 10% trichloroacetic acid (final concentration), incubation overnight at -20°C and three washes in cold ethanol. The resulting dry protein pellets were solubilized in equal volumes of 5× Laemmli buffer and stored at -80°C until use.

High performance thin layer chromatography (HPTLC)

To determine cholesterol contents, R and NR fractions were subjected to organic extraction by addition of 6 volumes of chloroform/methanol (2:1, v/v) and thorough vortexing, followed by centrifugation at 3,000×g for 5min. The organic lower phase was recovered and evaporated to dryness under a nitrogen stream. The dry lipid film was resuspended in 20µl of chloroform/methanol (1:1, v/v). Five µl of each sample were spotted on a Partisil HPK 60Å silica HPTLC plate (Whatman) along with 3µg of cholesterol standard, pre-developed in chloroform/methanol (1:1, v/v) and developed in chloroform/acetone (95:5, v/v). Bands were detected by dipping the plate into a 626.6mM CuSO₄, 8% H₃PO₄ solution followed by charring at 160°C.

Lipid extraction and analysis of ganglioside metabolism

Lipids were extracted by adding methanol to dry cell pellets and centrifuged at 10,000×g for 10 min at 4°C. The supernatant was then subjected to liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) analysis using an ionKey/MS system composed of the Acquity UPLC

MClass, ionKey source, and an iKey CSH C18 130 Å (1.7 µm particle size) 150 µm × 100 mm column (Waters) coupled to a Synapt G2-Si (Waters). Analyses were conducted with both positive and negative electrospray ionization mode using data-independent acquisition. The capillary voltage was 2.8 kV and the source temperature was 110 °C. Injections were 0.5 µL in the partial-loop mode, with a column temperature of 55 °C and flow rate of 3 µL/min. Mobile phase A consisted of acetonitrile/water (60:40) with 10 mM ammonium formate + 0.1% formic acid. Mobile phase B consisted of 2-propanol/acetonitrile (90:10) with 10 mM ammonium formate + 0.1% formic acid. The gradient was programmed as follows: 0.0–2.0 min, from 40% to 43% B; 2.0–2.1 min, to 50% B; 2.1–12.0 min, to 99% B; 12.0–12.1 min, to 40% B; and 12.1–14.0 min, at 40% B.

Data processing and analysis was conducted using Progenesis QI Informatics (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK) and MetaboAnalyst 3.0 software (25). Lipids were identified by database searches against their accurate masses using publicly available databases, including Lipid Metabolites and Pathways Strategy (LIPID MAPS) and Human Metabolome database (HMDB), as well as by fragmentation patterns and retention times, when available. Pathway analysis, which consisted of enrichment analysis and pathway topological analysis, were conducted using Metabolomics Pathway Analysis (MetPA) within MetaboAnalyst (26). Additional pathway over-representation analyses were conducted using Integrated Molecular Pathway Level Analysis (IMPALA) (27).

Proteomic analysis of T-cells isolated from WT and F12 mice
MS/MS Protein Identification and Quantification

Cells were lysed in 2% SDS and boiled at 95°C for 5min. Filter Aided Sample Preparation (FASP) was used for protein digestion. Briefly, cell lysates were treated with 100mM DTT for 30 min at 60°C, mixed with 8M urea buffer, loaded on Microcon 30kDa centrifugal filters (Millipore) and alkylated with 50mM iodoacetamide. Filters were washed twice with 8M urea and twice with 50mM ammonium bicarbonate. Following an overnight trypsin digestion at

37°C, samples were vacuum dried, and resuspended in 10% acetonitrile, 0.1% formic acid, for LC-MS/MS.

For each run, 1 µg was analysed by nanoRSLC-Q Exactive PLUS MS (Dionex RSLC Ultimate 3000, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Peptides were separated on a reversed-phase liquid chromatographic column (Pepmap C18, Dionex). Chromatography solvents were (A) 0.1% formic acid in water, and (B) 80% acetonitrile, 0.08% formic acid. Peptides were eluted from the column with the following gradient: 5% to 40% B (120 min), 40% to 80% (7 minutes). At 127 min, the gradient returned to 5% to re-equilibrate the column for 20 minutes before the next injection. Two blanks, two long 75 min-step gradients, were run between technical and biological triplicates to prevent sample carryover.

Peptides eluting from the column were analyzed by data dependent MS/MS, using Top-10 acquisition method. Briefly, the instrument settings were as follows. Resolution was set to 70,000 for MS scans and 17,500 for the data dependent MS/MS scans in order to increase speed. The MS AGC target was set to 3,106 counts, while MS/MS AGC target was set to 5,104. The MS scan range was from 400 to 2000 m/z. MS and MS/MS scans were recorded in profile mode. Dynamic exclusion was set to 30 sec duration. Three replicates of each sample were analyzed by nanoLC/MS/MS.

Data Processing Following LC-MS/MS acquisition

The raw MS data were processed with the MaxQuant software version 1.5.2.8 and searched with Andromeda search engine against the *Mus musculus* subset of the UniprotKB/Swissprot database (release 2015-03-04, 16704 sequences). To search parent mass and fragment ions, we set search mass deviation of 4.5 ppm and 20 ppm respectively. The minimum peptide length was set to 7 aminoacids and strict specificity for trypsin cleavage was required, allowing up to two missed cleavage sites. Carbamidomethylation (Cys) was set as fixed modification, whereas oxidation (Met) and N-term acetylation were set as variable modifications. The false discovery rates (FDRs) at the protein and peptide level were set to 1%. Scores were calculated in

MaxQuant as described previously (28). The reverse and common contaminant hits were removed from MaxQuant output. Proteins were quantified according to the MaxQuant label-free algorithm using LFQ intensities [22,23]; protein quantification was obtained using at least 2 peptides per protein.

Statistical and bioinformatic analysis, including heatmaps, profile plots and clustering, were performed with Perseus software (version 1.5.0.31) freely available at www.perseus-framework.org. For each protein we had LFQ values corresponding to the average LFQ from three technical triplicates. We filtered the data to keep only proteins with at least 5 valid values out of 12. Next, the data were imputed to fill missing data points by creating a Gaussian distribution of random numbers with a standard deviation of 33% relative to the standard deviation of the measured values and 1.8 standard deviation downshift of the mean to simulate the distribution of low signal values. For statistical comparison we performed a two-way ANOVA test, setting 2 groupings: Lck vs BalbC mice and stimulated versus non-stimulated mice ($p < 0.05$). Hierarchical clustering of proteins statistically different between Lck vs Balb/C mice and stimulated versus non-stimulated mice, and of proteins having a significant interaction between the two groupings, were performed in Perseus on logarithmized LFQ intensities after z-score normalization of the data, using Euclidean distances.

Statistical analysis

Data were analyzed with PRISM Software for Macintosh (GraphPad Software, Inc, USA). The difference between the two different groups was determined by using Student *t* test. *P* values of less than 0.05 were considered statistically significant.

Supplementary Materials:

- 1. Data file S1:** Pattern of identified signaling pathways
- 2. Data file S2:** Proteomics analysis of wild-type and transgenic T-cells in resting and following anti-CD3/CD28 stimulation.
- 3. Data file S3:** Differential proteomics analysis of wild-type and transgenic T-cells in resting and following anti-CD3/CD28 stimulation.
- 4. Table S1:** Oligonucleotides used for genomic DNA and transcript amplification
- 5. Table S2:** Antibody list
- 6. Movie S1-**Videomicroscopy of lipid raft dynamic in wild-type and transgenic T-cells following anti-CD3/CD28 stimulation

Acknowledgments. This work was supported in part by a grant from the French Kidney Foundation. P Vachin and K Sendeyo were supported by grants from the Ministry of research. Drs A Moktefi was supported by grants from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

Conflict of interest. The authors declare that they do not have any competing financial, personal, or professional interests.

Author Contributions. KS, PV, CC, AM, SYZ, AP, GA and ICG performed the experiments, MO, VA and DS wrote the paper. DS and MO supervised the project. All authors discussed the results and participated in writing the paper.

References

1. Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I., and Kagan, J. C. (2015) Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol* **33**, 257-290
2. Chakraborty, A. K., and Weiss, A. (2014) Insights into the initiation of TCR signaling. *Nat Immunol* **15**, 798-807
3. Viola, A., and Gupta, N. (2007) Tether and trap: regulation of membrane-raft dynamics by actin-binding proteins. *Nat Rev Immunol* **7**, 889-896
4. Brownlie, R. J., and Zamoyska, R. (2013) T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol* **13**, 257-269
5. Nakao, A., Miike, S., Hatano, M., Okumura, K., Tokuhisa, T., Ra, C., and Iwamoto, I. (2000) Blockade of transforming growth factor beta/Smad signaling in T cells by overexpression of Smad7 enhances antigen-induced airway inflammation and airway reactivity. *J Exp Med* **192**, 151-158
6. Ballarin-Gonzalez, B., Dagnaes-Hansen, F., Fenton, R. A., Gao, S., Hein, S., Dong, M., Kjems, J., and Howard, K. A. (2013) Protection and Systemic Translocation of siRNA Following Oral Administration of Chitosan/siRNA Nanoparticles. *Mol Ther Nucleic Acids* **2**, e76
7. Gao, S., Dagnaes-Hansen, F., Nielsen, E. J., Wengel, J., Besenbacher, F., Howard, K. A., and Kjems, J. (2009) The effect of chemical modification and nanoparticle formulation on stability and biodistribution of siRNA in mice. *Mol Ther* **17**, 1225-1233
8. Malissen, B., and Bongrand, P. (2015) Early T cell activation: integrating biochemical, structural, and biophysical cues. *Annu Rev Immunol* **33**, 539-561
9. Zeng, P., Xu, Y., Zeng, C., Ren, H., and Peng, M. (2011) Chitosan-modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for plasmid DNA delivery and HBV gene-silencing. *Int J Pharm* **415**, 259-266

10. Eibert, S. M., Lee, K. H., Pipkorn, R., Sester, U., Wabnitz, G. H., Giese, T., Meuer, S. C., and Samstag, Y. (2004) Cofilin peptide homologs interfere with immunological synapse formation and T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1957-1962
11. Zamoyska, R., Basson, A., Filby, A., Legname, G., Lovatt, M., and Seddon, B. (2003) The influence of the src-family kinases, Lck and Fyn, on T cell differentiation, survival and activation. *Immunol Rev* **191**, 107-118
12. Tuosto, L., Parolini, I., Schroder, S., Sargiacomo, M., Lanzavecchia, A., and Viola, A. (2001) Organization of plasma membrane functional rafts upon T cell activation. *Eur J Immunol* **31**, 345-349
13. Garofalo, T., Lenti, L., Longo, A., Misasi, R., Mattei, V., Pontieri, G. M., Pavan, A., and Sorice, M. (2002) Association of GM3 with Zap-70 induced by T cell activation in plasma membrane microdomains: GM3 as a marker of microdomains in human lymphocytes. *J Biol Chem* **277**, 11233-11238
14. Kuziemko, G. M., Stroh, M., and Stevens, R. C. (1996) Cholera toxin binding affinity and specificity for gangliosides determined by surface plasmon resonance. *Biochemistry* **35**, 6375-6384
15. Varshney, P., Yadav, V., and Saini, N. (2016) Lipid rafts in immune signalling: current progress and future perspective. *Immunology* **149**, 13-24
16. Sahali, D., Pawlak, A., Valanciute, A., Grimbert, P., Lang, P., Remy, P., Bensman, A., and Guellen, G. (2002) A novel approach to investigation of the pathogenesis of active minimal- change nephrotic syndrome using subtracted cDNA library screening. *J Am Soc Nephrol* **13**, 1238-1247.
17. Sahali, D., Sendeyo, K., Mangier, M., Audard, V., Zhang, S. Y., Lang, P., Ollero, M., and Pawlak, A. (2014) Immunopathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome with relapse. *Semin Immunopathol* **36**, 421-429
18. Audard, V., Zhang, S. Y., Copie-Bergman, C., Rucker-Martin, C., Ory, V., Candelier,

- M., Baia, M., Lang, P., Pawlak, A., and Sahali, D. (2010) Occurrence of minimal change nephrotic syndrome in classical Hodgkin lymphoma is closely related to the induction of c-mip in Hodgkin-Reed Sternberg cells and podocytes. *Blood* **115**, 3756-3762
19. Zhang, S. Y., Kamal, M., Dahan, K., Pawlak, A., Ory, V., Desvaux, D., Audard, V., Candelier, M., BenMohamed, F., Matignon, M., Christov, C., Decrouy, X., Bernard, V., Mangiapan, G., Lang, P., Guellaen, G., Ronco, P., and Sahali, D. (2010) c-mip impairs podocyte proximal signaling and induces heavy proteinuria. *Sci Signal* **3**, ra39
 20. Kassu, A., Marcus, R. A., D'Souza, M. B., Kelly-McKnight, E. A., Golden-Mason, L., Akkina, R., Fontenot, A. P., Wilson, C. C., and Palmer, B. E. (2010) Regulation of virus-specific CD4⁺ T cell function by multiple costimulatory receptors during chronic HIV infection. *J Immunol* **185**, 3007-3018
 21. Hodi, F. S., Mihm, M. C., Soiffer, R. J., Haluska, F. G., Butler, M., Seiden, M. V., Davis, T., Henry-Spires, R., MacRae, S., Willman, A., Padera, R., Jaklitsch, M. T., Shankar, S., Chen, T. C., Korman, A., Allison, J. P., and Dranoff, G. (2003) Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4712-4717
 22. Velu, V., Titanji, K., Zhu, B., Husain, S., Pladevega, A., Lai, L., Vanderford, T. H., Chennareddi, L., Silvestri, G., Freeman, G. J., Ahmed, R., and Amara, R. R. (2009) Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature* **458**, 206-210
 23. Sendeyo, K., Audard, V., Zhang, S. Y., Fan, Q., Bouachi, K., Ollero, M., Rucker-Martin, C., Gouadon, E., Desvaux, D., Bridoux, F., Guellaen, G., Ronco, P., Lang, P., Pawlak, A., and Sahali, D. (2013) Upregulation of c-mip is closely related to podocyte dysfunction in membranous nephropathy. *Kidney Int* **83**, 414-425
 24. Macdonald, J. L., and Pike, L. J. (2005) A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J Lipid Res* **46**, 1061-1067

25. Xia, J., Mandal, R., Sinelnikov, I. V., Broadhurst, D., and Wishart, D. S. (2012) MetaboAnalyst 2.0--a comprehensive server for metabolomic data analysis. *Nucleic Acids Res* **40**, W127-133
26. Li, F., Xu, Y., Shang, D., Yang, H., Liu, W., Han, J., Sun, Z., Yao, Q., Zhang, C., Ma, J., Su, F., Feng, L., Shi, X., Zhang, Y., Li, J., Gu, Q., Li, X., and Li, C. (2014) MPINet: metabolite pathway identification via coupling of global metabolite network structure and metabolomic profile. *Biomed Res Int* **2014**, 325697
27. Cavill, R., Kamburov, A., Ellis, J. K., Athersuch, T. J., Blagrove, M. S., Herwig, R., Ebbels, T. M., and Keun, H. C. (2011) Consensus-phenotype integration of transcriptomic and metabolomic data implies a role for metabolism in the chemosensitivity of tumour cells. *PLoS Comput Biol* **7**, e1001113
28. Cox, J., and Mann, M. (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* **26**, 1367-1372

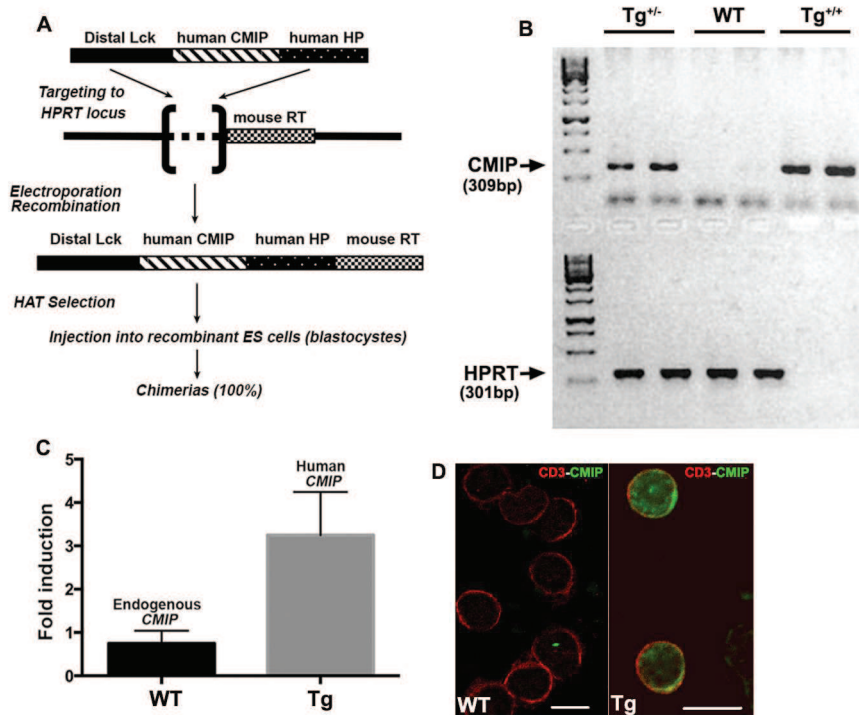


Figure 1. Generation of CMIP transgenic mice.

A, Schematic diagram of targeted transgenesis into the HPRT locus (see detail in Materials and Methods). All mice analyzed in this study were hemizygous males from F10 to F18 generations. **B**, PCR genotyping of mouse tail DNA. The HPRT PCR product is amplified in wild-type allele, but not in reconstituted HPRT gene such as in homozygous transgenic female (Tg^{+/+}) or hemizygous transgenic male (Tg⁺). **C**, Quantification of mouse and human CMIP transcripts in transgenic mice and control littermates by real time reverse transcription-quantitative PCR. **D**, Confocal immunofluorescence microscopy of CMIP expression in T-cells from transgenic and control littermates.

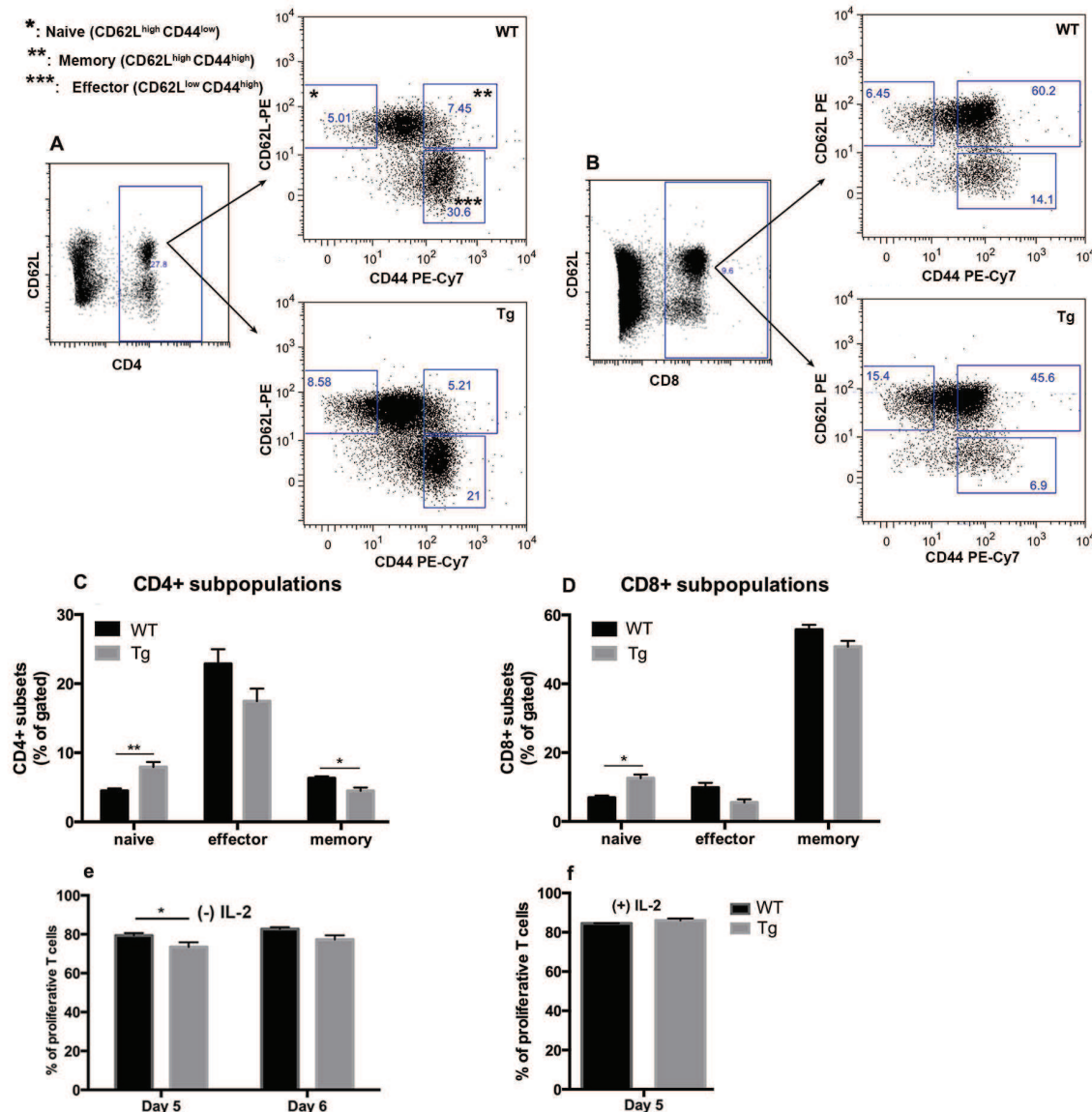


Figure 2. Transgenic mice develop an altered T-cell phenotype. *A* and *B*, Representative flow cytometry analysis of naïve, effector and memory T-cells in transgenic and control Tcells. Splenocytes from 12 week-old transgenic mice (Tg) and control littermates (WT) were gated for CD4+ cells (*A*) or for CD8+ cells (*B*) and analyzed for CD44 and CD62L expression. T-cell subpopulations were defined as naïve (CD44^{low}CD62L^{high}), memory

(CD44^{high}CD62L^{high}), or effector T-cells (CD44^{high}CD62L^{low}). **C and D**, Frequency of naïve, effector and memory T-cells. Results are representative of three independent experiments (n=5 for control and transgenic mice in each). The frequency of naïve T-cells in both CD4⁺ and CD8⁺ compartments was significantly increased, whereas the level of memory CD4⁺ was decreased in transgenic mice comparatively to control littermates (Tg versus WT, Mean with SEM: naïve CD4⁺, **p=0.0079; naïve CD8⁺, p=0.0159; memory CD4⁺, p=0.0303, Mann–Whitney test). Although effector CD4⁺ and CD8⁺ subsets are decreased in Tg mice, they do not reach statistical significance. **E and F**, Transgenic T-cells exhibit a lower proliferative capacity. T-cells were isolated from Tg mice and control littermates and labeled with CFSE (1μM). After synchronization, cells were stimulated with anti-CD3/CD28 antibodies (1μg/ml each). After 5 days, proliferation was analyzed by flow cytometry as the percentage of dividing T-cells. **E**, Graph showing the percentage of dividing T-cells. **F**, the addition of mouse recombinant IL2 (30U/mL) at 48h restore T-cell proliferation rate at comparable level between Tg mice and control littermates. Data are presented as the mean of two independent experiments (n=3). (Tg versus WT, Mean with SEM: * p=0.0178, Mann–Whitney test).

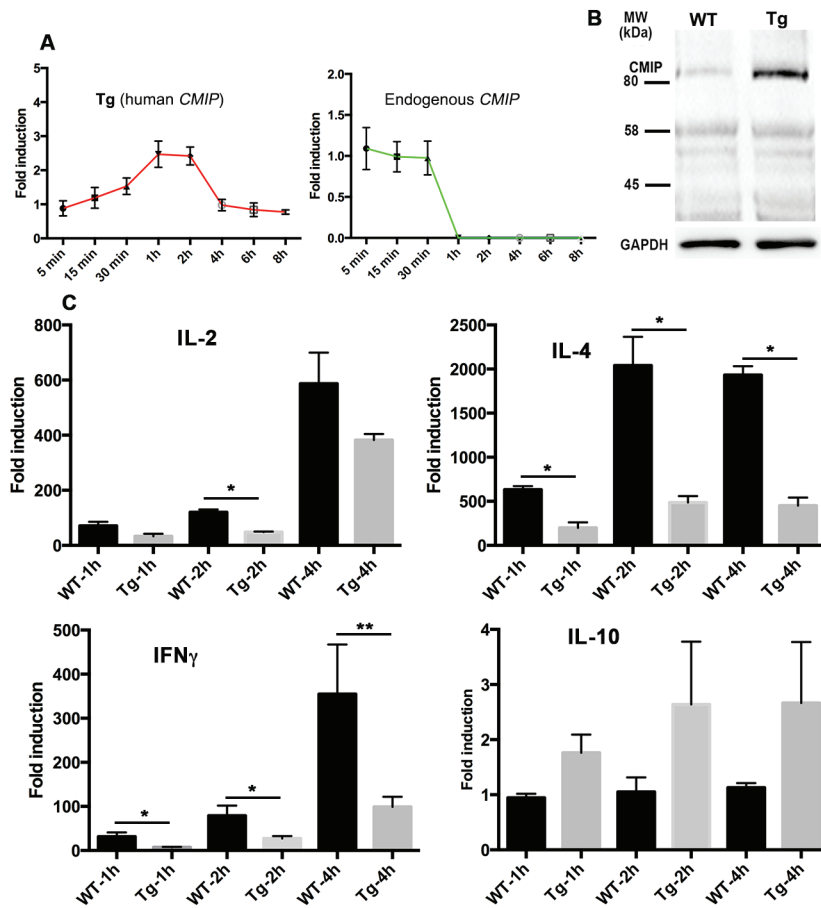


Figure 3. Influence of CMIP induction on cytokine production. **A**, Kinetics of CMIP induction. The abundance of endogenous and human CMIP transcript was measured by RTqPCR from transgenic T-cells in resting conditions and after costimulation by anti-CD3/CD28 (1 μ g/ml each) at several times as indicated. Fold induction was calculated relative to resting conditions. Data were representative of three independent experiments. **B**, Detection of CMIP by Western blot from protein lysates of transgenic and control T cells. **C**, Expression of cytokines. Total RNA was extracted from synchronized T-cells before and after CD3/CD28 stimulation (1 μ g/ml each) at the indicated times. IL-2, IFN γ and IL-4 were measured by RT-qPCR. The results are representative of three independent experiments (n=5). (Tg versus WT, Mean with SEM: IL-2, *p= 0.02; IFN γ , *p= 0.0235; IL-4, *p= 0,0186; **p= 0,0020, Mann–Whitney test).

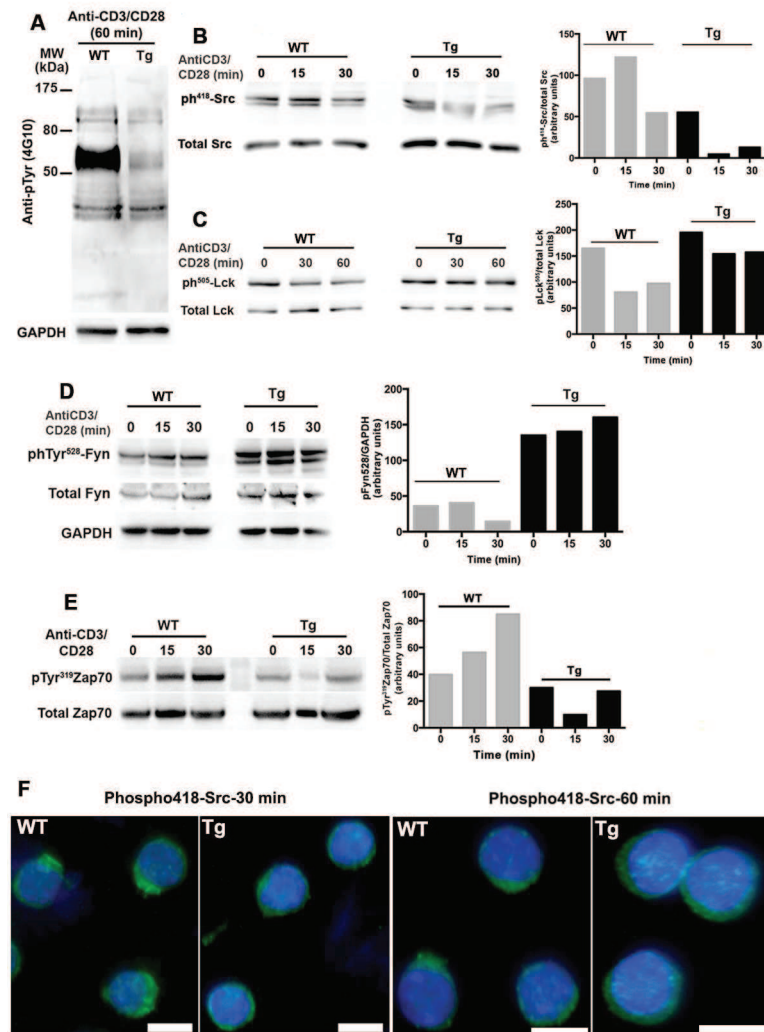


Figure 4. Transgenic T-cells exhibit a hypophosphorylated protein profile with downregulation of active Src. *A*, Representative Western blot of anti-phosphotyrosine 4G10 on protein lysates from transgenic and control littermates (WT) T-cells, after 60 min activation by anti- CD3/CD28; blots were striped and reprobed with anti-GAPDH antibody. *B-E*, Western blots of protein lysates from transgenic and control littermate T-cells, at several times following anti-CD3/CD28 activation (1 μ g/ml each); blots were striped and reprobed with an antibody raised against total specific protein. *F*, Immunofluorescence staining of phTyr418-Src in transgenic and control littermate T-cells isolated by negative immunoselection.

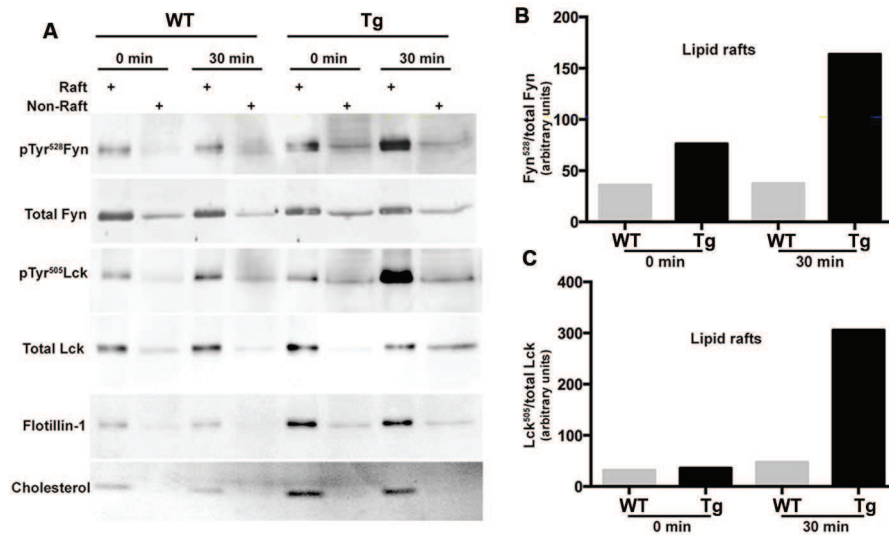


Figure 5. Transgenic T cell exhibit higher level of inactive Fyn and Lck in lipid rafts and lack to be activated after CD3/CD28 costimulation. **A**, Western blot in rafts (R) and non-raft (NR) fractions prepared from resting (0 min) and activated (30 min) transgenic and control (WT) Tcells. Rafts are enriched in Flotillin-1 and cholesterol. Samples were analyzed with anti-pTyr 528-Fyn and anti-pTyr505-Lck antibodies, recognizing the inactive forms, followed by antibodies recognizing the total forms of Fyn and Lck respectively. **B and C**, inactive/total Fyn and inactive/total Lck ratios in raft microdomains according to densitometric analysis of bands shown in **A**.

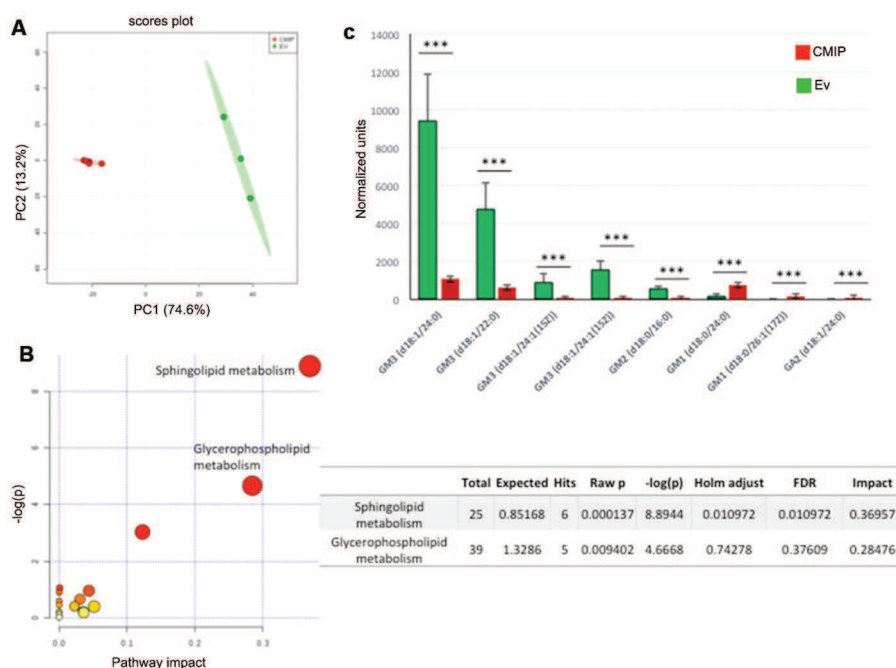


Figure 6. CMIP induces alterations in the glycosphingolipid biosynthetic pathway and in ganglioside species. Mouse podocyte cell line was stably transfected with a CMIP expression vector or with an empty vector (EV). Lipids were extracted and subjected to LC-MS analysis. **A**, Principal component analysis of ion abundance in the positive and negative modes was able to discriminate CMIP-transfected and EV-transfected cells. PC1 accounted for 74.6% of total variance. **B**, Metabolome view after MetPA shows sphingolipid metabolism as the most significantly altered pathway by CMIP expression. Total: the total number of compounds in the pathway; Hits: the actually matched number from the uploaded data; Raw p: original p value calculated from the enrichment analysis; Holm p: p value adjusted by Holm-Bonferroni method; FDR p: p value adjusted using False Discovery Rate; Impact: pathway impact value calculated from pathway topology analysis. **C**, Relative abundance of several ganglioside species showing a very significant difference between empty vector-transfected and CMIP-transfected cells. Data are expressed as means $\pm$ SD of normalized arbitrary units.

*** $p < 0.001$. EV: $n = 3$. CMIP: $n = 6$.

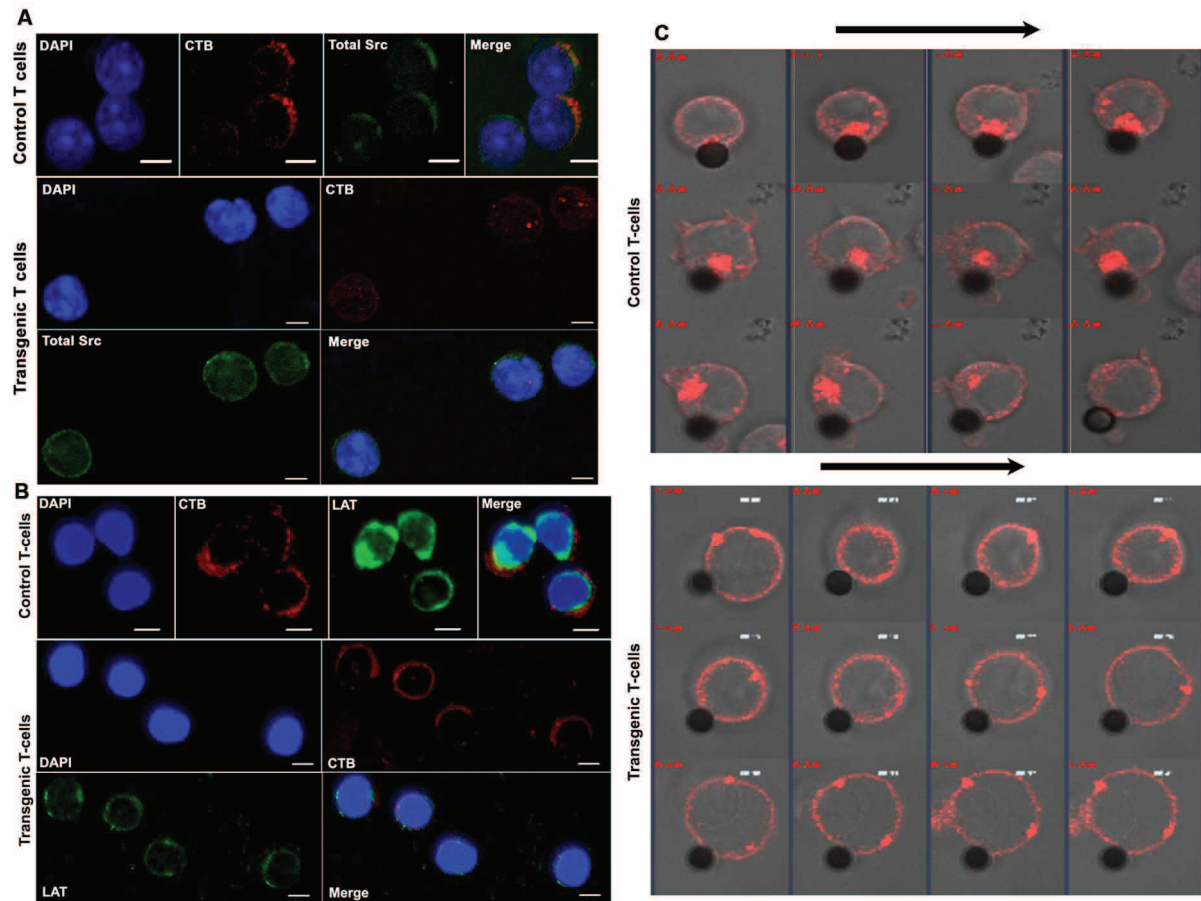


Figure 7. CMIP inhibits activation of raft signaling platform. *A*, CMIP inhibits membrane clustering of Src kinases and CTB after CD3/CD28 stimulation. Immunofluorescence analysis of transgenic and control T-cells after 30 min activation by anti-CD3/CD28 antibodies (1 $\mu\text{g/ml}$ each), then fixed and immunostained for total Src (green) and CTB (red). Cell nuclei were revealed by counterstaining with DAPI dye. Confocal analysis shows that Src kinases and CTB co-localize in control but not in transgenic T-cells. *B*, CMIP inhibits clustering into lipid rafts of LAT and CTB after CD3/CD28 stimulation. Immunofluorescence analysis of LAT and CTB, after similar T-cell activation than *A*. *C*, CMIP inhibits the clustering of lipid rafts and polarization of T-cells. Transgenic and control T-cells were synchronized, stained with CTB, loaded into 8-well plates at 50000c/well and activated with anti-CD3-coated beads (ratio cells:beads, 2:1) and soluble anti-CD28 (1 $\mu\text{g/ml}$). Cells were kept at 37°C. Data were acquired in a confocal microscope at 1 image/ 15 sec. Images were extracted from movies (1 image/ 1 min) and analyzed by Image J software. (magnification: 63x)

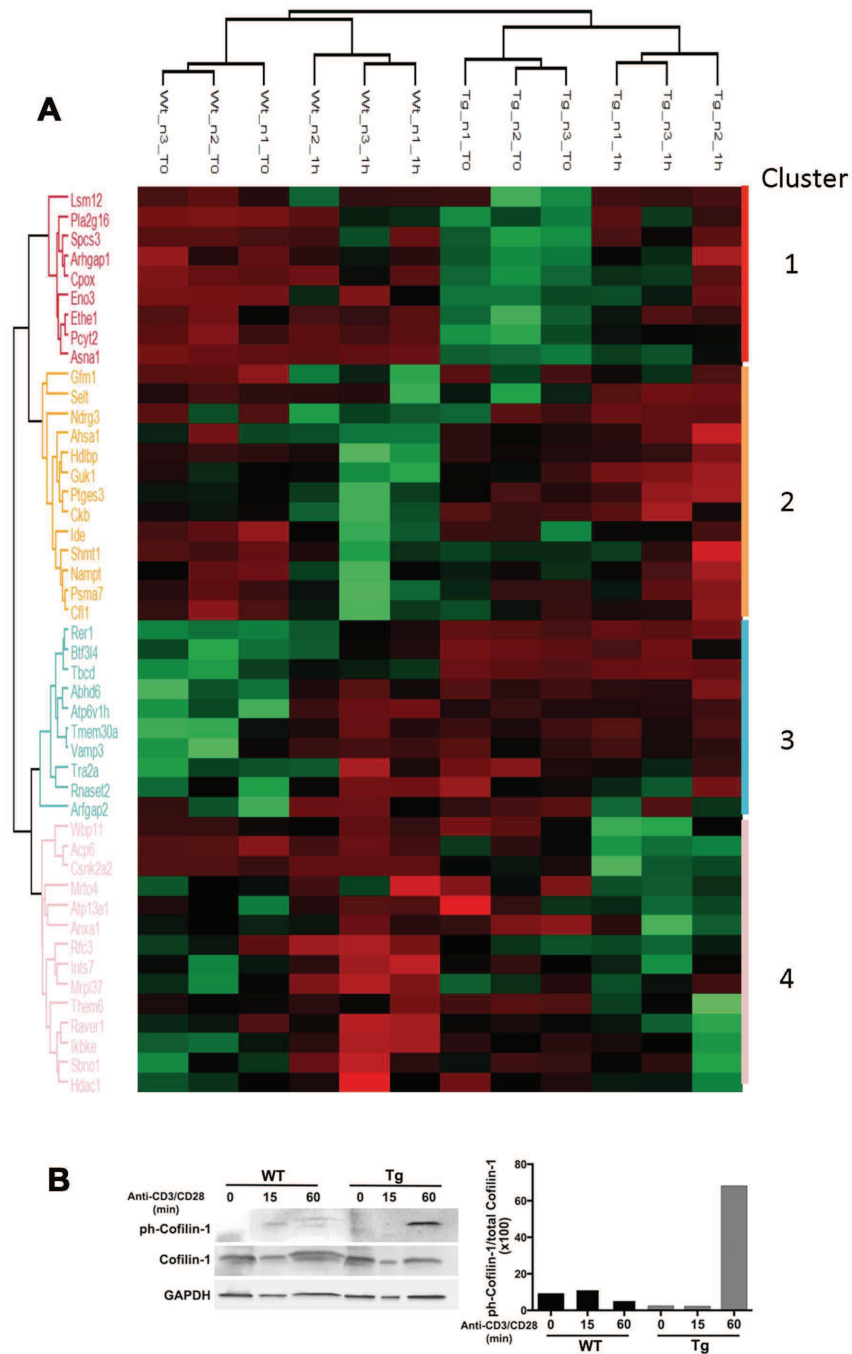


Figure 8. Impact of CMIP expression and T-cell activation on total proteome. *A*, Heat map showing the 46 proteins differentially expressed in T-cells obtained from transgenic and control T-cell subjected or not to 60 min costimulation by anti-CD3 /CD28 antibodies (1µg/ml each). The column tree denote the mice grouped by hierarchical clustering. Rows correspond to 46 proteins differentially expressed according to two-way ANOVA analysis ($p < 0.01$), distributed into four clusters. Each cluster corresponds to proteins showing a

similar variation pattern depending on both parameters (CMIP expression and T-cell activation). Proteins are labeled using their gene acronyms. **B**, Phosphorylation/inactivation of Cofilin-1 in transgenic T-cells. Western blot for cofilin-1 from total extracts of transgenic and control T-cells isolated by negative immunoselection, in resting conditions (0 min) and after 15 or 60 min costimulation with anti-CD3/CD28 antibodies (1 µg/ml each). Samples were analyzed with an anti-pSer3-Cofilin-1 antibody, recognizing the inactive form, and by an antibody recognizing the total form of Cofilin-1. GAPDH was used as a load control. The right panel shows the inactive/total Cofilin-1 ratio, according to densitometric analysis.

Cluster	Two-way ANOVA p value	Protein names	Gene names
	0,0173924	ATPase Asna1	Asna1
	0,0346941	Beta-enolase	Eno3
	0,0382656	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase,	Cpox
	0,0198362	Rho GTPase-activating protein 1	Arhgap1
	0,00452375	HRAS-like suppressor 3	Pla2g16
	0,00564185	Ethanolamine-phosphate cytidylyltransferase	Pcyt2
	0,0447962	Protein LSM12 homolog	Lsm12
	0,00512036	Signal peptidase complex subunit 3	Spcs3
	0,0185284	Persulfide dioxygenase ETHE1, mitochondrial	Ethe1
	0,0120071	Cofilin-1	Cfl1
	0,029132	Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic	Shmt1
	0,0207588	Selenoprotein T	Selt
	0,0308264	Creatine kinase B-type	Ckb
	0,00710747	Guanylate kinase	Guk1
	0,0328974	Activator of 90 kDa heat shock protein ATPase homolog 1	Ahsa1
	0,0272387	Elongation factor G, mitochondrial	Gfm1
	0,0336463	Vigilin	Hdlbp
	0,0136928	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	Nampt
	0,0350412	Insulin-degrading enzyme	Ide
	0,037093	Protein NDRG3	Ndr3
	0,0210732	Prostaglandin E synthase 3	Ptges3
	0,0274492	Proteasome subunit alpha type-7	Psma7
	0,0342864	Histone deacetylase 1	Hdac1
	0,0202517	Casein kinase II subunit alpha	Csnk2a2
	0,0197042	Annexin A1	Anxa1
	0,0223226	Protein strawberry notch homolog 1	Sbno1
	0,00719299	Integrator complex subunit 7	Ints7
	0,0246058	Protein THEM6	Them6
	0,0237745	Lysophosphatidic acid phosphatase type 6	Acp6
	0,0187061	Replication factor C subunit 3	Rfc3
	0,0401453	39S ribosomal protein L37, mitochondrial	Mrpl37
	0,0486016	WW domain-binding protein 11	Wbp11
	0,0214666	Ribonucleoprotein PTB-binding 1	Raver1
	0,0289481	mRNA turnover protein 4 homolog	Mrto4
	0,0357342	Manganese-transporting ATPase 13A1	Atp13a1
	0,0059116	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon	Ikbke
	0,0410545	Vesicle-associated membrane protein 3	Vamp3
	0,0413756	Transformer-2 protein homolog alpha	Tra2a
	0,000649362	V-type proton ATPase subunit H	Atp6v1h
	0,0444177	Tubulin-specific chaperone D	Tbcd
	0,00897285	Monoacylglycerol lipase ABHD6	Abhd6
	0,0217469	Cell cycle control protein 50A	Tmem30a
	0,0403846	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 2	Arfgap2
	0,0478009	Ribonuclease T2	Rnaset2
	0,0380768	Transcription factor BTF3 homolog 4	Btf3l4
	0,0360256	Protein RER1	Rer1

Table 2 : Oligonucleotides used for genomic DNA and transcript amplification.

Transcripts	Primers	T _m (°C)	Predicted size (bp)
Mouse <i>Cmip</i>	Forward: GCTGCTTGGGAGCGACGTGT Reverse: CGTTAGGTGGTGCGGCTCCC	62	180
Human <i>CMIP</i>	Forward: CGTGTGCCTGGCTGCCATCTACTCCTGCTATG Reverse: GACAGCCTGGCTTCGTGAGACACCAGGTC	63	176
Transgen	HPRT: Forward: GAGGGAGAAAAATGCGGAGTG Reverse: CTCCGGAAAGCAGTGAGGTAAG	62	301
	CMIP: Forward: CAGACCATGGTGGAGATCCTGTGC Reverse: TGAGGTGCTCGGCGCAGGCACTG	60	309
IL2	Forward: GCAGGATGGAGAATTACAGGAAC Reverse: CCGCAGAGGTCCAAGTTCA	54	125
IL4	Forward: CGGCACAGAGCTATTGATGGGTCTC Reverse: ATGGTGGCTCAGTACTACGAGTAATCCA	59	454
IFN γ	Forward: AGCTCTGAGACAATGAACGCTACACTGC Reverse: ACCCCGAATCAGCAGCGACTCCT	62	488
Il10	Forward: CTTGCACTACCAAAGCCACA Reverse: TTTTCACAGGGGAGAAATCG	57	451
18S	Forward: GTAACCCGTTGAACCCCAT Reverse: CCATCCAATCGGTAGTAGCG	55	151

Table S2**A-Antibodies used for FACS analysis**

Primary Antibodies	References
Mouse anti-mouse CD19-APC (IgA, k)	17-0191 (eBioscience)
Rat anti-mouse CD8a-Alexafluor488 (IgG2a, k)	53-0081 (eBioscience)
Golden Syrian Hamster mouse CD3 epsilon-PE (IgG)	12-0033 (eBioscience)
Anti-mouse CD19-1-APC	17-0191-81(eBioscience)
Rat anti-Mouse CD4 (L3T4) PE-Cy5 (IgG2a, k)	15-0042 (eBioscience)
Hamster anti-Mouse CD3 epsilon-PE (IgGk)	731982(Beckman Coulter)
Rat anti-Mouse CD4-PE (IgG2bk)	733260 (Beckman Coulter)
Rat anti-Mouse CD19-APC (IgG2ak)	732061 (Beckman coulter)
Rat anti-mouse CD8a/lyt-2-FITC (IgG2ak)	732023 (Beckman coulter)
Rat IgG2a isotype control-APC	17-4321-71 (eBioscience)
Rat anti-mouse CD23-PE (IgG2a, k)	25-0232-82 (eBioscience)
Rat IgG2a isotype control-PE	25-4321-82 (eBioscience)
Rat anti-mouse CD21/CD35-FITC (IgG2a)	11-0211-82 (eBioscience)
Rat anti-mouse CD3-PE (IgG2b, k)	555275 (BD Pharmingen)
Rat IgG2b, k isotype control-PE	553989 (BD Pharmingen)
Rat anti-mouse-CD4-PE (IgG2b,k)	553730 (BD Pharmingen)
Rat IgG2a, k isotype control-FITC	553929 (BD Pharmingen)
PE IgG2b	12-4031-81 (eBioscience)
PE –Cy5 CD4	733260 (Beckman Coulter)
PE- Cy7 CD23	563201 (BD Bioscience)
APC IgG2a	17-4321-71 (eBioscience)
PE IgG2a	12-4888-81 (eBioscience)
APC CD45R (B220)	130-091-843 (Miltenyi)
CD68 monoclonal mouse anti human	M0876 (DakoCytomation)
CD3 polyclonal Rabbit anti-human	A 0452 (DakoCytomation)

B-Antibodies used for Western blotting, Immunoprecipitation, immunofluorence and costimulation

Primary Antibodies	Species	Mono/ Polyclonal	Dilution	Supplier
CMIP	Rabbit	Polyclonal	1/1000 (WB) 1/200 (IF)	Local production
ZAP70 (MA1-21350)	Mouse	Monoclonal	1/500 (WB) 1/100 (IF)	Pierce
Phospho-ZAP70 (pY319)	Rabbit	Polyclonal	1/500 (WB) 1/100 (IF)	Pierce
Phosphotyrosine (4G10 [®])	Mouse	Monoclonal	1/1000 (WB)	Upstate
Fyn (FYN3)	Rabbit	Polyclonal	1/200 (WB)	Santa Cruz
Phospho-Fyn (pY528)	Mouse	Monoclonal	1/2500 (WB)	BD Biosciences
Phospho-Tyr Lck (Y505)	Mouse	Monoclonal	1/1000 (WB)	Cell Signaling
Src (L4A1)	Mouse	Monoclonal	1/1000 (WB) 1/100 (IF)	Cell Signaling
Phospho-Src (Y418)	Rabbit	Polyclonal	1/1000 (WB)	BD Biosciences
GAPDH (ab8545)	Mouse	Monoclonal	1/5000 (WB)	Abcam [®]
CTxB-Alexa Fluor [®] 555	GM1 fixation	Monoclonal	5 µg/ml	Molecular Probes [®]
Anti-mouse CD3e	Hamster	Monoclonal	1µg/ml	BD-Pharmingen [™]
Anti-mouse CD28	Hamster	Monoclonal	1µg/ml	BD-Pharmingen
LAT	Goat	Polyclona	1/200	Santa Cruz
Cofilin-1	Rabbit	Polyclonal	1/1000	Cell Signaling
Phosphor-Cofilin-1	Rabbit	Polyclonal	1/1000	Cell Signaling
Flotillin-1	Mouse	Monoclonal	1/1000	BD Biosciences

Discussion

Depuis plusieurs décennies, différentes études ont suggéré que le syndrome néphrotique à lésions glomérulaires minimes est une maladie liée à une dysfonction des lymphocytes T et de l'immunité à médiation cellulaire. Cependant, les perturbations lymphocytaires T observées dans le SNLGM sont hétérogènes et ne permettent pas de clarifier le mécanisme de l'atteinte rénale responsable du SNI.

Nous avons profité du PHRC « NEPHRUTIX » pour mener une étude en double aveugle, randomisée, de patients atteints de SNLGM, recevant le Rituximab ou un placebo. Le Rituximab, anticorps monoclonal dirigé contre le CD20, est devenu une alternative thérapeutique pour les patients rechuteurs fréquents et nécessitant un traitement permanent par les corticoïdes et/ou les immunosuppresseurs.

Nous avons concentré notre attention sur les populations T impliquées dans la coopération avec les lymphocytes B.

Plusieurs facteurs apportent une originalité dans les résultats apportés par notre étude :

- Chaque patient a fait l'objet d'une biopsie rénale afin de confirmer le diagnostic de SNLGM par des analyses anatomo-pathologiques.
- Le prélèvement séquentiel d'échantillon chez chacun des patients, au cours de la rémission, avant et pendant la rechute, a permis d'utiliser chaque patient comme son propre contrôle et de s'affranchir des variations inter-individuelles.
- L'existence d'un groupe placebo nous a permis de mieux comprendre les perturbations lymphocytaires T apparaissant au moment de la rechute.
- Nous montrons que le traitement par Rituximab dans le SNLGM n'influence pas seulement le répertoire B mais également plusieurs sous-populations des lymphocytes T. Cela pourrait expliquer l'efficacité du Rituximab dans le SNLGM (91).

Notre étude a montré que le Rituximab induit une diminution significative des T_{FH} alors que la rechute ne semble pas affecter cette population. Ces résultats suggèrent que les perturbations dans la production d'anticorps observées au cours de la rechute ne résultent pas d'une anomalie quantitative des T_{FH} . Toutefois, une augmentation nette de la population T_{FH} a été rapportée (92). La grande différence avec notre série provient du fait que les patients inclus dans Nephritix étaient quasiment tous sous triple immunosuppression (corticoïdes, mycophénolate et anticalcineurines) tandis que ceux inclus dans l'étude publiée ne prenaient aucun traitement depuis au moins six mois. Ces résultats suggèrent l'implication potentielle de cette sous-population dans la pathogénie du SNI et n'excluent nullement des altérations

qualitatives surajoutées. Il semble que la déplétion des LB induite par le Rituximab n'affecte pas les T_{FH} (93). Cela soulève la possibilité que la reconstitution retardée des cellules B mémoires commutées, rapportée par certains auteurs (94), pourrait résulter d'altérations qualitatives des cellules T_{FH} induite par la déplétion des lymphocytes B. En effet, l'expansion des cellules B mémoires commutées nécessite des cellules T_{FH} puisqu'elle est abrogée en l'absence de récepteur IL-21 ou de ligand CD40 (95).

Les cellules iNKT interagissent avec les lymphocytes B et stimulent les réponses immunitaires innée et adaptative en libérant de grandes quantités de cytokines Th1 comme Th2 après stimulation (35). De nombreuses études ont montré que la rémission de certaines maladies auto-immunes (telles que le lupus érythémateux systémique ou la polyarthrite rhumatoïde) est associée à une augmentation de la population iNKT après traitement par Rituximab (96,97). A l'inverse, notre étude a clairement montré une différence entre le SNLGM et ces autres maladies dysimmunitaires : le traitement par Rituximab dans le SNLGM est associé à une baisse des iNKT totales et plus particulièrement des iNKT DN (CD4⁻ CD8⁻) TCR V α 24. Nous avons également montré une autre différence notable dans le SNLGM : la fréquence des cellules T DN-TCR V α 24 est fortement diminuée dans les phases actives d'autres maladies dysimmunitaires (98,99) alors qu'elle est inchangée chez nos patients au cours de la rechute et surtout significativement diminuées après traitement par Rituximab. A cet égard, l'étude Nephritix est la première à rapporter les modifications de ces sous-populations dans le SNLGM et souligne l'implication de l'immunité innée dans la pathogénie du SNI. Dans la mesure où les rechutes surviennent dans un délai très rapide après une infection virale, une vaccination ou une autre sollicitation antigénique externe (58), il serait intéressant de suivre la cinétique de ces sous-populations afin de déterminer leur éventuel intérêt pour prédire une rechute ou la sensibilité au traitement.

Des travaux antérieurs avaient déjà montré une diminution des lymphocytes Treg au cours de la rechute chez des patients atteints de SNLGM (100,101). Nos données ont montré que la fréquence de cette population n'est pas significativement différente avant la rechute (en l'absence de traitement par Rituximab) et après Rituximab. Cela suggère que la reconstitution de la population T régulatrice est indépendante du traitement reçu. De plus, la baisse des Treg au moment de la rechute est corrélée à la baisse d'IL-2. Or cette cytokine a un rôle crucial dans le développement et le maintien de la population Treg (102).

Cette observation suggère deux hypothèses :

- l'administration d'IL-2 exogène à faible dose chez des patients en cours de rechute de SNLGM pourrait-elle augmenter la population T régulatrice et induire la rémission ? Une étude pilote sur 5 patients corticorésistants (dont 2 SNLGM) a montré que la population Treg est significativement augmentée après administration d'IL-2 exogène chez deux patients sur cinq mais qu'aucune amélioration de la protéinurie n'a été observée (103). Cependant, le choix de ces patients reste très discutable car ils présentaient une résistance précoce aux traitements immunosuppresseurs, ce qui suggère que les patients sont possiblement atteints d'une forme génétique du syndrome néphrotique et ne rentrent pas dans le cadre habituel des SNLGM à rechutes.

- Les Treg semblent contrôler la réponse humorale via la régulation des lymphocytes B et T_{FH} et que la déplétion de la population T régulatrice conduit à une expansion des lymphocytes B mémoires « switchés » (104). De plus, les Treg préviennent la prolifération des lymphocytes B auto-réactifs et induit leur apoptose. On peut donc supposer, que la baisse des Treg observée au moment de la rechute conduit à l'échappement et à la prolifération de lymphocytes B auto-réactifs pouvant contribuer au développement de maladies auto-immunes.

La stimulation par l'IL-2 est indispensable à la maturation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs (102). La diminution de l'IL2 au moment de la rechute pourrait donc expliquer l'hypo-réactivité des lymphocytes T précédemment décrite dans le SNLGM (105).

Enfin, la diminution concomitante des Treg et de la production d'IL-2 avec l'augmentation de l'expression de C-mip permet de poser l'hypothèse de l'existence d'un mécanisme physiopathologique commun restant à élucider.

Des études menées sur le modèle de rat Buffalo/Mna développant spontanément un syndrome néphrotique proche de la HSF humaine suggèrent que l'effet bénéfique sur la protéinurie d'un inhibiteur de la voie NFκB dérivé de la déoxypergualine pourrait être lié à une expansion de la population lymphocytaire T régulatrice (CD4+CD25+) (106). Ces données sont confortées par le transfert adoptif de T reg fonctionnel dans ce modèle de rat, qui permet de normaliser la protéinurie (107). Plus récemment, une étude a montré que les taux de LTreg naturels ou induits caractérisés par les marqueurs CD4+CD25^{high}Foxp3^{high} étaient plus faibles chez les patients adultes avec SNLGM comparativement aux sujets sains, alors que le taux lymphocytes T Th17 (CD4+IL17+) est augmenté. Le rapport Th17/Treg en circulation semble corrélé à l'évolution de la protéinurie, ce qui suggère l'existence d'une balance fonctionnelle Th17/Treg au cours du SNI adulte impliquée dans la pathogénie (101). Certains auteurs ont

montré que l'IL-17 induit *in vitro* des lésions podocytaires médiées essentiellement par C-mip puisque son extinction abolit cet effet (108). Par ailleurs, des observations de SNI ont été rapportées au cours du syndrome d'immunodysrégulation, polyendocrinopathie, entéropathie lié à l'X (IPEX) causé par des mutations inactivatrices du gène Foxp3 (109), laissant supposer une implication possible des Treg dans la pathogénie des SNI.

Mon deuxième travail a porté sur l'étude d'un modèle de souris transgéniques, exprimant le transgène *C-MIP* humain sous le contrôle du promoteur distal de Lck afin d'explorer le rôle de C-mip dans le lymphocyte T mature. Cette étude a montré que C-mip i) interfère avec les événements précoces de l'activation T en inhibant l'activation des Src kinases et leur localisation dans les radeaux lipidiques, ii) inhibe le recrutement des radeaux lipidiques indispensables à la formation de la synapse immunologique, iii) inhibe la prolifération T et diminue la production cytokinique et iv) induit une augmentation de la population des lymphocytes T naïfs.

Cette étude est la première à montrer que C-mip régule négativement l'activation lymphocytaire T.

Les souris Lck-C-mip présentent un nombre de lymphocytes T (LT) comparable à celui de souris contrôles, en revanche, la répartition de sous-populations est altérée : la fréquence des LT naïfs est augmentée alors que celle des populations effectrices et mémoires est diminuée. Ces perturbations sont associées à une diminution de la production cytokinique dont celle de l'IL-2. Les LT transgéniques prolifèrent moins *ex-vivo* après stimulation par CD3/CD28 mais ce défaut est corrigé par l'ajout d'IL-2 recombinant dans le milieu de culture. L'incapacité à produire des quantités suffisantes d'IL-2 pourrait expliquer cette incapacité à proliférer et à se différencier comme les LT contrôles.

Les premiers événements suite à l'engagement du TCR impliquent les tyrosines kinases de la famille des Src : Fyn et Lck. Notre étude a montré que les LT transgéniques présentent une augmentation des Src kinases Fyn et Lck sous leur forme inactive (respectivement pTyr⁵²⁸-Fyn et pTyr⁵⁰⁵-Lck) après stimulation par CD3/CD28, alors que la forme active des Src kinases (pTyr⁴¹⁸-Src) est diminuée. Ces résultats suggèrent que l'activation des Src kinases est perturbée en présence de C-mip.

Il a été décrit que Lck joue un rôle crucial dans la phosphorylation des motifs ITAMs, dans le recrutement et l'activation de Zap70 ainsi que dans les événements proximaux indispensables à la migration des récepteurs T dans les radeaux lipidiques. Nos résultats suggèrent que, chez les souris transgéniques, Lck est maintenu sous forme inactive et empêche ainsi l'activation

de Zap70 et le recrutement de LAT au niveau des radeaux lipidiques : C-mip inhibe la signalisation proximale et le recrutement des radeaux au niveau de la synapse immunologique. Nos analyses lipidomiques ont montré que les souris Lck-C-mip avaient un profil de gangliosides altérés : les niveaux de GM3, le plus abondant des gangliosides (110), et de GM2 sont diminués alors que celui des GM1, auquel se fixe principalement la choléra toxine, est augmenté chez les souris transgéniques. Or, GM3 a un rôle crucial dans l'activation et la transduction du signal, notamment en co-localisant avec Zap70 (111).

Notre étude a montré que la polarisation des LT, visualisée par la cholera toxine, après stimulation par CD3/CD28 est altérée chez les souris transgéniques, montrant à la fois une intensité de marquage à la choléra toxine plus faible mais également un défaut de polarisation du marquage. On peut donc penser que i) la choléra toxine étant un marqueur essentiellement des GM1 mais également des GM3 avec une affinité plus faible (112), on peut supposer que la baisse d'intensité du marquage par la cholera toxine s'explique par la déplétion en GM3 ; ii) que la diminution de GM2 et GM3 chez les souris transgéniques pourrait avoir un rôle dans l'inhibition de la formation de la synapse immunologique sans que le mécanisme responsable n'ait été identifié. Enfin l'analyse par protéomique différentielle a permis d'identifier 4 clusters de protéines présentant des variations chez les souris transgéniques comparées aux souris contrôles. Parmi ceux-ci, la cofiline-1 est inactivée chez les souris Lck-C-mip. Or cette protéine, acteur majeur de réarrangement du cytosquelette d'actine, a montré que l'inhibition de son interaction avec les filaments d'actine aboutissait à la perturbation de la formation de la synapse immunologique, à une production diminuée de cytokines ainsi qu'à une prolifération réduite (113).

Le gène *C-MIP* a été initialement identifié dans les PBMC de patients atteints d'un SNLGM. La protéine est induite dans certains cancers des cellules sanguines ou de tumeurs solides qui sont associées à la survenue d'un SNLGM concomitant (114,115). Le lien moléculaire entre les deux pathologies reste méconnu.

Contrairement à FoxP3 qui est exprimé de façon constitutive dans les Treg, l'expression basale de C-mip est peu ou pas détectable dans les conditions physiologiques. Néanmoins, les effets de FOXP3 et de C-mip sur la signalisation lymphocytaire T sont étrangement similaires. Il a été montré que la surexpression de FoxP3 dans des cultures primaires de LT CD4⁺ induisait une inhibition de la production de cytokines IL2, IL4 et l'IFN γ , ainsi qu'un blocage de l'activité transcriptionnelle dépendante de NFkB (116). De même, FoxP3 s'associe à RelA pour réprimer son activité transcriptionnelle sur les gènes cibles. Ces

propriétés sont partagées par C-mip puisqu'elles ont été démontrées dans le travail sur les souris transgéniques décrites dans cette thèse, ainsi que dans des travaux antérieurs (85,89). En outre, les Treg inhibent la stabilité de l'interaction des LT avec les cellules présentatrices d'antigènes et donc répriment la formation de la synapse immunologique (117). C-mip semble inhiber différemment la synapse immunologique en altérant la dynamique des lipides rafts puisqu'il bloque la formation de GM3, un précurseur de GM1. La molécule PD1 inhibe l'activation des LT qui inactive ZAP70 via le recrutement de SHP2. L'inhibition de la signalisation cellulaire médiée par PD1 affecte la prolifération cellulaire et les fonctions effectrices telles que la production de cytokines. La molécule CTL-4 joue également un rôle clé dans le contrôle de l'activation des LT. Dans les cellules non stimulées, son expression basale est faible mais est rapidement induite en cas d'activation. Cette cinétique est inverse de celle de C-mip, du moins dans les situations physiologiques, car la stimulation par CD3/CD28 induit une diminution très importante de C-mip au niveau du transcrit et la protéine n'est habituellement non détectable. Après activation des cellules T, CTL-4 est recruté dans des vésicules intracellulaires dans la synapse immunologique pour entraver les signaux délivrés par la co-stimulation CD3/CD28. Dans les cellules exprimant C-mip, l'effet inhibiteur semble s'exercer bien amont sur la dynamique des lipides rafts. D'une manière spéculative, nos résultats semblent suggérer que C-mip définit un nouveau mécanisme de régulation négative de l'activation lymphocytaire T. Son expression sélective dans les Treg si les résultats préliminaires sur la souris Scurfy se confirment, semble indiquer qu'il est recruté dans des situations pathologiques où les mécanismes de régulation négative de l'activation des LT sont dépassés ou inefficients.

C-mip a été également décrit comme interagissant avec de multiples partenaires, perturbant l'organisation du cytosquelette, diminuant l'activité NF- κ B et induisant l'apoptose (84,86,89,90) (Figure 14). L'étude de C-mip apporte donc un éclairage supplémentaire sur le rôle complexe de cette protéine: celle d'un régulateur négatif de l'activation des lymphocytes T. Ce rôle peut se révéler critique pour l'efficacité de la réponse immunitaire, pour la tolérance périphérique ou pour le contrôle de l'inflammation. A l'inverse, une activation maintenue peut conduire au développement de maladies auto-immunes, au rejet de greffe ou à faciliter l'apparition de cancers. De même, cet effet inhibiteur peut s'avérer délétère dans le contrôle des processus néoplasiques et à la dissémination métastatique. Une meilleure compréhension du rôle de C-mip dans le lymphocyte T pourra donc éventuellement ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques non seulement dans le SNLGM mais aussi dans d'autres pathologies.

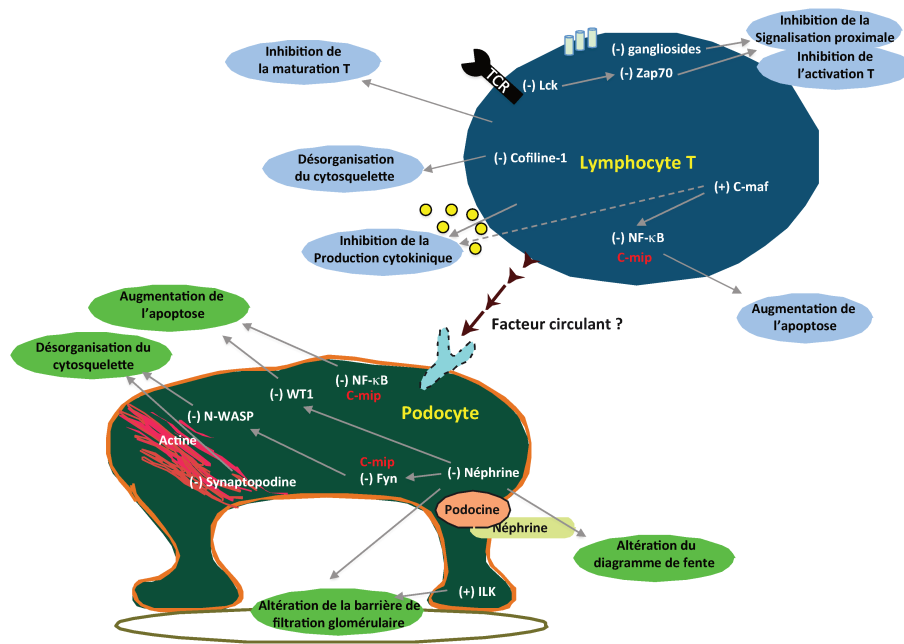


Fig. 14 : Rôles de C-mip dans la pathogénie du SNI

Bibliographie

1. Sahali D, Sendeyo K, Mangier M, Audard V, Zhang SY, Lang P, et al. Immunopathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome with relapse. *Semin Immunopathol*. 2014 Jul;36(4):421–9.
2. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2002 Apr;2(4):251–62.
3. Larosa DF, Orange JS. 1. Lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Feb;121(2 Suppl):S364–369; quiz S412.
4. Roulland S, Suarez F, Hermine O, Nadel B. Pathophysiological aspects of memory B-cell development. *Trends Immunol*. 2008 Jan 1;29(1):25–33.
5. Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, Green A, Perdrix A, Boyer O, et al. Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2008 Apr;127(1):14–25.
6. Chung JB, Silverman M, Monroe JG. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol*. 2003 Jun;24(6):343–9.
7. Zandvoort A, Timens W. The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. *Clin Exp Immunol*. 2002 Oct;130(1):4–11.
8. Oliver AM, Martin F, Kearney JF. IgMhighCD21high lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Jun 15;162(12):7198–207.
9. Attanavanich K, Kearney JF. Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Jan 15;172(2):803–11.
10. Sonoda K-H, Stein-Streilein J. CD1d on antigen-transporting APC and splenic marginal zone B cells promotes NKT cell-dependent tolerance. *Eur J Immunol*. 2002 Mar;32(3):848–57.
11. Lang GA, Devera TS, Lang ML. Requirement for CD1d expression by B cells to stimulate NKT cell-enhanced antibody production. *Blood*. 2008 Feb 15;111(4):2158–62.
12. Reif K, Ekland EH, Ohl L, Nakano H, Lipp M, Förster R, et al. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature*. 2002 Mar 7;416(6876):94–9.
13. Tarlinton D, Radbruch A, Hiepe F, Dörner T. Plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol*. 2008 Apr;20(2):162–9.
14. Reynaud C-A, Aoufouchi S, Faili A, Weill J-C. What role for AID: mutator, or assembler of the immunoglobulin mutasome? *Nat Immunol*. 2003 Jul;4(7):631–8.
15. Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*. 2002 May;2(5):309–22.
16. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*. 2010 Feb 26;327(5969):1098–102.
17. Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, et al. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 2002 Jun;3(6):549–57.
18. Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev*. 2000 Jul 15;14(14):1693–711.
19. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235–8.
20. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*. 2007 Jun;8(6):639–46.
21. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The

- orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell*. 2006 Sep 22;126(6):1121–33.
22. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol*. 2005 Apr;6(4):331–7.
 23. Kim JM, Rudensky A. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev*. 2006 Aug;212:86–98.
 24. Powell BR, Buist NR, Stenzel P. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J Pediatr*. 1982 May;100(5):731–7.
 25. Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest*. 2000 Dec;106(12):R75–81.
 26. Godfrey VL, Wilkinson JE, Rinchik EM, Russell LB. Fatal lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mouse requires T cells that mature in a sf thymic environment: potential model for thymic education. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Jul 1;88(13):5528–32.
 27. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K-J, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003 Dec 15;198(12):1875–86.
 28. Atarashi K, Umesaki Y, Honda K. Microbial influence on T cell subset development. *Semin Immunol*. 2011 Apr;23(2):146–53.
 29. Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 6;107(27):12204–9.
 30. Ma CS, Suryani S, Avery DT, Chan A, Nanan R, Santner-Nanan B, et al. Early commitment of naïve human CD4⁺ T cells to the T follicular helper (T_{FH}) cell lineage is induced by IL-12. *Immunol Cell Biol*. 2009 Dec;87(8):590–600.
 31. Nurieva RI, Podd A, Chen Y, Alekseev AM, Yu M, Qi X, et al. STAT5 protein negatively regulates T follicular helper (T_{fh}) cell generation and function. *J Biol Chem*. 2012 Mar 30;287(14):11234–9.
 32. Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol*. 2008 Apr;8(4):247–58.
 33. Dellabona P, Padovan E, Casorati G, Brockhaus M, Lanzavecchia A. An invariant V α 24-J α Q/V β 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4⁺ T cells. *J Exp Med*. 1994 Sep 1;180(3):1171–6.
 34. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297–336.
 35. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol*. 2013 Feb;13(2):101–17.
 36. La Cava A, Van Kaer L, Fu-Dong-Shi null. CD4⁺CD25⁺ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends Immunol*. 2006 Jul;27(7):322–7.
 37. Huppa JB, Davis MM. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(12):973–83.
 38. Dustin ML. Modular design of immunological synapses and kinapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Jul;1(1):a002873.
 39. Sharpe AH. Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev*. 2009 May;229(1):5–11.
 40. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol*. 2001 Dec;1(3):220–8.
 41. Chakraborty AK, Weiss A. Insights into the initiation of TCR signaling. *Nat Immunol*. 2014 Sep;15(9):798–807.
 42. Malissen B, Bongrand P. Early T cell activation: integrating biochemical, structural,

- and biophysical cues. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:539–61.
43. Viola A, Gupta N. Tether and trap: regulation of membrane-raft dynamics by actin-binding proteins. *Nat Rev Immunol*. 2007 Nov;7(11):889–96.
 44. Zikherman J, Weiss A. Antigen receptor signaling in the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(1):202.
 45. Brownlie RJ, Zamoyska R. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol*. 2013 Apr;13(4):257–69.
 46. Schoenborn JR, Tan YX, Zhang C, Shokat KM, Weiss A. Feedback circuits monitor and adjust basal Lck-dependent events in T cell receptor signaling. *Sci Signal*. 2011 Sep 13;4(190):ra59.
 47. Rhee I, Veillette A. Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2012 May;13(5):439–47.
 48. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197–216.
 49. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jan;4(1):11–22.
 50. Fadok VA, Chimini G. The phagocytosis of apoptotic cells. *Semin Immunol*. 2001 Dec;13(6):365–72.
 51. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*. 2003 Dec;3(12):984–93.
 52. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev*. 2003 Jan;83(1):253–307.
 53. Banas MC, Banas B, Hudkins KL, Wietecha TA, Iyoda M, Bock E, et al. TLR4 links podocytes with the innate immune system to mediate glomerular injury. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2008 Apr;19(4):704–13.
 54. Reiser J, von Gersdorff G, Loos M, Oh J, Asanuma K, Giardino L, et al. Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *J Clin Invest*. 2004 May;113(10):1390–7.
 55. Baye E, Gallazzini M, Delville M, Legendre C, Terzi F, Canaud G. The costimulatory receptor B7-1 is not induced in injured podocytes. *Kidney Int*. 2016 Nov;90(5):1037–44.
 56. Delville M, Baye E, Durrbach A, Audard V, Kofman T, Braun L, et al. B7-1 Blockade Does Not Improve Post-Transplant Nephrotic Syndrome Caused by Recurrent FSGS. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2016 Aug;27(8):2520–7.
 57. Greiber S, Müller B, Daemisch P, Pavenstädt H. Reactive oxygen species alter gene expression in podocytes: induction of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2002 Jan;13(1):86–95.
 58. Eddy AA, Symons JM. Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet Lond Engl*. 2003 Aug 23;362(9384):629–39.
 59. Dorval G, Gribouval O, Martinez-Barquero V, Machuca E, Tête M-J, Baudouin V, et al. Clinical and genetic heterogeneity in familial steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2017 Oct 23;1–11.
 60. Sahali D, Audard V, Rémy P, Lang P. [Pathogenesis and treatment of idiopathic nephrotic syndrome in adults]. *Nephrol Ther*. 2012 Jun;8(3):180–92.
 61. Kamei K, Ishikura K, Sako M, Aya K, Tanaka R, Nozu K, et al. Long-term outcome of childhood-onset complicated nephrotic syndrome after a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial of rituximab. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. 2017 Jun 29;
 62. Zhang S yu, Audard V, Fan Q, Pawlak A, Lang P, Sahali D. Immunopathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *Contrib Nephrol*. 2011;169:94–106.
 63. van den Berg JG, Weening JJ. Role of the immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *Clin Sci Lond Engl 1979*. 2004 Aug;107(2):125–36.

64. Yan K, Kudo A, Hirano H, Watanabe T, Tasaka T, Kataoka S, et al. Subcellular localization of glucocorticoid receptor protein in the human kidney glomerulus. *Kidney Int.* 1999 Jul;56(1):65–73.
65. Parry RG, Gillespie KM, Mathieson PW. Effects of type 2 cytokines on glomerular epithelial cells. *Exp Nephrol.* 2001;9(4):275–83.
66. Aten J, Roos A, Claessen N, Schilder-Tol EJ, Ten Berge IJ, Weening JJ. Strong and selective glomerular localization of CD134 ligand and TNF receptor-1 in proliferative lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2000 Aug;11(8):1426–38.
67. Van Den Berg JG, Aten J, Chand MA, Claessen N, Dijkink L, Wijdenes J, et al. Interleukin-4 and interleukin-13 act on glomerular visceral epithelial cells. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2000 Mar;11(3):413–22.
68. François H, Daugas E, Bensman A, Ronco P. Unexpected Efficacy of Rituximab in Multirelapsing Minimal Change Nephrotic Syndrome in the Adult: First Case Report and Pathophysiological Considerations. *Am J Kidney Dis.* 2007 Jan 1;49(1):158–61.
69. Munyentwali H, Bouachi K, Audard V, Remy P, Lang P, Mojaat R, et al. Rituximab is an efficient and safe treatment in adults with steroid-dependent minimal change disease. *Kidney Int.* 2013 Mar;83(3):511–6.
70. Warshaw BL, Check IJ. IgG subclasses in children with nephrotic syndrome. *Am J Clin Pathol.* 1989 Jul;92(1):68–72.
71. Kemper MJ, Altrogge H, Ganschow R, Müller-Wiefel DE. Serum levels of immunoglobulins and IgG subclasses in steroid sensitive nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2002 Jun;17(6):413–7.
72. Mathieson PW. Minimal change nephropathy and focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Immunopathol.* 2007 Nov;29(4):415–26.
73. Kemper MJ, Wolf G, Müller-Wiefel DE. Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child. *N Engl J Med.* 2001 Feb 1;344(5):386–7.
74. Dantal J, Bigot E, Bogers W, Testa A, Kriaa F, Jacques Y, et al. Effect of plasma protein adsorption on protein excretion in kidney-transplant recipients with recurrent nephrotic syndrome. *N Engl J Med.* 1994 Jan 6;330(1):7–14.
75. Savin VJ, Sharma R, Sharma M, McCarthy ET, Swan SK, Ellis E, et al. Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med.* 1996 Apr 4;334(14):878–83.
76. Rea R, Smith C, Sandhu K, Kwan J, Tomson C. Successful transplant of a kidney with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2001 Feb;16(2):416–7.
77. Boulton Jones JM, Tulloch I, Dore B, McLay A. Changes in the glomerular capillary wall induced by lymphocyte products and serum of nephrotic patients. *Clin Nephrol.* 1983 Aug;20(2):72–7.
78. Koyama A, Fujisaki M, Kobayashi M, Igarashi M, Narita M. A glomerular permeability factor produced by human T cell hybridomas. *Kidney Int.* 1991 Sep 1;40(3):453–60.
79. Tanaka R, Yoshikawa N, Nakamura H, Ito H. Infusion of peripheral blood mononuclear cell products from nephrotic children increases albuminuria in rats. *Nephron.* 1992;60(1):35–41.
80. Matsumoto K, Kanmatsuse K. Elevated vascular endothelial growth factor levels in the urine of patients with minimal-change nephrotic syndrome. *Clin Nephrol.* 2001 Apr;55(4):269–74.
81. Lai K-W, Wei C-L, Tan L-K, Tan P-H, Chiang GSC, Lee CGL, et al. Overexpression of Interleukin-13 Induces Minimal-Change-Like Nephropathy in Rats. *J Am Soc Nephrol.* 2007 May 1;18(5):1476–85.

82. McCarthy ET, Sharma M, Savin VJ. Circulating Permeability Factors in Idiopathic Nephrotic Syndrome and Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010 Nov 1;5(11):2115–21.
83. Wei C, El Hindi S, Li J, Fornoni A, Goes N, Sageshima J, et al. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med*. 2011 Jul 31;17(8):952–60.
84. Zhang S-Y, Kamal M, Dahan K, Pawlak A, Ory V, Desvaux D, et al. c-mip impairs podocyte proximal signaling and induces heavy proteinuria. *Sci Signal*. 2010;3(122):ra39.
85. Izzedine H, Mangier M, Ory V, Zhang S-Y, Sendeyo K, Bouachi K, et al. Expression patterns of RelA and c-mip are associated with different glomerular diseases following anti-VEGF therapy. *Kidney Int*. 2014 Feb;85(2):457–70.
86. Ory V, Fan Q, Hamdaoui N, Zhang S, Desvaux D, Audard V, et al. c-mip down-regulates NF- κ B activity and promotes apoptosis in podocytes. *Am J Pathol*. 2012 Jun;180(6):2284–92.
87. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol*. 2011 Jul 19;12(8):695–708.
88. Valanciutė A, le Gouvello S, Solhonne B, Pawlak A, Grimbert P, Lyonnet L, et al. NF-kappa B p65 antagonizes IL-4 induction by c-maf in minimal change nephrotic syndrome. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Jan 1;172(1):688–98.
89. Kamal M, Valanciute A, Dahan K, Ory V, Pawlak A, Lang P, et al. C-mip interacts physically with RelA and inhibits nuclear factor kappa B activity. *Mol Immunol*. 2009 Feb;46(5):991–8.
90. Kamal M, Pawlak A, BenMohamed F, Valanciutė A, Dahan K, Candelier M, et al. C-mip interacts with the p85 subunit of PI3 kinase and exerts a dual effect on ERK signaling via the recruitment of Dip1 and DAP kinase. *FEBS Lett*. 2010 Feb 5;584(3):500–6.
91. Rood IM, Huussen J, Wetzels JF, Deegens JK. Rituximab can induce remission of nephrotic syndrome in the absence of peripheral B-cells. *Nephrol Carlton Vic*. 2015 Sep;20(9):667–8.
92. Zhang N, Zhao P, Shrestha A, Zhang L, Qu Z, Liu M, et al. A higher frequency of CD4⁺CXCR5⁺ T follicular helper cells in adult patients with minimal change disease. *BioMed Res Int*. 2014;2014:836157.
93. Wallin EF, Jolly EC, Suchánek O, Bradley JA, Espéli M, Jayne DRW, et al. Human T-follicular helper and T-follicular regulatory cell maintenance is independent of germinal centers. *Blood*. 2014 Oct 23;124(17):2666–74.
94. Colucci M, Carsetti R, Cascioli S, Casiraghi F, Perna A, Ravà L, et al. B Cell Reconstitution after Rituximab Treatment in Idiopathic Nephrotic Syndrome. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2016 Jun;27(6):1811–22.
95. Zabel F, Fettelschoss A, Vogel M, Johansen P, Kündig TM, Bachmann MF. Distinct T helper cell dependence of memory B-cell proliferation versus plasma cell differentiation. *Immunology*. 2017;150(3):329–42.
96. Parietti V, Chiffot H, Sibilia J, Muller S, Monneaux F. Rituximab treatment overcomes reduction of regulatory iNKT cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2010 Mar;134(3):331–9.
97. Bosma A, Abdel-Gadir A, Isenberg DA, Jury EC, Mauri C. Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells. *Immunity*. 2012 Mar 23;36(3):477–90.
98. Oishi Y, Sakamoto A, Kurasawa K, Nakajima H, Nakao A, Nakagawa N, et al. CD4-CD8- T cells bearing invariant Valpha24JalphaQ TCR alpha-chain are decreased in patients with atopic diseases. *Clin Exp Immunol*. 2000 Mar;119(3):404–11.
99. Oishi Y, Sumida T, Sakamoto A, Kita Y, Kurasawa K, Nawata Y, et al. Selective

- reduction and recovery of invariant Valpha24JalphaQ T cell receptor T cells in correlation with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2001 Feb;28(2):275–83.
100. Araya C, Diaz L, Wasserfall C, Atkinson M, Mu W, Johnson R, et al. T regulatory cell function in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. 2009 Sep;24(9):1691–8.
 101. Liu L-L, Qin Y, Cai J-F, Wang H-Y, Tao J-L, Li H, et al. Th17/Treg imbalance in adult patients with minimal change nephrotic syndrome. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2011 Jun;139(3):314–20.
 102. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2012 Feb 17;12(3):180–90.
 103. Bonanni A, Bertelli R, Rossi R, Bruschi M, Di Donato A, Ravani P, et al. A Pilot Study of IL2 in Drug-Resistant Idiopathic Nephrotic Syndrome. *PloS One*. 2015;10(9):e0138343.
 104. Alexander C-M, Tygrett LT, Boyden AW, Wolniak KL, Legge KL, Waldschmidt TJ. T regulatory cells participate in the control of germinal centre reactions. *Immunology*. 2011 Aug;133(4):452–68.
 105. Fodor P, Saitúa MT, Rodriguez E, González B, Schlesinger L. T-cell dysfunction in minimal-change nephrotic syndrome of childhood. *Am J Dis Child* 1960. 1982 Aug;136(8):713–7.
 106. Le Berre L, Godfrin Y, Günther E, Buzelin F, Perretto S, Smit H, et al. Extrarenal effects on the pathogenesis and relapse of idiopathic nephrotic syndrome in Buffalo/Mna rats. *J Clin Invest*. 2002 Feb;109(4):491–8.
 107. Le Berre L, Bruneau S, Naulet J, Renaudin K, Buzelin F, Usal C, et al. Induction of T regulatory cells attenuates idiopathic nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2009 Jan;20(1):57–67.
 108. Liu Y, Su L, Lin Q, Han Y, You P, Fan Q. Induction of C-Mip by IL-17 Plays an Important Role in Adriamycin-Induced Podocyte Damage. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2015;36(4):1274–90.
 109. Hashimura Y, Nozu K, Kanegane H, Miyawaki T, Hayakawa A, Yoshikawa N, et al. Minimal change nephrotic syndrome associated with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. 2009 Jun;24(6):1181–6.
 110. Tuosto L, Parolini I, Schröder S, Sargiacomo M, Lanzavecchia A, Viola A. Organization of plasma membrane functional rafts upon T cell activation. *Eur J Immunol*. 2001 Feb;31(2):345–9.
 111. Garofalo T, Lenti L, Longo A, Misasi R, Mattei V, Pontieri GM, et al. Association of GM3 with Zap-70 induced by T cell activation in plasma membrane microdomains: GM3 as a marker of microdomains in human lymphocytes. *J Biol Chem*. 2002 Mar 29;277(13):11233–8.
 112. Kuziemko GM, Stroh M, Stevens RC. Cholera toxin binding affinity and specificity for gangliosides determined by surface plasmon resonance. *Biochemistry (Mosc)*. 1996 May 21;35(20):6375–84.
 113. Eibert SM, Lee K-H, Pipkorn R, Sester U, Wabnitz GH, Giese T, et al. Cofilin peptide homologs interfere with immunological synapse formation and T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 17;101(7):1957–62.
 114. Audard V, Zhang S, Copie-Bergman C, Rucker-Martin C, Ory V, Candelier M, et al. Occurrence of minimal change nephrotic syndrome in classical Hodgkin lymphoma is closely related to the induction of c-mip in Hodgkin-Reed Sternberg cells and podocytes. *Blood*. 2010 May 6;115(18):3756–62.

115. Bouatou Y, Koessler T, Oniszczyk J, Zhang S-Y, Moll S, Audard V, et al. Nephrotic Syndrome in Small Cell Lung Cancer and Induction of C-Mip in Podocytes. *Am J Kidney Dis*. 2017 Mar;69(3):477–80.
116. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Apr 5;102(14):5138–43.
117. Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, et al. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med*. 2006 Mar 20;203(3):505–11.