



**HAL**  
open science

# Étude du syndrome néphrotique idiopathique par des approches protéomiques

Cerina Chhuon

► **To cite this version:**

Cerina Chhuon. Étude du syndrome néphrotique idiopathique par des approches protéomiques. Immunothérapie. Université Paris-Est, 2020. Français. NNT : 2020PESC2093 . tel-03484316

**HAL Id: tel-03484316**

**<https://theses.hal.science/tel-03484316>**

Submitted on 17 Dec 2021

**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.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

UNIVERSITÉ DE PARIS-EST – ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du titre de DOCTEUR en Sciences de la vie et de la Santé

Présentée par

**CERINA CHHUON**

Etude du syndrome néphrotique idiopathique par des  
approches protéomiques

Soutenue le 16 décembre 2020

Membres du jury :

Rapporteur	Mr Jean-Michel CAMADRO	DR1 (CNRS)
Rapporteur	Mr Hans LORENZO	MCU-PH (Université Paris-Saclay)
Examineur	Mr Aleksander EDELMAN	DR1 Émérite (CNRS)
Directeur de thèse	Mr Mario OLLERO	Professeur (Université Paris-Est)
Co-Directrice de thèse	Mme Ida Chiara GUERRERA	IR1 (INSERM)



## REMERCIEMENTS

Voilà, c'est fini ! Ma thèse s'achève cette année. Même dans mes projections les plus folles, si on m'avait dit que cette dernière année se passerait de cette façon, je n'y aurais pas cru. Quatre années de dur labeur s'achèvent, j'en profite pour remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai travaillé ou côtoyé pendant toutes ces années.

Tout d'abord, je voudrais commencer par remercier mes directeurs de thèse :

**Mario**, je te remercie sincèrement pour tout, tes conseils avisés, ta grande implication dans ma thèse, toujours disponible à la milliseconde pour moi, toujours volontaire. Je ne t'ai jamais entendu râler sur rien ni personne, tu as un cœur en or, les personnes comme toi sont rares dans ce monde de brutes.

**Chiara**, on vient tout juste de fêter nos 10 ans ensemble ! Merci à toi de m'avoir soutenue pour que je puisse réaliser ma thèse à mi-temps au sein de la plateforme. J'ai beaucoup appris à tes côtés durant ces 4 dernières années, et si je suis aussi accomplie professionnellement aujourd'hui, c'est essentiellement grâce à toi. Je te remercie aussi chaleureusement pour ton soutien dans les moments difficiles de ma vie perso.

Je voudrais ensuite remercier les membres de mon jury de thèse :

**Aleksander**, aka Alex **n°2** (!) je garde précieusement dans ma mémoire tous les moments passés avec toi, je pense réellement que tu es un visionnaire, tu vises souvent de manière très juste et c'est toujours un plaisir de discuter avec toi, et surtout, je ne t'oublie pas.

**Jean-Michel**, je te remercie d'être présent à des moments charnières de ma vie professionnelle. Ma première expérience professionnelle a été à tes côtés, et si ça s'était mal passé, j'aurais certainement tourné les talons et dit adieu à la protéomique. Je me souviendrais toujours des moments passés avec toi et Manuel à l'IJM. Tu es un véritable puits de savoir, merci pour ta gentillesse et ta disponibilité.

**Hans**, je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci de l'intérêt que vous portez à mon travail.

Je remercie également les personnes qui partagent mon quotidien :

**Joanna**, j'apprécie beaucoup ta compagnie et c'est important quand on passe 8h par jour avec quelqu'un, merci pour toutes nos discussions qui ont aidé à soulager mes angoisses

**Vincent**, pour nos discussions plus ou moins sérieuses, ton tempérament gaffeur me fait toujours rire !

Merci à vous deux pour m'avoir, dans la mesure du possible, déchargée du travail de la plateforme pendant ma thèse, sans vous, je n'aurais pas pu mener à bien cette thèse.

**Danielle**, pour être toi, ta bonne humeur, ton énergie, pour toutes les engueulades (mais ça fait longtemps que tu ne m'as pas engueulée) et bisous bruyants (ça aussi, ça fait longtemps que je n'en ai pas eu, je ne remercie pas la covid).

Je remercie également toute l'équipe Sahali à Créteil et plus particulièrement, **Dil**, pour votre disponibilité, bienveillance et qualité de vos conseils, **Shao-Yu**, pour ton aide et ta gentillesse, **Julie**, je te remercie pour m'avoir formée alors que ce n'était pas ton boulot, **Hamza**, pour avoir écouté tous mes malheurs, **Cécile**, pour ta bonne humeur communicative.

Je tiens à remercier toute l'équipe Sermet à Necker, **Isabelle**, merci pour ton aide pour mes soucis de santé, **Aurélie**, je sais que mon estomac t'embête souvent, **Iwona**, **Nesrine**, de ne pas râler lorsque « j'emprunte » des choses, **Anita** à qui je pique souvent la paillasse, **Thao** pour ta gentillesse. J'ai une pensée pour les anciens de l'équipe qui sont partis **Matthieu** et **Juliette**.

Je tiens à remercier toute l'équipe 3p5 à Cochin, plus particulièrement **Marjorie** (force et courage !), **Virginie**, **François**, **Cédric**.

Un grand merci à **Camille** et **Anne-Claire** pour vos encouragements, c'est toujours agréable d'être comprise et écoutée.

Je voulais aussi remercier mes amies, **Angella**, **Astrid**, **Katelle**, **Nadira** et **Natou**, le club des filles aux agendas de ministres, on a toutes débutées des études de biologie et on a toutes prises des voies différentes ! J'ai une pensée particulière pour **Caro**, pour ton soutien indéfectible et à qui je confie tout mais tu es si loin maintenant !

Enfin, je remercie ma famille, mes cousins et cousines, mon frère. Mon papa, qui est toujours très fier du chemin que j'ai pris et qui me soutient dans toutes mes décisions, « du moment que je suis heureuse ». Ma maman, en dépit de tout, tu seras toujours dans mon cœur.

Mes plus grands remerciements vont à **Alexandre** (aka Alex n°1 ou Alekeusseu ou Erikson), tu savais que cette thèse allait bousculer notre vie mais tu m'as quand même poussée dans cette voie. Je ne te remercierais jamais assez pour m'avoir soutenue durant ces 4 dernières années, partageant les joies comme les peines. Je suis extrêmement chanceuse de t'avoir à mes côtés, je t'aime fort !



## LISTE DES FIGURES ET TABLES

Figure 1. Images optiques d'un glomérule rénal sain et HSF. ....	1
Figure 2. Images de microscopie électronique montrant l'effacement des pédicelles. ....	2
Figure 3. Anatomie du glomérule rénal.....	3
Figure 4. Architecture du podocyte.....	5
Figure 5. Cellules du système immunitaire. ....	10
Figure 6. Culture de podocytes humains immortalisés différenciés à J14 (37°C). ....	14
Figure 7. Workflow de l'analyse protéomique. ....	19
Figure 8. Etapes de la digestion FASP (Filter-Aided Sample Preparation) (J, Rr and Ja, 2014) .....	21
Figure 9. Etapes de la digestion S-Trap (Suspension Trap) (ProTIFI).....	22
Figure 10. Fractionnement à pH basique online ou offline (avec HPLC ou cône).....	25
Figure 11. Nomenclature des différents ions générés après fragmentation du peptide.....	27
Figure 12. Principe d'identification des protéines par interrogation sur banques de données .....	29
Figure 13. Méthodes de quantifications relatives sans marquages.....	31
Figure 14. Principe du "match between runs" .....	33
Figure 15. Résumé des protéines des rafts des podocytes impliquées dans l'HSF.....	45
Figure 16. Protéines des rafts et associées aux rafts lors de l'activation des LT.....	46
Figure 17. Gamme dynamique du protéome plasmatique. ....	48
Figure 18. Biogénèse et sécrétion des vésicules extracellulaires (EV) .....	51
Figure 19. Vésicules extracellulaires des cellules sanguines .....	52
Figure 20. Recrutement différentiel des protéines dans les rafts en fonction de la présence de CMIP96	
Tableau 1 : Comparatif des différentes méthodes de digestion.....	23
Tableau 2 : Exemple de quantification obtenue avec « match between runs ».....	34

## LISTE DES ABREVIATIONS

Angptl4	Glycoprotéine angiopoietin-like 4
CD2AP	CD2 Associated Protein
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMIP	c-maf Inducing Protein
CPA	Cellule présentatrice de l'Antigène
DDA	Data-Dependent Acquisition
DIA	Data-independent Acquisition
DRM	Detergent-Resistant Membranes
EV	Vésicules extracellulaires
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FRET	Förster resonance energy transfer
FSGS	Focal and Segmental GlomeruloSclerosis (ou HSF)
GEM	Glomerulonephrite Extra-Membraneuse
HSF	Hyalinose Segmentaire et Focale (ou FSGS)
IQGAP1	IQ motif –containing GTPase –Activating Protein 1
IMAC	Immobilized Metal ion Affinity Chromatography
JAK	Janus Kinase
LAT	Linker for activation of T cells
LB	Lymphocytes B
LCK	T Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LGM	Lésions Glomérulaires Minimales (ou MCNS)
LT	Lymphocytes T
MBR	Match Between Runs
MCD	Minimal Change Disease (ou MCNS)
MCNS	Minimal Change Nephrotic Syndrome (ou LGM)
MS	Mass spectrometry
Nck	Non-catalytic region of tyrosine kinase
NF- $\kappa$ B	Nuclear Transcription Factor $\kappa$ B
N-WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
PEC	Parietal Epithelial Cells
PH	Pleckstrin Homology
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3 phosphate Kinase
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
SCX	Strong Cation Exchange
SH2	Src Homology Domain 2
SNI	Syndrome Néphrotique Idiopathique
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
suPAR	soluble urokinase-type Plasminogen Activator Receptor
TCR	T Cell Receptor
TiO <sub>2</sub>	Titanium Dioxide
TRPC	Transient Receptor Potentiel Cation Channe
WT1	Wilm's Tumor Gene 1
ZAP70	Syk family kinase $\zeta$ -chain-associated protein of 70 KDa



# TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>II</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLES</b>	<b>IV</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>VI</b>
<b>ETAT DE L'ART</b>	<b>1</b>
<b>1.1 SYNDROME NEPHROTIQUE</b>	<b>1</b>
1.1.1 GENERALITES	1
1.1.2 PHYSIOPATHOLOGIE DU SNI	4
Structure du podocyte	4
Cytosquelette du podocyte	5
Conséquences des lésions podocytaires	6
1.1.2.1 ROLE DU SYSTEME IMMUNITAIRE	7
Rôle de CMIP	7
Dérégulation des populations de lymphocytes	8
1.1.2.2 ROLE DES POTENTIELS FACTEURS DE PERMEABILITÉ	10
Caractéristiques physico-chimiques du facteur de perméabilité	11
suPAR	11
CLCF-1	12
CASK	12
CD 40	12
<b>1.2 MODELES POUR L'ETUDE DU SYNDROME NEPHROTIQUE</b>	<b>13</b>
1.2.1 MODELES CELLULAIRES	13
1.2.2 MODELES ANIMAUX	15
1.2.2.1 Protéinurie spontanée chez le rat Buffalo/Mna	15
1.2.2.2 Protéinurie causée par des agents toxiques	15
1.2.2.3 Infusion de fractions plasmatiques chez des rats	15
1.2.2.4 Souris surexprimant CMIP (modèles Lck et néphrine)	16
<b>1.3 LA PROTEOMIQUE ET SES APPLICATIONS DANS L'ETUDE DU SYNDROME NEPHROTIQUE</b>	<b>17</b>
1.3.1 GENERALITES SUR LA PROTEOMIQUE ET LA SPECTROMETRIE DE MASSE	17
Introduction	17
Enjeux de l'analyse protéomique par spectrométrie de masse	18
1.3.1.1 Méthodologie de l'analyse protéomique par spectrométrie de masse (MS)	18
1.3.1.2 Préparation des échantillons	20
Extraction et digestion des protéines	20
Fractionnement des peptides pour une analyse en profondeur du protéome	23
1.3.1.3 Analyse nanoLC-MS/MS	26
1.3.1.4 Identification des protéines	26
Utilisation de bases de données	27
1.3.1.5 Analyse des données protéomiques quantitatives	30

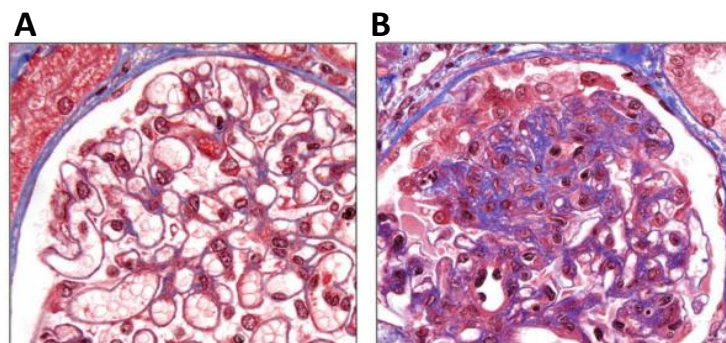
1.3.2	APPROCHES PROTEOMIQUES POUR L'ETUDE DU SYNDROME NEPHROTIQUE	36
1.3.2.1	PROTEOMIQUE DES PODOCYTES DANS DES MODELES DU SNI	36
1.3.2.2	PROTEOMIQUE DES LT DES PATIENTS MCNS	37
1.3.2.3	PHOSPHOPROTEOMIQUE	37
	Introduction sur la phosphorylation	37
	Approches pour l'étude du phosphoproteome	38
	L'analyse des phosphoprotéines dans le SNI	39
1.3.2.4	PROTEOMIQUE DES RAFTS	40
	Introduction sur les rafts	40
	Approches pour l'étude du raftome	42
	L'analyse des rafts dans le SNI	43
1.3.2.5	PROTEOMIQUE DES FLUIDES BIOLOGIQUES	47
	Plasma	47
	Urine	49
	Vésicules extracellulaires (EVs)	50
<b>OBJECTIFS DE LA THÈSE</b>		<b>54</b>
<b>RESULTATS</b>		<b>55</b>
<b>1.4</b>	<b>AXE FONDAMENTAL</b>	<b>55</b>
1.4.1	MISE AU POINT D'UNE METHODE FASP POUR L'ANALYSE DES LT	55
1.4.2	CMIP EST UN REGULATEUR NEGATIF DES LYMPHOCYTES T	63
1.4.3	DEVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE SENSIBLE S-TRAP POUR L'ANALYSE DU RAFTOME DES LYMPHOCYTES T	81
1.4.4	IMPACT DE L'EXPRESSION DE CMIP SUR LE PROTEOME DES RAFTS DES LT	95
1.4.5	SIGNALISATION PROXIMALE DU PODOCYTE SOUS L'EFFET DES ECHANGES PLASMATIQUES DE PATIENTS EN RECIDIVE POST-GREFFE DE LA HSF	97
<b>1.5</b>	<b>AXE CLINIQUE</b>	<b>126</b>
1.5.1	ETUDE PROTEOMIQUE DES ECHANGES PLASMATIQUES DE PATIENTS EN RECIDIVES POST-GREFFE DE LA HSF	126
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>		<b>146</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>		<b>152</b>
<b>RÉSUMÉ</b>		<b>162</b>
<b>ABSTRACT</b>		<b>162</b>

## ETAT DE L'ART

### 1.1 SYNDROME NEPHROTIQUE

#### 1.1.1 GENERALITES

Le syndrome néphrotique idiopathique (SNI) est une maladie rare du glomérule rénal touchant enfants et adultes dont les mécanismes ne sont pas encore bien élucidés. Il est défini par une protéinurie massive (présence de protéines dans les urines) supérieure à 3g par 24h, suffisamment abondante pour entraîner une hypoalbuminémie inférieure à 30g/l, sans lésions inflammatoires rénales ni dépôts d'immunoglobulines. Au niveau clinique, il se traduit par des œdèmes périphériques, une hypertension artérielle et est associé à une hyperlipidémie et des risques de thromboses. Chez l'adulte, l'examen histologique du rein est une étape diagnostique essentielle car elle permet de différencier deux formes différentes de la maladie : le syndrome néphrotique à lésions glomérulaires minimales (LGM, MCD ou MCNS en anglais) et la hyalinose segmentaire et focale (HSF, FSGS en anglais), qui nécessitent des stratégies thérapeutiques différentes. En l'absence de thérapie spécifique le traitement est basé sur l'administration de corticostéroïdes et d'immunosuppresseurs. La HSF est dite segmentaire signifiant qu'une partie seulement du glomérule présente des lésions, et focale, car parmi tous les glomérules du rein, seulement une partie est touchée. Chez les HSF, en microscopie optique, certaines protéines et certains lipides restent emprisonnés dans le glomérule, aboutissant à une hyalinose où le tissu a une apparence d'hyaline ou de verre par analyse histologique. Avec le temps, il est suggéré que ces parties d'hyalinose se développent en sclérose ou tissu cicatriciel qui remplace totalement ou partiellement le glomérule détruit (Figure 1). En microscopie électronique, on observe un effacement des pédicelles des podocytes (Figure 2).



*Figure 1. Images optiques d'un glomérule rénal sain et HSF. Microscopie photonique (coloration Trichrome) (A) Glomérule normal (B) Glomérule présentant une hyalinose (Lim et al., 2016).*

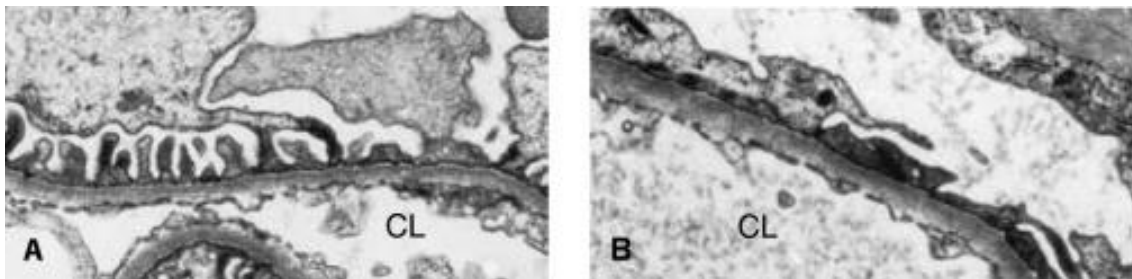
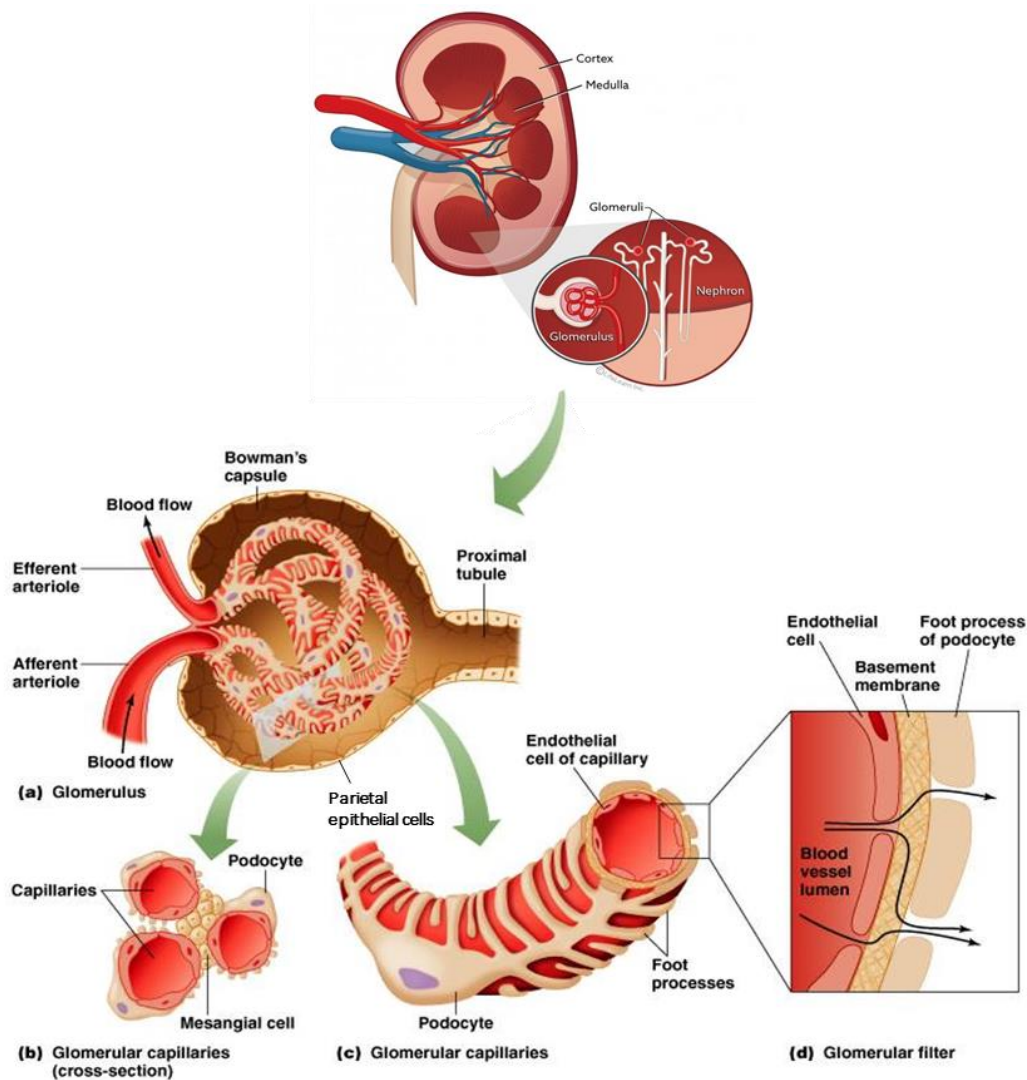


Figure 2. Images de microscopie électronique montrant l'effacement des pédicelles. Echelle 1:11000, coloration avec acétate d'uranyle et citrate de plomb (A) Podocytes normaux (B) Effacement des pédicelles des podocytes (van den Berg et al., 2004)

Des résultats de recherche suggèrent que ces changements observés dans la HSF ne sont que le résultat d'une aggravation de la forme LGM (Maas *et al.*, 2016). D'autres études suggèrent que ce sont deux maladies différentes car les mécanismes cellulaires qui conduisent à des lésions au niveau du podocyte ne sont pas les mêmes dans la HSF et la LGM (Regele *et al.*, 2000).

La HSF représente la forme la plus fréquente des glomérulopathies (15 à 25%) chez l'adulte (O'Shaughnessy *et al.*, 2017). A l'inverse des LGM, l'atteinte rénale des HSF est le plus souvent irréversible et résistante aux corticoïdes. Ainsi, l'évolution de la forme cortico-résistante est souvent défavorable et mène à une insuffisance rénale et à terme à une transplantation rénale (D'Agati, Kaskel and Falk, 2011). Les stratégies thérapeutiques proposées pour réduire le risque d'évolution vers l'insuffisance rénale terminale, reposent sur l'utilisation coordonnée des immunosuppresseurs avec de larges doses de corticoïdes et plus récemment, l'utilisation d'échanges plasmatiques ou de colonnes d'immunoabsorption.

Le rôle principal du rein est de filtrer les déchets métaboliques du sang, qui sont toxiques lorsqu'ils ne sont pas éliminés, tout en empêchant les protéines de taille supérieure à celle de l'albumine de se déverser dans l'urine. Le néphron est l'unité structurale et fonctionnelle du rein. Chaque néphron comprend un glomérule et un tubule. Le glomérule est une masse sphérique de capillaires et est essentiel pour la filtration du sang et la production d'urine primaire. Le glomérule est composé de quatre types cellulaires distincts : les cellules endothéliales, les cellules mésangiales, les podocytes et les cellules épithéliales pariétales (*parietal epithelial cells* ou *PEC*) (Figure 3). Chez un adulte, le nombre médian de néphron s'élève à 940 000 par individu et chaque glomérule est composé de 558 podocytes (Puelles *et al.*, 2015).



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

**Figure 3. Anatomie du glomérule rénal.**

*(a) Le glomérule est essentiellement composé d'un réseau capillaire. De l'artériole afférente naît le réseau capillaire où le sang est filtré à travers la barrière de filtration glomérulaire. Ce réseau capillaire se poursuit par une artériole efférente qui transporte le sang filtré. Ce réseau est entouré d'une capsule fibreuse : la capsule de Bowman qui recueille l'urine primitive et débouche à son autre extrémité dans le tubule contourné proximal. (b) Section transversale d'un capillaire, on distingue les cellules mésangiales, les capillaires au centre et les podocytes autour des capillaires. (c) Morphologie particulière des pédicelles entourant les capillaires sanguins du glomérule. (d) Barrière de filtration glomérulaire composée de cellules endothéliales, de la membrane basale glomérulaire et des podocytes. Le flux sanguin passant à travers la barrière est représenté par des flèches.*

La barrière de filtration glomérulaire permet la filtration de l'eau et de solutés et est composée de trois couches : les cellules endothéliales, la membrane basale glomérulaire et les podocytes (Figure 3d). L'endothélium fenêtré joue le rôle de première barrière de filtration. La membrane basale glomérulaire fait ainsi office de deux filtres : un filtre de taille qui empêche le passage de grosses molécules supérieures à 150kDa et un filtre électrochimique qui empêche le passage des molécules chargées négativement. Elle est continuellement renouvelée grâce aux cellules épithéliales et

mésangiales. Les podocytes sont des cellules épithéliales hautement différenciées qui couvrent la surface externe de la membrane basale glomérulaire et sont essentielles pour le maintien de l'intégrité de la barrière de filtration. Ils ont une architecture unique avec des prolongements cytoplasmiques et des ramifications, nommés pédicelles. Ces pédicelles s'entrelacent autour des capillaires, sont reliés les uns aux autres par les diaphragmes de fente laissant des fentes de filtration de 25 à 60 nm, qui fonctionnent comme un filtre moléculaire et qui constituent la dernière barrière contre la perte de protéines dans l'espace urinaire.

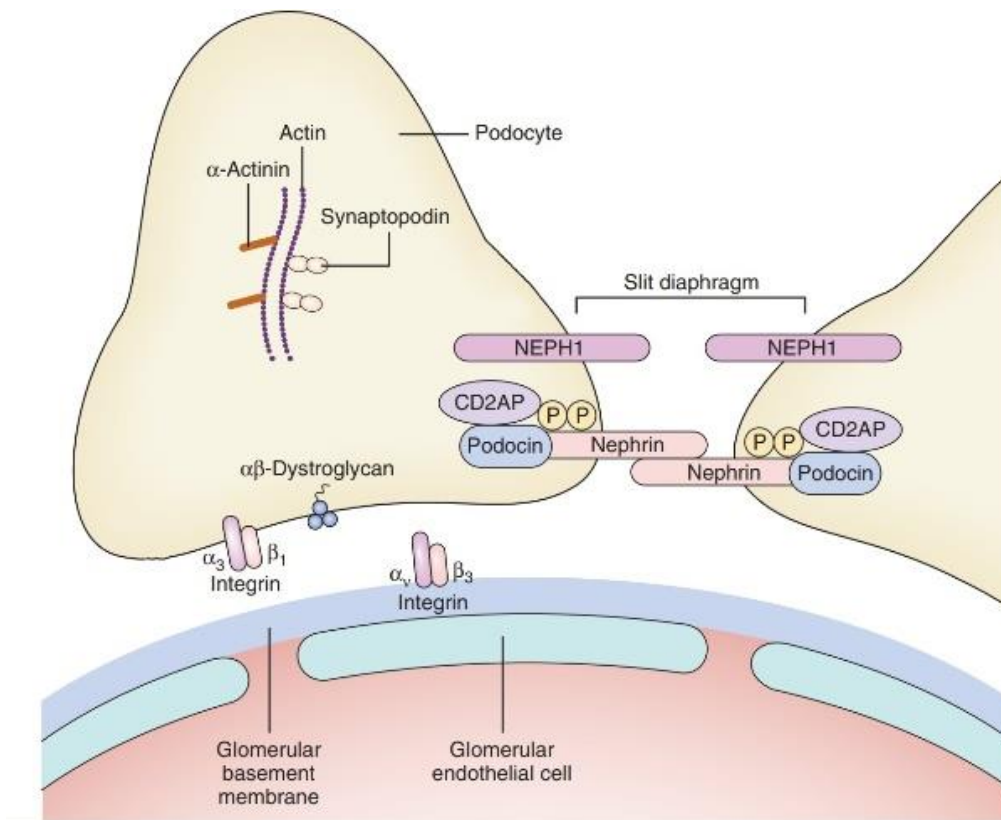
### 1.1.2 PHYSIOPATHOLOGIE DU SNI

De nombreux progrès ont été accomplis ces dernières années dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la maladie et, plus particulièrement, dans la barrière de filtration glomérulaire grâce à l'identification d'un certain nombre de gènes codant pour des protéines du glomérule rénal, en particulier du podocyte et du diaphragme de fente, et dont les mutations sont associées à l'apparition du SNI. Toutefois, la majorité des SNI (80%) restent idiopathiques (D'Agati, Kaskel and Falk, 2011).

Chaque type cellulaire qui compose la barrière de filtration glomérulaire a son importance. Cependant, la lésion podocytaire est la première caractéristique morphologique observée chez les patients HSF, ce qui explique pourquoi le podocyte en particulier est au centre de la maladie.

#### Structure du podocyte

Le podocyte est composé de 3 parties : le domaine apical, le domaine basal et le diaphragme de fente (Figure 4). Le diaphragme de fente est composé de plusieurs protéines dont la néphrine, neph-1, podocine, l' $\alpha$ -actinine-4 et CD2AP. En formant la seule connexion entre deux podocytes adjacents, le diaphragme de fente empêche la fuite des protéines des capillaires sanguins vers l'urine en agissant comme filtre de taille, comme un tamis. Il peut également être une barrière de charge, certaines protéines étant phosphorylées et chargées négativement. De plus, certaines protéines participent à la signalisation podocytaire (Martin and Jones, 2018). La partie apicale, localisée du côté de l'espace urinaire, possède une surface de charge négative due à la présence de la podocalyxine. Cette surface négative a deux rôles : elle empêche le passage de protéines chargées négativement dans l'espace urinaire et permet d'ouvrir un passage pour les molécules de petite taille qui ont déjà traversé la couche de cellules endothéliales et la membrane basale glomérulaire. La région basale est ancrée à la membrane basale glomérulaire via les intégrines avec leurs sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  et les dystroglycanes. La membrane basale glomérulaire est principalement constituée d'une matrice extracellulaire composée de collagène de type IV, de laminine et de protéoglycanes.



**Figure 4. Architecture du podocyte.** Brenner and rector's *The Kidney*, 11ème édition avec modifications. Schéma montrant le diaphragme de fente entre deux podocytes adjacents qui sont attachés à la membrane basale glomérulaire par des intégrines et des dystroglycane. Le diaphragme est constitué d'homodimères de NEPH1 mais aussi d'homodimères de néphrine, qui interagit avec la podocine et CD2AP. Le réseau de cytosquelette d'actine est représenté par l' $\alpha$ -actinine-4 et la synaptopodine.

#### Cytosquelette du podocyte

Les podocytes sont des cellules actives et mobiles grâce à un système de contraction dans les pédicelles qui comprend des fibres d'actine,  $\alpha$ -actinine et myosine. Les podocytes possèdent également un cytosquelette riche en filament intermédiaire, la vimentine, qui permet de maintenir la morphologie et la rigidité du podocyte. De plus, un système de microtubules comprenant l' $\alpha$  et la  $\beta$ -tubuline forme un réseau de cytosquelette dynamique. Avec l'actine, il régule la mobilité, les transports vésiculaires et maintient la forme et la polarité de la cellule. Les signaux envoyés au cytosquelette via le diaphragme de fente sont importants pour la fonction normale du podocyte (Schell and Huber, 2017).

## Conséquences des lésions podocytaires

La caractéristique principale des lésions podocytaires est l'effacement des pédicelles. Le cytosquelette d'actine détermine la morphologie du podocyte. Ainsi, les protéines qui régulent ou stabilisent le cytosquelette sont importantes dans la fonction normale du podocyte et une désorganisation du cytosquelette peut conduire à des changements dans la forme du podocyte et provoquer l'effacement des pédicelles. Des études récentes montrent le rôle de la famille de Rho-GTPases dans le contrôle et le remodelage de l'actine (Wang *et al.*, 2012). Des mutations dans les gènes codant les protéines régulant la famille de Rho-GTPases ont été retrouvées dans des formes familiales des HSF (Akilesh *et al.*, 2011). Ainsi, lorsque le cytosquelette est désorganisé, le processus d'effacement des pédicelles commence, les podocytes s'aplatissent ce qui conduit à la perte de l'intégrité de la barrière de filtration glomérulaire et la protéinurie apparaît (D'Agati, Kaskel and Falk, 2011).

Les podocytes sont des cellules épithéliales post-mitotiques dont la prolifération est limitée, voire arrêtée une fois différenciées. Ainsi, des lésions podocytaires peuvent conduire à l'apoptose et leur détachement, conduisant à une réduction du nombre de podocytes dans les glomérules. Par conséquent, le réarrangement du cytosquelette peut provoquer le détachement du podocyte : notamment, la protéine  $\alpha$ -actinine-4 semble jouer un rôle important dans ce processus. Des études ont montré que des souris ne possédant pas l' $\alpha$ -actinine-4 développent une HSF avec un nombre réduit de podocytes, une diminution de leur adhérence conduisant à leur détachement et leur présence dans l'urine (Feng *et al.*, 2018). Cette perte de podocytes mène au développement et à la progression de la maladie. Des études ont démontré que les lésions sclérotiques d'HSF commencent à être visibles lorsque le nombre total de podocytes est réduit de 40% jusqu'à atteindre un stade de glomérulosclérose global avec une fonction rénale réduite lorsque le nombre de podocytes est réduit de 60% (Wharram *et al.*, 2005). Après ces lésions du podocyte, celui-ci ne prolifère plus et n'est pas remplacé. Des études suggèrent cependant que les PEC, en se différenciant, peuvent remplacer les podocytes altérés sous l'effet de certains traitements (Benigni *et al.*, 2011).

A ce jour, l'origine des lésions podocytaires associées à cette maladie est encore mal connue. Malgré la confusion qui règne à ce sujet, le SNI est probablement une maladie d'origine dysimmunitaire avec une implication d'un ou plusieurs facteurs rendant la barrière de filtration glomérulaire perméable aux protéines.



### 1.1.2.1 ROLE DU SYSTEME IMMUNITAIRE

Le SNI semble être associé à une dérégulation du système immunitaire, en particulier des lymphocytes T (LT). Cette piste a été évoquée depuis de nombreuses années et repose sur plusieurs observations (Shalhoub, 1974). Les premières ont été rapportées chez des patients qui sont entrés en rémission complète du syndrome néphrotique après avoir contracté la rougeole, dont le virus est à l'origine de la déplétion des LT (inhibition de la prolifération et de l'activation des LT) (Lin and Hsu, 1986). De plus, les patients atteints de thymomes ou de lymphomes (Audard *et al.*, 2010), développent le SNI, ce qui soutient l'hypothèse du rôle des LT dans la maladie. De manière générale, l'efficacité des immunosuppresseurs et des corticoïdes (Deegens and Wetzels, 2011) suggèrent que le système immunitaire joue un rôle dans la physiopathologie du SNI et plus particulièrement les lymphocytes T, cible préférentielle de certaines classes d'immunosuppresseurs. En effet, les anti-calcineurines (immunosuppresseurs comme la ciclosporine ou le tacrolimus), sont fréquemment prescrites pour traiter les formes cortico-résistantes car ils permettent d'inhiber la transcription de l'IL-2 (dépendante de la calcineurine) qui n'active plus le LT (Havele and Paetkau, 1988). Ainsi, des études à partir de LT de patients se sont avérées décisives dans la recherche des mécanismes pathogéniques de la maladie.

#### Rôle de CMIP

A partir d'une approche de clonage soustractif, qui permet de mettre en évidence des gènes dont l'expression est différentielle entre deux populations, des études de notre laboratoire ont identifié initialement un gène appelé *CMIP* qui est surexprimé dans les LT d'un patient LGM en phase de poussée par rapport à un patient en phase de rémission (Sahali *et al.*, 2002). Ce gène code pour une protéine du même nom, CMIP, de 86 kDa. La protéine est surexprimée dans les LT des LGM mais également dans les podocytes des mêmes patients. Il a été démontré que CMIP empêche Fyn, une protéine appartenant à la famille des Src kinases, de phosphoryler la néphrine, ce qui a pour conséquence d'empêcher le recrutement de la protéine adaptatrice Nck et d'inactiver la protéine N-WASP, qui joue un rôle clé dans la réorganisation du cytosquelette (Zhang *et al.*, 2010). D'autres preuves suggèrent l'implication de CMIP dans la réorganisation du cytosquelette podocytaire. En utilisant la technique du double hybride (Grimbert *et al.*, 2003), la filamine A, une protéine qui permet d'organiser les réseaux de filaments d'actine (Popowicz *et al.*, 2006), a été identifiée comme l'une des protéines partenaires de CMIP. Des études supplémentaires ont également montré que l'expression de CMIP est associée à une désorganisation du cytosquelette du podocyte via l'inhibition de l'activité de la cofilin-1, une protéine intervenant dans la polymérisation des filaments d'actine (Yu *et al.*, 2017).

Cette réorganisation du cytosquelette serait parallèle à une dérégulation de la signalisation proximale du podocyte et pourrait expliquer la fusion des pédicelles, la protéinurie et ainsi contribuer à la progression de la maladie. Cette altération des podocytes est également accompagnée par une dérégulation des cellules du système immunitaire. En effet, dans un modèle permettant aux LT de surexprimer CMIP, des résultats du laboratoire ont montré une inhibition de la transcription des gènes régulant l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires des lymphocytes, telles que IL-2, IFN- $\gamma$  et IL-4 (Kamal *et al.*, 2010).

Chez des individus sains, le gène CMIP est peu exprimé dans les LT et les podocytes. Chez les patients SNI, le gène CMIP est surexprimé dans les LT et les podocytes et est peu exprimé dans les autres organes, tels que le thymus, le foie fœtal et les organes hématopoïétiques. Par ailleurs, des études de notre laboratoire ont démontré que les transcrits de CMIP sont augmentés dans les lymphocytes de patients SNI ceci précédant la rechute (Boumediene *et al.*, 2018). Ainsi, CMIP est faiblement exprimé dans des conditions physiologiques mais surexprimé dans des conditions pathologiques au niveau lymphocytaire et podocytaire. Ces observations suggèrent CMIP comme un acteur décisif du lien physiopathologique entre dérégulation podocytaire et lymphocytaire au cours de la maladie.

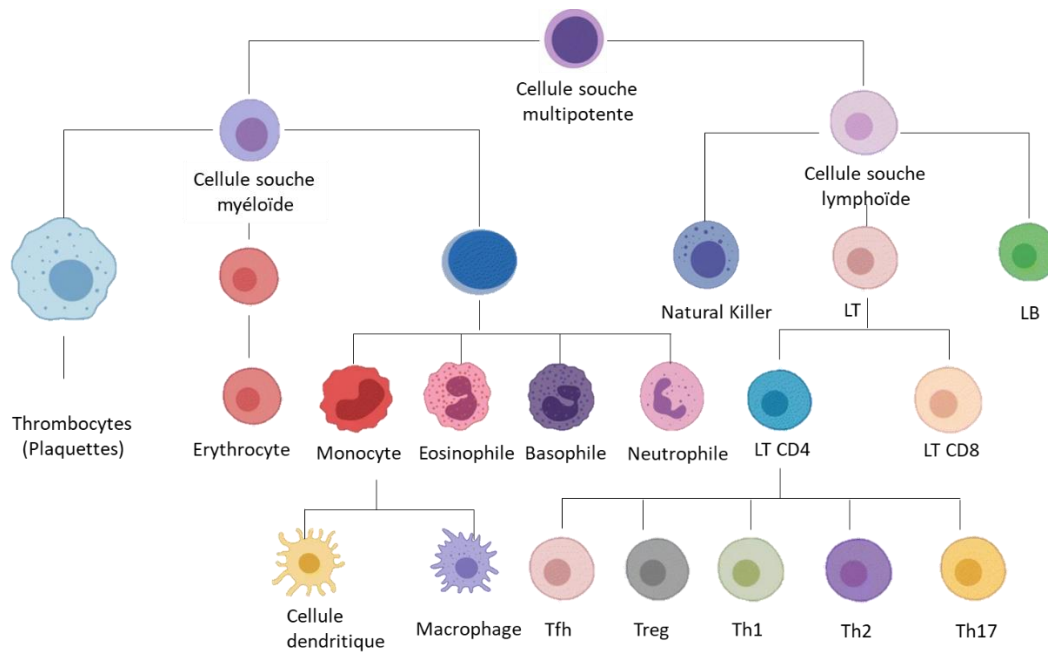
#### Dérégulation des populations de lymphocytes

De nombreuses données convergent en faveur d'un lien existant entre le SNI et les lymphocytes. Un certain nombre d'études ont alors cherché à caractériser les sous-populations de lymphocytes qui se retrouvent dérégulées dans la maladie. Dans une petite cohorte de patients HSF, certaines sous-populations de LT sont dérégulées, en particulier les LT CD4+ retrouvées en plus faible pourcentage, un ratio LT CD4+/CD8+ diminué ainsi qu'une activité cellulaire des LT auxiliaires (ou *helper*, Th) avec une diminution de la synthèse des IgG diminuée par rapport aux contrôles (Herrod *et al.*, 1983). Ces LT auxiliaires jouent un rôle central dans la réponse immunitaire car ils activent d'autres types cellulaires qui agiront de façon directe sur la réponse immunitaire. Selon le type de cytokines produites, les LT auxiliaires peuvent être divisés en plusieurs groupes dont les Th1, Th2 et Th17 (Figure 5). Des études ont démontré un rôle des sous-populations de Th2 et Th17 dans la maladie. Un profil spécifique de cytokines est surexprimé chez les patients atteints de SNI et regroupe les cytokines suivantes : IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 qui sont produits par les cellules Th2. Dans des biopsies rénales de patients HSF, il y a une augmentation des LT CD3+ interstitiels et glomérulaires. En parallèle, il y a une diminution des Tregs FoxP3+ infiltrés dans le tissu interstitiel comparés aux biopsies contrôles (Benz *et al.*, 2010). Il a également été démontré que la sévérité du SNI est associée à une diminution de l'activité des Tregs (Wang *et al.*, 2008). De plus, des études ont montré que le nombre de cellules

Th17 était augmenté chez les HSF par rapport à des individus sains. Les cellules Th17 produisent une cytokine, l'IL17 dont la synthèse est également augmentée et qui pourrait causer des lésions podocytaires en diminuant les taux de podocalyxine, ce qui entraîne la protéinurie et la perte des podocytes. La podocalyxine étant chargée négativement et ainsi empêche les protéines de passer la barrière de filtration glomérulaire et garde le diaphragme de fente intact. Il a également été montré que l'IL17 entraîne l'apoptose du podocyte en augmentant l'expression des protéines apoptotiques caspase-3 et caspase-8 par la voie Fas. Cette apoptose médiée par l'IL-17 diminuerait le nombre de podocytes et pourrait provoquer des lésions podocytaires ainsi que la protéinurie (Wang *et al.*, 2013). En ce qui concerne les macrophages, leur nombre est également augmenté chez les patients FSGS (Benz *et al.*, 2010)

Des études ont également montré que la population lymphocytaire des Tfh (auxiliaires folliculaires), impliquée dans la maturation des cellules productrices d'anticorps, était augmentée chez les patients en rechute du SNI. Cette observation a été confirmée par notre équipe, qui a en outre démontré que le traitement par rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20 bloquant l'activation du lymphocyte B (LB), provoque une diminution de la population Tfh périphérique, plus particulièrement celle exprimant à leur surface les récepteurs CXCR5, et que cette diminution est associée à la rémission des patients qui avaient rechutés (Boumediene *et al.*, 2018). Le rituximab, qui est particulièrement utilisé contre les lymphomes à cellules B, a démontré une certaine efficacité chez des patients présentant une HSF, suggérant une coopération entre les Tfh et les LB dans la maladie (Kamei *et al.*, 2020).

D'autres cellules immunitaires semblent également impliquées dans l'apparition ou la rechute du SNI. En effet, les patients SNI rechutent rapidement suite à des épisodes infectieux (Mishra *et al.*, 2013), allergiques (Abdel-Hafez *et al.*, 2009) ou lors de l'exposition à la pollution de l'air (Lin *et al.*, 2018), ce qui suggère le rôle des cellules immunitaires de l'immunité innée dans la maladie.



Adapted from Torang et al., 2019

**Figure 5. Cellules du système immunitaire. De (Torang, Gupta and Klinke, 2019) avec modifications. Cellules du système immunitaire issues de l'hématopoïèse. Les cellules mononucléées périphériques du sang ou PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) sont toutes les cellules du sang ayant un seul noyau et comprennent : tous les lymphocytes T (LT), les lymphocytes B (LB) et les Natural Killer (NK) et les monocytes (macrophages et cellules dendritiques).**

Finalement, les lésions HSF ne sont pas accompagnées d'inflammation, ni d'infiltration de quelconques cellules immunitaires ou dépôts d'immunoglobulines au niveau des glomérules rénaux. Ces observations semblent indiquer que l'implication des cellules immunitaires est plutôt indirecte. Ainsi, les études se sont focalisées sur l'existence d'un facteur soluble, dit de perméabilité, produit par le système immunitaire, capable d'altérer la barrière de filtration glomérulaire.

### 1.1.2.2 RÔLE DES POTENTIELS FACTEURS DE PERMEABILITÉ

L'idée d'un facteur de perméabilité circulant causant la destruction de la barrière de filtration glomérulaire a émergé pour la première fois en 1954 (Gentili, Tangheroni and Gelli, 1954) où le plasma d'un enfant atteint du syndrome néphrotique a été transfusé chez un enfant sain. Ce dernier a alors développé une protéinurie massive. Au-delà de la question éthique qui entoure cet essai controversé, cette expérience marqua le début des recherches sur le facteur de perméabilité. D'autres preuves de l'existence d'un ou plusieurs facteurs circulants ont été décrites dans la littérature. En effet, 40% des patients HSF récidivent après transplantation rénale, souvent immédiatement ou dans les heures qui suivent l'opération (Chang et al., 2012). De plus, des patients HSF qui ont bénéficié d'échanges plasmatiques, une technique consistant à substituer le plasma du malade avec du plasma d'individus sains ou des solutions d'albumine, ont vu leur protéinurie diminuer comparé à ceux n'ayant pas reçu ce traitement (Straatmann et al., 2014). La preuve la plus convaincante de l'existence de ce facteur est

un cas clinique rapporté en 2012 (Gallon *et al.*, 2012), où un rein a été transplanté une première fois chez un patient HSF mais après récurrence, le même rein a été transplanté une deuxième fois chez un autre patient HSF qui n'a pas développé de protéinurie.

#### Caractéristiques physico-chimiques du facteur de perméabilité

Les caractéristiques physico-chimiques du facteur de perméabilité ont été étudiées dans diverses publications. En 1996, le facteur circulant est recherché dans les séras de patients HSF (Savin *et al.*, 1996). Les auteurs ont observé que l'on peut précipiter la fraction active des séras, celle qui augmente la perméabilité glomérulaire, avec une solution de sulfate d'ammonium à 70-80%, qui permet aussi de séparer la fraction active de la fraction contenant les immunoglobulines. Par ailleurs, l'immunoabsorption sur colonne de protéine A permet de diminuer la protéinurie chez des patients récidivants HSF. Il a été suggéré que le facteur de perméabilité se lie à la protéine A et a un poids moléculaire entre 30 et 50kDa. Lorsque la fraction de 30-50kDa est infusée dans des rats, ces derniers développent une protéinurie. De plus, des études ont suggéré que le facteur de perméabilité a une haute affinité pour les sucres et interagit avec le glycocalyx des podocytes. Pour tester cette hypothèse, le galactose a été utilisé comme agent saturant les sites de liaison du facteur circulant, qui n'a alors plus d'activité. Ces résultats suggèrent que le galactose empêche l'interaction entre le facteur circulant et les podocytes. De plus, la prise de galactose per os ou par voie intraveineuse chez des patients récidivants HSF permet de diminuer la perméabilité glomérulaire (Savin *et al.*, 2008).

#### suPAR

La nature et l'origine du facteur circulant sont encore inconnues et sont très discutées. Des études ont démontré que suPAR (*Soluble Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor*) est élevé dans le plasma de patients FSGS par rapport à des individus sains et qu'il est responsable de l'effacement des pédicelles (Wei *et al.*, 2011). Le récepteur soluble suPAR est libéré dans la circulation sanguine lorsque le récepteur uPAR est clivé à la membrane des cellules. Le récepteur uPAR est exprimé par les cellules immunitaires mais aussi par les cellules endothéliales et les podocytes. Ce récepteur est impliqué dans de nombreux mécanismes cellulaires, tels que la migration et l'adhésion des leucocytes (Sendo and Araki, 1999) mais également dans la prolifération cellulaire (Hildenbrand *et al.*, 2008) ou l'angiogenèse (Breuss and Uhrin, 2012). Ces résultats sont controversés car d'autres études ont montré que des injections de suPAR chez des souris ne provoquent pas de protéinurie sauf si ces injections sont combinées avec d'autres molécules qui endommagent les podocytes comme les anticorps anti-CD40. De plus, le taux de suPAR dans le plasma dépendant de la fonction rénale des patients, ce facteur ne semble pas spécifique aux HSF et est élevé dans d'autres pathologies rénales

ou hépatiques (Maas, Wetzels and Deegens, 2012). De plus, suPAR n'est pas retenu par les colonnes de protéine A (Beaudreuil *et al.*, 2014).

#### CLCF-1

Le CLCF-1 (*Cardiotrophin-like Cytokine Factor 1*) a été identifié dans le plasma de patients HSF en récurrence post-greffe par chromatographie d'affinité et par spectrométrie de masse. CLCF-1 est un membre de la famille d'IL-6 et est exprimé par plusieurs tissus et est connu pour activer les LB. Il induit l'albuminurie chez des souris et augmente la perméabilité de la barrière glomérulaire de rats via l'activation de la voie JAK/STAT. Ces effets sont inhibés en injectant des anticorps anti-CLCF1 ou avec des inhibiteurs de la voie JAK/STAT (Sharma *et al.*, 2015).

#### CASK

CASK (*Calcium/Calmodulin Dependent Serine Protein Kinase*) est une kinase associée à la membrane plasmique et qui régule les interactions protéine-protéine dans différents types cellulaires, dont les podocytes et les neurones. La protéine a été identifiée dans les séras de patients HSF après immunoadsorption sur colonne de protéine A comparé à des individus sains où CASK n'est pas détectée. Une injection intraveineuse de la protéine recombinante CASK provoque la protéinurie chez des souris ainsi que l'effacement des pédicelles et une réorganisation du cytosquelette des podocytes en culture (Beaudreuil *et al.*, 2019).

#### CD 40

Cette protéine appartient à la famille des récepteurs TNF et est exprimée dans la majorité des cellules du système immunitaire. L'interaction entre ce récepteur et son ligand, CD40L, permet de réguler différents aspects de la réponse immunitaire, dont la prolifération des LB avec la production d'immunoglobulines (Banchereau *et al.*, 1994) mais aussi l'activation et la prolifération des LT avec la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et IL-2 (Peng *et al.*, 1996). Dans un travail publié par Delville *et al.*, CD40 a été détecté dans les glomérules de patients HSF. De plus, des anticorps anti-CD40 ont également été quantifiés dans le sérum de patients HSF en récurrence. Les auteurs ont également mis en contact ces anticorps avec des podocytes en culture et ont observé une désorganisation du cytosquelette. Enfin, ils ont injecté le complexe CD40/CD40L dans des souris induisant une protéinurie (Delville *et al.*, 2014). Cette protéine, qui a un poids moléculaire de 150kDa, contredit les résultats obtenus par Savin, qui suggère que le facteur de perméabilité est entre 30 et 50kDa.

Les preuves cliniques convergent vers l'existence d'un ou plusieurs facteurs de perméabilité à l'origine de l'HSF. Jusqu'à présent, aucune des molécules candidates n'a été validée par une étude

multicentrique ni dans différents modèles d'étude de l'HSF. D'ailleurs, les traitements tels que les échanges plasmatiques ne sont pas toujours efficaces et la rémission ne dure pas ce qui suggère que des facteurs locaux rénaux sont associés à des lésions au niveau des podocytes ou que d'autres facteurs non circulants sont impliqués dans la maladie.

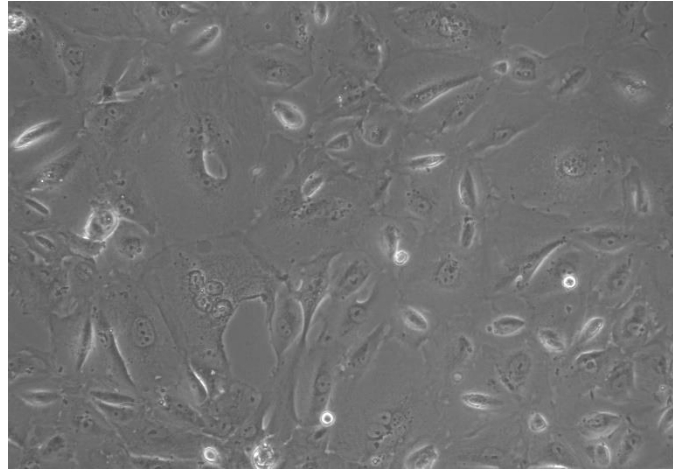
## 1.2 MODELES POUR L'ETUDE DU SYNDROME NEPHROTIQUE

Une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la maladie est un prérequis essentiel pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ainsi, des modèles *in vitro* et *in vivo* ont été développés et constituent des outils précieux pour étudier ces mécanismes.

### 1.2.1 Modèles cellulaires

Les cultures primaires de podocytes isolés directement à partir de glomérules murins ou humains, présentent l'avantage d'être très proches des conditions *in vivo*. Cependant, ces cultures subissent une dédifférenciation rapide et ont une capacité de prolifération limitée, et ne sont ainsi pas utilisées fréquemment en recherche (Ni, Saleem and Mathieson, 2012). Afin de disposer d'un plus grand nombre de cellules, il est possible de travailler sur des lignées immortalisées. Les lignées immortalisées podocytaires sont très utilisées dans la recherche sur le SNI pour mieux comprendre les mécanismes cellulaires des podocytes au cours de la maladie, au niveau de la régulation du cytosquelette (Schenk *et al.*, 2017), du cycle cellulaire (Griffin *et al.*, 2003) ou encore pour étudier l'effet du facteur circulant sur les podocytes (Coward *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2013; Kim, Roshanravan and Dryer, 2017). La lignée humaine immortalisée la plus utilisée, est celle développée par l'équipe de Moin Saleem (Bristol, UK). Cette lignée a été obtenue grâce à l'expression de l'agent oncogène SV40 permettant aux cellules d'échapper à la sénescence cellulaire normale. Il est ainsi possible de réguler l'expression du transgène avec la température. A 33°C, le transgène est exprimé et permet aux cellules de proliférer. Lorsque la lignée cellulaire est placée à 37°C, le transgène ne s'exprime plus, les cellules ne prolifèrent plus et commencent à se différencier et à exprimer les marqueurs protéiques podocytaires tels que la néphrine, la podocine ou la synaptopodine (Saleem *et al.*, 2002) (Figure 6). Les protocoles de culture cellulaire ont été optimisés afin de permettre de cultiver les cellules de façon reproductible. L'inconvénient des cultures podocytaires immortalisées est l'absence de « crosstalk » entre les différents types cellulaires qui composent la barrière de filtration glomérulaire, mais

également l'absence du diaphragme de fente, les cellules exprimant en faible quantité les protéines telles que la néphrine ou la podocine.



*Figure 6. Culture de podocytes humains immortalisés différenciés à J14 (37°C). Image de microscopie optique, grossissement x100 d'une lignée humaine immortalisée AB 8/13 en prolifération à 33°C pendant 10 jours puis différenciation des cellules à 37°C pendant 14 jours.*

Ainsi, l'utilisation d'organoïdes semble une approche prometteuse pour étudier les mécanismes cellulaires impliqués dans la maladie. Les organoïdes rénaux dérivés de cellules souches pluripotentes expriment les marqueurs spécifiques du podocyte, notamment les protéines du diaphragme de fente. Cependant, la vascularisation du glomérule est un problème et empêche la maturation de l'organoïde. Les organoïdes possèdent les caractéristiques d'un glomérule avec son environnement, mais ont une capacité de filtration limitée. De plus, les cellules utilisées pour créer ces organoïdes sont dérivées de cellules génétiquement modifiées et requiert des protocoles d'induction complexe, ce qui peut altérer leur morphologie et leur fonction (M, Cw and Tj, 2019).

Des avancées récentes dans le domaine des cellules souches et la bio-ingénierie ont permis de développer de nouveaux modèles pour étudier le SNI. Dernièrement, des glomérules sur puce ont notamment été développés et permettent d'étudier le rôle du microenvironnement (« *crossstalk* » entre les différents types cellulaires composant le glomérule) ainsi que le système immunitaire. Des glomérules entiers ont été incubés avec du sérum de patients récidivants HSF ce qui a diminué la perméabilité glomérulaire comparé à du sérum d'individus sains (Savin *et al.*, 1996). Cependant, cette méthode manque de reproductibilité (Maas, Deegens and Wetzels, 2014).



## 1.2.2 Modèles animaux

### 1.2.2.1 Protéinurie spontanée chez le rat Buffalo/Mna

Afin d'étudier la protéinurie, le rat Buffalo/Mna (du nom de leur créateur Matsuyama et Nagayo) développe spontanément une protéinurie et une glomérulosclérose à l'âge de deux mois ressemblant à l'HSF chez l'humain (Nakamura *et al.*, 1986). Ces lésions ne sont pas causées par l'âge ou l'hypertension. Il a été ensuite suggéré que la protéinurie développée par les rats était due à un ou plusieurs facteurs circulants, après avoir observé après néphrectomie bilatérale et transplantation de reins provenant de rats sains, qu'ils développaient la protéinurie et un effacement des pédicelles. Cependant, ces rats ne développent pas une protéinurie immédiate comme celle observée chez l'humain. De la même façon, les reins altérés des rats Buffalo transplantés chez des rats sains, récupèrent leur fonction. Toutes ces observations suggèrent un rôle d'un facteur circulant dans ce modèle de la maladie.

### 1.2.2.2 Protéinurie causée par des agents toxiques

Plusieurs modèles animaux reposent sur l'administration d'agents toxiques tels que l'adriamycine, le LPS ou la puromycine. L'adriamycine est un intercalant de l'ADN utilisé en chimiothérapie. Lorsqu'il est injecté à des rats à une dose minimale, l'adriamycine provoque une atteinte glomérulaire progressive caractérisée par une protéinurie massive. Les rats développent une HSF en 16 semaines sous ce traitement. Ces modèles sont faciles à créer mais doivent être surveillés sur du long terme. Par ailleurs, les mécanismes menant aux lésions podocytaires sont non spécifiques, ces lésions étant provoquées par une cause différente de celle associée à l'HSF chez l'humain, ce qui limite leur utilisation. Ces modèles sont utilisés pour rechercher des approches thérapeutiques possibles et d'étudier l'effet de potentiels traitements (Simic, Tabatabaeifar and Schaefer, 2013).

### 1.2.2.3 Infusion de fractions plasmatiques chez des rats

Des études ont été menées afin de mieux comprendre le rôle de ces facteurs circulants : Savin *et al.* ont montré en 1997, qu'il y avait induction d'une protéinurie chez des rats en infusant directement la fraction plasmatique active supposément contenant le facteur circulant (Savin *et al.*, 1996). Un autre groupe, mené par Dantal, a essayé de reproduire les mêmes résultats avec 5 patients HSF, 3 non-HSF et 3 individus sains mais n'a pas réussi à observer une protéinurie chez aucun des groupes. Les résultats du groupe de Savin n'ont pour l'instant pas pu être reproduits par aucun laboratoire (Le Berre *et al.*, 2000).

#### 1.2.2.4 Souris surexprimant CMIP (modèles Lck et néphrine)

Le modèle Lck est un modèle de souris transgénique développé par l'équipe qui permet d'étudier les conséquences fonctionnelles de la surexpression de CMIP dans les LT. En effet, dans ce modèle l'expression du transgène CMIP humain est sous le contrôle du promoteur Lck distal qui permet une expression sélective dans les LT matures. La protéinurie a été observée chez ces souris dès les premiers croisements, cependant, elle s'est estompée au bout de plusieurs générations (quelques mois). Bien que la protéinurie ne soit plus observée chez ces souris, le gène ainsi que la protéine CMIP sont bien détectés dans les LT.

Un modèle transgénique surexprimant CMIP sous le contrôle du promoteur de la néphrine a été développé et caractérisé par l'équipe. La souris, surexprimant CMIP dans le podocyte, développe une protéinurie et une inhibition de la signalisation proximale dans la cellule cible, avec inhibition de la phosphorylation de la néphrine et de l'interaction de Fyn avec N-WASP, conduisant à une désorganisation du cytosquelette et effacement des pédicelles (Zhang *et al.*, 2010).

## 1.3 LA PROTEOMIQUE ET SES APPLICATIONS DANS L'ETUDE DU SYNDROME NEPHROTIQUE

### 1.3.1 GENERALITES SUR LA PROTEOMIQUE ET LA SPECTROMETRIE DE MASSE

#### Introduction

Le terme protéome a été utilisé pour la première fois en 1994 par Marc Wilkins pour définir l'ensemble des protéines codées par un génome et exprimées dans des cellules, tissus, organes et organismes à un instant précis. Un quart de siècle plus tard, la protéomique, la technique qui permet d'étudier le protéome, est devenue un des domaines scientifiques les plus importants et les plus populaires pour l'étude à large échelle des organismes biologiques.

Les protéines sont des biomolécules essentielles à chaque cellule vivante. Elles sont impliquées dans toutes les actions de la vie cellulaire et sont très importantes dans le maintien de la structure, la fonction et la régulation des tissus et organes du corps humain. Les cellules du corps humain contiennent des milliers de protéines différentes, que l'on appelle le protéome, et qui sont à l'origine de fonctions diverses, dont l'interaction fonctionnelle assure la survie et l'homéostasie cellulaire.

La protéomique permet l'étude des milliers de protéines cellulaires qui travaillent de concert afin d'orchestrer la vie cellulaire. On estime que pour environ 22 000 gènes, il existe 12 000 protéines exprimées à un moment donné dans toutes les cellules humaines (Wilhelm *et al.*, 2014). Pour chaque protéine, il peut exister différentes versions, dites isoformes : la même protéine peut être non modifiée ou modifiée par une ou plusieurs modifications post ou co-traductionnelles. Les protéines auront une fonction différente selon la combinaison de modifications présente sur chaque isoforme. Il y aurait ainsi plus de 100 000 isoformes différentes qui existent dans le protéome eucaryote qui contribuent à l'homéostasie cellulaire. Certaines études ont démontré que les niveaux d'ARN du transcriptome ne reflètent pas l'abondance ou la fonction des protéines (Haider and Pal, 2013). Le protéome humain ne peut donc pas être entièrement prédit par le transcriptome. L'étude du protéome est complémentaire à l'étude du transcriptome pour déchiffrer et comprendre les processus biologiques des cellules et des organismes.

L'éventail des applications de la protéomique est très large et il permet aujourd'hui de répondre à une grande variété de questions biologiques. Par exemple, en recherche fondamentale : elle permet de mieux comprendre les changements dans les mécanismes cellulaires mis en cause dans les pathologies humaines en étudiant les variations globales du protéome, les modifications des protéines et de leurs interactions ; en recherche clinique, elle constitue un outil puissant pour la découverte de biomarqueurs pour le diagnostic, le pronostic et la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.

Au début, la protéomique était étudiée principalement grâce au couplage de l'électrophorèse 2D et de la spectrométrie de masse. L'électrophorèse 2D est une technique très résolutive, mais peu reproductible et à faible débit. Depuis les années 2000, le domaine de la protéomique a évolué constamment grâce aux nombreux développements instrumentaux des spectromètres de masse et de leur couplage à la chromatographie liquide, qui ont permis de grandement démocratiser les analyses protéomiques, par le gain en sensibilité et débit, mais aussi par la compréhension de ces limites.

### Enjeux de l'analyse protéomique par spectrométrie de masse

Afin d'identifier des biomarqueurs et d'avoir une vision globale des changements de l'ensemble des processus biologiques mis en jeu dans les pathologies humaines et en particulier le syndrome néphrotique qui est au centre de cette thèse, il est nécessaire de pouvoir identifier et quantifier en profondeur le protéome issu de cellules ou de fluides biologiques. Cependant, en dépit des progrès extraordinaires réalisés jusqu'à maintenant, aucun spectromètre de masse ne permet aujourd'hui d'analyser de façon exhaustive le protéome et ce, pour plusieurs raisons liées à la complexité du protéome (épissage, modifications post-traductionnelles) et aux limitations de l'instrumentation (gamme dynamique, sensibilité et vitesse d'analyse).

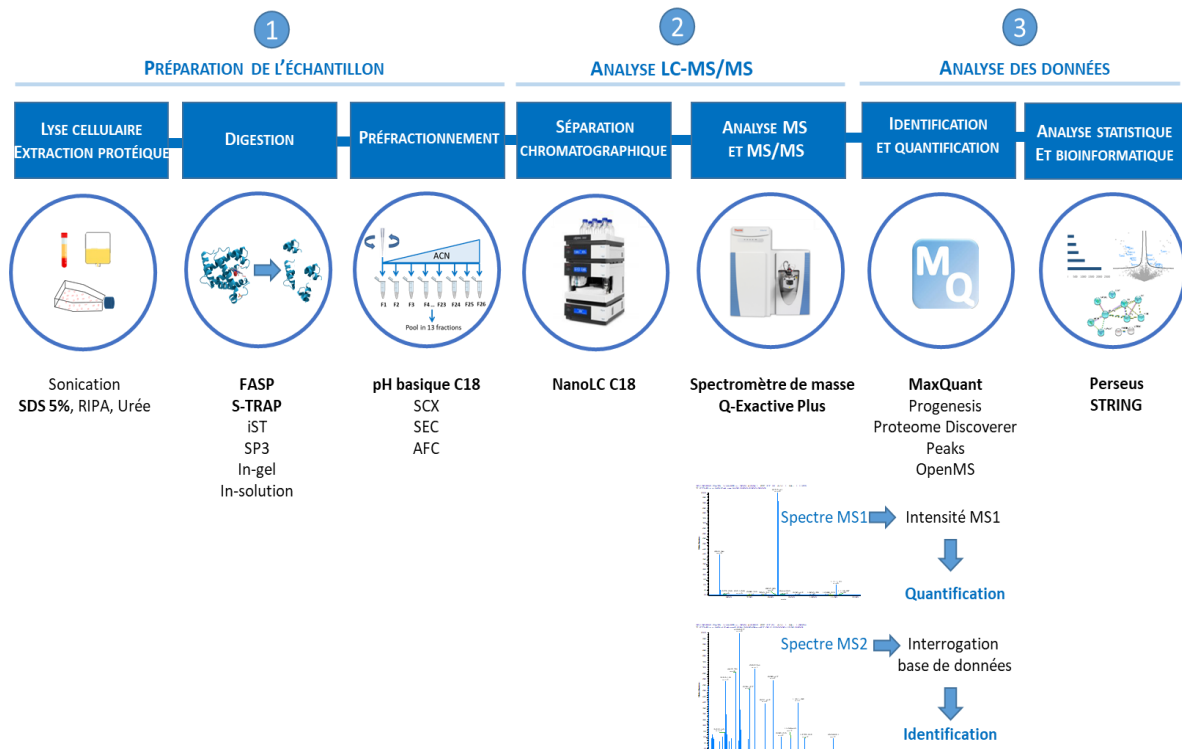
De nos jours, en dépit des efforts considérables engagés dans le domaine, la protéomique est encore confronté à de nombreux enjeux à la fois au niveau de la préparation des échantillons, mais également au niveau instrumental et à l'analyse des données. Au cours de ma thèse, j'ai rencontré certains de ces enjeux en essayant de mettre en place des expériences pour mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans le syndrome néphrotique. Afin d'appréhender ces enjeux, j'ai mis en place et développé plusieurs méthodes qui seront détaillées dans les résultats. Avant de présenter les résultats obtenus lors ma thèse, l'état de l'art du domaine de la protéomique est abordé.

#### 1.3.1.1 Méthodologie de l'analyse protéomique par spectrométrie de masse (MS)

Les protéines intactes étant plus complexes à analyser (difficiles à séparer, ioniser et fragmenter), la majorité des études protéomiques par spectrométrie de masse reposent sur une stratégie dite « *bottom-up* », qui consiste à digérer les protéines en petits peptides. En mesurant les masses des peptides au lieu des protéines, les principales difficultés liées à l'analyse des protéines intactes peuvent ainsi être court-circuitées (Zhang *et al.*, 2013).

La méthodologie appliquée à l'analyse protéomique comprend 3 étapes essentielles (Figure 7) :

1. La préparation des échantillons dont la digestion des protéines en peptides.
2. La séparation des peptides par chromatographie liquide couplée à l'analyse par spectrométrie de masse (LC-MS/MS)
3. L'analyse des données



**Figure 7. Workflow de l'analyse protéomique.**(1) La préparation de l'échantillon comporte les étapes de lyse cellulaire, digestion et/ou préfractionnement. (2) l'analyse LC-MS/MS (chromatographie liquide suivie de l'analyse MS/MS par spectrométrie de masse) (3) l'analyse des données avec l'identification (spectre MS2), la quantification des protéines (intensité MS1) suivie de l'analyse statistique et bioinformatique.

Les études protéomiques peuvent nécessiter des optimisations de méthodes pour répondre à la problématique posée. Au cours de ma thèse, j'ai plus particulièrement choisi de développer certaines méthodes de préparation d'échantillons qui ont ainsi été appliquées au projet de thèse, et qui sont désormais appliquées aussi dans plusieurs projets de collaboration de la plateforme.

### 1.3.1.2 Préparation des échantillons

L'objectif de cette première étape est d'extraire les protéines à partir d'un échantillon biologique et préparer les protéines pour leur analyse par spectrométrie de masse. Les principaux enjeux liés à la préparation des échantillons dépendent de l'élimination de détergents utilisés pour solubiliser les cellules et les tissus. Ces détergents ne sont souvent pas compatibles avec l'analyse LC-MS/MS (séparation chromatographique affectée et suppression de signal MS). De plus, en protéomique il n'y a aucune étape d'amplification, donc la préparation est également cruciale pour l'analyse d'échantillons faiblement abondants afin de minimiser les pertes de matériel. La qualité des données acquises par MS est dépendante de la complexité de l'échantillon, sachant que plus l'échantillon est décomplexifié, plus on aura accès aux protéines moins abondantes.

Ainsi, la préparation des échantillons est composée de plusieurs étapes : l'extraction des protéines, la digestion des protéines en peptides et leur fractionnement éventuel.

#### Extraction et digestion des protéines

La préparation des échantillons est dépendante de la nature de l'échantillon biologique, et les tampons de lyse doivent être choisis en conséquence. L'étape de digestion doit permettre d'éliminer les détergents et les sels utilisés dans les tampons d'extraction de protéines.

Pendant longtemps, les protéines étaient séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse 1D avec une solubilisation préalable des protéines dans du Laemmli (tampon à base de détergents SDS, NP-40 et DOC dans sa version classique) puis une digestion « in-gel » des protéines en peptides. Pour une analyse complète de l'échantillon, chaque piste du gel est ainsi découpée en une dizaine de bandes et chaque bande est digérée après une longue préparation pour se débarrasser des détergents et des éléments qui interfèrent avec la digestion des protéines. L'avantage de cette méthode est de pouvoir réaliser une étape de préfractionnement en fonction du poids moléculaire. Cependant, il existe plusieurs limitations à cette approche, notamment car elle est laborieuse, longue, elle est sujette à de possibles erreurs de manipulations, mais le plus problématique reste la perte de peptides à chaque étape, notamment durant l'extraction de peptides.

Une autre alternative à la digestion « in-gel » est la digestion « in-solution » des protéines. Cette méthode permet de se passer du gel et a comme avantage de demander moins d'étapes et requiert moins de temps de préparation. Elle utilise des agents chaotropiques, comme l'urée, pour l'extraction des protéines et leur digestion dans des conditions dénaturantes. Cette méthode a l'avantage de directement extraire, dénaturer et digérer les protéines dans le tampon de lyse. Elle repose sur l'addition d'une haute concentration en urée (8M) pour solubiliser les protéines suivies d'une dilution de 4 à 8 fois afin de réduire la concentration du dénaturant pour permettre à l'enzyme

d'être toujours active pour digérer les protéines. Cependant, à haute concentration, l'urée est associée à une diminution de l'efficacité de l'activité enzymatique de la trypsine et les agents chaotropiques comme l'urée sont moins efficaces pour solubiliser les membranes. Cette digestion, qui peut nécessiter une précipitation préalable pour éliminer les détergents et autres contaminants, peut aboutir à des pertes d'échantillons dues à une solubilisation incomplète des protéines après précipitation. Cette digestion est la méthode classique la plus répandue, elle est très souvent suivie d'une étape de purification de l'échantillon afin d'éliminer l'urée qui peut gêner lors de la séparation chromatographique qui précède l'analyse par spectrométrie de masse (LC-MS/MS). De plus, la présence d'urée peut conduire à une carbamylation des protéines via la réaction avec l'acide isocyanique, un produit de dégradation de l'urée. Cette réaction est exacerbée à de hautes températures et de longues périodes d'incubations. De plus, les digestions de protéines dans l'urée ont un nombre de sites où l'enzyme n'a pas clivé (« missed cleavages ») plus important qu'avec d'autres méthodes de digestion, ce qui est attribué à la dénaturation de la protéase qui rend la digestion moins efficace (León *et al.*, 2013).

Une alternative aux deux méthodes précédentes est la digestion sur filtre ou FASP (Filter-Aided Sample Preparation) qui a été introduite en 2005 (Manza *et al.*, 2005), puis reprise en 2009 (Wiśniewski *et al.*, 2009) et décrite comme universelle et adaptée à tout type d'échantillons. Cette approche permet l'utilisation de SDS pour solubiliser les protéines, lequel est ensuite éliminé par des lavages répétés avec l'urée (Figure 8). Cette méthode sur filtre est efficace pour éliminer toutes les molécules interférentes avant la digestion des protéines dans une solution d'ammonium bicarbonate, qui est compatible avec l'activité enzymatique de la trypsine, il n'y a donc pas besoin d'ajouter une étape de purification supplémentaire avant analyse LC-MS/MS. Cependant, cette technique montre une reproductibilité limitée, probablement due à l'absorption de certaines protéines sur le filtre. Dans mes travaux j'ai aussi contribué à établir un protocole plus reproductible et adapté à la digestion de moins de 1 µg (Lipecka *et al.*, 2016).

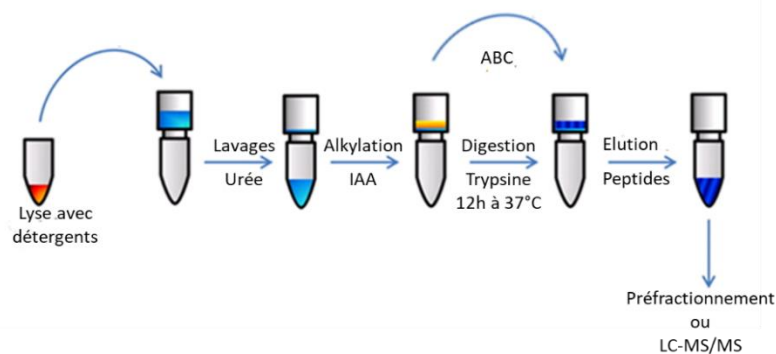


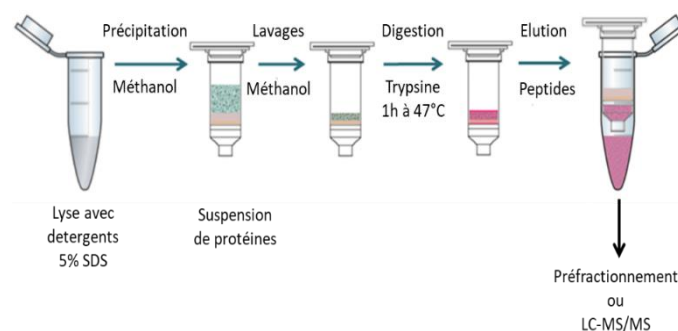
Figure 8. Etapes de la digestion FASP (Filter-Aided Sample Preparation) (J, Rr and Ja, 2014)

Plus récemment, les dernières méthodes développées en matière de préparation d'échantillons sont des méthodes qui permettent d'effectuer toutes les étapes de la préparation : la lyse, les étapes de lavages et la digestion dans un seul tube afin de limiter les pertes d'échantillons et de pouvoir ainsi traiter des échantillons de faibles abondances.

La méthode in-StageTip (iST) décrite en 2014 (Kulak *et al.*, 2014) , repose sur la digestion des protéines dans un cône (ou « tip ») qui contient un ou plusieurs disque(s) de phase hydrophobe de type octadecyl (C18). Le design en cône est intéressant car il permet de préparer les échantillons de façon robotisée à large échelle. Un inconvénient de cette méthode est l'utilisation d'un détergent compatible avec la spectrométrie de masse car la C18 ne permet pas d'éliminer les détergents ioniques tels que le SDS et ainsi réduire la solubilisation des protéines membranaires.

La méthode Single-Pot Solid-phase-enhanced sample preparation (SP3) introduite en 2014 par Krijgsveld *et al.*, utilise un mélange de billes magnétiques, fonctionnalisées avec des groupes carboxylates qui sont de surface hydrophile et hydrophobe. Les protéines sont précipitées sur les billes et sont ensuite lavées de tous détergents et contaminants. Le principal atout de cette méthode réside dans l'utilisation de billes magnétiques, qui facilitent toutes les étapes, notamment de lavages. La digestion est ensuite directement effectuée sur les billes magnétiques (Hughes *et al.*, 2019). L'avantage majeur de cette approche reste son coût peu élevé et significativement inférieur aux méthodes précédentes. Elle est compatible avec tout type de détergents et avec de très faibles et de très fortes quantités de matériels. Toutes les étapes se font dans un seul tube ce qui minimise les pertes de matériels. Cependant, sur la plateforme, nous avons remarqué une variabilité dans l'élimination des détergents.

La méthode Suspension Trapping (S-Trap) repose sur l'utilisation d'un filtre de quartz pour capturer les protéines (Figure 9). L'échantillon est lysé avec une haute concentration de SDS (5%), ce qui permet de solubiliser de façon optimale toutes les protéines et en particulier, les protéines membranaires. Les protéines sont ensuite précipitées et forment une suspension de protéines qui est piégée sur un filtre de quartz facilitant l'élimination des détergents, sels et autres contaminants qui pourraient interférer avec la digestion enzymatique et l'analyse par spectrométrie de masse.



**Figure 9. Etapes de la digestion S-Trap (Suspension Trap)**



Les protéines sont directement digérées dans les pores du filtre et les peptides sont élués dans une solution d'ammonium bicarbonate puis d'acétonitrile qui sont compatibles avec l'analyse LC-MS/MS.

Chaque approche possède ses avantages et inconvénients (

Tableau 1) (Kr, Mm and Ab, 2018; M *et al.*, 2018). Dans nos études, après plusieurs tests, nous avons choisi d'utiliser le FASP, afin de s'assurer d'une bonne solubilisation et reproductibilité dans la préparation des échantillons, et le S-Trap, afin de traiter des échantillons peu abondants et de se débarrasser des contaminants spécifiques qui ne sont pas éliminés avec le FASP.

<b>TYPE DE DIGESTION</b>	<b>RENDEMENT</b>	<b>COMPATIBILITE AUX DETERGENTS</b>	<b>TEMPS MOYEN DE PREPARATION</b>
<b>IN-GEL</b>	+	+++	4h + 12h digestion
<b>IN-SOLUTION</b>	++	-	2h + 12h digestion
<b>FASP</b>	++	++	4h + 12h digestion
<b>IST</b>	+++	-	30min + élimination SDS + 1h30 digestion
<b>SP3</b>	++	++	1h + 1h digestion
<b>S-Trap</b>	+++	+++	30min + 1h digestion

*Tableau 1. Comparatif des différentes méthodes de digestion*

#### Fractionnement des peptides pour une analyse en profondeur du protéome

Les échantillons biologiques, comme un lysat cellulaire total ou un tissu, sont complexes et contiennent des dizaines de milliers de protéines. Les digestions enzymatiques, comme la digestion à la trypsine, produisent des centaines de milliers de peptides. Une seule analyse directe par LC-MS/MS ne permet pas d'avoir la résolution chromatographique suffisante afin de pouvoir séparer tous les peptides contenus dans un échantillon complexe. En particulier, certains peptides peuvent co-éluer et présenter une masse sur charge similaire et différents niveaux d'abondance pouvant induire des suppressions de signaux. Ainsi, la principale limitation des analyses protéomiques par des spectromètres de masse réside dans leur gamme dynamique, relativement restreinte à 4 ordres de magnitude (rapport d'abondance entre les protéines les moins abondantes et les plus abondantes).

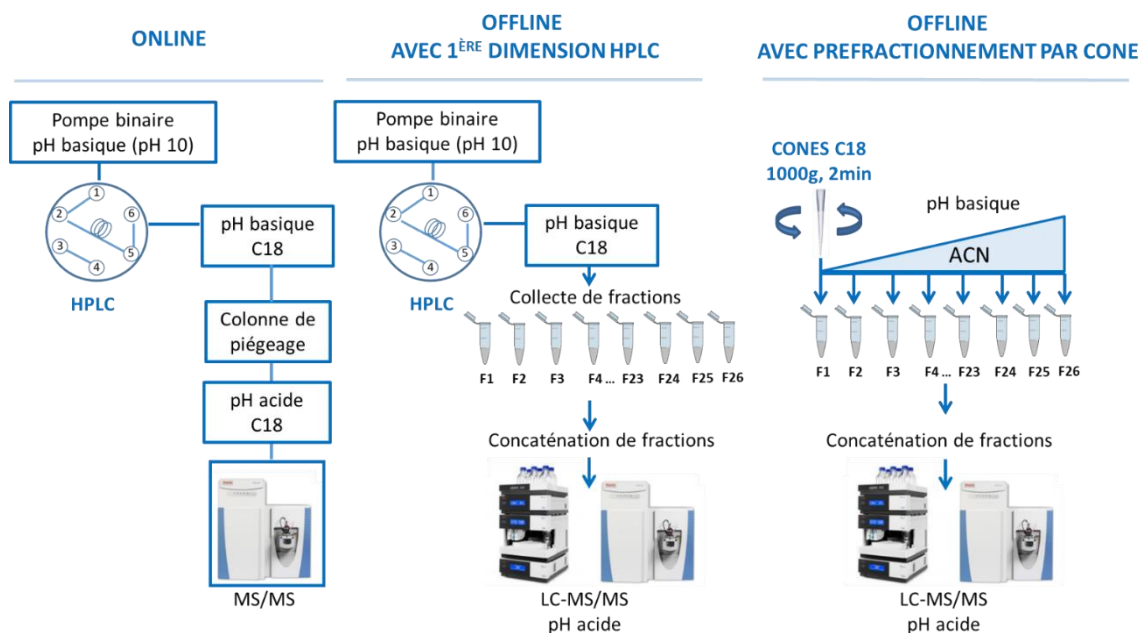
Cette gamme dynamique dépasse les 6 ordres de magnitude pour un lysat cellulaire, jusqu'à atteindre 12 ordres de magnitude dans le plasma. L'analyse du plasma est donc particulièrement difficile et repose sur des stratégies de déplétion des protéines les plus abondantes (Lee *et al.*, 2019). Ainsi, afin de réaliser une analyse en profondeur du protéome humain issu d'un lysat complexe dans le but d'identifier les protéines les moins abondantes, il est souvent nécessaire d'ajouter une étape de préfractionnement avant la partie LC-MS/MS.

Une méthode communément utilisée est le fractionnement en deux dimensions (ou fractionnement 2D) qui consiste à utiliser deux méthodes de fractionnement à la suite. Ces méthodes peuvent être basées sur différentes propriétés physico-chimiques des peptides ou des protéines, à savoir leur hydrophobicité, leur charge ou leur poids moléculaire. Dans la plupart des analyses par spectrométrie de masse, la seconde dimension est la chromatographie liquide à phase inverse à pH acide à cause de l'efficacité de la séparation et plus particulièrement pour sa compatibilité avec le spectromètre de masse et la facilité de sa mise en place.

Pour la première dimension, on utilise des combinaisons orthogonales variées, comme la phase inverse à pH basique (*High-pH*), la phase à échange cationique fort (SCX), la chromatographie à exclusion de taille (SEC) ou la chromatographie d'affinité (AFC). En combinant les deux dimensions, on peut augmenter la séparation d'un mélange complexe de peptides et augmenter ainsi le nombre de pic détectés et, *in fine*, le nombre de protéines identifiées.

Le fractionnement à pH basique des peptides, introduit en 2005 (Gilar *et al.*, 2005), est basé sur l'interaction hydrophobique des peptides avec une phase stationnaire C18 et une phase mobile hydrophile. La combinaison pH basique et pH acide offre une grande orthogonalité. La différence significative en sélectivité chromatographique entre le pH basique et le pH acide est due à un changement dans la distribution de charge à l'intérieur de la chaîne peptidique. Les peptides possèdent des groupes fonctionnels basiques et acides dont la charge nette est affectée par le pH de la phase mobile. Les peptides acides sont retenus plus longtemps à pH acide à cause de l'augmentation en hydrophobicité des résidus carboxyliques protonés alors que les peptides basiques sont retenus plus longtemps à pH basique à cause de l'augmentation en hydrophobicité des résidus basiques déprotonés. Les fractions sont obtenues après élution avec un gradient d'acétonitrile puis elles sont séchées et analysées à pH acide. En concaténant les fractions, les temps d'analyse sont réduits tout en permettant de distribuer uniformément les peptides abondants et moins abondants tout au long de la séparation chromatographique. La première dimension à pH basique offre une meilleure résolution que les méthodes SCX et SEC avec une meilleure couverture de séquence. De plus, ces dernières méthodes nécessitent une étape supplémentaire de purification qui n'est pas nécessaire avec la méthode à pH basique, ce qui diminue la perte de matériel et réduit le temps de préparation.

Il existe deux types de stratégies pour le fractionnement à pH basique : la stratégie *offline* et la stratégie *online*. La méthode *offline* repose sur une collection de fractions à partir d'une HPLC ou d'un cône (Figure 10), dans lequel un ou plusieurs disques de C18 sont insérés, puis dans un second temps une analyse est réalisée fraction par fraction sur la deuxième dimension de séparation. Dans une plateforme *online*, les peptides sont séparés par HPLC et directement transférés de la première dimension vers la deuxième dimension. Les systèmes *online* ont donc besoin d'un développement de méthode et uniquement dédiés à ce type de fractionnement. De nombreux groupes utilisent la méthode *offline*, faute de temps pour implémenter une méthode permettant de réaliser le fractionnement ou de moyens mis à disposition dans le laboratoire. L'avantage de l'HPLC est qu'on peut automatiser ce qui permet une meilleure reproductibilité et n'est pas limité en nombre de fractions récoltées. Le principal atout du fractionnement à partir de cônes est la facilité de mise en place de la méthode et son coût peu onéreux (pas d'achat d'une HPLC). En revanche, le fractionnement à haut pH présente un inconvénient : les particules de silice sur lesquelles sont greffées les C18 ne sont pas compatibles à pH basique. Il existe d'autres alternatives résistantes aux pH basiques, notamment le Polystyrene-DVB, qui possède les mêmes caractéristiques physico-chimiques que les C18 notamment en termes de séparation par hydrophobicité mais qui n'offre pas les mêmes performances d'après les tests effectués dans notre laboratoire.



**Figure 10. Fractionnement à pH basique online ou offline (avec HPLC ou cône). Le fractionnement peut être réalisé de plusieurs façons : méthode online à l'aide de deux pompes binaires où les peptides sont séparés dans un premier temps à pH basique puis chaque fraction est diluée avec une solution acide et les peptides sont ensuite piégés sur une autre colonne C18. Enfin, un gradient d'acétonitrile permet d'éluer les peptides à pH acide. La méthode offline avec une 1<sup>ère</sup> dimension HPLC permet de fractionner les peptides à pH basique à l'aide d'une HPLC. Les fractions sont ensuite collectées, concaténées, séchées puis analysées par LC-MS/MS. La méthode offline avec préfractionnement par cône est réalisée à l'aide de cônes dans lesquels sont insérés des disques C18. Par centrifugation, les peptides sont élués à pH basique avec une concentration croissante d'acétonitrile. Les fractions sont concaténées, séchées puis analysées par LC-MS/MS.**

Au final, le fractionnement à pH basique offre de nombreux avantages en termes de performance, de spécificité et de facilité de mise en place, nous avons ainsi choisi ce type de fractionnement pour certaines études du projet de thèse.

#### *1.3.1.3 Analyse nanoLC-MS/MS*

La deuxième dimension évoquée dans la partie précédente fait le plus souvent référence à la séparation par nano-chromatographie liquide en phase inverse (C18) à pH acide. La chromatographie liquide est dite nanoUPLC (nano Ultra High Performance Liquid Chromatography) car travaillant avec des débits de l'ordre du nanolitres par secondes, elle offre une meilleure sensibilité que les instruments classiques UPLC. La nanoUPLC est un appareil constitué de pompes à hautes pression qui, à partir de deux solutions (100% H<sub>2</sub>O acidifié et 100% acétonitrile acidifié), délivre un gradient croissant d'acétonitrile dans une colonne analytique où les peptides hydrophiles sont d'abord élués au début du gradient pour finir par les peptides plus hydrophobes. Les peptides sont ainsi retenus sur la colonne, ce qui permet de les séparer et de les éluer les uns après les autres. La colonne analytique est parfois précédée d'une précolonne, permettant de dessaler l'échantillon et de préserver l'intégrité de la colonne analytique souvent très coûteuse.

Au fur et à mesure de l'élution des peptides de la colonne analytique, procédure qui peut prendre jusqu'à plusieurs heures selon la complexité de l'échantillon, les peptides sont ensuite ionisés positivement par nanoélectrospray et injectés directement dans le spectromètre de masse. A l'intérieur du spectromètre de masse, des spectres dits MS ou MS1 sont générés et représentent toutes les masses des ions détectés par l'analyseur à un temps de rétention donné. L'information seule de la masse des ions des peptides ne permet pas d'identifier les protéines, il est alors nécessaire de procéder à une étape de fragmentation. Selon la méthode d'acquisition employée, les 10 ions les plus intenses du spectre MS sont sélectionnés et fragmentés, les uns après les autres, de manière séquentielle, pour générer des fragments d'ions représentant le spectre MS/MS ou MS2. Cette fragmentation permet de retrouver la séquence peptidique. Une fois le cycle MS + 10 MS/MS effectué, un nouveau cycle est enclenché. Ce mode d'acquisition est appelé « DDA » pour « Data-Dependent Acquisition ».

#### *1.3.1.4 Identification des protéines*

Le développement des analyses à haut débit a généré une quantité impressionnante de données et a ainsi fait évoluer les outils bio-informatiques, rendant l'assignation manuelle des spectres trop fastidieuse pour être réalisée sans aide automatisée. En effet, deux heures d'analyse d'un lysat total peuvent générer autour de 40 000 spectres MS/MS.

La dissociation induite par collision (CID) est la méthode de fragmentation la plus utilisée car implémentée dans la plupart des spectromètres de masse. La fragmentation CID repose sur l'accélération des ions dans une cellule de collision dans lequel circule un gaz à haute pureté (azote ou hélium). La "higher-energy collisional dissociation" (HCD) est une fragmentation similaire à la CID mais caractérisée par une énergie d'activation plus haute que celle utilisée dans la CID. Chaque ion peptidique est isolé et entre en collision avec les molécules de gaz. Dès lors, son énergie cinétique est transformée en énergie vibrationnelle qui se distribue le long de l'ion peptidique et finit par rompre la liaison la plus fragile du peptide. Ces collisions peuvent être répétées et générer des ruptures à d'autres endroits de la séquence du peptide. Le plus souvent, seulement une liaison peptidique est rompue, donnant naissance à un fragment N-terminal et un fragment C-terminal, nommés ions b et y respectivement. Si la charge est retenue du côté N-terminal, on parle d'ions a, b et c et si la charge est retenue du côté C-terminal, on parle d'ions x, y et z, selon la nomenclature de Roepstorff and Fohlman en 1984. L'intensité des ions a,b,c et x,y,z dépendent du type de fragmentation utilisé. Pour la fragmentation CID, les ions b et y sont les plus intenses (Figure 11). A cause de la haute énergie de la HCD, la fragmentation est plus efficace et génère des ions y de façon prédominante.

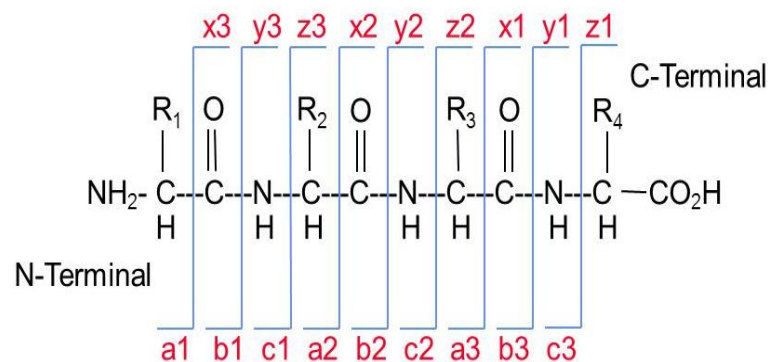


Figure 11. Nomenclature des différents ions générés après fragmentation du peptide. (Biemann, *Methods Enzymol*, 1990)

### Utilisation de bases de données

Un logiciel idéal pour l'identification des protéines n'utiliserait que les données acquises par le spectromètre de masse. Des stratégies de séquençage « de novo » permettent d'identifier les protéines mais plusieurs développements sont nécessaires pour que cette méthode soit utilisée en routine.

Aujourd'hui, l'identification des protéines repose principalement sur l'utilisation des bases de données. Les bases de données sont composées de séquences d'acides aminés de toutes les protéines d'un ou plusieurs organismes prédits à partir du génome. Le nombre d'entrées de ces bases de données a grandi exponentiellement depuis plusieurs années, en corrélation avec le séquençage à haut

débit des génomes. Bien qu'il existe de multiples sources publiques regroupant des bases de données, celles qui sont les plus utilisées sont Swiss-prot (UniprotKB) et NCBI non redondant (NCBI nr). Ces bases de données sont régulièrement mises à jour et permettent l'accès aux scientifiques aux données les plus récentes. Il est important que les bases de données utilisées soient complètes car si une séquence protéique est absente de la base de données, il est impossible de l'identifier avec les méthodes classiques. Les bases de données sont disponibles gratuitement et téléchargeables sur internet. Au laboratoire, nous avons choisi de travailler avec Swiss-prot, qui est une base de données manuellement annotée et vérifiée par des personnes physiques. Cependant, cette base de données reste limitée. Par exemple, elle ne contiendra pas toutes les séquences modifiées à cause de "single-nucleotide polymorphism" ou SNP et qui sont très variables d'un individu à l'autre.

Il existe un grand nombre de logiciels permettant de réaliser l'identification des protéines avec l'approche *bottom-up* et ils reposent tous sur le même principe (Figure 12). Dans une première étape, une base de données contenant toutes les séquences protéiques annotées de l'espèce d'intérêt est digérée *in silico* en utilisant la même enzyme protéolytique qu'utilisée expérimentalement. Cela constitue une liste de masses théoriques de tous les peptides des protéines. Dans une seconde étape, tous les peptides candidats sélectionnés sont fragmentés *in silico* en utilisant les caractéristiques de fragmentation peptidique connus et le spectre théorique généré est comparé au spectre généré expérimentalement. La qualité de la correspondance entre le spectre théorique et expérimental donne un score afin d'identifier la meilleure correspondance possible au spectre. Ainsi, une protéine sera identifiée si plusieurs masses des fragments expérimentaux correspondent à une protéine dans la base de données avec une certaine tolérance d'erreur de masse donnée. La précision de la mesure est ainsi très importante pour une identification la plus probable possible, il est par conséquent très vivement conseillé d'acquérir les données avec un instrument à haute résolution.

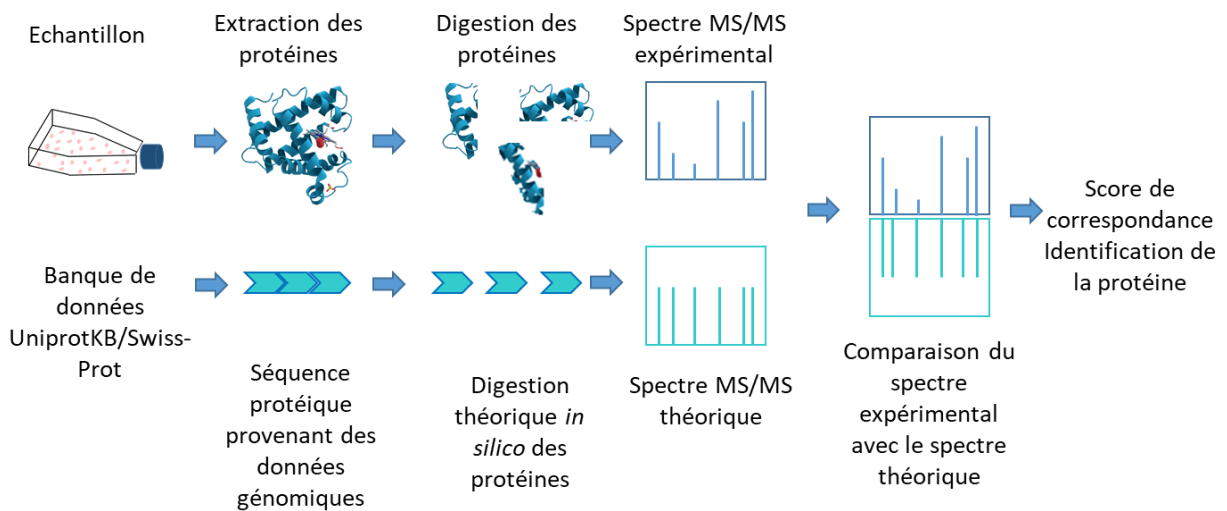


Figure 12. Principe d'identification des protéines par interrogation sur banques de données

La différence qui réside entre les différents logiciels est l'algorithme qui permet de faire la corrélation entre les données théoriques et les données expérimentales. Certains utilisent un score de cross-corrélation (Sequest) ou une mesure de probabilité statistique. Andromeda (Cox *et al.*, 2011) comme Mascot utilisent cette dernière méthode, qui permet de déterminer si la correspondance du spectre théorique avec le spectre expérimental est correcte et non due au hasard. Mascot calcule la p-value, qui est une mesure de probabilité que la correspondance soit dû au hasard, plus la p-value est petite, plus la correspondance est probable. Un score d'identification de la protéine est également calculé directement à partir de la p-value :

$$\text{Ion score} = -10\log(p)$$

Où p est la p-value. Généralement, on parle de score, qui représente une valeur plus intuitive pour l'utilisateur. Une probabilité de 1/10 000 correspond à un score de 40. L'expérimentateur établit ses propres critères pour déterminer si son identification est valide comme son seuil de score ainsi que le nombre de peptides identifiés par protéine. Au laboratoire, on considère qu'un peptide est correctement identifié à partir d'un score de 25 et si un seul peptide est identifié à partir d'une protéine, celui-là doit avoir un score minimal de 40.

Les résultats obtenus par spectrométrie de masse doivent être ultérieurement filtrés sur la base de False Discovery Rate (FDR). Le but du calcul du FDR est de mesurer le taux de faux-positifs lorsque l'on applique des tests statistiques ou de probabilité sur une large série de données. Pour calculer FDR, il existe différentes méthodes. La plus populaire d'entre elles consiste à générer une base de données dite « decoy » à partir de la base de données que l'on veut utiliser pour l'analyse, en

randomisant les acides aminés de chaque protéine ou en inversant simplement les séquences protéiques. Une recherche est effectuée entre cette base de données « decoy » avec la base de données de référence et un certain nombre de faux-positifs sont identifiés. Dans les grands jeux de données protéomiques, on établit un seuil  $FDR < 5\%$  ou  $FDR < 1\%$  pour être plus stringent.

Quand on répète des t-tests sur des milliers de protéines, on ajuste la p-value avec le FDR. La "permutation-based" FDR est basée sur le principe de randomisation des données sur lesquelles sont calculées les p-value. Le FDR est alors estimé en comptant le nombre de faux-positifs dans les données significatives. Une q-value (ou p-value ajustée) est alors reportée pour chaque test t.

Très récemment, de nombreux efforts ont été consacrés au développement du "deep learning". Cette approche, en passe de devenir incontournable dans tous les domaines de la biologie et notamment dans le domaine de la protéomique, repose sur des réseaux neuronaux entraînés à partir de données complexes. Ces réseaux neuronaux, tels que Prosit, peuvent permettre d'améliorer l'identification des protéines en réalisant la prédiction de l'intensité de chaque ion fragment des spectres MS/MS, ainsi que le temps de rétention des peptides. Ces approches permettent ainsi de réduire le FDR à 0,1% (Gessulat *et al.*, 2019).

#### 1.3.1.5 Analyse des données protéomiques quantitatives

Il existe deux types de quantification utilisés en protéomique :

- La quantification relative des protéines : permet de comparer la quantité d'une protéine parmi plusieurs conditions ou échantillons différents (exprimée en ratios).
- La quantification absolue des protéines : permet de connaître la quantité en ng par exemple d'une protéine dans un échantillon complexe (exprimée en ng/ml, par exemple).

La quantification relative des protéines est divisée en deux catégories : la quantification avec marquage et la quantification sans marquage des protéines (ou des peptides). Il n'y a pas de méthode plus performante qu'une autre pour quantifier les protéines. Chaque méthode a ses avantages et inconvénients et le choix de la méthode est dépendant de la nature de l'échantillon (cellules, tissus, fluides biologiques) et de la précision de quantification souhaitée. Plusieurs considérations pratiques sont également à prendre en compte pour le choix de la méthode (temps machine, ajout ultérieur d'échantillons, coûts des réactifs, complexité de la préparation des échantillons).



Il existe deux principales stratégies pour la quantification relative sans marquage : celle basée sur l'intensité des pics MS1 ou « label-free », et celle basée sur le nombre de spectres MS/MS ou « spectral counting » (Figure 13). Il a été montré que les stratégies basées sur l'intensité MS1 sont plus précises que les stratégies basées sur le « spectral counting », notamment sur les protéines de faible abondance. Dans ce paragraphe, je me concentrerai donc sur les stratégies basées sur l'intensité MS1, parce que c'est ce que j'ai choisi pour mes travaux.

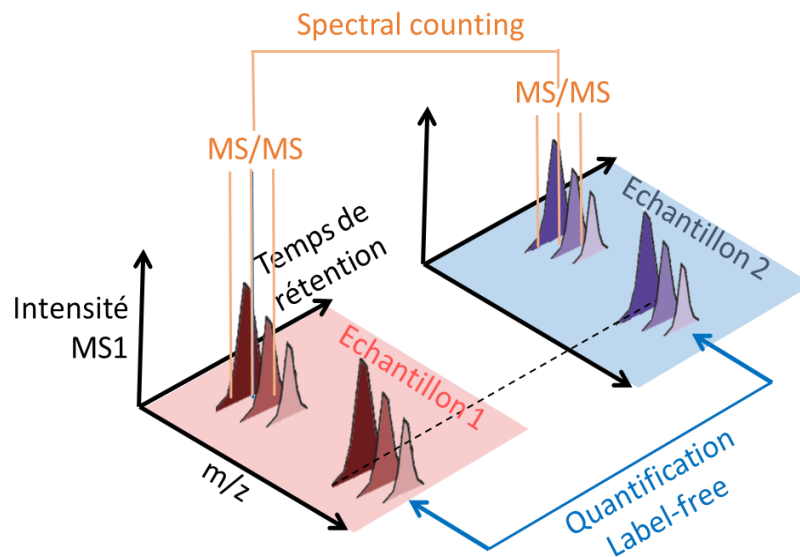


Figure 13. Méthodes de quantifications relatives sans marquages

La quantification label-free repose sur le principe suivant : le signal MS1 d'un peptide donné est intégré et l'aire sous la courbe donne une mesure du nombre total d'ions et est proportionnelle à l'abondance du peptide dans l'échantillon. Plus le signal est intense, plus le peptide est abondant. Ensuite, l'intensité de la protéine est calculée en réalisant la somme des intensités des peptides. L'intensité de cette protéine est alors comparée avec l'intensité de la même protéine quantifiée dans une analyse (ou échantillon) parallèle.

Les logiciels pour la quantification label-free réalisent globalement les mêmes étapes : les massifs isotopiques ou « features » sont d'abord détectés, puis les « features » sont identifiés avec un moteur de recherche (Andromeda, Mascot, X!Tandem). Une fois les identifications effectuées, les temps de rétentions des peptides sont réalignés. En effet, les peptides peuvent avoir des temps de rétentions légèrement différentes selon les injections. Il est alors nécessaire de réaligner les temps de rétentions pour augmenter la précision de la quantification. Ensuite, chaque pic identifié dans une fenêtre de temps de rétention d'une analyse LC-MS/MS est comparé avec chaque pic non identifié d'une autre analyse LC-MS/MS dans la même fenêtre (également appelé « match between runs »). L'identification

est transférée d'une analyse à l'autre si les pics non identifiés ont les mêmes propriétés ( $m/z$ , état de charge) que les pics identifiés dans la même fenêtre de temps de rétention. Les données doivent également être normalisées : des différences en intensités peuvent être dues à des variations expérimentales soit dans la préparation d'échantillons ou lors de l'injection des échantillons sur la LC-MS/MS. Une normalisation est alors nécessaire pour pouvoir comparer les échantillons entre eux. Enfin, les protéines sont quantifiées en utilisant les signaux des peptides. Dans le logiciel Maxquant, les intensités normalisées sont reportées sous le nom Label-free Quantification ou LFQ. Ces données peuvent être ensuite intégrées dans un logiciel d'analyses statistiques nommé Perseus et développé par (Tyanova *et al.*, 2016).

Plusieurs logiciels ont été développés ces dernières années pour réaliser la quantification label-free, certains sont open-source (Maxquant, OpenMS), d'autres commerciaux (Proteome Discoverer®, Progenesis Q1®, Peaks®). Les différents logiciels quantifient un nombre différent de protéines, d'après (Välikangas, Suomi and Elo, 2018), Maxquant et Progenesis performant le mieux en termes de précision de quantification. Progenesis®, est un logiciel originalement développé par Nonlinear Dynamics (Waters) pour la quantification label-free. D'après,(Välikangas, Suomi and Elo, 2018), Progenesis quantifie moins de protéines que les autres logiciels mais avec une meilleure précision et avec très peu de valeurs manquantes. Maxquant est un logiciel versatile gratuit, créé en 2007 par Juergen Cox, composé d'une suite d'algorithmes dont l'algorithme MaxLFQ, développé pour la quantification label-free (Cox *et al.*, 2014). Sur les mêmes jeux de données, Maxquant quantifie un plus grand nombre de protéines avec une bonne précision, notamment en utilisant une imputation des données réalisée avec le logiciel Perseus, développé par la même équipe.

En synthèse, les avantages de la quantification label-free sont les suivants : i) La simplicité de la préparation d'échantillons ; ii) Une plus grande gamme dynamique analysée ; iii) Pas de limite dans le nombre d'échantillons à comparer.

Le problème principal de la quantification label-free est la présence de valeurs manquantes. Lorsque l'on compare plusieurs échantillons, il peut arriver qu'une protéine soit quantifiée dans certains échantillons et pas dans d'autres, générant ainsi des valeurs manquantes. Afin de comparer les échantillons entre eux et réaliser des tests statistiques, il ne doit pas y avoir de valeurs manquantes dans les données. Les valeurs manquantes sont causées par deux raisons : l'absence du peptide dans l'échantillon et/ou une absence stochastique des peptides due au DDA (ie. Le peptide est présent à une abondance au-dessus de la limite de détection de l'instrument mais n'est pas détecté). Il n'y a toujours pas de consensus dans la communauté scientifique sur la gestion de ces valeurs manquantes. Eliminer les protéines qui présentent des valeurs manquantes peut conduire à une liste réduite de

protéines quantifiées et à l'exclusion des protéines potentiellement d'intérêt. Afin de prendre en compte un maximum de protéines, différentes méthodes d'imputation peuvent être utilisées (Karpievitch, Dabney and Smith, 2012). Certaines méthodes sont disponibles dans des suites logiciels (tel que Perseus) et consistent à imputer des valeurs constantes ou des valeurs générées au hasard qui suivent une distribution normale de valeurs de faible intensité calculée sur la distribution des valeurs détectées.

Afin de limiter le nombre de valeurs manquantes, certains logiciels tels que Maxquant possèdent une option appelée « match between runs » ou MBR (Figure 14), qui permet de transférer l'identification d'un peptide d'un échantillon à un autre. En effet, lorsque le peptide a été identifié dans un premier échantillon et que ce même peptide existe dans le deuxième échantillon mais n'a pas été identifié (soit car il n'y a pas eu de spectre MS/MS associé à ce peptide, soit le spectre MS/MS obtenu n'est pas d'assez bonne qualité pour permettre l'identification du peptide), ce dernier aura une valeur de quantification reportée par le logiciel (Tableau 2) (Cox and Mann, 2008). Cette option est particulièrement utile pour les peptides présents en faible abondance.

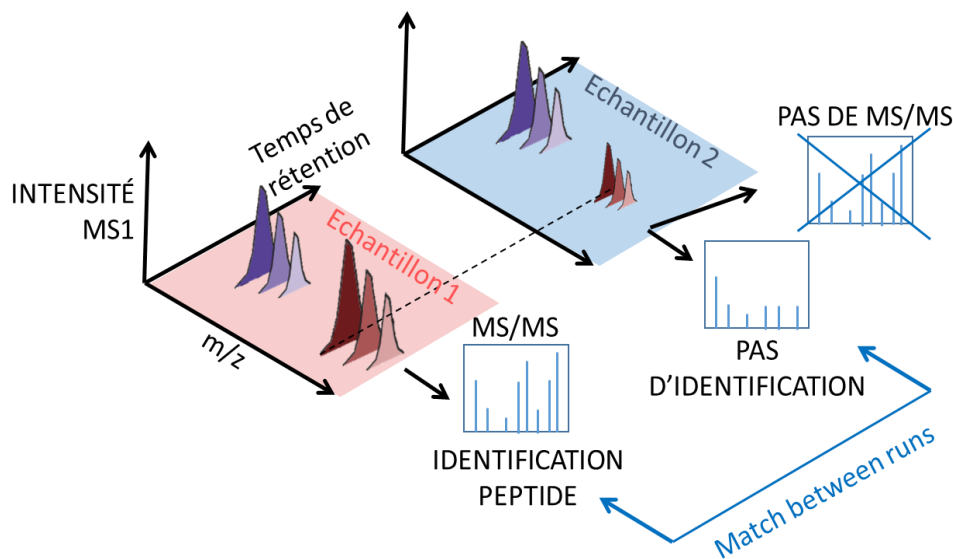


Figure 14. Principe du "match between runs"

Le MBR peut aussi être utilisé avec une librairie de spectres, obtenue à partir d'un préfractionnement de l'échantillon, pour gagner en profondeur d'analyse, dans le but d'augmenter le nombre de peptides quantifiés et par conséquent, le nombre de protéines quantifiées.

	Quantification Peptide 1 Echantillon 1	Quantification Peptide 1 Echantillon 2
"MATCH BETWEEN RUNS"	Valeur d'intensité reportée	Valeur d'intensité reportée
PAS DE "MATCH BETWEEN RUNS"	Valeur d'intensité reportée	Valeur d'intensité <b>NON</b> reportée

Tableau 2 : Exemple de quantification obtenue avec « match between runs »

Ces dernières années, de nombreux efforts ont été réalisés pour développer une alternative au DDA, le “data-independent acquisition” ou DIA. Le DIA est un mode d’acquisition développé en 2004 par Yates (Venable *et al.*, 2004) qui permet de fragmenter sans *a priori* tous les ions sur une gamme de masse  $m/z$  prédéfinie (généralement 25 Da). Cette fragmentation est répétée séquentiellement jusqu’à couvrir toute la gamme de masse (généralement entre 400 Da et 2000 Da). Il n’y a alors pas de biais lors de la fragmentation, tous les ions sont fragmentés indépendamment de leur intensité, et en théorie, pas de sous-échantillonnage qui est l’inconvénient principal de la méthode DDA. Le DIA apparaît donc comme une méthode qui permettrait de limiter au maximum les valeurs manquantes. Cependant, il est nécessaire de constituer une bibliothèque ou « library » en mode DDA avant de pouvoir analyser des données DIA. De plus, les spectres obtenus sont complexes et demandent un développement conséquent des logiciels d’analyse pour traiter ce genre de données : peu de laboratoires ont mis en place la quantification label-free en DIA, laquelle reste un défi majeur.

Dernièrement, de nouvelles avancées en matière de “deep learning” permettent de se passer des bibliothèques générées expérimentalement (Gessulat *et al.*, 2019). Ainsi, une équipe a développé une approche de “deep learning” permettant d’analyser les données DIA avec des bibliothèques spectrales générées *in silico*, ce qui permet un gain de temps et qui dispense de réaliser les analyses DDA en amont du DIA (Yang *et al.*, 2020). Ces approches, très prometteuses, ne sont toujours pas implémentées pour une utilisation en routine.

Pour mon projet de thèse, nous avons décidé de réaliser les analyses quantitatives par label-free, car nos tests au laboratoire ont montré que cette méthode permettait de quantifier le plus grand nombre de protéines par rapport à des méthodes avec marquage sur l’instrumentation installée sur la plateforme. De plus, cette quantification présente d’autres avantages tels que la possibilité d’inclure des patients additionnels au fur et à mesure de la collecte d’échantillons biologiques, ainsi que la

facilité de la préparation d'échantillons. Pour analyser ces données quantitatives, nous avons choisi de nous orienter vers le logiciel Maxquant, qui est un logiciel complet, possédant la fonction « match between runs », qui analyse mieux les spectres HCD que d'autres logiciels (Mancuso *et al.*, 2012) et quantifie de façon rapide et précise les protéines.

## 1.3.2 APPROCHES PROTEOMIQUES POUR L'ETUDE DU SYNDROME NEPHROTIQUE

### 1.3.2.1 PROTEOMIQUE DES PODOCYTES DANS DES MODELES DU SNI

Les podocytes du glomérule rénal sont particulièrement difficiles à étudier. En effet, ces cellules adhèrent fortement aux capillaires sanguins autour desquels ils sont enroulés. Il est alors compliqué de les isoler à un haut degré de pureté pour les analyser. De plus, les podocytes représentent seulement 1% des cellules du rein et environ 20% des cellules du glomérule (Takemoto *et al.*, 2006). La microdissection laser sur des coupes congelées de glomérules ou des coupes fixées à la paraffine ne permet pas d'isoler facilement les différents types cellulaires. De plus, cette technique ne permet pas de récupérer beaucoup de protéines.

En dépit de ces limitations, une analyse protéomique a été réalisée sur un glomérule rénal par microdissection laser de 3 patients HSF (2 idiopathiques corticorésistants primaires et 1 corticorésistant avec mutation de la néphrine) (Höhne *et al.*, 2018; Koehler *et al.*, 2020). Le protéome glomérulaire a été comparé à celui des glomérules non sclérosés provenant de tumeurs rénales à cellules claires. Les auteurs ont conclu que les podocytes provenant de patients HSF à un stade avancé de la maladie ne pouvaient pas être analysés seuls de façon concluante à cause du processus de dédifférenciation perdant l'expression des protéines spécifiques et du détachement des podocytes menant à une sous-représentation de leurs protéines, ne pouvant pas ainsi être comparés au contrôle. Pour donner un sens à cette première analyse, ils ont alors comparé les protéines identifiées dans cette expérience avec les protéines surexprimées des podocytes provenant d'un modèle de souris reproduisant les lésions HSF. Ils ont ainsi identifié des protéines communes associées au protéasome (PSMB7) et à la réorganisation du cytosquelette (Filamine-B, TRIM32) ainsi qu'un rôle du facteur de transcription STAT-1 (Koehler *et al.*, 2020). Récemment, des méthodes pour purifier les podocytes des autres cellules du glomérule ont été développés en utilisant le FACS. Ces approches nécessitent des souris transgéniques qui expriment les protéines étiquetées GFP sous le contrôle du promoteur de la néphrine. Cette approche a permis d'identifier 119 protéines spécifiques au podocyte (500 000 cellules ou 5/20µg) par quantification label-free (Boerries *et al.*, 2013).

L'étude menée par Xu *et al.* a permis d'analyser 251 profils d'expression spécifique à l'HSF reproduits chez un rat Sprague Dawley, ayant subi une néphrectomie unilatérale. Notamment parmi ces profils, l'identification de la thymosine  $\beta$ 4, une protéine associée à l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 et est impliquée dans l'angiogenèse et la réparation de blessures, est différentiellement exprimée chez le modèle HSF par rapport à un modèle sain (Xu *et al.*, 2005).

Ainsi, dû aux difficultés associées à l'étude de cellules de patients, afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires podocytaires impliqués dans la maladie, les principales études protéomiques ont été réalisées sur des cultures de podocytes immortalisées ou sur des modèles animaux néphropathiques.

Les cultures cellulaires immortalisées ont le désavantage de ne pas former de diaphragme de fente. Ces cellules expriment en petit nombre de copies des protéines de la néphrine et la podocine, protéines clés de cette structure. Ces modèles sont ainsi utilisés pour étudier les réseaux de signalisation podocytaires, la signalisation du diaphragme de fente et les implications du cytosquelette sur le podocyte. Dernièrement, l'étude menée par le laboratoire de Cologne a permis de cartographier 7240 protéines dans les podocytes en culture en utilisant les données transcriptomiques et les données protéomiques (Rinschen *et al.*, 2016).

#### 1.3.2.2 *PROTEOMIQUE DES LT DES PATIENTS MCNS*

Aucune étude protéomique des LT n'a été réalisée chez les patients HSF à ce jour. Une seule étude est parue en 2008 et porte sur l'analyse protéomique des LT chez les MCNS (González *et al.*, 2009). Cette étude avait pour but d'identifier les protéines dont l'expression est augmentée dans les LT de patients MCNS en rechute comparé à des patients non-protéinuriques. L'étude protéomique réalisée utilisait le couplage de l'électrophorèse 2D suivie de l'analyse par spectrométrie de masse MALDI TOF-TOF. Cette étude a seulement mis en évidence 4 protéines dérégulées chez les MCNS en rechute : la L-plastine, l'annexine III, l' $\alpha$ -tropomyosine et la glutathionne peroxidase. Parmi ces 4 protéines, 3 protéines sont associées au cytosquelette et impliquées dans l'activation des LT, ce qui suggère un rôle du réarrangement du cytosquelette dans la physiopathologie de la maladie. La limitation majeure de cette étude est le peu de matériel récupéré des spots 2D et la sensibilité limitée du MALDI-TOF/TOF. Pour les spots 2D, seuls ceux avec une abondance suffisante conduisaient à l'identification des protéines, ce qui expliquerait le peu de protéines différentielles trouvées dans cette étude.

#### 1.3.2.3 *PHOSPHOPROTEOMIQUE*

##### *Introduction sur la phosphorylation*

La phosphorylation est la modification post-traductionnelle la plus fréquente chez les protéines humaines. Les études récentes estiment que 75% des protéines des cellules eucaryotes sont phosphorylées (Sharma *et al.*, 2014). Cette modification est régulée par l'ajout ou le retrait d'un ion phosphate, réaction catalysée par des kinases et phosphatases respectivement. Ainsi, le génome

humain contient 518 gènes codant pour des kinases et environ 100 gènes pour des phosphatases (Tonks, 2006). L'activité de ces enzymes est finement régulée, et module le niveau de phosphorylation des protéines. On estime qu'elles pourraient phosphoryler et déphosphoryler 700 000 sites potentiels de protéines des cellules eucaryotes (Ubersax and Ferrell, 2007). De plus, la plupart des protéines sont phosphorylées sur de multiples résidus par différentes kinases, ce qui ajoute un niveau supplémentaire de complexité au protéome des protéines phosphorylées (phosphoprotéome). La phosphorylation a un impact sur tous les aspects de la vie cellulaire des protéines : leur fonction, leur localisation, leurs interactions avec d'autres protéines, et elle est également fortement impliquée dans la transduction du signal intracellulaire (Olsen *et al.*, 2006). Ainsi, l'étude des phosphorylations est importante car une activité anormale des kinases et phosphatases et associée à une dérégulation des signaux intracellulaires, ce qui peut conduire au développement de nombreuses maladies (Boucher, Kleinriders and Kahn, 2014; Tenreiro, Eckermann and Outeiro, 2014; Ardito *et al.*, 2017), notamment de nombreuses pathologies rénales (Feng, 2020).

#### Approches pour l'étude du phosphoprotéome

La phosphorylation peut être étudiée par différentes techniques. L'approche biochimique classique est le plus souvent ciblée, et repose sur la détection des phosphorylations par des anticorps spécifiques. Bien que l'utilisation d'anticorps dirigés contre des sites spécifiques phosphorylés permette d'étudier facilement les modulations des phosphoprotéines d'intérêt, les anticorps dirigés contre la plupart des phosphosites et protéines n'existent pas toujours commercialement. La spectrométrie de masse est alors apparue comme la technique rendant possible l'étude des phosphoprotéines de façon non ciblée, ce qui permet d'identifier de nouvelles phosphoprotéines et, plus particulièrement, de localiser leurs sites de phosphorylation. Il devient alors intéressant d'à la fois identifier les sites phosphorylés avec précision mais aussi quantifier les changements en niveaux de phosphorylation de ces sites afin de mieux comprendre la signalisation cellulaire mise en jeu au cours de ces pathologies humaines.

De larges efforts ont été réalisés pour développer des approches globales pour l'analyse quantitative des phosphoprotéines (phosphoproteomique) à haut débit par spectrométrie de masse. Il est désormais possible d'identifier plus de 38 000 phosphosites dans un type cellulaire (Sharma *et al.*, 2014).

Des développements récents dans les méthodes de préparation d'échantillon, d'analyse de données (localisation correcte du site de phosphorylation) et dans les méthodes de quantification des phosphoprotéines ont pu permettre l'analyse comparative des phosphoprotéomes. Une étape d'enrichissement des phosphoprotéines (ou phosphopeptides après digestion des



protéines) est essentielle car elles sont représentées en faible proportion comparé aux peptides non phosphorylés et ces derniers gênent la détection des phosphopeptides par spectrométrie de masse. Les méthodes d'enrichissement sont basées sur la chromatographie d'affinité, notamment des immunopurifications ou par chimio-affinité via des ions métalliques immobilisés (IMAC), soit par échange ionique (SCX) ou encore avec du dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>). Les approches basées sur les immunopurifications reposent sur des anticorps anti-phosphoTyrosine (pY), très spécifiques, et sont utilisées lorsqu'il y a un intérêt particulier pour ces sites, notamment pour l'analyse des récepteurs tyrosine kinases (RTK) (Hunter, 2009). Par contre, les anticorps anti-phosphoSerine (pS) et phosphoThreonine (pT) ne sont pas très spécifiques et ne sont pas utilisés dans ce type d'études (Murray, Spivey and Woscholski, 2013). Il a été observé que l'IMAC et la SCX sont des méthodes pour lesquelles on retrouve un grand nombre de liaisons non-spécifiques, conduisant à une faible spécificité et un faible rendement d'enrichissement des phosphopeptides (Thingholm, Jensen and Larsen, 2009). Après des tests préliminaires, pour le travail de ma thèse la chromatographie d'affinité sur TiO<sub>2</sub> a été choisie pour sa haute spécificité envers les phosphopeptides mono et multi phosphorylés, et pour sa capacité à capturer les pY, pT et pS.

Une fois les phosphopeptides enrichis, ils sont séparés et analysés par LC-MS/MS. La présence d'une phosphorylation sur un peptide se traduit par une augmentation de la masse du précurseur et de certains ions fragments. A partir de ces éléments, la position de la phosphorylation peut être déterminée dans la séquence. Cependant, il n'est pas toujours possible d'identifier le site de localisation de la phosphorylation précisément, surtout dans le cas où plusieurs S, T ou Y se retrouvent proches dans le même peptide. Un score de confiance est alors attribué au site de phosphorylation le plus probable grâce aux logiciels Andromeda (MaxQuant) (Cox *et al.*, 2011) ou ptmRS (Taus *et al.*, 2011). La quantification des phosphoprotéines peut être réalisée avec marquage ou sans marquage (label-free). Dans ce manuscrit, la méthode label-free a été utilisée pour réaliser les quantifications de phosphoprotéomique. Elle nécessite que le design expérimental soit reproductible et bien qu'elle soit moins précise que les méthodes avec marquage, elle permet d'éviter les problèmes liés aux marquages (coût élevé des réactifs, marquage partiel, limitation du nombre d'échantillons) (Zhang *et al.*, 2013).

### L'analyse des phosphoprotéines dans le SNI

L'étude des phosphorylations dans le SNI est cruciale dans la compréhension des mécanismes et pour développer de nouvelles pistes thérapeutiques. On connaît l'implication de la phosphorylation de la synaptopodine dans le SNI. En effet, les anti-calcineurines sont régulièrement utilisés dans le traitement des HSF primaires résistants aux corticostéroïdes. Ce traitement permet de réduire la protéinurie en empêchant la déphosphorylation de la synaptopodine sur les résidus T216 et S619, ce

qui lui permet de se lier à la protéine 14-3-3 $\beta$  et ainsi, de stabiliser le cytosquelette du podocyte (Faul *et al.*, 2008).

Des études ont démontré l'activation de la signalisation de la voie JAK/STAT chez l'HSF dans la cohorte NEPTUNE, avec une plus haute activité transcriptionnelle de STAT1 et des niveaux de STAT1 phosphorylés au niveau glomérulaire et tubulaire chez les patients HSF. Cette voie d'activation pourrait être un mécanisme clé cellulaire impliqué dans la progression de la maladie glomérulaire. Chez des patients atteints de néphropathie diabétique, un traitement à base d'inhibiteurs de JAK/JAK2 permet de réduire l'albuminurie et est bien toléré, suggérant que ce traitement pourrait également être utilisé avec succès chez des patients HSF (Tao *et al.*, 2018).

A ce jour, aucune étude globale des phosphorylations à large échelle n'a été réalisée dans le contexte du SNI. Cependant, des études phosphoprotéomiques ont été réalisées sur des glomérules murins entiers non pathologiques afin de dresser une cartographie des protéines phosphorylées dans les cellules glomérulaires (composées de podocytes et de cellules mésangiales) (Rinschen *et al.*, 2014). Cette étude a permis d'identifier 2449 phosphoprotéines correspondant à 6868 sites de phosphorylations dont 1717 nouveaux sites de phosphorylations non répertoriés dans PhosphoSitePlus (Hornbeck *et al.*, 2012). Notamment, 16 phosphosites non connus sont identifiés sur 5 protéines majeures du diaphragme de fente : Neph1, néphrine, podocine, CD2AP et TRPC6. Parmi ces protéines, il a été démontré qu'un défaut au niveau du site de phosphorylation T232 de la podocine est retrouvée chez certains patients HSF (Tonna *et al.*, 2008).

#### 1.3.2.4 PROTEOMIQUE DES RAFTS

##### Introduction sur les rafts

La membrane plasmique est composée de lipides, protéines, glycanes dans différentes proportions et sa composition dépend du type cellulaire. Les lipides sont les éléments constitutifs principaux des membranes. Parmi les lipides membranaires, on retrouve des phospholipides, des sphingolipides, des glycolipides et du cholestérol. Le rôle des lipides membranaires a été décrit dans de nombreuses études et différents modèles ont été proposés pour expliquer la structure de ces membranes et leur interaction avec les autres composants cellulaires. Initialement pensée comme une structure rigide, Singer et Nicolson ont proposé en 1972, le modèle de la mosaïque fluide pour décrire le comportement dynamique de la membrane cellulaire et leur composition hétérogène (Singer and Nicolson, 1972). Elle est définie comme asymétrique car la composition en lipides diffère pour chaque feuillet de la membrane.

Le concept de « lipid rafts » a été introduit en 1997 (Simons and Ikonen, 1997) où les auteurs décrivent pour la première fois l'existence de clusters de membranes, riches en sphingolipides et en cholestérol, et qui sont mobiles. A l'intérieur de ces clusters, les protéines peuvent être sélectivement incluses ou exclues des rafts et ainsi concentrer des partenaires spécifiques, exclure des régulateurs négatifs, induire des changements conformationnels ou encore réguler les propriétés membranaires de façon locale. Les protéines forment ainsi de larges complexes avec les lipides. Ces rafts ont pour fonction de faciliter les interactions entre protéines et constituent des plateformes pour la signalisation intracellulaire. Dans la littérature, on parle de radeaux lipidiques, ou de microdomaines ou de nanodomaines, mais également de « *detergent-resistant membranes* » (DRMs) pour désigner les rafts. Contrairement à la composition hétérogène du reste de la membrane plasmique, les rafts sont très compacts, ce qui les rend insolubles aux détergents non ioniques (tels que le Triton X-100) à basse température. Ces rafts sont de faible densité dû à la présence d'acides gras insaturés, ce qui permet de les séparer du reste de la membrane après extraction membranaire et ultracentrifugation dans un gradient de densité composé d'iodixanol ou de sucrose (Boesze-Battaglia, 2006).

Bien que le terme rafts ait été initialement utilisé pour décrire les parties de membranes plasmiques, ils ont également été décrits au niveau des membranes des organelles, on parle alors de rafts intracellulaires. De la même façon qu'au niveau de la membrane plasmique, les rafts intracellulaires facilitent la réorganisation des molécules qui est nécessaire pour la signalisation moléculaire à l'intérieur des organelles mais également inter-organelles, via le tri et le trafic de composants membranaires entre les différentes organelles. Ainsi, la composition en lipides des membranes de différentes organelles est différente de la composition en lipides de la membrane plasmique (Ouweneel, Thomas and Sorci-Thomas, 2020).

En dépit des nombreux efforts réalisés en développements méthodologiques sur les rafts, on ne connaît toujours pas précisément leur taille, structure et composition. Certaines études (Pralle *et al.*, 2000) montrent que les radeaux lipidiques ont une taille de l'ordre du nanomètre (taille estimée entre 50 et 200nm de diamètre). Les rafts sont ainsi de très petites tailles mais également très dynamiques, à la fois en diffusion latérale mais aussi dans leur formation et leur dissolution, ce qui rend leur détection très difficile dans les cellules vivantes. Cependant, la présence de rafts a été décrite en utilisant des techniques de FRET (Owen *et al.*, 2012), de super-résolution (Sezgin *et al.*, 2019), par microscopie électronique (Prior *et al.*, 2003) ou encore par suivi dynamique de molécules uniques (Komura *et al.*, 2016). Ainsi, la microscopie à super-résolution a été appliquée à des cellules de lymphocytes B vivantes. Les auteurs (Stone and Veatch, 2015) ont montré que les protéines BCR étaient recrutées dans les radeaux lipidiques et incluait des régulateurs clés pour l'activation du lymphocyte B. Ces résultats confirment ce qui a déjà été observé dans d'autres cellules du système

immunitaire et qui mènent à la même observation, à savoir le rôle important des rafts dans l'activation des cellules immunitaires.

### Approches pour l'étude du raftome

Les études protéomiques sur les rafts ont pour but de mieux comprendre les voies de signalisation cellulaire et leur modulation. L'étape la plus importante dans l'analyse protéomique des rafts est la purification des rafts. Après une lyse cellulaire avec ou sans détergents, les membranes sont séparées selon leur densité par ultracentrifugation dans un gradient de sucrose ou d'iodixanol. Enfin, à partir de la fraction contenant les membranes des rafts, de faible densité, les protéines sont extraites et analysées par spectrométrie de masse.

La méthode la plus utilisée pour purifier les rafts exploite la particularité physico-chimique des rafts à savoir la résistance aux détergents non-ioniques à froid, comme le Triton X-100 (Boesze-Battaglia, 2006). La majorité des lipides membranaires et des protéines sont efficacement solubilisés dans 1% Triton X-100 tandis que les membranes de rafts, résistantes à ce détergent, sont alors récupérées par flottaison dans un gradient de sucrose ou iodixanol. A cause de cette caractéristique, les radeaux lipidiques sont également appelés « *detergent-resistant membranes* » ou DRM. Le triton X-100 est le détergent le plus utilisé mais d'autres détergents sont également utilisés comme le Triton X-114, CHAPS, NP-40, Octylglucoside, Brij et Lubrol. L'utilisation de détergents est controversée dans la mesure où certaines études montrent qu'ils induisent des artefacts : la composition et les propriétés des radeaux lipidiques sont dépendants de la nature chimique et la concentration du détergent, de la température et de la durée de solubilisation. Il a été suggéré que les détergents pourraient induire des formations artéfactuelles de structures de radeaux lipidiques qui ne sont pas présentes dans les membranes natives avant traitement au détergent (Hancock, 2006). Des études ont démontré que des protéines des rafts peuvent être solubilisées par le Triton X-100 (Simons and Toomre, 2000) et que l'utilisation de ce détergent causait une redistribution des gangliosides (Heffer-Laue *et al.*, 2005). Ainsi, cela questionne la validité de cette approche qui ne peut pas être représentative de ce qu'il se passe *in vivo*. La principale alternative à l'utilisation de détergents repose sur la disruption des cellules par sonication sans détergents puis purification par flottaison des rafts dans un gradient de sucrose ou d'iodixanol dans des conditions de tampons physiologiques (Smart *et al.*, 1995; Song *et al.*, 1996). Cependant, les protocoles utilisant le sucrose requièrent de multiples et de longues centrifugations produisant peu de rendements. D'autres méthodes utilisant l'iodixanol permettent de réduire le temps de centrifugation (Macdonald and Pike, 2005). Ainsi, dans ce manuscrit, une méthode sans détergent combinée à une ultracentrifugation courte dans l'iodixanol a été choisie comme la méthode la plus

rapide qui se rapproche le plus des conditions physiologiques pour analyser les rafts par spectrométrie de masse.

Une base de données nommée Raftprot (Mohamed *et al.*, 2019) rassemble toutes les données protéomiques des rafts publiées dans la littérature. La base de données permet d'explorer les données en fonction de l'espèce, du type cellulaire, du type de préparation d'échantillon et du type de spectromètre de masse utilisé. Selon les données répertoriées sur Raftprot V2 (<https://raftprot.org/>), une très grosse majorité d'études protéomiques ont été réalisées en utilisant du détergent (86%) tandis que seulement 14% ont été réalisées sans détergent. Très peu d'études utilisent le gradient d'iodixanol avec la spectrométrie de masse, une étude a employé un gradient d'iodixanol pour purifier les rafts avant de les séparer par gel SDS-PAGE et de réaliser la digestion dans le gel, puis les protéines des rafts sont analysées par MALDI et ESI-Quadrupole (Bagnat *et al.*, 2000). Bien que l'iodixanol soit la méthode la plus rapide et la plus pratique, il n'est pas utilisé dans les études lipidomiques où le sucrose lui est préféré. En effet, l'iodixanol peut se retrouver avec les lipides après extraction ce qui affecte la précision et la fiabilité des données de spectrométrie de masse de lipidomique (Lingwood and Simons, 2007).

La difficulté d'éliminer l'iodixanol lors de l'analyse par spectrométrie de masse pourrait expliquer le peu d'études utilisant cette molécule.

Par ailleurs, l'isolement des rafts étant techniquement difficile et long, les études protéomiques actuelles se limitent à étudier les rafts à partir de lignées cellulaires en culture ou à partir de tissus, avec seulement peu d'études qui s'attardent sur des sous-populations cellulaires ou des échantillons peu abondants. Dans la partie des résultats sera décrite une méthode qui a été mise au point au cours de la thèse, afin d'analyser les rafts préparés par iodixanol sur une sous-population cellulaire, les LT isolés à partir d'une souris.

#### L'analyse des rafts dans le SNI

Aucune étude protéomique a été réalisée sur les rafts dans le contexte de la maladie. Les différentes études réalisées ces dernières années reposent essentiellement sur l'utilisation de la microscopie photonique pour visualiser le comportement des protéines des rafts à la membrane plasmique (Tanimura *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2011; Dinic *et al.*, 2015) ou par des méthodes biochimiques via l'isolement des rafts par ultracentrifugation et détection des protéines par Western-Blot (Huber *et al.*, 2001; Schwarz *et al.*, 2001).

### **Axe néphrine/podocine/CD2AP**

Dans le podocyte, les rafts sont essentiels pour le fonctionnement du diaphragme de fente. Ainsi, la néphrine, une protéine clé du diaphragme de fente, est recrutée dans les rafts où elle est phosphorylée par Fyn (Simons *et al.*, 2001). Le recrutement de la néphrine dans les rafts contrôle la morphologie cellulaire du podocyte via les protéines adaptatrices Nck qui régulent la polymérisation de l'actine (Verma *et al.*, 2006). Les protéines adaptatrices sont des protéines qui contiennent des domaines qui modulent les interactions entre protéines. La plupart des protéines adaptatrices sont localisées au niveau des rafts ou près des rafts dans les podocytes et leurs interactions sont régulées via la phosphorylation et déphosphorylation de protéines cibles (Benzing, 2004).

La podocine contient un motif de reconnaissance pour les lipides, ce qui lui permet d'être recrutée dans les rafts et colocalise ainsi avec la néphrine et augmente son activité de 40 fois *in vitro* (Huber *et al.*, 2001). Elle se lie et régule le récepteur TRPC6, qui est un canal modulant l'entrée du calcium dans les podocytes. Le podocyte étant contractile (Drenckhahn and Franke, 1988), il peut être régulé par le niveau de calcium dans le microenvironnement (Reiser *et al.*, 2005). Le complexe podocine et néphrine est ainsi important pour le maintien de la structure du podocyte mais aussi dans la signalisation du podocyte. Des études utilisant la technologie Cre-lox permettant au gène de la podocine d'être inactivée chez la souris, montrent que ce modèle produit des lésions HSF après 4 semaines (Mollet *et al.*, 2009).

CD2AP, une protéine adaptatrice du podocyte, interagit avec la néphrine et la podocine et permet de les ancrer au cytosquelette du podocyte. Lorsque la fonction de la protéine CD2AP est altérée, le podocyte est plus fragile et est plus sujet à des lésions podocytaires. Des variants de CD2AP peuvent mener à une mort prématurée des podocytes. Des études utilisant des souris KO pour CD2AP, montrent que ces souris développent une protéinurie massive et meurent à l'âge de 6 semaines, soulignant le rôle important de CD2AP dans la barrière de filtration glomérulaire (Kim *et al.*, 2003).

### **Axe néphrine PI3K/Akt/Rac1**

Une autre voie de signalisation impliquant la néphrine est via l'axe PI3K/Akt/Rac1. La Néphrine et CD2AP recrutent PI3K à la membrane plasmique, activant ainsi la signalisation dépendante d'Akt qui est nécessaire pour la régulation du cytosquelette d'actine et la survie de la cellule. Parmi les protéines régulant l'assemblage et l'organisation du cytosquelette d'actine, les petites protéines G de la famille Rho (ou Rho GTPases) semblent jouer un rôle fondamental (Tapon and Hall, 1997). Cette famille est composée de 3 membres majeurs : Rac1, RhoA et Cdc42 (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Une augmentation de Rac1 et une diminution de RhoA entraîne une perte de l'architecture normale du

cytosquelette (Zhu *et al.*, 2008). La phosphorylation de la néphrine régule ainsi la polymérisation et la réorganisation de l'actine avec la voie PI3K/Akt/Rac1, de concert avec d'autres voies de signalisation, comme celle impliquant les protéines Nck et N-WASP.

### Axe néphrine/Nck/N-WASP

Les unités de la néphrine de deux podocytes adjacents interagissent entre elles. Ainsi, la partie extracellulaire de la néphrine transmet les signaux du diaphragme de fente vers le cytosquelette d'actine intracellulaire. La partie cytoplasmique interagit et se lie à des protéines adaptatrices comme CD2AP ou Nck. Ces protéines adaptatrices interagissent directement avec l'actine ou avec des protéines de liaison de l'actine comme la  $\beta$ -actinine-4, la synaptopodine, la cofiline etc. La partie cytoplasmique de la néphrine est composée de 6 résidus tyrosine conservés, qui peuvent être phosphorylés par des membres de la famille des src kinase dans des conditions physiologiques ou pathologiques. Une fois la néphrine phosphorylée par Fyn, le domaine SH2 de Nck se lie à la phospho-néphrine et les domaines SH3 de Nck se lient à N-WASP et PAK. N-WASP va à son tour activer le complexe Arp2/3, qui interagit directement avec le cytosquelette d'actine. PAK, une fois phosphorylée, va agir directement sur l'actine-F (Zhu *et al.*, 2010). Nck, N-WASP et PAK sont ainsi recrutés et activés lors de la réparation du podocyte lorsqu'il y a besoin d'une réorganisation et polymérisation rapide de l'actine. L'organisation des protéines des rafts du podocyte est schématisée dans la Figure 15.

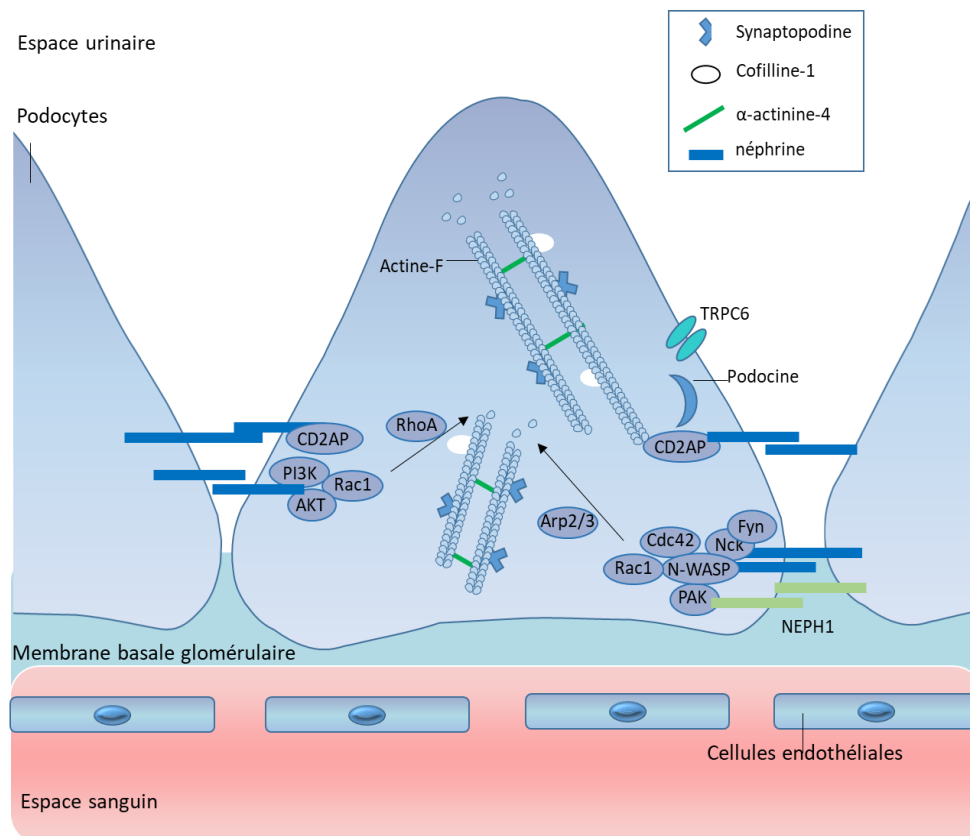


Figure 15. Résumé des protéines des rafts des podocytes impliquées dans l'HNF

## Rafts des LT

Le rôle des rafts est essentiel pour l'activation des LT. Une activation complète du LT nécessite deux signaux reçus par la liaison du récepteur des cellules T (TCR) avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de la cellule présentatrice de l'antigène (CPA). Il se forme ainsi ce que l'on appelle la synapse immunologique qui stimule et contrôle l'activation du LT. Le premier signal est déclenché par la reconnaissance du TCR avec l'antigène, le complexe TCR-CD3 se forme alors et va permettre la transduction du signal. Le second signal est un signal de co-activation qui implique la liaison du CD28 du LT avec CD80 du CPA (Zumerle, Molon and Viola, 2017). Des études ont démontré que le récepteur TCR n'est pas localisé dans les rafts au repos et est transloqué dans les rafts lors de l'activation du lymphocyte T (Montixi *et al.*, 1998). D'autres études montrent que le TCR est localisé dans les rafts au repos mais que les rafts s'agrègent ensemble lors de l'activation du lymphocyte T (Dinic *et al.*, 2015). La signalisation du lymphocyte T est dépendante des protéines Lck et LAT, qui sont constitutivement présentes dans les rafts. Après stimulation du TCR, la protéine tyrosine kinase ZAP70 se lie au TCR phosphorylé dans les rafts et active LAT et recrute d'autres protéines adaptatrices pour l'activation du LT. Lors de l'activation du LT, Lck devient active et phosphoryle les motifs ITAM des CD3. Lck permet le recrutement et la phosphorylation de ZAP70, qui à son tour, va phosphoryler la protéine LAT. La protéine Gads s'associe à LAT et SLP-76 qui va lier Nck et moduler la réorganisation du cytosquelette via PAK1 et MEK. La protéine Rac1, recrutée dans les rafts lors de l'activation du TCR, régule également la réorganisation du cytosquelette. La protéine Ras, également recrutée dans les rafts, peut aussi réguler le cytosquelette d'actine via MEK mais de surcroît, jouer un rôle dans la prolifération du LT via la PI3K et Akt (schéma en Figure 16).

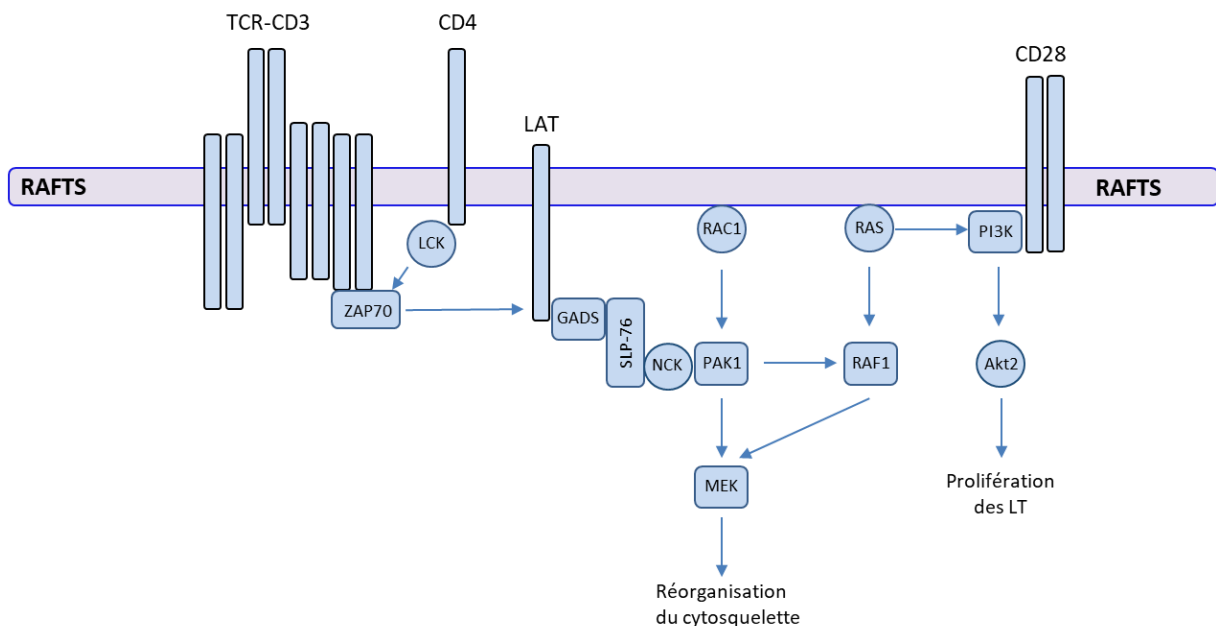


Figure 16. Protéines des rafts et associées aux rafts lors de l'activation des LT



### 1.3.2.5 PROTEOMIQUE DES FLUIDES BIOLOGIQUES

L'examen histologique du rein est une étape diagnostique essentielle car elle permet de différencier les LGM des HSF, qui nécessitent des stratégies thérapeutiques différentes et pour prédire la possible évolution de la maladie. Cependant, la biopsie rénale est une procédure invasive qui peut mener à des complications comme des hématomes, des fistules artérioveineuses et des infections. De plus, la biopsie rénale est contre-indiquée dans certaines circonstances, notamment, lors de troubles de l'hémostase, une hypertension non contrôlée par médicaments ou la présence d'un seul rein (Whittier and Korbet, 2004). Il y a donc un besoin de rechercher des biomarqueurs à partir d'une méthode non invasive pour établir le diagnostic définitif, idéalement dans les fluides biologiques des malades.

#### Plasma

##### **Enjeux**

Le sang est un fluide biologique qui peut être collecté facilement et de façon peu invasive. Il irrigue tous les organes et tissus du corps et contient ainsi, toutes les protéines sécrétées par les cellules et tissus. Sa composition est ainsi modifiée dans diverses pathologies. Le plasma, la partie du sang débarrassée des réticulocytes, constitue ainsi la meilleure source pour la découverte de nouveaux biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques de nombreuses maladies. En revanche, l'analyse du protéome du plasma représente un enjeu majeur dans le domaine de la protéomique. Cette difficulté est liée à la gamme dynamique du plasma qui s'étend sur 12 ordres de magnitude (Figure 17) alors que les spectromètres de masse ne détectent qu'une gamme dynamique de 4 voire 5 ordres de magnitude pour les plus récents (Anderson and Anderson, 2002). Le Human Plasma Proteome Project est une initiative débutée en 2002 dont le but est de reporter les protéines présentes dans le plasma (Nanjappa *et al.*, 2014). A ce jour, environ 3500 protéines ont été détectées dans le plasma, ces identifications provenant de 180 études avec un FDR <1%. Cela représente moins de 20% du protéome humain.

Les stratégies permettant d'analyser en profondeur le plasma reposent sur l'utilisation de fractionnement et/ou de déplétion. La déplétion utilisant des anticorps dirigés contre les protéines les plus abondantes du plasma est la méthode la plus utilisée pour accéder à l'identification des protéines les moins abondantes. D'autres méthodes exploitent les propriétés physico-chimiques des protéines par liaisons colorant-protéines, précipitation différentielle par poids moléculaire, précipitation ou

l'utilisation de bibliothèques peptidiques permettant d'égaliser les contenus protéiques du plasma (Lee *et al.*, 2019).

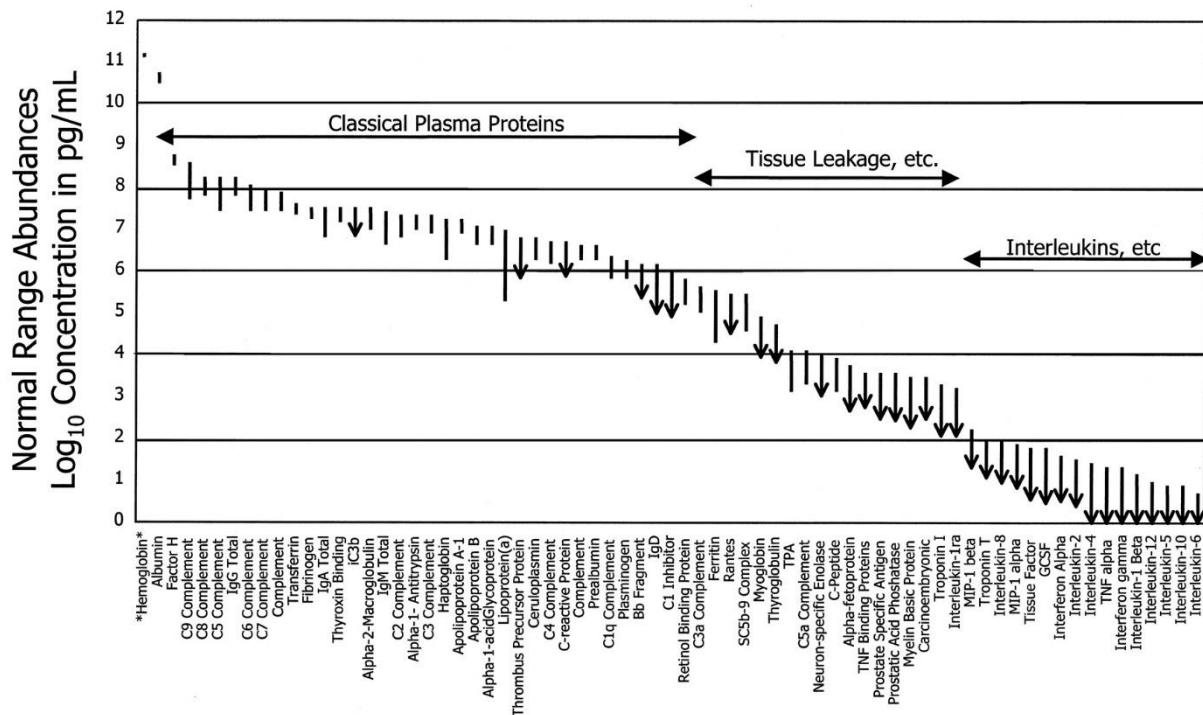


Figure 17. Gamme dynamique du protéome plasmatique. Extrait de (Anderson and Anderson, 2002)

Aucune protéine différentielle a été identifiée par analyse protéomique sur le plasma de patients HSF, bien qu'une tentative infructueuse ait été rapportée dans la littérature (Lopez-Hellin *et al.*, 2013). Dans cette étude, un pool de plasma et d'urine de deux groupes de patients récidivants (8 plasma) et non récidivants (27 plasma) après la greffe rénale a été utilisé, mais aucune différence n'a été détectée entre les deux pools. Par contre, dans l'urine, la protéine ApoA-Ib a été retrouvée augmentée chez les récidivants et validée par Western-Blot sur 6 sur 6 de patients récidivants et non détectée chez 33 sur 34 patients non récidivants. Ainsi, la détection précoce de ApoA-Ib pourrait prédire la récurrence avant que les premiers symptômes, permettant ainsi une meilleure prise en charge. Cette protéine est également retrouvée dans une autre étude où ApoA1 est différentiellement augmentée dans les urines de 4 HSF résistants aux corticostéroïdes par rapport à 6 HSF sensibles aux corticostéroïdes (Kalantari *et al.*, 2014).

Plusieurs études protéomiques ont été réalisées sur le plasma de patients pédiatriques LGM. Deux patients dont le plasma a été prélevé avant traitement et après rémission ainsi que quatre patients ont été intégrés dans l'étude pour le recueil d'urines. Les validations par ELISA ont été réalisées sur 14 patients différents. Après déplétion de l'albumine et des IgG, ils ont identifié 388 protéines dans le plasma et 18 différentiellement modulées dans le plasma avant et après rémission.

Ces protéines sont des protéines abondantes plasmatiques telles que les protéines de la coagulation (fibrinogène, alpha-2-macroglobuline) qui présentent une expression plus élevée (2 fois) chez les patients avant traitement. Les protéines suPAR, CLCF-1, CD40 ou encore CASK, présentées par d'autres auteurs comme potentiels facteurs de perméabilité chez les HSF, n'ont pas été identifiées dans cette étude. En revanche, l'expression de la protéine hémopexine est diminuée avant traitement dans le plasma des patients avant traitement, ce qui a également été observé dans une autre étude (Bakker *et al.*, 2005). Pour le protéome urinaire, 425 protéines ont été identifiées avec 38 protéines différentiellement exprimées dont la protéine E-cadhérine, étant en plus faible abondance dans les urines des patients avant traitement. Cette protéine facilite les adhésions cellules-cellules et pourrait avoir un impact sur l'intégrité de la barrière de filtration glomérulaire (Andersen *et al.*, 2012).

Une étude pédiatrique protéomique a été réalisée sur le plasma de 8 patients corticorésistants et 7 patients corticosensibles avant et après traitement avec corticostéroïdes. Après déplétion des 20 protéines les plus abondantes du plasma, 226 protéines ont été identifiées sur ces 15 patients en utilisant un spectromètre de masse performant (Orbitrap Elite). Le but de cette étude était d'identifier des biomarqueurs prédictifs de la corticorésistance avant tout traitement. Des validations par Western-Blot ont permis de confirmer des niveaux d'expressions protéiques élevés chez les corticorésistants de ces protéines : la vitamine D binding protein, l'hémopexine, l'adiponectine, la sex hormone-binding globulin et APOL1. Ces protéines ont ainsi été proposées comme biomarqueurs potentiels capables de distinguer les formes corticorésistantes des formes corticosensibles (Agrawal *et al.*, 2019).

## Urine

### Enjeux

Dans le contexte du SNI, l'urine est un fluide biologique intéressant car elle est directement en contact avec les podocytes. Elle présente plusieurs avantages par rapport au plasma : elle reflète directement les changements physiologiques se produisant dans le rein, elle peut être collectée facilement de manière non-invasive en grande quantité, et elle pose moins de défis analytiques comparé au plasma. Ainsi, l'urine est souvent le fluide biologique de choix pour rechercher des biomarqueurs dans diverses maladies rénales (Bourderioux *et al.*, 2015; Jung *et al.*, 2020). Cependant, lorsque la barrière de filtration glomérulaire est altérée, la composition de l'urine est fortement contaminée par les protéines plasmatiques. Ainsi, une analyse protéomique urinaire nécessite d'être réalisée de préférence lorsque la progression de la maladie n'est pas avancée et la fonction du rein est encore préservée.

De nombreuses études protéomiques sur l'urine ont été réalisées durant la dernière décennie chez les HSF en utilisant des approches variées.

Des biomarqueurs pour différencier les HSF des autres maladies glomérulaires telles que la glomérulonéphrite extra-membraneuse (GEM) ou la néphropathie à IgA ont été reportés (Nafar *et al.*, 2014). En revanche, il paraît difficile de différencier les LGM des HSF (Choi *et al.*, 2017).

Une étude (Kalantari *et al.*, 2014) a été réalisée afin d'identifier des biomarqueurs pronostiques entre des HSF modérés (eGFR>60cc/min/1.73m<sup>2</sup>) et graves (eGFR<60cc/min/1.73m<sup>2</sup>), ce qui pourrait permettre de surveiller la progression de la maladie. Ils ont identifié 110 protéines avec un spectromètre de masse récent (Q-Exactive MS) et parmi les 54 protéines différentiellement exprimées entre les 2 groupes de patients, la ribonucléase 2 et l'haptoglobine étaient les plus dérégulées. Le rôle de la ribonucléase 2 et de l'haptoglobine dans le contexte de la maladie n'est pas clair mais il a été démontré qu'il y a avait une corrélation entre la concentration de ces protéines et l'insuffisance rénale (Humphrey *et al.*, 1977; Costacou *et al.*, 2009).

Un modèle de classification a été développé dans une autre étude (Pérez *et al.*, 2014) qui permet de différencier les LGM des HSF en analysant leur profil protéique urinaire par MALDI-TOF. Ils ont avec succès classifié 72% des HSF et 81% des LGM en utilisant un profil protéique dont l' $\alpha$ -1-antitrypsine a une expression diminuée chez les HSF comparés aux LGM. Cette protéine pourrait avoir un rôle dans la maladie via son action anti-inflammatoire et anti-apoptotique (Zager, Johnson and Frostad, 2014). Les profils d'expression ont également été validés par ELISA sur un groupe de patients HSF (n=14) et LGM (n=14) (Pérez *et al.*, 2017)

Les échantillons d'urine de 5 patients atteints de syndrome néphrotique (formes de la maladie non mentionnées) ont été séparés à haut pH en 20 fractions (via une méthode « offline » utilisant une HPLC) puis analysés par triple TOF MS pour un total de 809 protéines identifiées (Wang *et al.*, 2017). Cette étude représente la plus large identification de protéines dans les urines chez des patients atteints de syndrome néphrotique.

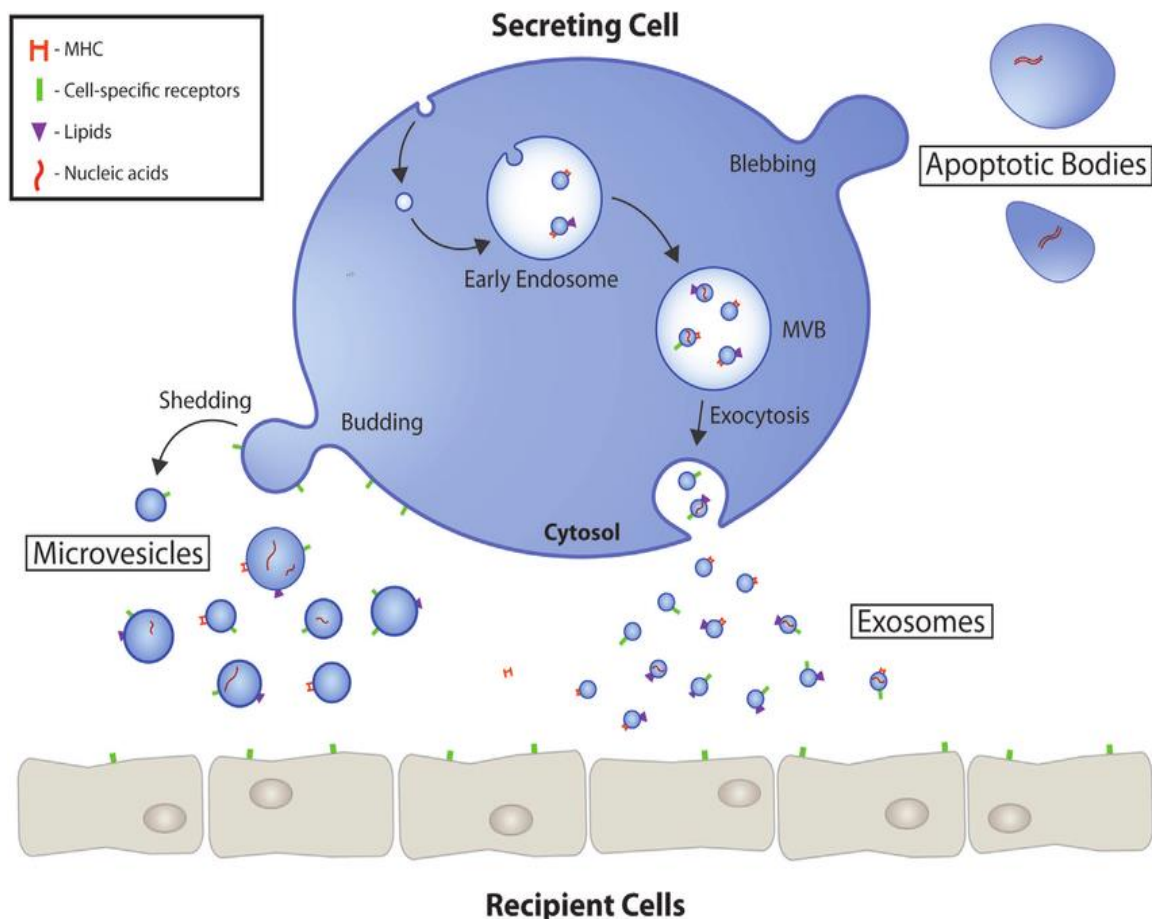
#### Vésicules extracellulaires (EVs)

Les vésicules extracellulaires (*extracellular vesicles or EVs*) sont des vésicules possédant une double couche lipidique et présentes dans tous les fluides biologiques. Les EVs sont sécrétées par tout type cellulaire et peuvent potentiellement être porteurs de messages intercellulaires (Figure 18). Les EVs sont divisées en plusieurs groupes, selon leur taille et le mécanisme de biogénèse dont elles sont originaires. On distingue les exosomes (30-150nm) qui sont formés à partir d'endosomes multivésiculaires suivi de leur fusion avec la membrane plasmique ; les microvésicules (100-1000nm) qui proviennent directement de la membrane plasmique et les corps apoptotiques, qui sont des vésicules formées lors de l'apoptose (>1000nm).

Les exosomes et les EVs ont en commun le regroupement des lipides et des protéines à la surface des membranes plasmiques/endosomales et ils contiennent tous deux des protéines et autres biomolécules. Leur composition et sécrétion est différente dans diverses pathologies et est modulée par différentes conditions de stress (inflammation chronique, infection, hypoxie, stress mécanique et oxydatif etc.) (Abramowicz, Widlak and Pietrowska, 2019). Les EVs du sang proviennent des cellules du sang, la plupart venant de plaquettes, de cellules endothéliales, des érythrocytes, des leucocytes mais aussi de toutes les cellules du corps des tissus et organes irrigués par le sang (Figure 19).

## Enjeux

A l'instar de la protéomique du plasma, la protéomique des EVs connaît les mêmes écueils. Les EVs plasmatiques sont contaminées par les protéines les plus abondantes du plasma, telles que l'albumine, et les EVs urinaires le sont par les protéines abondantes de l'urine telles que l'uromoduline. Néanmoins, le niveau de cette contamination reste faible et gérable lors de l'analyse protéomique, à condition que la préparation des EVs soit bien maîtrisée.



**Figure 18. Biogénèse et sécrétion des vésicules extracellulaires (EV)** Représentation schématisée de l'origine et la sécrétion des EV (vésicules extracellulaires). Les exosomes dérivent des vésicules intraluminales par bourgeonnement dans les endosomes précoces. Ceux-ci évoluent en corps multivésiculaires qui fusionnent avec les lysosomes pour la dégradation des protéines ou fusionnent avec la membrane plasmique où ils délivrent leur contenu au milieu extracellulaire. Les microvésicules proviennent directement de la membrane plasmique. Les corps apoptotiques sont obtenus suite à la mort programmée des cellules.

## EVs du plasma

Les EVs du plasma peuvent avoir des origines très variées (Figure 19). Récemment, les auteurs d'une étude (Ma *et al.*, 2020) ont isolé les exosomes à partir d'échanges plasmatiques de patients atteints de neuromyéélite optique, une maladie auto-immune touchant les nerfs de l'œil et de la moelle épinière. Cette étude a permis d'identifier 647 protéines exosomales en utilisant le DIA à partir de 8 patients et 40 échanges plasmatiques (5 par patients).

Les EV peuvent traverser la membrane basale glomérulaire, il est alors possible de les utiliser comme véhicules thérapeutiques qui cibleraient les cellules rénales (Wang *et al.*, 2016). Dans une autre étude (Zhang *et al.*, 2017), des transcrits d'ARNm trouvés dans les exosomes plasmatiques de patients transplantés peuvent prédire un rejet de greffe. Récemment, une étude utilisant des EVTrap, des billes magnétiques recouvertes de groupements lipophiles ciblant les lipides des exosomes, ont permis d'identifier 2238 protéines à partir de 5µL de plasma sur un Q-Exactive HF-X (Iliuk *et al.*, 2020).

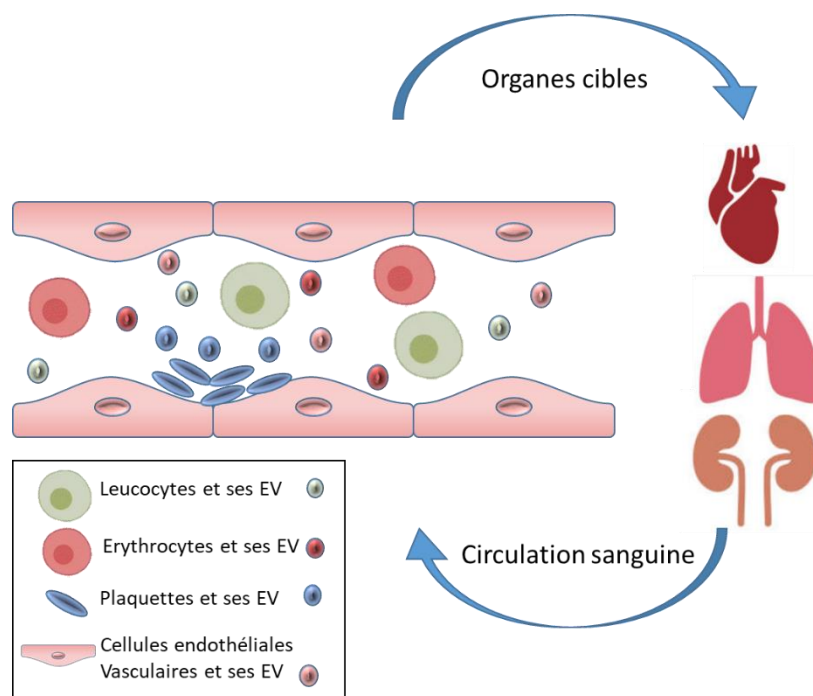


Figure 19. Vésicules extracellulaires des cellules sanguines

## EVs de l'urine

Il existe peu d'études protéomiques analysant les microvésicules urinaires chez les HSF. Une étude utilise comme technique l'immunoabsorption avec des billes recouvertes d'anticorps anti-CR1, Complement Receptor 1, une protéine marqueur spécifique du podocyte, pour enrichir les exosomes provenant des podocytes des urines. Les exosomes sont ensuite digérés en gel puis analysés

par LC-MS/MS avec un LTQ Orbitrap velos. Cet enrichissement a permis d'identifier 1195 protéines dont 65% présentes dans la base de données ExoCarta, qui répertorie les protéines identifiées dans les exosomes humains de nombreux tissus et lignées cellulaires. Cette méthode ne permet pas de s'affranchir totalement des protéines les plus abondantes de l'urine (albumine, uromoduline) mais enrichit aussi les protéines spécifiques du podocyte (Prunotto *et al.*, 2013).

Une autre étude utilise un gradient sucrose/D<sub>2</sub>O 5-30% afin de purifier les vésicules membranaires glomérulaires enrichies en podocine et podocalyxine, provenant donc des parties apicales des podocytes. Ce gradient permet de séparer l'uromoduline, protéine retrouvée en très larges quantités dans l'urine, ainsi que l'albumine des autres protéines. Cette étude identifie 5657 protéines à partir d'urines de 3 GEM ce qui fait de cette étude la plus large base de données protéique urinaire de maladies glomérulaires. Dans cette étude, les protéines telles que la néphrine, TPRC6 et CD2AP ont été détectées dans les exosomes de patients atteints de syndrome néphrotique mais pas chez les individus sains. Ainsi, les auteurs ont développé une approche qui permet d'étudier en profondeur les protéines impliquées dans les maladies glomérulaires en étudiant les vésicules membranaires glomérulaires (Hogan *et al.*, 2014).

Une dernière étude propose WT-1 comme un biomarqueur potentiel de lésions podocytaires. Les exosomes urinaires de 7 patients HSF et 12 patients non-HSF (sensibles aux corticostéroïdes) ont été analysés et la quantification de la protéine WT-1 permet de distinguer les patients HSF actifs des non-HSF (Zhou *et al.*, 2013).

## OBJECTIFS DE LA THÈSE

Le principal objectif des travaux de cette thèse est de mieux comprendre la physiopathologie du syndrome néphrotique idiopathique en suivant deux axes complémentaires :

- Un axe fondamental, afin d'étudier les mécanismes cellulaires impliqués dans les lymphocytes T et les podocytes dans le contexte du SNI à l'aide de modèles animaux et cellulaires
- Un axe clinique, afin d'identifier de potentiels biomarqueurs impliqués dans le processus physiopathologique à partir d'une petite cohorte de patients.

Pour atteindre cet objectif, j'ai dû dans un premier temps mettre en place une stratégie afin d'améliorer la sensibilité de l'analyse protéomique. Ensuite, face aux résultats encourageants obtenus, cette approche a été appliquée à l'analyse du protéome total du lymphocyte T afin de mieux comprendre le rôle de CMIP dans ces cellules. La protéine CMIP pouvant être localisée dans les rafts, j'ai aussi développé une méthode permettant l'analyse des rafts à partir d'une faible quantité de matériel, les LT purifiés à partir d'une seule souris. Nous avons ainsi analysé l'impact de CMIP sur le protéome des rafts lymphocytaires.

Afin de mieux comprendre les premiers événements de signalisation cellulaire déclenchés par des potentiels facteurs circulants responsables de la récurrence post greffe de la HSF, nous avons également analysé le raftome et le phosphoprotéome des podocytes après les avoir mis en contact avec le plasma des patients.

Enfin, dans un contexte plus clinique, les échanges plasmatiques (fraction soluble et vésicules extracellulaires -EVs-) des patients SNI en récurrence post-greffe ont été analysés afin de mettre en évidence des biomarqueurs du SNI et/ou de son évolution vers une récurrence.



# RESULTATS

## 1.4 AXE FONDAMENTAL

### 1.4.1 MISE AU POINT D'UNE METHODE FASP POUR L'ANALYSE DES LT

#### **Introduction**

Afin de mieux comprendre la physiopathologie du SNI, nous voulions utiliser la spectrométrie de masse pour identifier les protéines impliquées dans les processus moléculaires de cette maladie. La préparation des échantillons pour l'analyse par spectrométrie de masse est une étape essentielle. Elle nécessite une solubilisation complète de toutes les protéines avec des détergents pour réaliser une analyse en profondeur du protéome. En revanche, les détergents ne sont pas compatibles avec l'analyse par spectrométrie de masse et peuvent être éliminés par différentes méthodes telles que la précipitation, la chromatographie, par SDS-PAGE ou par l'utilisation de filtres ("Filter-Aided Sample Preparation" ou FASP).

#### **Objectifs de l'étude**

Nous avons ainsi décidé dans un premier temps de mettre en place une stratégie de préparation des échantillons qui nous permettrait d'obtenir une solubilisation complète des protéines et une meilleure reproductibilité dans l'identification des protéines comparé aux méthodes classiques pour pouvoir l'appliquer à ce projet de thèse.

#### **Résultats obtenus**

Nous avons comparé la méthode FASP, qui consiste à déposer les protéines sur un filtre moléculaire de 30kDa et de réaliser sur ce même filtre toutes les étapes nécessaires à la digestion des protéines par centrifugation. Ces filtres sont disponibles dans le commerce sous deux formes : filtres à fond plat ou filtres à fond conique. Lorsque la méthode initiale du FASP a été publiée, les auteurs ont utilisé des filtres à fond conique, ce qui leur permettait de réaliser la digestion de façon très rapide grâce à la forme des filtres qui permet de diminuer les temps de centrifugation. Cependant, nos résultats montrent que lorsqu'on utilise du SDS, qui permet de solubiliser complètement les protéines, à une concentration de 2%, ce détergent n'était pas correctement éliminé par les filtres coniques. Nous avons digéré des quantités différentes 1, 10 et 100µg avec des concentrations différentes de SDS (0,1% et 2%) pour connaître quelle était l'efficacité de ces filtres sur de petites quantités de protéines comme sur de grandes quantités. Nous avons comparé les performances du FASP avec la précipitation à l'éthanol. Les résultats obtenus montrent une supériorité du FASP à fond plat comparé au FASP à fond conique et à la précipitation à l'éthanol.

## **Conclusions**

Cette méthode permet d'utiliser une haute concentration de SDS afin de solubiliser complètement les protéines et de les digérer de façon reproductible même sur de petites quantités de protéines comme le montre les digestions réalisées sur un îlot pancréatique (2000 cellules) où le FASP à fond plat permet d'identifier 2463 protéines par rapport à la précipitation à l'éthanol où seulement 1169 protéines sont identifiées.

## TECHNICAL BRIEF

# Sensitivity of mass spectrometry analysis depends on the shape of the filtration unit used for filter aided sample preparation (FASP)

Joanna Lipecka<sup>1,5</sup>, Cerina Chhuon<sup>2,5</sup>, Matthieu Bourderioux<sup>2,5</sup>, Marie-Andrée Bessard<sup>3,4,5</sup>, Peter van Endert<sup>3,4,5</sup>, Aleksander Edelman<sup>3,5</sup> and Ida Chiara Guerrero<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup> The CPN Proteomics Facility – 3P5, Center of Psychiatry and Neuroscience, UMR INSERM 894, Paris, France

<sup>2</sup> Proteomic Platform Necker, PPN-3P5, Structure Fédérative de Recherche SFR Necker US24, Paris, France

<sup>3</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1151, Paris, France

<sup>4</sup> Centre National de la Recherche Scientifique, Unité 8253, Paris, France

<sup>5</sup> Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

Efficient protein solubilization using detergents is required for in-depth proteome analysis, but successful LC-MS/MS analysis greatly depends on proper detergents removal. A commonly used sample processing method is the filter-aided sample preparation (FASP), which allows protein digestion and detergent removal on the same filtration device. Many optimizations of the FASP protocol have been published, but there is no information on the influence of the filtration unit typology on the detergents removal. The aim of this study was to compare the performance of conic and flat bottom filtration units in terms of number of proteins identified by LC-MS/MS. We have analyzed 1, 10 and 100 µg of total cell lysate prepared using lysis buffer with different SDS concentrations. We compared the FASP protocol using conic and flat bottom filtration units to ethanol precipitation method. Subsequently, we applied our most performant protocol to single murine pancreatic islet, and identified up to 2463 protein using FASP versus 1169 proteins using ethanol precipitation. We conclude that FASP performance depends strongly on the filter shape: flat bottom devices are better suited for low-protein samples, as they allow better SDS removal leading to the identification of greater number of proteins.

Received: February 17, 2016

Revised: May 2, 2016

Accepted: May 20, 2016

**Keywords:**

FASP / Sample preparation / SDS removal / Sensitivity / Single pancreatic islet / Technology



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Sensitive high-throughput proteomic analysis of complex protein mixtures is based on appropriate protein sample preparation and analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The major current

challenge is to obtain in-depth proteome coverage, especially from samples containing low protein amounts that cannot be thoroughly fractionated prior LC-MS/MS [1]. In order to optimize the proteome coverage of these samples, protein solubilization and extraction from all cell compartments must be as thorough as possible [2]. To achieve this goal, various detergents and surfactants are employed in protein sample preparation, the most common being SDS. SDS is a very potent detergent allowing solubilization of a wide range of protein types including hydrophobic membrane proteins. However, SDS, like other detergents, interferes with subsequent

**Correspondence:** Dr. Ida Chiara Guerrero, Plateforme Protéomique PPN, SFR Necker US24, Bâtiment Leriche, Porte 9, 14 Rue Maria Helena Vieira Da Silva 75014 Paris

**E-mail:** chiara.guerrera@inserm.fr

**Fax:** +331 72 60 63 33

**Abbreviations:** FASP, filter-aided sample preparation; LC-MS/MS, liquid chromatography-mass spectrometry; MWCO, molecular weight cut-off; RIPA, radioimmunoprecipitation buffer

**Colour Online:** See the article online to view Fig. 1 in colour.

LC-MS/MS analysis, leading to decrease of reverse-phase LC resolution and MS ion signal suppression.

Successful proteomic analysis, thus, requires an SDS removal step in the sample preparation, achievable by protein precipitation with organic solvents, by chromatography, by SDS-PAGE electrophoresis or by filter-aided sample preparation (FASP).

FASP is a method originally developed by Manza [3] and modified by Wisniewski [4]. FASP allows on-filter removal of SDS, salt, nucleic acids and lipids prior to on-filter digestion of solubilized proteins. FASP has been successfully applied to analyze bacteria, mammalian cells, yeast and paraffin-embedded tissue samples [4–7], as well as subcellular fractions containing membrane proteins [8], brain phosphoproteins and N-glycoproteins [9, 10].

Various modifications of FASP have been published, notably aiming to improve sensitivity, often at the cost of simplicity and rapidity of the protocol. However, nothing has been reported on the influence of the filter shape on sensitivity and peptide recovery after detergent removal. FASP is performed on molecular weight cut-off (30 kDa MWCO) centrifugal filters, which are commercialized in conic or flat membrane shape. The original FASP protocol was established using the flat bottom Microcon devices; however, subsequently several studies also employed the Amicon filter units with conic bottom [11–13]. We believe that the filter shape affects peptide recovery after digestion.

The main purpose of this work was to evaluate suitability of the two types of filtration units on 1, 10 and 100 µg of total cell lysate. To verify if the optimized protocol that we obtained is efficient for low-abundance-protein samples, we have chosen to apply it for the analysis of a single murine pancreatic islet. This structure contains an average of 1000 cells, and is composed of least four to five different cell types, including different hormone-producing cells, endothelial and neural cells [14]. The analysis of this kind of small structure is medically important but remains very difficult. Until now, only one study describes a quantitative proteomic analysis of single pancreatic islets with 2013 proteins identified [15].

For this study, the human cystic fibrosis bronchial epithelial cells (CFBE41o<sup>-</sup>) were grown as described [16]. The lysis of cells was carried out either with either SDS buffer (2% SDS in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 for 10 min at 95°C) or with radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate and 0.1% SDS) for 15 min at 4°C. Protein concentration was determined by DC Protein Assay (Bio Rad, France). Pancreatic islets were prepared by hand-picking exactly as described in [17] and cryopreserved as dry pellets at -80°C.

SDS and RIPA protein extracts were precipitated with 100% ethanol (EtOH) in presence of 100 mM sodium acetate. Protein pellets were then resuspended in 50 mM ammonium bicarbonate (ABC buffer), reduced for 1 h at 60°C with 8 mM DTT, alkylated for 30 min at room temperature in the dark using 150 mM iodoacetamide (IAM) and digested with Trypsin

(Promega, France) overnight at 37°C (enzyme-to-protein ratio 1:50) [18].

FASP procedure was performed as described previously [4]. Briefly, the aliquots of protein extracts containing 1, 10 and 100 µg (in a maximal volume of 25 µL) were first reduced with 0.1 M DTT for 30 min at 60°C in final volume of 100 µL, then applied to 30 kDa MWCO centrifugal filter units (Amicon Ultra, Millipore, Cat No UFC503024; Microcon, Millipore Cat No MRCF0R030; Filtres centrifuges VWR Collection Cat No 516-0231), mixed with 200 µL of 8 M urea, 100 mM Tris-HCl pH 8.8 (UA buffer, prepared fresh with urea powder not more than 3 months old) and finally centrifuged for 15 min at 15 000 x g. In order to remove detergents and DTT, the filters were washed twice with 200 µL of UA buffer. Alkylation was carried out by incubation for 20 min in the dark with 50 mM iodoacetamide. Filters were then washed twice with 100 µL of UA buffer (15 000 x g for 15 min) followed by two washes with 100 µL of ABC buffer (15 000 x g for 10 min). All centrifugation steps were performed at room temperature. Finally, trypsin was added in 1:50 ratio and digestion was achieved by overnight incubation at 37°C.

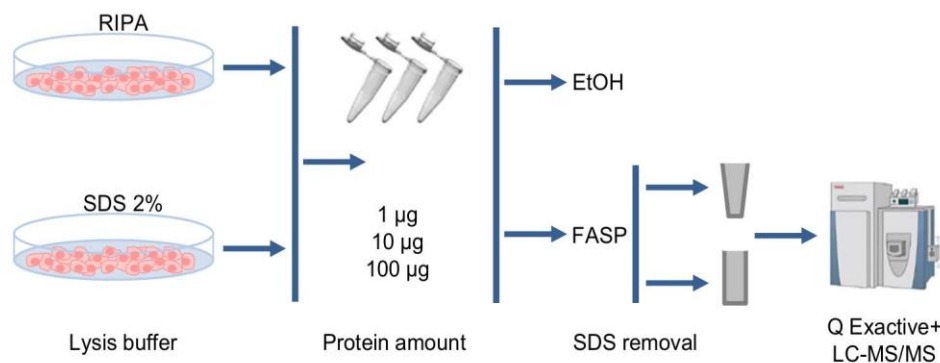
Two different procedures were applied for peptide elution: (i) peptides were collected by centrifugation followed by two washes with 40 µL of 50 mM ABC buffer and vacuum dried; (ii) peptides were collected by centrifugation (15 000 x g for 10 min), and the filters were washed with 50 mM ABC followed by 0.5 M NaCl to improve peptide recovery. Desalting was then carried out using C18 Zip Tips (Millipore) following manufacturer's instructions and the samples were vacuum dried.

Finally, peptide digests were resuspended in 10% ACN, 0.1% (v/v) TFA.

For CFBE analysis, three independent experiments were run in parallel for each condition tested. For single pancreatic analysis, the analysis were performed in biological triplicate.

For each LC-MS/MS run, estimated 0.5 µg were injected in a nanoRSLC-Q Exactive PLUS (Dionex RSLC Ultimate 3000, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Peptides were separated on a 50 cm reversed-phase liquid chromatographic column (Pepmap C18, Dionex). Peptides from CFBE cells were eluted from the column with 44 min gradient. Peptides from single pancreatic islet were eluted from the column with the 240 min gradient. Two blanks were run between samples to prevent carryover. Peptides eluting from the column were analyzed by data dependent MS/MS, using top ten acquisition method. Briefly, the instrument settings were as follows: resolution was set to 70 000 for MS scans and 17 500 for the MS/MS scans. The MS AGC target was set to 3.10<sup>6</sup> counts with 200 ms for the injection time, while MS/MS AGC target was set to 1.10<sup>5</sup> with 120 ms for the injection time. The MS scan range was from 400 to 2000 *m/z*. Dynamic exclusion was set to 30 s.

Peak lists were generated by Proteome Discoverer v1.4 (Thermo Scientific) and searched against the human subset (20 203 sequences) from the UniProtKB/Swiss-Prot complete proteome database (release 2015\_07; 549 008 sequences)



**Figure 1.** Filter-aided sample preparation workflow. After the lysis of the cells in either in RIPA or 2% SDS lysis buffer, samples containing 1, 10 or 100 µg of proteins are processed by ethanol precipitation or following FASP protocol. After enzymatic proteolysis, 0.5 µg of each sample was analysed by LC-MS/MS on Q Exactive Plus mass spectrometer.

using the MASCOT search engine (version 2.2.07; Matrix Science). Fixed modification [Carbamidomethyl (C)] and variable modification [Oxidation (M)] were allowed as well as one missed cleavage. Enzyme was trypsin, monoisotopic peptide mass tolerance was  $\pm 5$  ppm, fragment mass tolerance was  $\pm 0.02$  Da. Minimum ion score was 25. For pancreatic islets, samples were also analyzed using Maxquant software suite using the same search parameters. Volcano plots were obtained using Perseus comparing three biological replicates of the murine islet prepared by ethanol precipitation and by FASP (*t*-test,  $FDR < 0.01$ ,  $S0 = 2$ ). In order to allow a good separation of distributions of unique and common proteins and peptides, missing values were imputed using a distribution of valid values (width = 0.1 of SD, downshift = 6 for proteins and width = 0.3 of SD, downshift = 4 for peptides). Protein classes were defined according to GO annotation, Kegg name, keywords and Corum databases.

In order to compare the efficacy of conic and flat filtration devices, we performed the FASP protocol on 1, 10 and 100 µg of CFBE cells solubilized with 2% SDS lysis buffer (Fig. 1). Ethanol precipitation (EtOH) protocol was used as a reference for efficient detergent removal. We also performed the same experiments using a low SDS solubilization buffer, RIPA buffer, to understand the impact of SDS concentration on removal efficacy. Equal amounts were then injected and analyzed by LC-MS/MS. The performances of SDS removal methods used in this study were evaluated on the basis of the number of identified proteins.

The results are resumed in Fig. 2A, upper panel. For all the protein amounts tested, we observed that FASP method consistently led to a higher number of protein identified compared to ethanol precipitation. Also, no significant differences were observed between samples solubilized with RIPA and SDS lysis buffer at 10 and 100 µg, suggesting that both buffers are equally compatible with FASP. However, we observed that processing samples with conic bottom filters led to a random drop in number of identified proteins (from  $1318 \pm 139$  to  $603 \pm 262$  proteins). The ion extracted chromatograms (XIC) of an abundant peptide of actin shows clearly that chromatographic separation was compromised in the sample obtained from the conic filter, suggesting that the SDS was not always completely removed from the sample (Fig. 2A, bottom panel c). This was confirmed by the fact that RIPA and ethanol samples

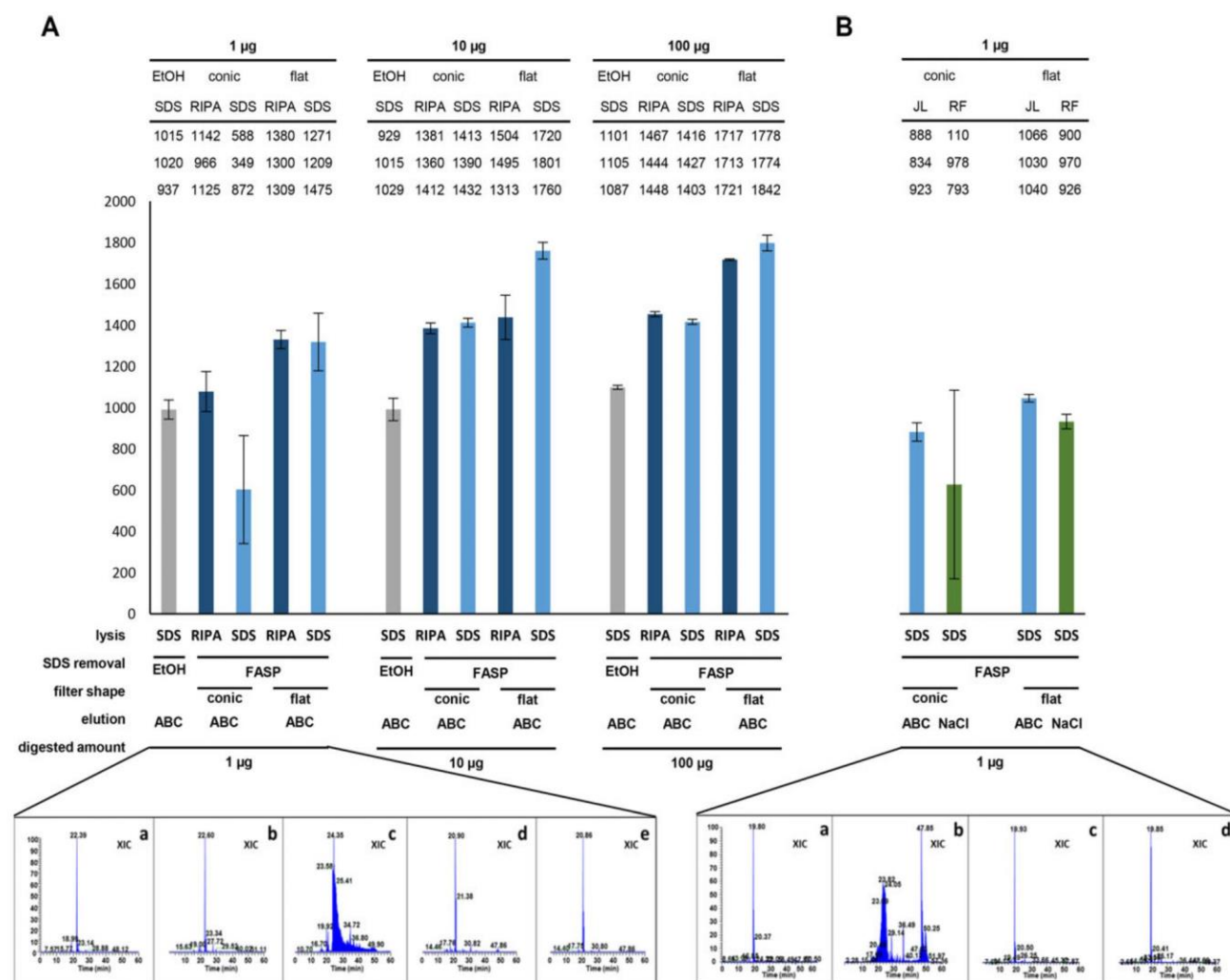
did not present the same separation problem (Fig. 2A, bottom panels a and b). This suggests that flat bottom filtration units are much more efficient at removing SDS from low-protein samples (1 µg).

We further evaluated the performance of flat and conic filters on another published FASP protocol reported to improve peptides recovery after trypsin digestion [19]. We processed 1 µg samples with both conic and flat filter units following the protocol used in this study (JL) and the another FASP protocol (RF) (Fig. 2B). First, we show that the protocol JL slightly outperforms the protocol RF ( $1045 \pm 45$  versus  $932 \pm 35$  proteins identified). Second, we confirm that FASP performed using flat filters is more sensitive and reproducible than FASP on conic filters in RF protocol as well as in ours. Third, the problem of incomplete SDS removal persists with the protocol RF using conic filters (Fig. 2B, bottom panel b).

The complete list of proteins identified from CFBE cells including their GO annotations, KEGG name, Keywords and Corum terms is reported in Supporting Information Table S1.

Based on the above observations, we have applied the FASP protocol using flat bottom filters to the single pancreatic islet analysis. Handpicked islets from three different mice were solubilized with RIPA buffer, processed in parallel with ethanol precipitation or flat bottom FASP and analyzed by 4 h-long LC-MS/MS run. As shown on Fig. 3 (top panel), FASP approach largely overrides the ethanol precipitation method, providing an average of twice as much of identifications, namely 1791, 1360 and 2463 versus 723, 699 and 1169 IDs (the detailed list of identified proteins is reported in Supporting Information Table S2). About 23% of the proteins identified are involved in cellular pathways specific of the pancreas (Fig. 3 B). The variability of the number of proteins identified in the islets from three mice is probably due to the different size of the islets.

We further investigated the nature of the peptides and proteins obtained with the two methods to understand the higher number of identifications by FASP protocol. First, we compared the physicochemical properties of peptides retrieved by FASP and ethanol precipitation. We obtained twice as many identified peptides by FASP (12779 versus 5778 peptides). FASP protocol seems to allow better recovery of small peptides compared to ethanol precipitation/in



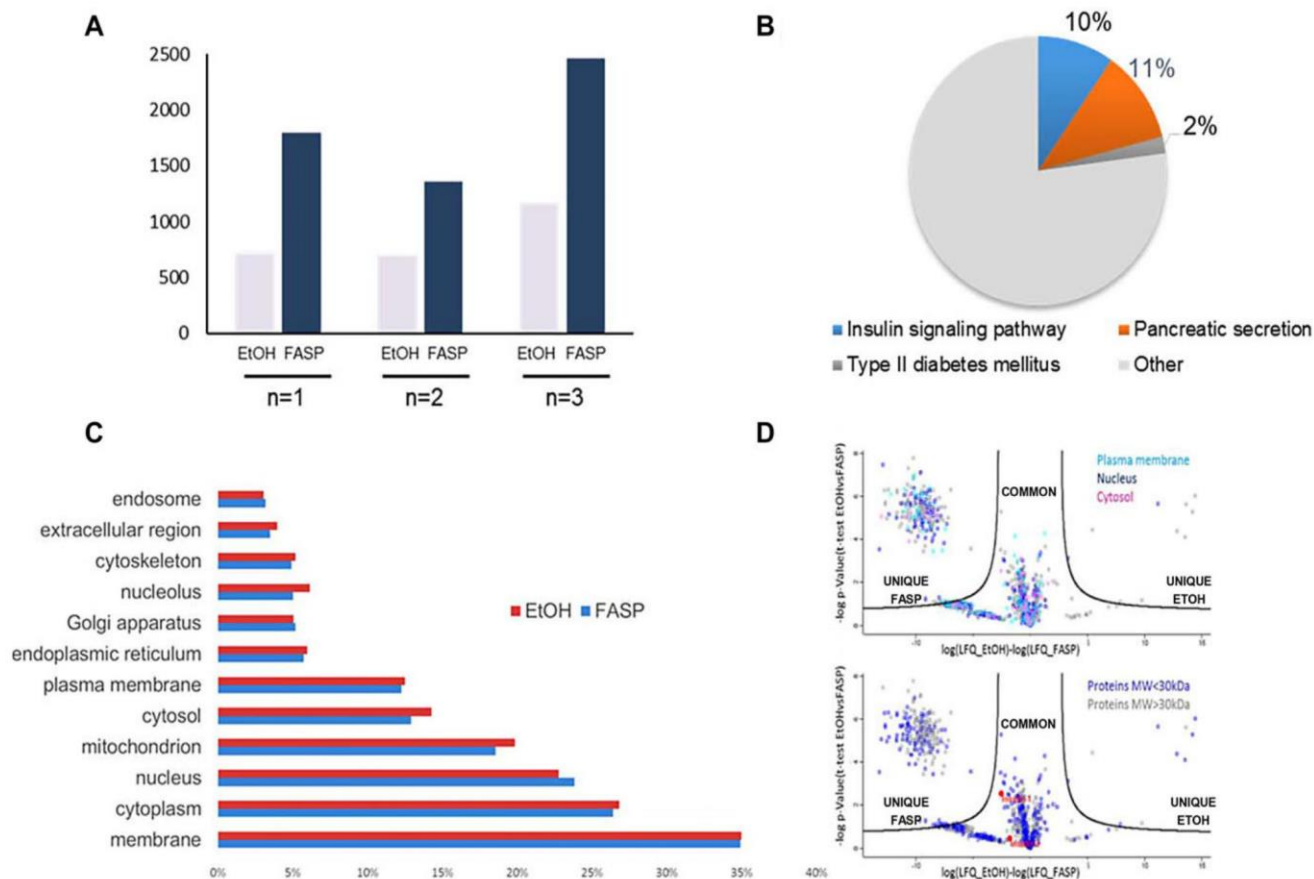
**Figure 2.** Impact of protein preparation method on number of proteins identified. (A) Upper panel: number of proteins identified in the samples proceeded either with ethanol precipitation or FASP methods. SDS- and RIPA-lysed samples of 100 µg (right), 10 µg (middle) and 1 µg (left) are presented. Conic Amicon and flat Microcon centrifugal filters were used for FASP protocol. Bars represent the mean number of identified proteins from three experimental replicates ( $n = 3$ ), with the corresponding standard deviation. (A) Bottom panel: extracted ion chromatogram of an actin peptide (QEYDESGPSIVHR) on 1 µg of protein for the following conditions: (a) SDS/EtOH, (b) RIPA/FASP conic, (c) SDS/FASP conic, (d) RIPA/FASP flat and (e) SDS/FASP flat. (B) Upper panel: number of proteins identified in SDS-lysed 1 µg samples. Conic Amicon and flat Microcon filters were used and two peptides elution protocols were employed: elution with ammonium bicarbonate (ABC, JL) or ABC followed by NaCl (NaCl, RF). Bars represent the mean number of identified proteins from three experimental replicates ( $n = 3$ ), with the corresponding standard deviation. (B) Bottom panel: extracted ion chromatogram of an actin peptide (QEYDESGPSIVHR) on 1 µg of protein for the following conditions: (a) ABC elution, conic (b) NaCl elution conic, (c) ABC elution, flat and (d) NaCl elution, flat.

solution digestion (Supporting Information Fig. 1). Second, we compared the classes of the proteins identified by FASP versus ethanol precipitation protocol. Similar distributions of cellular components suggest that the increase in protein number using FASP is not related to enrichment of particular classes of proteins (Fig. 3C). Plasma membrane, nuclear and cytosolic proteins are highlighted on a volcano plot in proteins identified in both preparations as in proteins identified uniquely by FASP (Fig. 3D). Furthermore, we observed that low-molecular-weight proteins were well retained by the filtration unit used, which has a nominal cut-off of 30 kDa (Fig. 3, lower panel). As an example, we highlighted insulin 1 and 2 (MW of 5.8 kDa in their mature form) as they were

identified in both, sample prepared by ethanol precipitation and by FASP (Fig. 3D).

In order to perform a quantitative evaluation of FASP, we plotted the label free quantification (LFQ) intensities of the proteins obtained in different experimental (CFBE cells) and biological replicates (pancreatic islets). We observed an excellent correlation ( $0.980 < R^2 < 0.984$ ) for CFBE analysis and a very good correlation for pancreatic islets analysis ( $0.873 < R^2 < 0.949$ ). These results are shown in Supporting Information Fig. 2.

The results reported in this study demonstrate that FASP protocol generally allow to identify a higher number of proteins than ethanol precipitation, perhaps because



**Figure 3.** Single pancreatic islet proteomic analysis. Top: number of proteins identified in the samples solubilized in RIPA buffer and processed with ethanol precipitation and FASP protocol. Three independent preparations from three mice are presented ( $n = 3$ ). (B) Pie chart of the functional classification of the proteins obtained with the FASP method using pertinent Kegg pathway term database. The percentage represent the enrichment of the indicated term versus the total number of terms associated to the analysis. (C) Histogram distribution of GO cellular component slim terms normalized to the number of total proteins identified with FASP and ethanol protocols. (D) Top: volcano plot of the proteins identified, with reported GO cell component annotation highlighted. (D) Bottom: volcano plot of the proteins identified, proteins with theoretical MW > 30 kDa are presented in blue, and Insulin 1 and 2 marked in red.

of the higher recovery of smaller peptides by FASP. Furthermore, our results confirm previous observations [4], that low-molecular-weight proteins, like insulin 1 and 2, are not lost in the early washing steps of the FASP protocol.

Our results show that flat bottom devices are best suited to process protein amounts ranging from 1 to 100  $\mu\text{g}$  and that RIPA buffer is as efficient as SDS buffer in protein identification yield using FASP. Conic-shaped filter units do not efficiently remove SDS from the sample, leading to loss of sensitivity in the analysis of low abundance samples. We believe that detergent removal using conic-shaped filtration units is less efficient at all protein concentrations tested, but the residual SDS impacts more strongly the analysis of low-protein samples as these samples are much less diluted before injection for LC-MS/MS analysis, resulting with a higher SDS residual concentration. The same problem persists with two different FASP protocols tested, leading to variable and unpredictable amount of residual SDS

Finally, this study reports a sensitive and direct proteomic analysis of a single pancreatic islet that gives access to proteins involved in diabetes and pancreatic secretion. Such thorough analysis from very low amounts of material opens the possibility to perform the analysis of small biopsies, other types of single structures and rare cells populations.

We would like to thank Dr. Patrick Mayeux, Marjorie Leduc, Dr. Francois Guillonnet for useful discussion and all the personnel of the Proteomic Platform of the University Paris Descartes (3P5-Cochin).

The authors have declared no conflict of interest.

## References

- [1] Zubarev, R. A., The challenge of the proteome dynamic range and its implications for in-depth proteomics. *Proteomics* 2013, 13(5), pp. 723–726.
- [2] Saravanan, R. S., Rose, J. K., A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of

- recalcitrant plant tissues. *Proteomics* 2004, 4(9), pp. 2522–2532.
- [3] Manza, L. L., Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters. *Proteomics* 2005, 5(7), pp. 1742–1745.
- [4] Wisniewski, J. R., Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* 2009, 6(5), pp. 359–362.
- [5] Erde, J., Loo, R. R., Loo, J. A., Enhanced FASP (eFASP) to increase proteome coverage and sample recovery for quantitative proteomic experiments. *J. Proteome Res.* 2014, 13(4), pp. 1885–1895.
- [6] Maurer, M., Comprehensive comparative and semiquantitative proteome of a very low number of native and matched epstein-barr-virus-transformed B lymphocytes infiltrating human melanoma. *J. Proteome Res.* 2014, 13(6), pp. 2830–2845.
- [7] Tanca, A., Comparison of detergent-based sample preparation workflows for LTQ-Orbitrap analysis of the *Escherichia coli* proteome. *Proteomics* 2013, 13(17), pp. 2597–2607.
- [8] Wisniewski, J. R., Zougman, A., Mann, M., Combination of FASP and StageTip-based fractionation allows in-depth analysis of the hippocampal membrane proteome. *J. Proteome Res.* 2009, 8(12), pp. 5674–5678.
- [9] Ostasiewicz, P., Proteome, phosphoproteome, and N-glycoproteome are quantitatively preserved in formalin-fixed paraffin-embedded tissue and analyzable by high-resolution mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 2010, 9(7), pp. 3688–3700.
- [10] Zielinska, D. F., Precision mapping of an in vivo N-glycoproteome reveals rigid topological and sequence constraints. *Cell* 2010, 141(5), pp. 897–907.
- [11] Nel, A. J., Comparative reevaluation of FASP and enhanced FASP methods by LC-MS/MS. *J. Proteome Res.* 2015, 14(3), pp. 1637–1642.
- [12] Craven, R. A., Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded renal tissue samples by label-free MS: assessment of overall technical variability and the impact of block age. *Proteomics Clin. Appl.* 2013, 7(3–4), p. 273–282.
- [13] Scifo, E., Proteomic analysis of the palmitoyl protein thioesterase 1 interactome in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J. Proteomics* 2015, 123, pp. 42–53.
- [14] Sundsten, T., Ortsater, H., Proteomics in diabetes research. *Mol. Cell Endocrinol.* 2009, 297(1–2), pp. 93–103.
- [15] Waanders, L. F., Quantitative proteomic analysis of single pancreatic islets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2009, 106(45), pp. 18902–18907.
- [16] Illek, B., Cl transport in complemented CF bronchial epithelial cells correlates with CFTR mRNA expression levels. *Cell. Physiol. Biochem.* 2008, 22(1–4), pp. 57–68.
- [17] Deprez-Poulain, R., Catalytic site inhibition of insulin-degrading enzyme by a small molecule induces glucose intolerance in mice. *Nat. Commun.* 2015, 6, 8250.
- [18] Bourderioux, M., A new workflow for proteomic analysis of urinary exosomes and assessment in cystinuria patients. *J. Proteome Res.* 2015, 14(1), pp. 567–777.
- [19] Raimondo, F., Comparative membrane proteomics: a technical advancement in the search of renal cell carcinoma biomarkers. *Mol. Biosyst.* 2015, 11(6), pp. 1708–1716.



## 1.4.2 CMIP EST UN REGULATEUR NEGATIF DES LYMPHOCYTES T

### **Introduction**

Les études menés dans notre laboratoire ont permis d'identifier un gène anormalement exprimé dans les cellules de patients atteints par le syndrome néphrotique idiopathique (SNI) : le gène *CMIP*. Ce gène, qui est faiblement ou pas exprimé dans les tissus des individus sains, s'exprime à l'inverse fortement au cours des poussées et est réprimé en rémission, à la fois dans les LT ainsi que dans les podocytes, cibles du SNI. Dans une étude réalisée sur des patients pédiatriques, les résultats ont montré que les rechutes étaient associées à un déficit fonctionnel de la sous-population des T-reg (Boumediene *et al.*, 2018). De plus, ces rechutes sont accompagnées d'une induction importante du transcrit de *CMIP* dans les PBMC de ces patients.

### **Objectifs de l'étude**

Notre laboratoire a créé un modèle de souris qui surexprime *CMIP*, sous le contrôle du promoteur *Lck*, lorsque le LT est activé, afin de mieux comprendre les conséquences fonctionnelles de la surexpression de *CMIP* dans ces cellules. Les lymphocytes T ont été purifiés à partir de la rate par immunosélection négative, synchronisés et activés avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28, qui miment les premiers signaux de l'activation lymphocytaire.

Notre objectif était d'évaluer l'impact de *CMIP* sur le protéome du LT par spectrométrie de masse. Pour cela, nous avons appliqué la méthode FASP (fond plat) mis en place au cours de la thèse et qui permet de complètement solubiliser les protéines tout en gardant une bonne reproductibilité dans la digestion afin de quantifier de façon précise les changements du protéome sous l'effet de l'expression de *CMIP*.

### **Résultats obtenus**

L'effet de *CMIP* est multiple et agit à plusieurs niveaux : lors de l'activation et de la prolifération du LT, en passant par le métabolisme lipidique, mais également au niveau du cytosquelette du LT.

Les quantifications par qRT-PCR ont révélé que l'induction du transcrit de *CMIP* était associée à une diminution de la production des cytokines IL-2, IL-4 et IFN- $\gamma$  chez les souris transgéniques. De plus, ce profil cytokinique est associé à une diminution des formes actives des Src kinases (p-Y418), protéines qui permettent la transduction du signal lors de l'activation du LT. Ces résultats suggèrent ainsi un défaut d'activation des LT. L'activation du LT et la formation de la synapse immunologique s'accompagne d'une relocalisation de multiples protéines membranaires dans les microdomaines de type raft. Chez les souris transgéniques, le co-marquage par immunofluorescence de la toxine cholérique, permettant le marquage du ganglioside GM1, marqueur des rafts, et des Src kinases

montrent que la relocalisation et la phosphorylation activatrice des Src kinases ne s'opère pas lors de l'activation du LT. L'étude dynamique par vidéomicroscopie a confirmé que CMIP empêche le regroupement des rafts et de leurs protéines et marqueurs lipidiques au niveau de la synapse immunologique.

Afin de savoir si CMIP a également un effet sur le lipidome, pas seulement ceux présents au niveau des rafts mais de façon globale, une étude de lipidomique non ciblée a démontré que le métabolisme des sphingolipides est significativement altéré avec une expression diminuée des gangliosides de GM2 et GM3 dans les cellules qui surexpriment CMIP.

Enfin, la comparaison des protéines des lymphocytes T, en condition non activée (T0 min) et en condition activée (T15 min), a permis de mettre en évidence les voies perturbées en présence de CMIP. Ce sont des protéines impliquées dans le remodelage lipidique ou le métabolisme des nucléotides entre autres. Au total, 2660 protéines ont été identifiées dans les deux conditions en triplicats biologiques et en triplicats techniques et ont été quantifiées par label-free. Dans la condition activée, 13 protéines ne sont pas présentes chez les contrôles mais sont augmentées ou inchangées chez les souris transgéniques, notamment des protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine, comme la cofilin-1, qui a été validée par Western Blot.

### **Conclusions**

CMIP apparaît comme un régulateur négatif de l'activation du LT et pourrait être impliqué dans la désorganisation du cytosquelette via la dérégulation de l'activité de la cofiline-1.



## ARTICLE

## CMIP is a negative regulator of T cell signaling

Julie Oniszczuk<sup>1,2</sup>, Kelhia Sendeyo<sup>1,2</sup>, Cerina Chhuon<sup>3</sup>, Berkan Savas<sup>1,2</sup>, Etienne Cogné<sup>1,2</sup>, Pauline Vachin<sup>1,2</sup>, Carole Henique<sup>1,2</sup>, Ida Chiara Guerrero<sup>3</sup>, Giuseppe Astarita<sup>4</sup>, Vincent Frontera<sup>1,2</sup>, Andre Pawlak<sup>1,2</sup>, Vincent Audard<sup>1,2,5,6</sup>, Dil Sahali<sup>1,2,5,6</sup> and Mario Ollero<sup>1,2</sup>

Upon their interaction with cognate antigen, T cells integrate different extracellular and intracellular signals involving basal and induced protein–protein interactions, as well as the binding of proteins to lipids, which can lead to either cell activation or inhibition. Here, we show that the selective T cell expression of CMIP, a new adapter protein, by targeted transgenesis drives T cells toward a naïve phenotype. We found that CMIP inhibits activation of the Src kinases Fyn and Lck after CD3/CD28 costimulation and the subsequent localization of Fyn and Lck to LRs. Video microscopy analysis showed 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. Moreover, transgenic T cells exhibited the downregulation of GM3 synthase, a key enzyme involved in the biosynthesis of gangliosides. These results suggest that CMIP negatively impacts proximal signaling and cytoskeletal rearrangement and defines a new mechanism for the negative regulation of T cells that could be a therapeutic target.

**Keywords:** CMIP; Transgenic mice; T cells

*Cellular & Molecular Immunology* \_\_\_\_\_; <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0266-5>

## INTRODUCTION

T cells play a central role in adaptive immunity through their close interplay with humoral and cellular sensors of innate immunity.<sup>1</sup> T cell activation is initiated by ligation of the TCR by an appropriate peptide bound to a major histocompatibility complex (MHC) molecule, which triggers rapid Src kinase-mediated phosphorylation of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a conserved domain of signal-transducing chains in the TCR complex.<sup>2</sup> Phosphorylated ITAMs serve as binding sites for ZAP-70 kinase, which is activated by its phosphorylation by the Src kinase Lck, stabilizing the ITAM-ZAP 70 interaction. Active TCRs are clustered, and the Src kinases Lck and Fyn and ZAP-70 are recruited in lipid rafts (LR), which are plasma membrane microdomains enriched in cholesterol and glycosphingolipids that serve as signaling platforms, in T cells.<sup>3</sup> Activation of ZAP-70 induces the phosphorylation of the transmembrane adapter molecule LAT (linker for activation of T cells) at multiple tyrosine residues and leukocyte phosphoprotein of 76 kDa (SLP-76), generating a signaling multicomplex within LRs through protein–protein or protein–lipid interactions. Activation of costimulatory molecules, such as CD28, promotes the recruitment of kinases and adapter proteins within LRs, which induces cytoskeletal reorganization that leads to the formation of immunological synapses. 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 the activation of transcription factors, such as NF- $\kappa$ B, NFAT, and AP-1.<sup>4</sup>

CMIP (C-Maf-inducing protein) was initially identified in T cells from patients with minimal change nephrotic syndrome (MCNS), a renal disease of unknown immune origin.<sup>5</sup> 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); and a C-terminal region containing a leucine-rich repeat (LRR) domain.

CMIP has been found to be overexpressed in podocytes during INS relapse and in membranous nephropathy, another immune-mediated glomerular disease.<sup>6,7</sup> Recent studies showed that CMIP is also induced in some T cell subsets in patients with active systemic lupus erythematosus<sup>8</sup> and INS-like disease associated with cancers.<sup>9,10</sup> Increased CMIP abundance in these various pathological conditions may reflect different mechanisms of its induction that are possibly cell-specific. In fact, CMIP moves from the cytoplasm to the plasma membrane through its PH domain or to the nuclear compartment via its nuclear localization site, and this shuttling implies its interactions with different partners. For instance, several CMIP partners have been identified by the yeast two-hybrid system and confirmed by immunoprecipitation; these partners include the Src kinase Fyn, the P85 subunit of PI3 kinase,

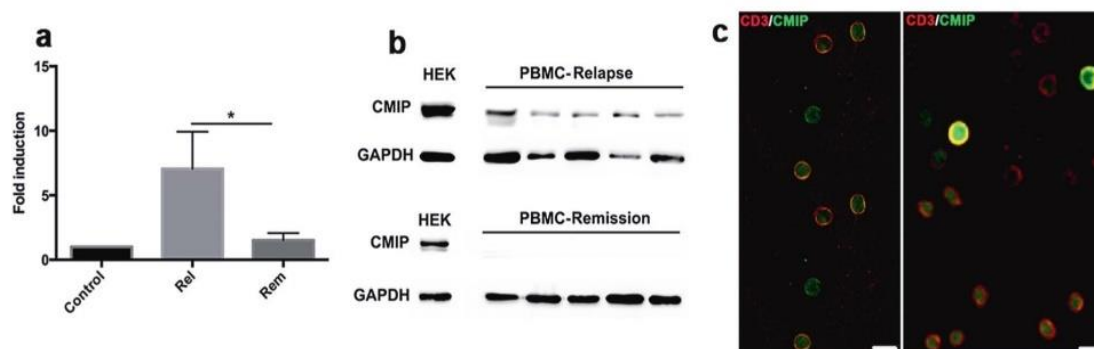
<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMR5 955, Equipe 21, F-94010 Créteil, France; <sup>2</sup>Faculté de Médecine, Université Paris Est, UMR5 955, Equipe 21, F-94010 Créteil, France; <sup>3</sup>Proteomic Platform Necker, PPN-3P5, Structure Fédérative de Recherche SFR Necker US24, 75015 Paris, France; <sup>4</sup>Department of Biochemistry, Molecular and Cellular Biology, Georgetown University, Washington, DC, USA; <sup>5</sup>AP-HP, Groupe Henri-Mondor Albert-Chenevier, Service de Néphrologie, F-94010 Créteil, France and <sup>6</sup>Institut Francilien De Recherche En Néphrologie Et Transplantation, F-94010 Créteil, France

Correspondence: Dil Sahali (dil.sahali@inserm.fr)

These authors contributed equally: Julie Oniszczuk, Kelhia Sendeyo

Received: 1 December 2018 Accepted: 10 July 2019

Published online: 08 August 2019



**Fig. 1** Expression of CMIP in MCNS. **a** RT-qPCR to determine CMIP expression in healthy subjects ( $n = 10$ ) and MCNS patients ( $n = 10$ ) at relapse and in steroid-free remission. The data are quantified as the fold-change in induction relative to the control subject (mean with SEM,  $*p = 0.0156$ , Mann-Whitney test). **b** Western blot analysis of CMIP expression in the PBMCs of MCNS patients in relapse and remission. HEK cells transfected with recombinant human CMIP served as a positive control. **c** Confocal microscopy analysis of T cells isolated by negative immunoselection and double-labeled with CMIP (green) and CD3 (red) antibodies. Left panel: control: healthy subject; right panel: MCNS T cells from relapse

RelA (the p65 subunit of NF- $\kappa$ B), filamin A, and DIP-1 (death-associated protein kinase (DAPK)-interacting protein 1), among others.<sup>11–13</sup> By interacting with RelA, CMIP prevents RelA nuclear translocation and inhibits NF- $\kappa$ B activation.<sup>11,14</sup> In podocytes, CMIP promotes apoptosis by inducing caspase-3 activity, which upregulates the proapoptotic protein Bax and downregulates the antiapoptotic protein Bcl-2.<sup>15</sup> However, CMIP is scarcely detectable at both the transcript and protein levels in adult tissues under physiological conditions, which is due at least in part to its notable transcriptional repression by NF- $\kappa$ B and WT1, two master transcription factors.<sup>16,17</sup>

The increase in CMIP transcript levels in lymphocytes from patients with MCNS constitutes one of the hallmarks of MCNS relapse,<sup>6</sup> strongly suggesting the potential involvement of CMIP in disease pathogenesis and regulation of the immune response, but its precise role is currently unknown. Given that sequence analysis of CMIP coding regions shows a strong identity (99%) between CMIP in humans, mice and rats, we generated transgenic mice selectively overexpressing CMIP in mature lymphocytes. In the present study, we aimed to understand the role of CMIP in T cell signaling by thoroughly observing the impact of its overexpression on the T cell response.

## RESULTS

### Expression of CMIP in human T cells

We first analyzed the expression of CMIP at the mRNA and protein levels in patients with MCNS relapse and remission, as well as in control healthy subjects. Expression of the transcript was measured by real-time quantitative PCR (RT-qPCR), with each patient analyzed in relapse and steroid-free remission ( $n = 10$ ). The transcript levels in patients were quantified as fold-changes in induction relative to transcript levels in control subjects. We found MCNS relapse to be associated with a significant increase in CMIP abundance (Fig. 1a). Western blots of PBMC lysates showed a slight band recognized by polyclonal CMIP antibody at the expected size in patients with MCNS relapse (Fig. 1b), but this band was scarcely detected or absent in patients in remission. Immunofluorescence analysis indicated that CMIP was expressed selectively in a subset of T cells (Fig. 1c), but the unavailability of CMIP-specific monoclonal antibodies precluded accurate characterization of this subset by flow cytometry.

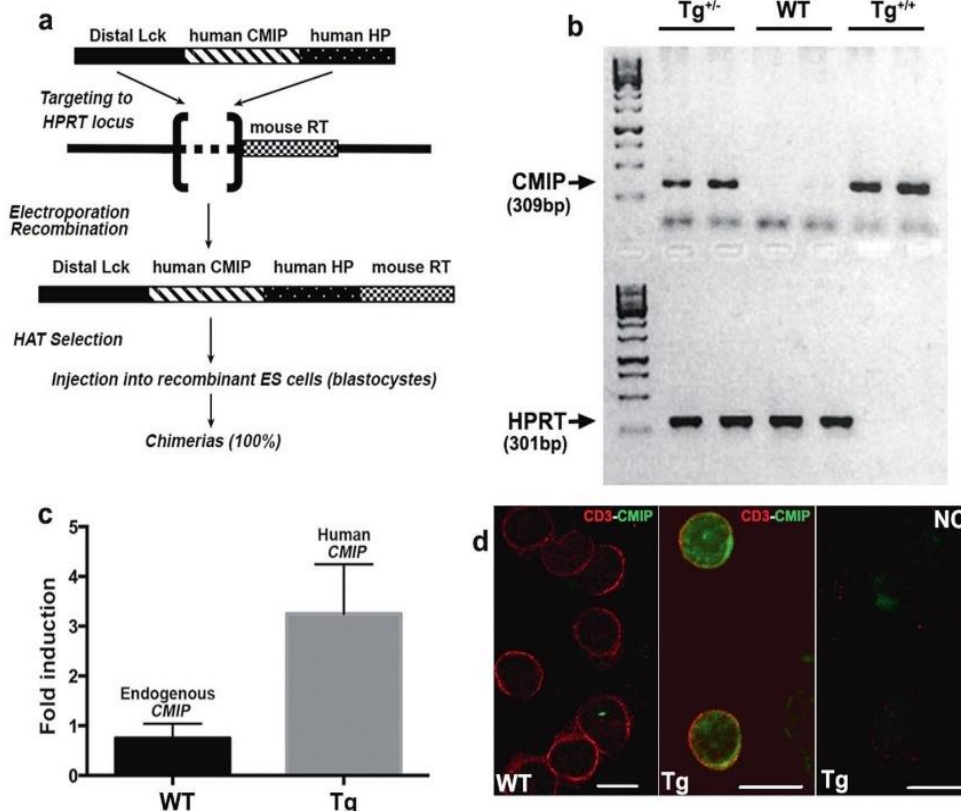
### Generation of CMIP transgenic mice

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. 2a). It has been established that the Lck distal promoter drives transgene expression in peripheral T cells.<sup>18</sup> We obtained six founders, which were crossed with wild-type (WT) 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, which was confirmed by tail genotyping, from the F10 to F18 generations (Fig. 2b). Transgene expression was demonstrated at the transcriptional level in splenic T cells (Fig. 2c). Although the endogenous CMIP transcript was detected in WT (control littermates) splenic T cells, immunofluorescence labeling using two different polyclonal antibodies detected a significant signal for the CMIP transcript in transgenic mice, but this signal was scarce in WT splenic T cells (Fig. 2d). Examination of the thymus, node and spleen during follow-up showed that the basal phenotype of transgenic mice was normal, and no lymphoproliferative syndrome was observed until one year of age.

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

To assess the influence of CMIP expression on T cell compartments, we determined the frequencies of the main peripheral T cell subsets by FACS analysis. Splenocytes from 12-week-old mice were purified and stained with antibodies against CD4, CD8, CD44, and CD62L. Although the number of CD3 T cells and the percentages of either CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells were comparable between WT and transgenic mice ( $n = 5$  mice in each group) (Fig. 3a, b), the frequencies of naïve CD4<sup>+</sup> T cells (CD4<sup>+</sup>CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>high</sup>) and naïve CD8<sup>+</sup> T cells (CD8<sup>+</sup>CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>high</sup>) were significantly increased in Tg mice, whereas the frequencies of memory and effector T cells (CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>high</sup> and CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>, respectively) were decreased in both Tg CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (Fig. 3c, d). We next analyzed T cell proliferative ability following CD3/CD28 stimulation. T cells were cultured *ex vivo* in quiescent conditions (6 h in the presence of 2% FCS) and then incubated in complete medium containing 10% FCS in the presence of anti-CD3/CD28 antibodies (1  $\mu$ g/ml each). After staining with CFSE at day 0, T cells were allowed to proliferate for 5 days and then analyzed by flow cytometry. As attested by CFSE dilution, the percentage of dividing cells was lower in transgenic T cells than in WT T cells, but the addition of IL-2 to the culture medium restored the proliferative capacity of transgenic T cells to control levels (Fig. 3e, S1).



**Fig. 2** Generation of CMIP transgenic mice. **a** Schematic diagram of targeted transgenesis into the HPRT locus (see details in the Materials and Methods section). All mice analyzed in this study were hemizygous males from the F10 to F18 generations. **b** PCR genotyping of mouse tail DNA. The HPRT PCR product was amplified from the WT allele in homozygous transgenic females (Tg<sup>+/+</sup>) or hemizygous transgenic males (Tg<sup>+</sup>) but not the reconstituted HPRT gene. **c** Quantification of mouse and human CMIP transcripts in transgenic mice and WT mice by RT-qPCR. **d** Confocal immunofluorescence microscopy of CMIP expression in T cells from WT and transgenic mice. The rightmost figure in the panel corresponds to the negative control, in which IgG isotype control antibody was used instead of primary antibody (Cmpip/CD4) in Tg T cells

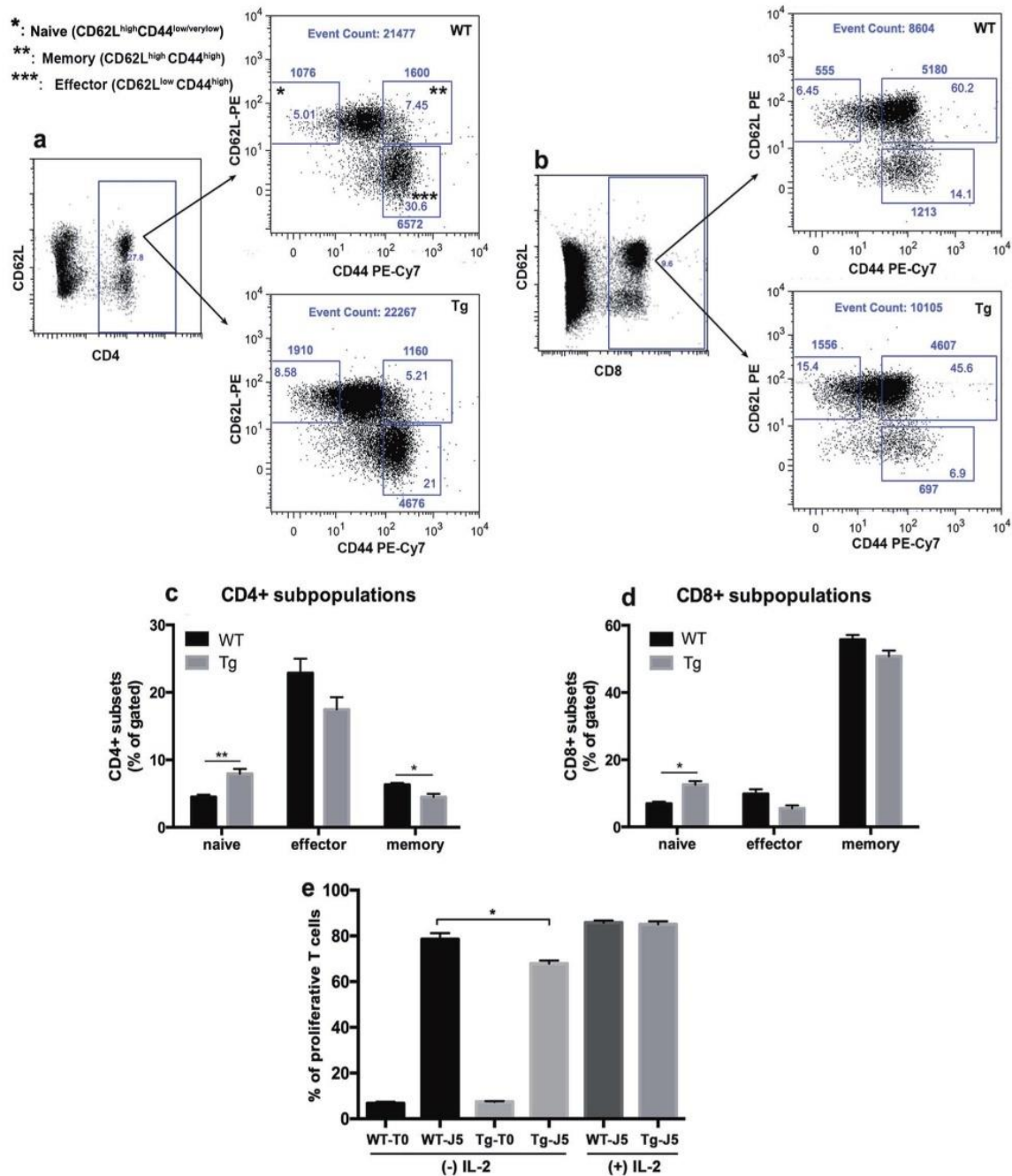
Transgenic T cells display an impaired response to CD3-CD28 stimulation

We sought to determine the effects of the *in vivo* overexpression of CMIP on T cell activation and polarization. We first studied 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 6 h at 37 °C and then activated with anti-CD3/CD28 antibodies (1 µg/ml each). The abundance of the endogenous CMIP transcript quantified by RT-qPCR rapidly fell upon CD3/CD28 stimulation, and the endogenous protein was scarcely detected by Western blotting (Fig. 4a, b). In contrast, CMIP transgene expression driven by the Lck distal promoter was significantly increased at the mRNA and protein levels at early stages and peaked 1 h after activation (Fig. 4a, b). In physiological conditions, T cell activation is associated with the strong induction of NF-κB activity. Previous reports have shown that NF-κB is a repressor of CMIP transcriptional activation,<sup>11,14</sup> which may account for the downregulation of endogenous Cmpip in WT mice.

We next analyzed whether expression of the CMIP transgene is associated with a particular pattern of cytokine production in T cells isolated by negative immunoselection. Because transgene abundance started to decline beginning 2 h after activation, we analyzed cytokine expression over the 16 h following CD3/CD28 activation by RT-qPCR, except for IL2 expression, as IL2 transcription started earlier after T cell stimulation. Compared with T cells from WT mice, T cells from transgenic mice exhibited significantly lower levels of IL-2, IL-4, and IFNγ, whereas the IL-10 level was increased (Fig. 4c). To assess whether cytokine production is affected by signals bypassing TCR stimulation, T cells were isolated

by negative immunoselection and challenged with phorbol myristate ester (PMA, 50 ng/ml) and ionomycin (0.5 µg/ml). While decreased IL-2 production was found in Tg T cells stimulated by CD3/CD28, no significant difference between WT and Tg T cells following PMA/ionomycin activation was observed (Fig. S2). In contrast, increased levels of IL-4 and IFNγ transcripts were detected in WT T cells after 4 h of PMA/ionomycin activation, although the differences between IL-4 and IFNγ levels were less pronounced than those between TCR signals. Notably, the increased abundance of IL-10 mRNA in Tg T cells after CD3/CD28 stimulation was not found with PMA/ionomycin activation, which suggests that proximal signals arising from Tg T cells are required for IL-10 synthesis. Altogether, these results suggest that increased Cmpip abundance is mainly associated with the inhibition of T cell activation and the differentiation of T cells into effector T cells.

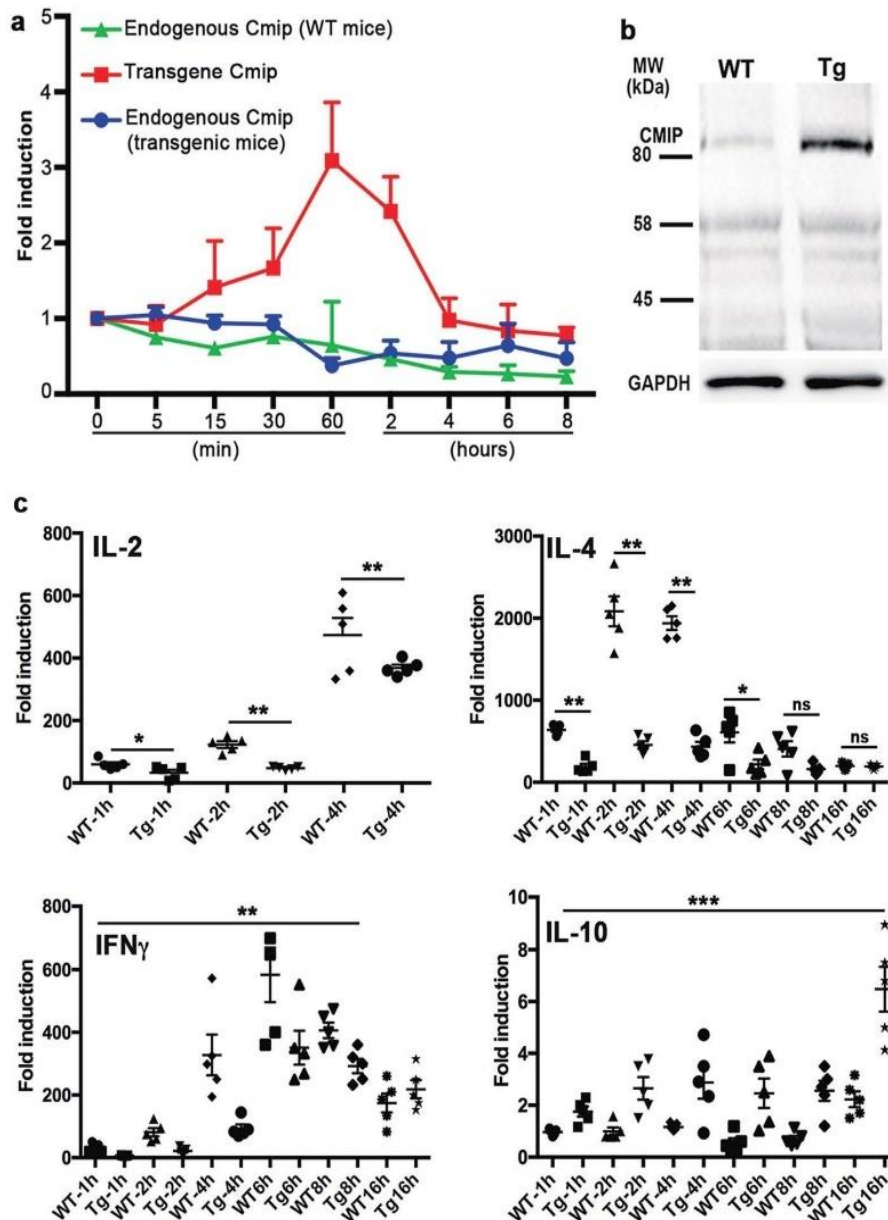
CMIP expression is associated with the inactivation of Src kinases. In physiological situations, T cell activation results in a series of phosphorylation cascades that ultimately result in cellular proliferation, differentiation and cytokine production. The decreased reactivity of transgenic T cells in response to CD3-CD28 stimulation compared to that of WT T cells led us to investigate whether transgenic T cells are defective in the phosphorylation of some components that play a key role in early signaling. T cells were synchronized (6 h in the presence of 2% FCS) and then stimulated with anti-CD3/CD28 antibodies. Total protein lysates were collected at 1 h after activation and analyzed by Western blotting using the anti-phosphotyrosine monoclonal antibody 4G10. Wild-type T cells exhibited



**Fig. 3** Transgenic mice develop an altered T cell phenotype. **a, b** Representative flow cytometry analysis of naïve, effector and memory T cells in transgenic and WT T cells. Splenocytes from 12-week-old transgenic mice (Tg) and WT mice were gated for CD4 + cells (**a**) or CD8 + cells (**b**) and analyzed for CD44 and CD62L expression. T cell subpopulations were defined as naïve (CD44<sup>low/verylow</sup>CD62L<sup>high</sup>), memory (CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>high</sup>), or effector T cells (CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup>). The numbers inside and outside each small square indicate the percentage and the absolute number of cells, respectively. The total number of events is shown at the top. **c** and **d** Frequencies of naïve, effector and memory T cells. The results are representative of three independent experiments ( $n = 5$  each for WT and transgenic mice). The frequency of naïve T cells in both CD4 + and CD8 + compartments was significantly increased, whereas the level of memory CD4 + T cells was decreased in transgenic mice compared to WT mice (Tg vs. 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 were decreased in Tg mice, this difference did not reach statistical significance. **e** Transgenic T cells exhibited a decreased proliferative capacity compared to WT T cells. T cells were isolated from Tg and WT mice and labeled with CFSE (1  $\mu$ M). After synchronization, the cells were stimulated with anti-CD3/CD28 antibodies (1  $\mu$ g/ml each). After 5 days, proliferation was analyzed by flow cytometry as the percentage of dividing cells. The addition of mouse recombinant IL2 (30 U/ml) at 24 and 72 h after stimulation restored the T cell proliferation rate, which was comparable between Tg and WT mice. Data are presented as the mean of four independent experiments. (Tg vs. WT at day 5, mean with SD:  $* p = 0.0286$ , Mann-Whitney test)

substantial phosphorylation within a region spanning 60-70 kDa that was barely detected in Tg T cells (Fig. 5a). This region includes members of the Src kinase family, which are involved in the early steps of T cell activation, among others.<sup>19</sup> The Src kinase family comprises nine members, of which Lck and Fyn are the most abundant in T cells, that play a crucial role in the

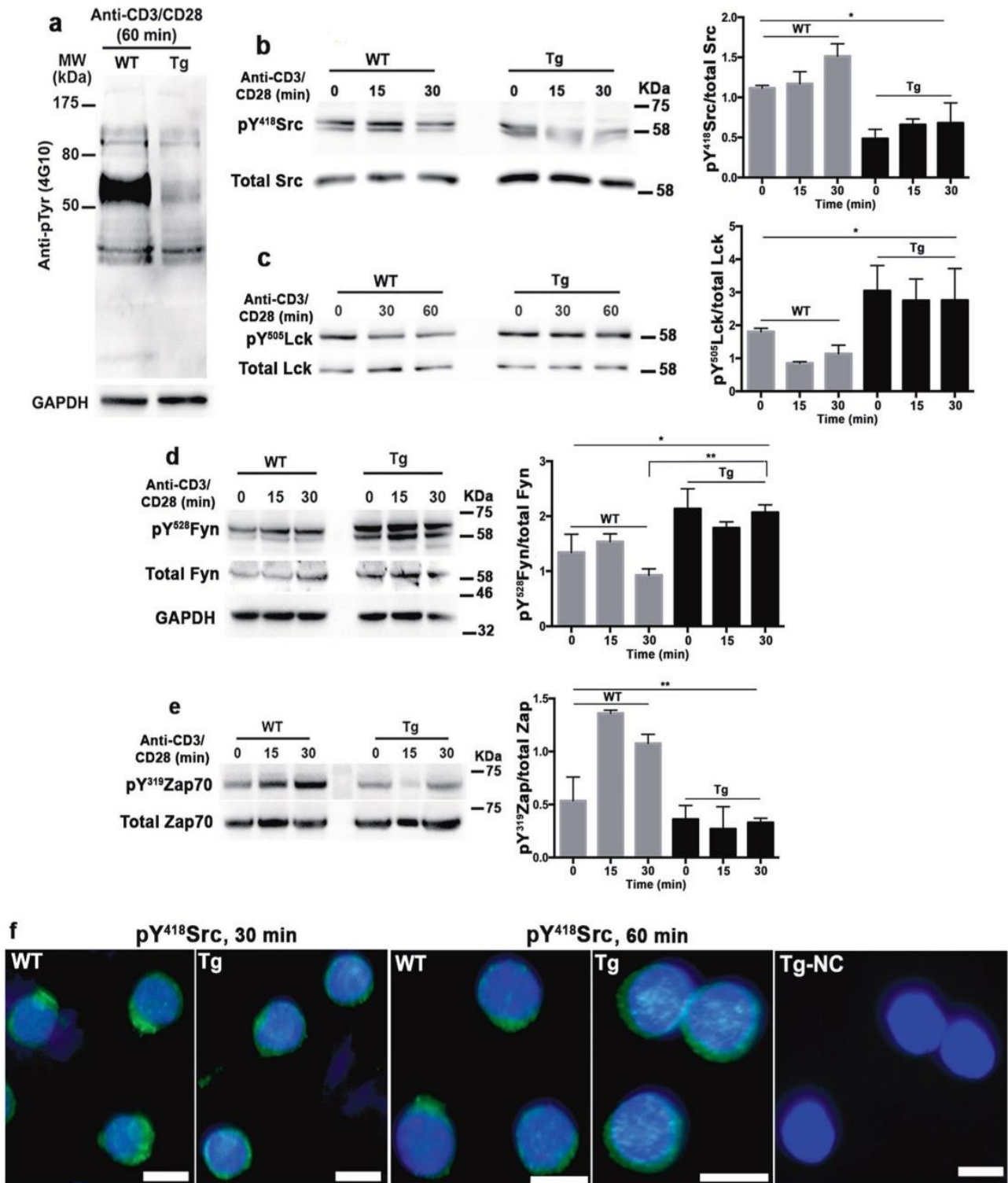
immune response.<sup>20</sup> Therefore, we tested the reactivity of protein lysates with an anti-Src antibody that recognizes the phosphotyrosine (pY) site at residue 418, which is specific to active Src kinases. A decrease in pY<sup>418</sup>Src in transgenic T cells culminating 15 min after activation, which coincided with the highest levels of pY<sup>418</sup>Src in WT T cells, was clearly observed



**Fig. 4** Influence of CMIP induction on cytokine expression. **a** Expression of the CMIP transcript. Total RNA was extracted from synchronized T cells before and after CD3/CD28 stimulation (1 µg/ml each) at the indicated times. The expression of endogenous Cmpip in WT (green) and Tg mice (blue) along with Tg Cmpip (red) is shown. **b** Expression of CMIP protein under the same conditions. **c** IL-2, IFN $\gamma$ , IL-4, and IL-10 transcripts were quantified by RT-qPCR. The results are representative of three independent experiments ( $n = 5$  mice in each group). [Tg vs. WT, mean with SEM; IL-2, 1 h:  $^{*}p = 0.0278$ , 2 h:  $^{**}p = 0.0040$ , 4 h:  $^{**}p = 0.0040$ ; IL-4, 1 h:  $^{**}p = 0.0040$ , 2 h:  $^{**}p = 0.0040$ , 4 h:  $^{**}p = 0.0040$ , 6 h:  $^{*}p = 0.0278$ , 8 and 16 h: nonsignificant (ns); IFN $\gamma$ , 1 h:  $^{*}p = 0.0257$ , 2 h:  $^{**}p = 0.0040$ , 4 h:  $^{**}p = 0.0079$ , 6 h:  $^{*}p = 0.0317$ , 8 h:  $^{*}p = 0.0317$  and 16 h:  $p = 0.532$  (ns); IL-10, 1 h:  $^{*}p = 0.0286$ , 2 h:  $^{*}p = 0.0159$ , 4 h:  $p = 0.1508$  (ns), 6 h:  $^{*}p = 0.0159$ , 8 h:  $^{**}p = 0.0079$ , 16 h:  $^{**}p = 0.0079$ ; Mann-Whitney tests]

(Fig. 5b). The early events of T cell activation involve the clustering of T cell receptors and costimulator molecules and recruitment of the Src kinases Fyn and Lck into LRs.<sup>3</sup> Lck phosphorylates ITAM motifs at intracellular CD3 domains and induces ZAP70 recruitment.<sup>21</sup> We evaluated the levels of pY<sup>505</sup>Lck and pY<sup>528</sup>Fyn, which are specific to the inactive forms of Lck and Fyn, respectively, after T cell stimulation. The abundance of pY<sup>505</sup>Lck and pY<sup>528</sup>Fyn was increased in transgenic T cells at baseline compare to that in WT T cells, which persisted after CD3/CD28 stimulation (Fig. 5c, d). We examined the phosphorylation levels of ZAP70 and observed a remarkable increase in the active form of ZAP70 (pY<sup>319</sup>Zap 70) in WT T cells upon their stimulation but not in transgenic T cells (Fig. 5e). Interestingly, immunofluorescence analysis showed that pY<sup>418</sup>Src was confined to a clustered compartment within

the thin layer of subplasma membrane at 30 and 60 min after activation in WT T cells; this formation was not detected in Tg T cells (Fig. 5f). Overall, these results suggest that CMIP inhibits the first steps of T cell activation. This possibility was further assessed in Cmpip-deficient T cells from a new mouse model of selective and doxycycline-inducible CMIP ablation in T cells (CD2-rtTA/TetOn-Cre/CMIP<sup>loxP/loxP</sup>). Naïve CD4 T cells were purified from KO and control littermates (without doxycycline treatment) and stimulated by anti-CD3/CD28 antibodies (1 µg/ml each) for 15 and 30 min (Fig. S3). The levels of the inactive forms of the Src kinases Fyn and Lck was lower in Cmpip-deficient T cells than in T cells from controls, whereas the abundance of active pY<sup>418</sup> Src kinases and pY<sup>319</sup>Zap70 was increased (Fig. S3,a-d). Genotyping and Western blotting confirmed that Cmpip was expressed in control littermates and deleted in KO mice (Fig. S3,e).



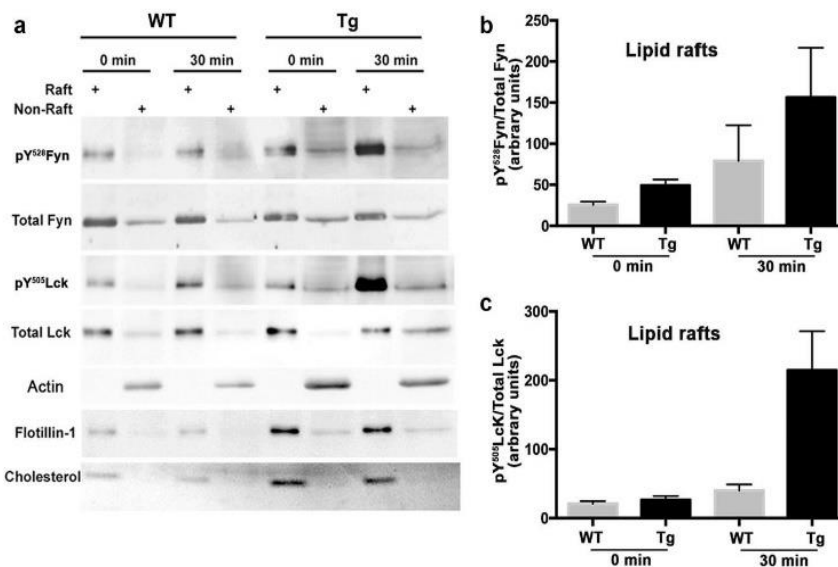
**Fig. 5** Transgenic T cells exhibit a hypophosphorylated protein profile with the downregulation of active Src. **a** Representative Western blot of protein lysates from transgenic and WT T cells after 60 min of activation by anti-CD3/CD28 antibodies incubated with anti-phosphotyrosine 4G10; blots were stripped and reprobed with anti-GAPDH antibody. **b–e** Western blots of protein lysates from transgenic and WT T cells several time points following anti-CD3/CD28 antibody activation (1 µg/ml each); blots were stripped and reprobed with an antibody raised against total specific protein. The results are representative of three independent experiments [pY<sup>418</sup>Src/total Src: one-way ANOVA, \**p* = 0.0163; pY<sup>505</sup>Lck/total Lck: Kruskal-Wallis test, \**p* = 0.0362; pY<sup>528</sup>Fyn/total GAPDH, one-way ANOVA, \**p* = 0.0204, Tg vs. WT (30 min), \*\**p* = 0.0015; pY<sup>319</sup>Zap70/total Zap70, one-way ANOVA, \*\**p* = 0.0068]. **f** Immunofluorescence staining for pY<sup>418</sup>Src in transgenic and WT T cells isolated by negative immunoselection

Transgenic T cells show the accumulation of inactive Fyn and Lck in LR

We investigated whether the clustering of LR is compromised as a result of impaired Src kinase activation in transgenic T cells. We purified LR at rest and 30 min following activation by anti-CD3/

CD28 antibodies (1 µg/ml each) with a detergent-free OptiPrep method. Then, we tested the distribution of flotillin-1 and cholesterol by Western blotting and thin layer chromatography (TLC) and found them to be enriched in LR fractions. The observed difference in flotillin-1 and cholesterol signals between WT and Tg





**Fig. 6** Transgenic T cells exhibit higher levels of inactive Fyn and Lck in LR and fail to be activated after CD3/CD28 costimulation. **a** Western blotting and TLC of raft (R) and nonraft (NR) fractions prepared at rest (0 min) and after the activation (30 min) of transgenic and WT mouse T cells. Rafts are enriched in Flotillin-1 and cholesterol. Samples were analyzed with anti-pY<sup>528</sup>Fyn and anti-pY<sup>505</sup>Lck antibodies, which recognize the inactive forms of Fyn and Lck, respectively, followed by antibodies recognizing total Fyn and Lck, respectively. Cholesterol was analyzed by TLC. **b, c** Inactive/total Fyn and inactive/total Lck in raft microdomains according to densitometric analysis of the bands shown in **a**

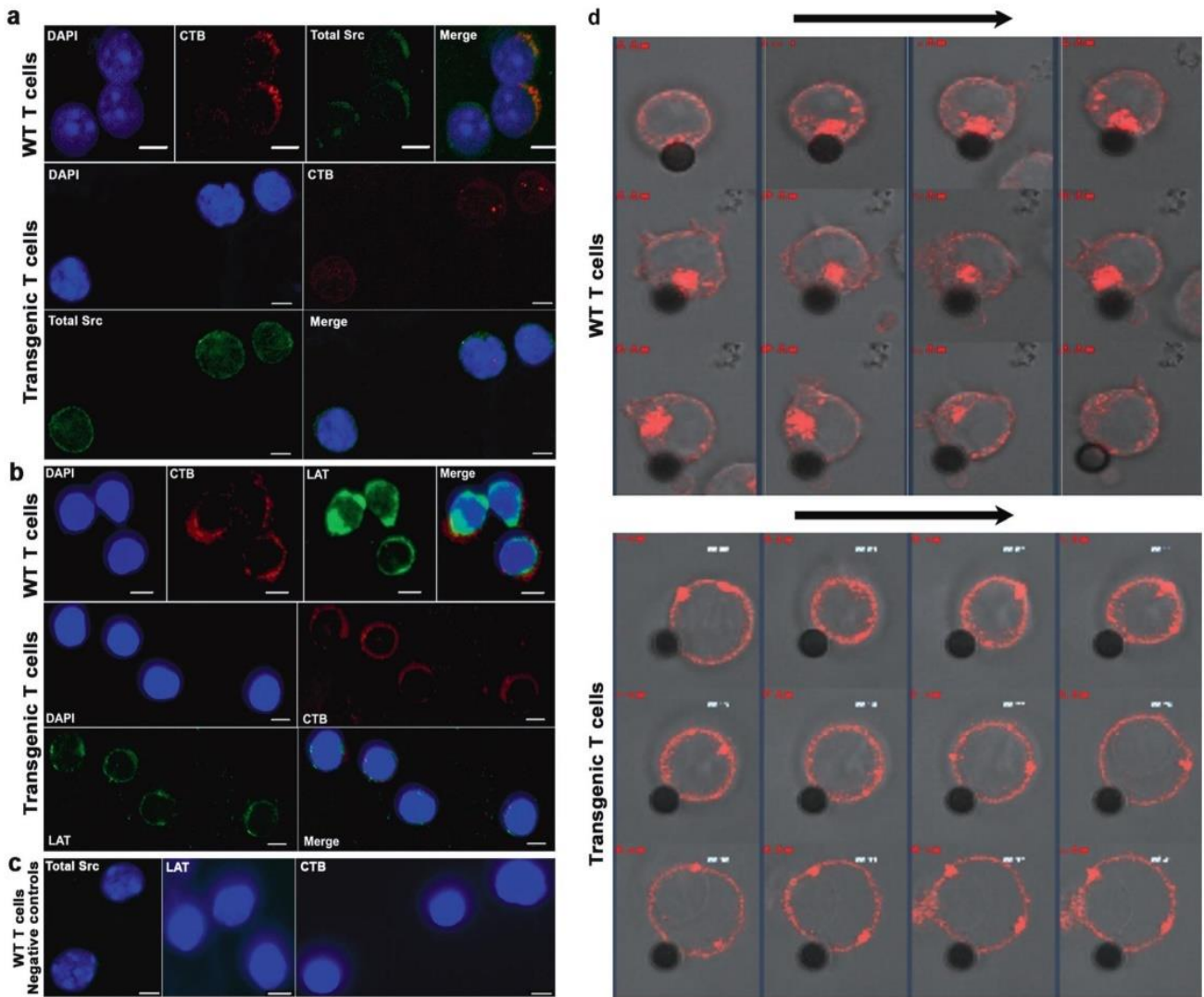
LRs was due to a difference in the input (Fig. 6a). Total Fyn and Lck were both found to be mostly localized to LR at similar proportions, except in transgenic T cells, in which the total Lck was reduced in LR after 30 min of activation. In resting conditions, the relative abundance of pY<sup>528</sup>Fyn (inactive form) in LR was twice as high in transgenic T cells than in WT T cells (Fig. 6a, b). The relative abundance of pY<sup>528</sup>Fyn was dramatically increased in activated transgenic T cells, whereas it remained low in activated WT T cells. Although we found no difference in pY<sup>505</sup>Lck abundance between transgenic and WT T cells in resting conditions, pY<sup>505</sup>Lck was significantly increased in the LR of activated transgenic T cells compared to that in WT T cells (Fig. 6a, c). These results suggest that the decreased reactivity of transgenic T cells compared to that of WT T cells results from the inactivation of Src kinases in LR linked to the CMIP-mediated inhibition of proximal signaling.

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.<sup>22</sup> We evaluated whether the distribution of LR in transgenic T cells was affected using the lipid raft marker cholera toxin B (CTB), which preferentially binds the ganglioside M1 (GM1) glycosphingolipid. We performed double fluorescence labeling with anti-Src antibody and CTB. WT T cells exhibited the polarized colocalization of both markers 30 min after activation (Fig. 7a). However, we did not detect any polarization in transgenic T cells, suggesting that CMIP interferes with LR migration. Then, we analyzed linker for activation of T cells (LAT), an adapter protein recruited at the plasma membrane that segregates into LR upon engagement of the T cell receptor and costimulatory signaling. The membrane localization and distributions of LAT and CTB (coupled with Alexa Fluor 555) were examined by fluorescence staining 30 min after T cell activation by anti-CD3/CD28 antibodies (1 µg/ml each). While LAT and CTB were clustered in plasma membrane microdomains in WT T cells, they were spread along the plasma membrane in transgenic T cells (Fig. 7b). We next monitored LR dynamics following anti-CD3/CD28 antibody costimulation. T cells from transgenic and WT mice were isolated by negative immunoselection, stained with AF555-CTB, and then incubated in the presence of anti-CD3-coated

beads and soluble anti-CD28 (1 µg/ml). The time-dependent distribution of fluorescence was evaluated by video microscopy. CTB moved from the periphery and formed a cluster at the contact points between T cells and anti-CD3-coated beads (Fig. 8d and Movie S1). Conversely, CTB did not move toward anti-CD3-coated beads in transgenic T cells, suggesting that the beads were unable to reorganize GM1-positive microdomains. Collectively, these results suggest that CMIP prevents LR clustering required for the formation of immunological synapses and effective T cell activation.

**CMIP alters glyco/gangliosphingolipid metabolism**

To examine whether CMIP overexpression modifies the dynamics and lipid composition of cell membranes, we used mouse podocytes from an immortalized independent cell line that were stably transfected with the CMIP coding sequence optimized for untargeted global lipidomics analysis. Principal component analysis (PCA) of our lipidomic data showed the clear clustering of our samples into two groups that discriminated between CMIP-transfected and empty vector-transfected control cells (EV). Figure 8a shows PCA in which both positive and negative ions had been 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 of KEGG pathways using Metabolomics Pathway Analysis (MetPA) showed that CMIP expression had a strong impact on sphingolipid metabolism (Fig. 8b). In addition, independent overrepresentation analysis across multiple pathways sources using IMPaLa confirmed that the most significant alteration in CMIP expression affected glyco/gangliosphingolipid metabolism (Data file S1). Consistently, the levels of GM3 and GM2 species were significantly decreased, whereas the levels of GM1 species increased in CMIP-expressing cells compared to those in control cells (Fig. 8c). To understand the mechanism leading to these modifications to the ganglioside profile, we used Western blotting to evaluate the expression level of GM3 synthase, a key enzyme in the biosynthesis of ganglioside gangliosides responsible for the conversion of LacCer into GM3. We observed the decreased expression of GM3 synthase in Tg cells compared to that in WT cells, especially at 30 and 60 min after activation (Fig. 8d). This result suggests that a decrease in GM3 synthase expression contributes, at least in part, to the

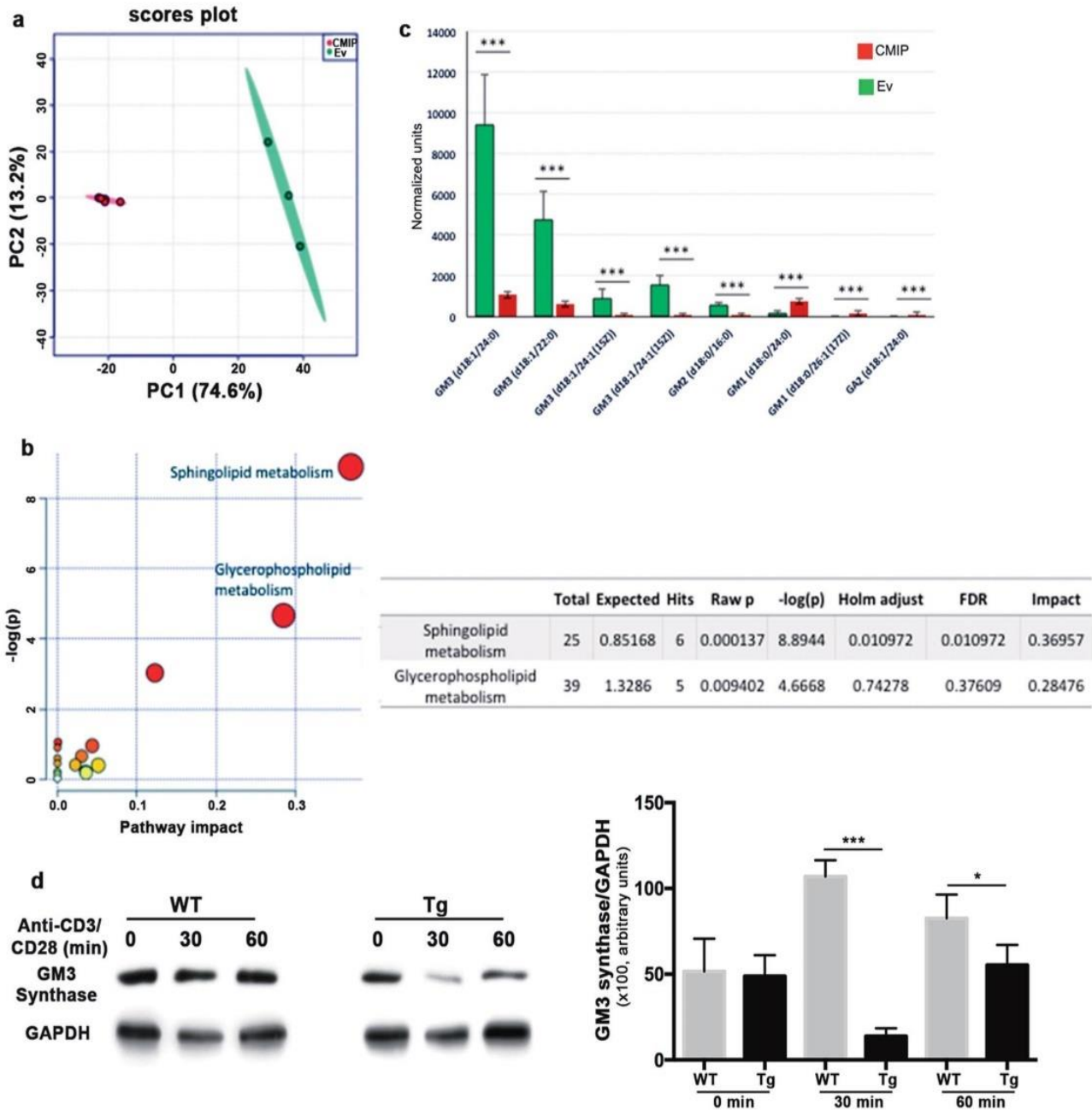


**Fig. 7** CMIP inhibits clustering and activation of the raft signaling platform. **a** CMIP inhibits membrane clustering of Src kinases and CTB after CD3/CD28 stimulation. Immunofluorescence analysis of transgenic and WT T cells after 30 min of activation by anti-CD3/CD28 antibodies (1  $\mu$ g/ml each) that were then fixed and immunostained for total Src (green) and CTB (red). Cellular nuclei were revealed by counterstaining with DAPI dye. Confocal analysis shows that Src kinases and CTB colocalize in WT but not transgenic T cells. **b** CMIP inhibits the clustering of LAT and CTB into LR after CD3/CD28 stimulation. Fluorescence analysis of LAT and CTB after T cell activation performed as in **a**. **c** Negative Src, LAT and CTB controls: the specificity of each signal in WT T cells was assessed using IgG isotype control antibody instead of primary antibody. **d** CMIP inhibits LR clustering and T cell polarization. Transgenic and WT T cells were synchronized, stained with CTB, loaded into 8-well plates at 50,000 cells/well and activated with anti-CD3-coated beads (cells:beads, 2:1) and soluble anti-CD28 (1  $\mu$ g/ml). Cells were kept at 37  $^{\circ}$ C. Data were acquired with a confocal microscope at 1 image/15 s. Images were extracted from movies (1 image/min) and analyzed by ImageJ software (magnification:  $\times$ 63)

downregulation of GM3 and GM2 observed in cells overexpressing CMIP.

Proteomic analysis of T cells isolated from WT and transgenic mice To further evaluate the impact of CMIP expression on T cell signaling, we performed differential proteomic analysis of T cells from 12-week-old transgenic and WT mice (twelfth generation,  $n=3$  each). T cells were purified by negative immunoselection and then activated by anti-CD3/CD28 antibodies (1  $\mu$ g/ml each). At 0 and 60 min after stimulation (corresponding to the time of highest transgene expression), total proteins were extracted and digested with trypsin, and the peptides in three parallel technical replicates per sample were quantified. The expression levels of the 2660 identified proteins in four conditions were compared (Data file S2). As a result, 46 proteins were found to be differentially expressed between transgenic and WT T cells as a function of T cell activation (two-way ANOVA interaction,  $p < 0.05$ ) (Data file S3). Hierarchical clustering displayed four major clusters

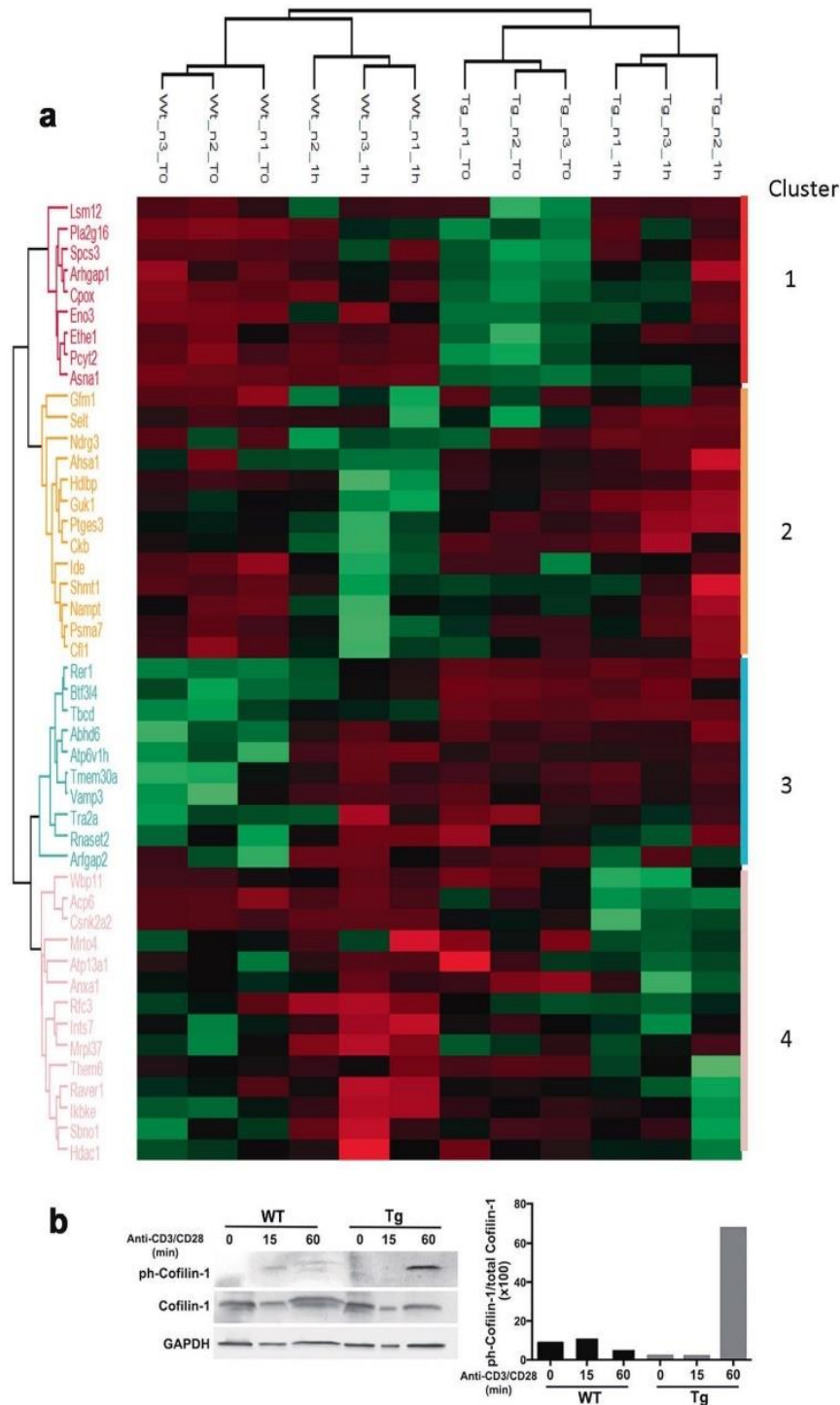
grouping proteins whose expression varied in the different experimental conditions (Fig. 9a, Table 1). Under basal conditions, a cluster of 9 proteins (cluster 1) were found to be highly expressed in WT T cells, while they were strongly downregulated in transgenic T cells. This cluster includes two proteins involved in lipid remodeling, namely, HRAS-like suppressor 3 (Pla2g16) and ethanolamine phosphate cytidylyltransferase (Pcyt2). In activated T cells, the expression levels of a cluster of 13 proteins (cluster 2) were found to be depleted in WT mice but increased or unchanged in transgenic mice. This cluster includes proteins involved in the organization of the actin cytoskeleton, such as cofilin-1 (Cfl1), and nucleotide metabolism, such as creatine kinase B-type (Ckb), nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) and guanylate kinase (Guk1). Cluster 3 encompassed 10 proteins that were significantly downregulated in WT T cells relative to their expression in transgenic T cells in basal conditions. This cluster includes two proteins involved in lipid uptake and metabolism, namely, cell cycle control protein 50 A (Tmeme30a)



**Fig. 8** CMIP induces alterations in the glycosphingolipid biosynthetic pathway and ganglioside species. A mouse podocyte cell line was stably transfected with a CMIP expression vector or 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 discriminated between CMIP-transfected and EV-transfected cells. PC1 accounted for 74.6% of the total variance. **b** Metabolome view after MetPA shows sphingolipid metabolism to be the pathway most significantly altered by CMIP expression. Total: the total number of compounds in the pathway; Hits: the actual matched number from the uploaded data; Raw p: original *p* value calculated from enrichment analysis; Holm p: *p* value adjusted by the Holm-Bonferroni method; FDR p: *p* value adjusted using the false discovery rate; Impact: pathway impact value calculated from pathway topology analysis. **c** The relative abundances of several ganglioside species are very significantly different between empty vector-transfected and CMIP-transfected cells. Data are expressed as the means  $\pm$  SDs of normalized arbitrary units.  $***p < 0.001$ . EV: *n* = 3. CMIP: *n* = 6. **d** Representative Western blot showing GM3 synthase (*St3Gal5* gene) in protein lysates at rest (0 min) or after 30 and 60 min of the activation of transgenic and WT T cells with anti-CD3/CD28 antibodies; blots were stripped and reprobed with anti-GAPDH antibody. Statistical analyses of three independent experiments were performed [Tg vs. WT (30 min),  $***p = 0.0005$  and Tg vs. WT (60 min),  $*p = 0.0254$ ]

and monoacylglycerol lipase (Abhd6). Most remarkably, a fourth cluster (cluster 4) comprised 14 proteins that underwent a dramatic increase in expression after stimulation in WT cells but were depleted in transgenic T cells under the same conditions. The most notable representative members of this cluster were inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon (*Ikbke*), casein kinase II subunit alpha (*Csnk2a2*), the cPLA2 inhibitor annexin-1 (*Anxa1*), and the lipid remodeling factor lysophosphatidic

acid phosphatase 6 (*Acp6*). These results, along with other data obtained from the transgenic mouse model, suggest a defect in T cell activation associated with CMIP expression. Based on these findings, we further analyzed the expression of Cofilin-1, a major actor in the dynamic rearrangement of the actin cytoskeleton<sup>23</sup> whose activity was recently reported to be negatively regulated by CMIP in podocytes,<sup>24</sup> by Western blotting. We found that phosphorylated Cofilin-1, the inactive form of Cofilin-1, was



**Fig. 9** Impact of CMIP expression and T cell activation on the total proteome. **a** Heat map showing 46 differentially expressed proteins in T cells obtained from transgenic and WT mice that were or were not subjected to 60 min of costimulation with anti-CD3/CD28 antibodies (1  $\mu$ g/ml each). The column tree denotes mice grouped by hierarchical clustering. Rows correspond to 46 proteins whose differential expression was significant according to two-way ANOVA ( $p < 0.01$ ) distributed into four clusters. Each cluster corresponds to proteins showing a similar pattern in variation depending on both parameters (CMIP expression and T cell activation). Proteins are labeled with their gene acronyms. **b** Phosphorylation/inactivation of Cofilin-1 in transgenic T cells. Western blot showing cofilin-1 in total extracts of transgenic and WT T cells isolated by negative immunoselection at reset (0 min) and after 15 or 60 min of costimulation with anti-CD3/CD28 antibodies (1  $\mu$ g/ml each). Samples were analyzed with an anti-pSer3-Cofilin-1 antibody that recognizes the inactive form of cofilin-1 and an antibody recognizing the total Cofilin-1. GAPDH was used as a loading control. The right panel shows the inactive/total Cofilin-1 ratio according to densitometric analysis

dramatically increased in transgenic T cells at 60 min after stimulation compared to its levels in WT T cells (Fig. 9b). Likewise, Cofilin-1 was hyperphosphorylated in HEK cells overexpressing CMIP compared to its levels in 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 CMIP in vivo and the functional consequences of its overexpression in T cells, which led us to generate a transgenic mouse model in which CMIP was selectively induced in peripheral T cells. We show the following for the first time: (i) CMIP interferes with the early events of T cell signaling by

**Table 1.** Protein clusters differentially expressed between transgenic and wild-type T cells (see text for details)

Cluster	Two-way ANOVA p value Interaction	Protein names	Gene names
	0.0173924	ATPase Asna1	Asna1
	0.0346941	Beta-enolase	Eno3
	0.0382656	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, mitochond	Cpox
	0.0198362	Rho GTPase-activating protein 1	Arhgap1
	0.00452375	HRAS-like suppressor 3	Pla2g16
	0.00564185	Ethanolamine-phosphate cytidyltransferase	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	Psm7
	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	Mrp137
	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

inhibiting the activation of Src kinases (Fyn and Lck) and Zap-70 and their localization to LR; (ii) CMIP inhibits LR clustering, which is required for immunological synapse formation; and (iii) transgenic T cells in which CMIP is selectively induced exhibit a

lower proliferative capacity and are less prone to produce cytokines after their stimulation than WT T cells. In addition, the transgenic mice displayed a higher percentage of T cells with a naïve T cell phenotype and a lower reactivity to CD3/CD28 stimulation than WT

mice, as reflected by a decrease in IL-2 production. The inability to produce sufficient IL-2 may explain why transgenic T cells fail to proliferate and to differentiate like WT T cells. However, the addition of recombinant IL-2 to the culture medium restored their proliferative capacity. These results are consistent with previous data obtained from a randomized multicenter clinical trial that included cytokine and CMIP expression studies in the same patients at relapse and remission.<sup>6</sup> Indeed, we found that MCNS relapse is associated with the downregulation of IL2 and a concomitant increase in CMIP abundance. Altogether, these findings suggest that CMIP inhibits the differentiation of naïve T cells to effector cells and acts as a negative regulator of T cell signaling. IL-10 plays a key role in preventing inflammatory and autoimmune processes.<sup>25</sup> Given the contrasting effects of CMIP induction on cytokine production marked by the downregulation of IFN $\gamma$  and IL4 and the increased production of IL-10, we postulate that increased Cmpip abundance interferes with T cell differentiation into Th1 or Th2 cell subsets but may facilitate the development of regulatory T cell responses.

Although we focused on the study of early signaling events in T cells here, the finding that the Tg T cells were insensitive to PMA/ionomycin activation is unexpected because the recruitment of proximal signals is traditionally thought to be uncoupled from downstream effectors. Indeed, the inhibitory effects of Cmpip seem to involve proximal events occurring in T cell signaling, as well as transcriptional machinery leading to cytokine synthesis. The fact that the PMA/ionomycin-mediated stimulation of IL-4 and IFN $\gamma$  was sensitive to Cmpip inhibition suggests two potential mechanisms that are not mutually exclusive. The first mechanism relies on the crossregulation of factors involved in early T cell proximal events and PKC $\theta$ . PKC $\theta$  has been shown to associate with CD28 in PMA-stimulated T cells and physically interact with ZAP70 in lipid rafts, leading to the activation of downstream signaling pathways and cytokine synthesis.<sup>26</sup> Moreover, PKC $\theta$  inhibits the suppressive function of regulatory T cells.<sup>27</sup> Determining whether Cmpip can disrupt this regulatory loop requires additional investigation. The second mechanism implies the direct effect of Cmpip as a repressor of NF- $\kappa$ B activity.<sup>11,14</sup> NF- $\kappa$ B binds to the CD28-responsive element in the *Il-2* promoter and acts as a potent transactivator.<sup>28</sup> Moreover, NF- $\kappa$ B can be activated by the stimulation of PKC by PMA.<sup>29</sup> The influence of Cmpip on the transcriptional regulation of cytokines remains to be investigated.

The most proximal signaling events following T cell engagement involve the Src family tyrosine kinases Lck and Fyn. The abundance of the inactive Src kinases Fyn and Lck was significantly increased following the CD3/CD28-induced stimulation of transgenic T cells, whereas active Src kinase forms assessed by pY<sup>418</sup>Src were reduced, suggesting that the early molecular events leading to the recruitment and activation of Src kinases in LRs are altered in the presence of CMIP. Activation of T cells by CD3/CD28 resulted in the polarization of LRs, which are enriched in Src kinases, GPI-linked proteins and adapter proteins that function together as signaling platforms. Because 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 the migration of T cell receptors into LRs.<sup>30</sup> Our results suggest that Lck is maintained in its inactive conformation in transgenic T cells, preventing Zap 70 activation and LAT recruitment in LRs. We show here that T cell polarization, as visualized by CTxB staining, is inhibited after CD3/CD28 stimulation in transgenic T cells, while it is clearly observed in WT T cells. Collectively, these results suggest that CMIP inhibits proximal signaling and prevents the recruitment of LRs to the immunological synapse. These two observations—the defects in both the localization of proteins in LRs and LR clustering—are complementary. These processes can be linked, but the data provided by both approaches are independent. CTxB analysis cannot inform about the distribution of Src kinases in LRs, whereas

LR isolation and WB cannot inform about raft clustering at the TCR. Altogether, the results of these approaches indicate the existence of an underlying mechanism involving CMIP that leads to LR disruption.

Our lipidomic analysis revealed ganglio-series glycosphingolipid synthesis to be the main metabolic pathway impacted by Cmpip expression in a model cell line. This finding was consistent with the alterations in membrane raft signaling induced by Cmpip expression in T cells. GM3, the precursor of GM1 and GM2, is the most abundant class of gangliosides in T cells,<sup>31</sup> where GM3 gangliosides seem to play a key role in activation and signal transduction and notably colocalize with the protein tyrosine kinase ZAP70.<sup>32</sup> Hence, the observed depletion of GM2 and GM3 cellular content and GM1 localization due to CMIP expression could be fundamental in the inhibition of immunological synapse formation suggested by our results.

T cell proximal signaling requires the integrity of LRs based on the following arguments: (1) GM3 is the main component of LRs, and the activation of CD4<sup>+</sup> T cells is severely compromised in G3-deficient mice, highlighting the functional relevance of LRs in T cell signaling.<sup>33</sup> (2) LR clustering occurs at the interface between T cell and antigen-presenting cell, forming the immunological synapse.<sup>34,35</sup> (3) The Src kinases Lck and Fyn, ZAP-70 kinase and adapter proteins, among others, are recruited to LRs.<sup>36</sup> Finally, (4) actin cytoskeleton rearrangement structurally regulates LR dynamics.<sup>37</sup> We have previously shown that CMIP interacts physically with Fyn and filamin A, so it may interfere with both LR and cytoskeleton dynamics.<sup>13,38</sup> Altogether, these data suggest that the negative regulatory role of CMIP is complex and affects early events in T cell signaling. However, the way in which CMIP inhibits LR dynamics by reducing GM3 and GM2 generation remains to be unveiled.

The importance of LRs in T cell activation lies in their ability to promote the efficient recruitment of membrane receptors and proximal protein partners by serving as a signaling platform and coordinate rearrangement of the actin cytoskeleton, which is required to enable sustained activation of the T cell response.<sup>39</sup> We sought to understand the impact of CMIP on these molecular events by differential proteomics and found four clusters of proteins that display significant differences in expression in transgenic T cells compared with WT T cells. We confirmed that cofilin-1, a major mediator of actin dynamics, is inactivated in transgenic T cells. T cell stimulation in the presence of cell-permeable cofilin peptide homologs has been shown to inhibit the interaction of cofilin with F-actin filaments, resulting in the impaired formation of the immune synapse, reduced production of T helper 1 (Th1) and Th2 cell cytokines, and reduced cell proliferation.<sup>23</sup>

CMIP is a new PH domain-containing and LRR domain-containing protein originally identified in T cells from patients with MCNS.<sup>5</sup> Several investigations carried out over the last decade have shed new light on the structural and functional characteristics of CMIP.<sup>40</sup> The recent observation that CMIP is overproduced in the tumor cell environment in patients who develop MCNS, even idiopathic MCNS, in the context of cancer raises intriguing questions and possibly implicates CMIP in the pathophysiological process of MCNS.<sup>9</sup> To date, CMIP has been found to interact with multiple partners, interfere with cytoskeletal dynamics, downregulate NF- $\kappa$ B activity and promote apoptosis.<sup>38</sup> Its involvement in different signaling pathways suggests that CMIP is present in multiple complexes that regulate the response to intracellular and membrane receptors. The current study adds new insight into CMIP function and suggests the negative regulatory role of CMIP in T cell signaling. Negative regulation is critical for the termination of immune responses, peripheral tolerance and the prevention of 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, excess negative regulation may impede appropriate T cell activation in response to pathogens and lead to chronic infection. In addition, the inability to engage appropriate T cell responses against tumoral neoantigens results in cellular proliferation and metastasis. Indeed, the induction of inhibitory molecules, such as CTLA-4 and PD-1, was found to be correlated with viral load,<sup>41</sup> and in cancer,<sup>42</sup> the blockade of these inhibitory molecules provides a clear survival benefit.<sup>43</sup> However, our results do not exclude a role for CMIP as a modulator of T cell activation and the immune response. Thus, a better understanding of the role of CMIP in the negative regulation of T cell signaling may open new therapeutic perspectives to manipulate the immune system.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

Ten adult patients were included after their informed consent was obtained. The diagnosis of MCNS was confirmed by renal biopsy before inclusion. All patients with relapse had proteinuria >3 gr/24 h and low serum albumin levels (<30 gr/l). Blood samples were obtained at the time of diagnosis before treatment. Remission samples were collected during periods of inactive disease defined by proteinuria <0.2 g/24 h without steroid treatment. Samples were obtained in the context of a clinical trial (Clinical trial.gov identifier: NCT01197040) with the written consent of participants involved in this study.

### Generation of CMIP transgenic mice

A transgenic mouse model was constructed with a targeting system based on the reconstitution of a functional X-linked hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Hprt) locus as previously described.<sup>38</sup> The full-length coding sequence of human CMIP was inserted downstream of the distal Lck promoter, allowing CMIP expression in only peripheral T-lymphocytes.<sup>18</sup> The HPRT PCR product was amplified in WT and heterozygous transgenic female (Tg<sup>+/-</sup>) mice but not in mice with reconstituted HPRT alleles, such as homozygous transgenic female (Tg<sup>+/+</sup>) or hemizygous transgenic male (Tg+) mice. The CMIP and HPRT PCR products were 309 and 301 base pairs in size, respectively (Table S1).

The experimental procedures were approved by the National Ethics Committee (COMETH) under accreditation number 29/01/13-1.

### Generation of conditional and inducible T cell-specific CMIP knockout mice

Details of the construction of Cmpip<sup>lox/lox</sup> mice have been previously reported.<sup>17</sup> A triple transgenic mouse strain (CD2-rtTA/TetOn-Cre/CMIP<sup>loxP/loxP</sup>) was generated by sequential crossing. We first crossed Cmpip<sup>lox/lox</sup> mice with C.Cg-Tg(tetO-Cre)1Jaw/J mice (strain N° 006244) that were purchased from Jackson laboratory (Bar Harbor, ME USA). Then, the homozygous double transgenic TetO-Cre/CmpipLox mice were crossed with Tg(CD2-rtTA)CRza mice (a generous gift of R Zamoyska, MRC, London, UK). The offspring were subsequently intercrossed until mice homozygous for the three genes were obtained.

### Flow cytometry analysis

Splenocytes were incubated for 10 min at room temperature (RT) with TruStain fcX<sup>TM</sup> (BioLegend) and then stained with anti-mouse fluorochrome-conjugated mAbs against CD4, CD8, CD44, and CD62L for 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 CyAn ADP analyzer

(Beckman Coulter) using FlowJo software (Tree Star, San Carlos, CA, USA).

### T cell isolation

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

### Ex vivo T cell stimulation

Before stimulation, T cells were systematically synchronized at the G1 phase of the cell cycle by serum starvation in 2% fetal calf serum (FCS) for 6 h. Synchronized T cells were then activated for the indicated times with soluble anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (eBiosciences, San Diego, CA, USA) at 1 µg/ml in RPMI complete medium supplemented with 10% FCS. In another set of experiments, T cells were activated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 50 ng/ml) and ionomycin (0.5 µg/ml) for the indicated times in similar culture conditions.

### Western blot analysis

All primary antibodies used in this study are referenced in Table S2B. Western blotting was performed as previously described.<sup>38</sup>

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

Total RNA was extracted and purified using an RNeasy kit (Qiagen, Germantown, USA) following the supplier's protocol. The sequences of the primers used are listed in Table S1. RT-qPCR was performed as previously described.<sup>7</sup> All RT-qPCRs were performed in duplicate, and expression levels were normalized to 18S rRNA expression. Cycle threshold (CT) values 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 ( $\Delta CT = CT_{\text{gene of interest}} - CT_{18S}$ ). Samples amplified with cycle thresholds greater than 32 were excluded from the analyses. The fold-change in mRNA induction relative to that in unstimulated cells was evaluated by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method.

### T cell proliferation assay

T cell proliferation was determined by the extent of carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) dye dispersion in the culture at day 5 in the presence of soluble anti-CD3/anti-CD28 antibodies (1 µg/ml each). For CFSE labeling, synchronized T cells were resuspended at 10<sup>7</sup> cells/ml in PBS containing 1 µM CFSE (eBioscience) and incubated for 10 min at RT. The labeling reaction was terminated by the addition of 3 volumes of cold PBS. Then, the cells were washed three times, resuspended in RPMI complete medium supplemented with 10% FCS at 10<sup>7</sup> cells/ml in the presence of soluble anti-CD3/CD28 antibodies (1 µg/ml) with or without IL-2 (30 U/ml), and incubated for five days. The incorporation of CFSE was measured by flow cytometry.

### Immunocytochemistry

T cells were plated at 10<sup>4</sup> cells/slide using a cytospin centrifuge, fixed in 4% PFA for 10 min at RT, and then permeabilized by incubation with 0.3% Triton X-100 for 10 min. Endogenous biotin and avidin were blocked using an Avidin-Biotin Blocking kit (Vector Laboratories). Membranous ganglioside GM1 was visualized by direct incubation with Alexa Fluor555-conjugated cholera toxin subunit B (Molecular Probes, 8 µg/ml in PBS, 50 µl/slide) for 25 min at RT and washed (3 × 5 min) before being covered with Vectashield mounting medium containing DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories), following which the slides were viewed under a fluorescence microscope (Zeiss, Germany)

with the appropriate filters. A rabbit polyclonal antibody developed in our laboratory was used (1:1000 dilution) to visualize CMIP. An anti-CMIP antibody recognizing both human and mouse CMIP has been previously described.<sup>17</sup> To ensure the specificity of each signal, IgG isotype control antibody (Cell Signaling) was used instead of primary antibody in control samples.

#### Confocal and video microscopy

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

#### Lipid raft preparation

Lipid raft microdomains were obtained by a detergent-free method based on the method described by McDonald and Pike.<sup>44</sup> Between 15 and 30 million cells per sample were washed twice in cold PBS, resuspended in 800 µl of MBS/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer (25 mM MES, 150 mM NaCl, 250 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 6; supplemented with 1 mM PMSF and phosphatase and protease inhibitor cocktails) and lysed by 20 passages through a 21 G needle, followed by sonication 3 times for 60 s in a Vibra-Cell 75022 sonicator. The homogenate was mixed with two volumes of 60% OptiPrep<sup>TM</sup> (Axis Shield) in a final volume of 2 ml containing 40% OptiPrep<sup>TM</sup>. A three-step discontinuous density gradient was made by adding 2 ml of 30% OptiPrep<sup>TM</sup> in MBS/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer and 1 ml of 5% OptiPrep<sup>TM</sup> sequentially to the top of the homogenate. The mixture was spun in a TL-100 rotor at 268,000×g for 2 h in an Optima MAX-XP ultracentrifuge (Beckman Coulter). After spinning, 8 fractions of 600 µl each and the 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 (rafts) and NR (nonrafts), respectively. These pools were characterized using the established lipid and protein raft markers Flotillin-1 and cholesterol, respectively. For Western blot studies, proteins from the R and NR fractions were precipitated by the addition of 10% trichloroacetic acid (final concentration), incubation overnight at -20 °C and three washes in cold ethanol. The resultant 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)

Cholesterol levels were evaluated by thin layer chromatography as previously described.<sup>45</sup> Briefly, the R and NR fractions were subjected to organic extraction by the addition of 6 volumes of chloroform/methanol (2:1, v/v) and thorough vortexing, followed by centrifugation at 3000×g for 5 min. The organic lower phase was recovered and evaporated to dryness under a nitrogen stream. The dry lipid film was resuspended in 20 µl of chloroform/methanol (1:1, v/v). Five microliters of each sample was spotted on a Partisil HPK 60 Å silica HPTLC plate (Whatman) along with 3 µg of cholesterol standard, predeveloped 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 solution of 626.6 mM CuSO<sub>4</sub> and 8% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> followed by charring at 160 °C.

#### Lipid extraction, untargeted lipidomics and analysis of ganglioside metabolism

Untargeted lipidomics was optimized in immortalized mouse podocytes stably transfected with a vector carrying the coding sequence of CMIP or an empty vector as a control. The cell line characteristics and culture conditions have been described before.<sup>38</sup> Five million cells per sample were subjected to organic extraction. Lipids were extracted by adding methanol to dry cell

pellets and centrifuging them 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 with an Acquity UPLC M-Class system, 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 mass spectrometer (Waters). Analyses were conducted in 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 of 0.5 µl were carried out in partial loop mode, the column temperature was 55 °C, and the flow rate was 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, from 43 to 50% B; 2.1–12.0 min, from 50 to 99% B; 12.0–12.1 min, from 99 to 40% B; and 12.1–14.0 min, 40% B.

Data processing and analysis were conducted using Progenesis QI Informatics (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK) and MetaAnalyst 3.0 software.<sup>46</sup> Each UPLC-MS run was imported as an ion intensity map that included m/z and retention time. These ion maps were then aligned along the retention time direction. From the aligned runs, an aggregate run representing the compounds in all samples was used for peak picking. This aggregate run was then compared with all runs so the same ions were detected in every run. Isotope and adduct deconvolution was applied to reduce the number of features detected. Data were normalized according to total ion intensity. Lipids of interest were filtered for further identification using ANOVA  $p < 0.001$  and a fold-change > 5.

Lipids were identified by database searches against their accurate masses using the publicly available databases Lipid Metabolites and Pathways Strategy (LIPID MAPS) and Human Metabolome database (HMDB) and by fragmentation patterns and retention times when available. Pathway analysis consisting of enrichment analysis and pathway topological analysis was conducted using Metabolomics Pathway Analysis (MetPA) within MetaAnalyst.<sup>47</sup> Additional pathway overrepresentation analyses were conducted using Integrated Molecular Pathway Level Analysis (IMPALA).<sup>48</sup>

**Proteomic analysis of T cells isolated from WT and transgenic mice MS/MS protein identification and quantification.** Cells were lysed in 2% SDS and boiled at 95 °C for 5 min. Filter-Aided Sample Preparation (FASP) was used for protein digestion. Briefly, cell lysates were treated with 100 mM DTT for 30 min at 60 °C, mixed with 8 M urea buffer, loaded on Microcon 30 kDa centrifugal filters (Millipore) and alkylated with 50 mM iodoacetamide. The filters were washed twice with 8 M urea and twice with 50 mM ammonium bicarbonate. Following overnight trypsin digestion at 37 °C, the samples were vacuum dried and resuspended in 10% acetonitrile and 0.1% formic acid for LC-MS/MS. For each run, 1 µg of sample was analyzed by a 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). The solvents used during chromatography were (A) 0.1% formic acid in water and (B) 80% acetonitrile and 0.08% formic acid. Peptides were eluted from the column with the following gradient: 5 to 40% B (120 min) and 40 to 80% (7 min). After 127 min, the gradient returned to 5% to re-equilibrate the column for 20 min before the next injection. Two blanks and two long 75 min step gradients were run between technical and biological triplicate samples to prevent sample carryover. Peptides eluting from the column were analyzed by data-dependent MS/MS using the Top 10 acquisition method. Briefly, the instrument settings were as follows. The resolution was set to 70,000 for MS scans and 17,500 for



data-dependent MS/MS scans to increase speed. The MS AGC target was set to 3106 counts, while the MS/MS AGC target was set to 5104. 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 a 30 s 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 MaxQuant software version 1.5.2.8, and the Andromeda search engine was used to search the raw MS data against the *Mus musculus* subset of the UniProtKB/SwissProt database (release 2015-03-04, 16704 sequences). To search parent mass and fragment ions, we used search mass deviations of 4.5 ppm and 20 ppm, respectively. The minimum peptide length was set to 7 amino acids, and strict specificity for trypsin cleavage allowing up to two missed cleavage sites was required. Carbamidomethylation (Cys) was set as a fixed modification, whereas oxidation (Met) and N-term acetylation were set as variable modifications. The false discovery rates (FDRs) at the protein and peptide levels were set to 1%. Scores were calculated in MaxQuant as described previously.<sup>49</sup> The reverse and common contaminant hits were removed from the MaxQuant output. Proteins were quantified according to the MaxQuant label-free algorithm using LFQ intensities;<sup>22,23</sup> protein quantification was obtained using at least 2 peptides per protein. Statistical and bioinformatic analyses, including heatmaps, profile plots and clustering, were performed with Perseus software (version 1.5.0.31), which is freely available at [www.perseus-framework.org](http://www.perseus-framework.org). For each protein, LFQ values corresponded 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 input 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 a 1.8 standard deviation downshift of the mean to simulate the distribution of low signal values. For statistical comparison of 2 pairs of groups (Lck vs. Balb/c mice and stimulated vs. nonstimulated mice), two-way ANOVA was performed ( $p < 0.05$ ). Hierarchical clustering of proteins whose expression levels were significantly different between Lck vs. Balb/C mice and stimulated vs. nonstimulated mice and proteins exhibiting a significant interaction between the two pairs of groups 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). Differences between the two different groups was determined by using Student's *t*-test. *P* values of less than 0.05 indicated statistical significance.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Prof. Rose Zamoyska (Medical Research Council, London, United Kingdom) for providing us with the Tg(CD2-rtTA) CRza mouse model. This work was supported in part by a grant from the French Kidney Foundation. J.O., P.V., and K.S. were supported by grants from the Ministry of Research.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.O., K.S., C.C., P.V., B.S., E.C., C.H., V.F., A.P., G.A. and I.C.G. performed the experiments. M.O., V.A. and D.S. wrote the paper. D.S. and M.O. supervised the project. All authors discussed the results and participated in writing the paper.

#### ADDITIONAL INFORMATION

The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41423-019-0266-5>) contains supplementary material.

**Competing interests:** The authors declare no competing interests.

#### REFERENCES

- Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I. & Kagan, J. C. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 257–290 (2015).
- Chakraborty, A. K. & Weiss, A. Insights into the initiation of TCR signaling. *Nat. Immunol.* **15**, 798–807 (2014).
- Viola, A. & Gupta, N. Tether and trap: regulation of membrane-raft dynamics by actin-binding proteins. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 889–896 (2007).
- Brownlie, R. J. & Zamoyska, R. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 257–269 (2013).
- Sahali, D. et al. 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 (2002).
- Boumediene, A. et al. NEPHRUTIX: a randomized, double-blind, placebo vs Rituximab-controlled trial assessing T-cell subset changes in Minimal Change Nephrotic Syndrome. *J. Autoimmun.* **88**, 91–102 (2018).
- Sendeyo, K. et al. Upregulation of c-mip is closely related to podocyte dysfunction in membranous nephropathy. *Kidney Int.* **83**, 414–425 (2013).
- Bouachi, K. et al. Expression of CMIP in podocytes is restricted to specific classes of lupus nephritis. *PLoS ONE* **13**, e0207066 (2018).
- Audard, V. 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* **115**, 3756–3762 (2010).
- Bouatou, Y. et al. Nephrotic syndrome in small cell lung cancer and induction of C-Mip in podocytes. *Am. J. Kidney Dis.* 2017;69:477–480.
- Kamal, M. et al. C-mip interacts physically with RelA and inhibits nuclear factor kappa B activity. *Mol. Immunol.* **46**, 991–998 (2009).
- Kamal, 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.* **584**, 500–506 (2010).
- Grimbert, P. et al. The Filamin-A is a partner of Tc-mip, a new adapter protein involved in c-maf-dependent Th2 signaling pathway. *Mol. Immunol.* **40**, 1257–1261 (2004).
- Izzedine, H. et al. Expression patterns of RelA and c-mip are associated with different glomerular diseases following anti-VEGF therapy. *Kidney Int.* **85**, 457–470 (2014).
- Ory, V. et al. c-mip down-regulates NF-kappaB activity and promotes apoptosis in podocytes. *Am. J. Pathol.* **180**, 2284–2292 (2012).
- Izzedine, H. et al. Kidney diseases associated with anti-vascular endothelial growth factor (VEGF): an 8-year observational study at a single center. *Medicine* **93**, 333–339 (2014).
- Moktefi, A. et al. Repression of CMIP transcription by WT1 is relevant to podocyte health. *Kidney Int.* **90**, 1298–1311 (2016).
- Nakao, A. et al. 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 (2000).
- Ballarin-Gonzalez, B. et al. Protection and systemic translocation of siRNA following oral administration of Chitosan/siRNA nanoparticles. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2**, e76 (2013).
- Gao, S. et al. The effect of chemical modification and nanoparticle formulation on stability and biodistribution of siRNA in mice. *Mol. Ther.* **17**, 1225–1233 (2009).
- Malissen, B. & Bongrand, P. Early T cell activation: integrating biochemical, structural, and biophysical cues. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 539–561 (2015).
- Zeng, P., Xu, Y., Zeng, C., Ren, H. & Peng, M. Chitosan-modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for plasmid DNA delivery and HBV gene-silencing. *Int. J. Pharm.* **415**, 259–266 (2011).
- Eibert, S. M. et al. Cofilin peptide homologs interfere with immunological synapse formation and T cell activation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 1957–1962 (2004).
- Yu, L. et al. cMaf inducing protein inhibits cofilin1 activity and alters podocyte cytoskeleton organization. *Mol. Med. Rep.* **16**, 4955–4963 (2017).
- Saraiva, M. & O'Garra, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 170–181 (2010).
- Xie, J. et al. Phosphotyrosine-dependent interaction between the kinases PKCtheta and Zap70 promotes proximal TCR signaling. *Sci. Signal.* 2019;12: eaar3349.
- Zanin-Zhorov, A. et al. Protein kinase C-theta mediates negative feedback on regulatory T cell function. *Science* **328**, 372–376 (2010).
- Ghosh, P., Tan, T. H., Rice, N. R., Sica, A. & Young, H. A. The interleukin 2 CD28-responsive complex contains at least three members of the NF kappa B family: c-Rel, p50, and p65. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 1696–1700 (1993).

29. Bomsztyk, K. et al. Evidence that interleukin-1 and phorbol esters activate NF-kappa B by different pathways: role of protein kinase C. *Cell Regul.* **2**, 329–335 (1991).
30. Zamoyska, R. et al. The influence of the src-family kinases, Lck and Fyn, on T cell differentiation, survival and activation. *Immunol. Rev.* **191**, 107–118 (2003).
31. Tuosto, L. et al. Organization of plasma membrane functional rafts upon T cell activation. *Eur. J. Immunol.* **31**, 345–349 (2001).
32. Garofalo, T. 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.* **277**, 11233–11238 (2002).
33. Nagafuku, M. et al. CD4 and CD8 T cells require different membrane gangliosides for activation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, E336–E342 (2012).
34. Dykstra, M., Cherukuri, A., Sohn, H. W., Tzeng, S. J. & Pierce, S. K. Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 457–481 (2003).
35. Davis, D. M. & Dustin, M. L. What is the importance of the immunological synapse? *Trends Immunol.* **25**, 323–327 (2004).
36. Zumerle, S., Molon, B. & Viola, A. Membrane rafts in T cell activation: a spotlight on CD28 costimulation. *Front. Immunol.* **8**, 1467 (2017).
37. Ballek, O. et al. TCR triggering induces the formation of Lck-RACK1-Actinin-1 multiprotein network affecting Lck redistribution. *Front. Immunol.* **7**, 449 (2016).
38. Zhang, S. Y. et al. c-mip impairs podocyte proximal signaling and induces heavy proteinuria. *Sci. Signal.* **3**, ra39 (2010).
39. Varshney, P., Yadav, V. & Saini, N. Lipid rafts in immune signalling: current progress and future perspective. *Immunology* **149**, 13–24 (2016).
40. Sahali, D. et al. Immunopathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome with relapse. *Semin. Immunopathol.* **36**, 421–429 (2014).
41. Kassu, A. et al. Regulation of virus-specific CD4+ T cell function by multiple costimulatory receptors during chronic HIV infection. *J. Immunol.* **185**, 3007–3018 (2010).
42. Hodi, F. S. et al. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 4712–4717 (2003).
43. Velu, V. et al. Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature* **458**, 206–210 (2009).
44. Macdonald, J. L. & Pike, L. J. A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J. Lipid Res.* **46**, 1061–1067 (2005).
45. Bourderioux, M. et al. A new workflow for proteomic analysis of urinary exosomes and assessment in cystinuria patients. *J. Proteome Res.* **14**, 567–577 (2015).
46. Xia, J., Mandal, R., Sinelnikov, I. V., Broadhurst, D. & Wishart, D. S. MetaboAnalyst 2.0—a comprehensive server for metabolomic data analysis. *Nucleic Acids Res.* **40** (Web Server issue), W127–W133 (2012).
47. Li, F. et al. MPINet: metabolite pathway identification via coupling of global metabolite network structure and metabolomic profile. *BioMed. Res. Int.* 2014;2014:325697.
48. Cavill, R. et al. Consensus-phenotype integration of transcriptomic and metabolomic data implies a role for metabolism in the chemosensitivity of tumour cells. *PLoS Comput. Biol.* **7**, e1001113 (2011).
49. Cox, J. & Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1367–1372 (2008).

### 1.4.3 DEVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE SENSIBLE S-TRAP POUR L'ANALYSE DU RAFTOME DES LYMPHOCYTES T

#### **Introduction**

Les résultats obtenus montrant le défaut de polarisation des rafts quand CMIP est exprimé par les LT nous ont amené à nous intéresser aux acteurs de cette polarisation par des approches protéomiques. L'analyse des rafts par spectrométrie de masse fait face à de multiples enjeux tels que la solubilisation complète des rafts avant analyse MS, le rendement obtenu à partir de faibles quantités d'échantillon, l'utilisation controversée des détergents pour les isoler, la pureté et les temps de préparation des rafts. Afin de réduire les biais liés à l'utilisation de détergents, qui peuvent être introduits lors de la préparation des rafts, et également de réduire les temps d'ultracentrifugation inhérents à cette préparation, nous avons choisi d'utiliser une méthode sans détergent couplé à une ultracentrifugation rapide dans un gradient d'iodixanol. Peu d'études reportent l'utilisation de la spectrométrie de masse sur des échantillons contenant de l'iodixanol. En effet, la méthode FASP développée au cours de ma thèse n'est pas compatible pour analyser les protéines des rafts. Elle n'élimine pas complètement l'iodixanol ce qui rend les analyses quantitatives moins précises et peu reproductibles, surtout sur de petites quantités de protéines où une contamination est spécialement problématique.

#### **Objectifs de l'étude**

La quantité de rafts récoltée à partir de LT d'une seule souris étant particulièrement faible, cela nous a incité à développer une méthode sensible qui permet d'éliminer les contaminants liés à la préparation, dont l'iodixanol, de façon efficace et reproductible. En effet, nous avons choisi de ne pas pooler les rafts de différentes souris afin de garder une puissance statistique satisfaisante. Nous avons décidé de publier cette méthode en utilisant uniquement les souris WT.

#### **Résultats obtenus**

Plusieurs méthodes ont été testées afin d'éliminer l'iodixanol : FASP, précipitation, étape supplémentaire d'ultracentrifugation, mais une seule a permis d'éliminer l'iodixanol : le S-Trap. Cette méthode permet de piéger les protéines sur une grande surface, ce qui rend possible l'élimination de la plupart des contaminants et autres détergents qui pourraient gêner l'analyse par spectrométrie de masse. Cette méthode a ainsi été utilisée pour la constitution d'une base de données *in-house* de rafts de LT de souris en fractionnant les peptides à haut pH chaque fraction du gradient d'iodixanol. En effet, nous avons décidé de créer notre base de données des rafts car toutes les préparations visant à séparer certaines classes de protéines, et la préparation des rafts n'est pas une exception, ne sont jamais pures.

Lors de la préparation des rafts, on n'obtient jamais 100% de rafts. De plus, les études des rafts des LT de souris ne sont pas nombreuses et il a été difficile de s'appuyer sur des résultats déjà existants.

Ainsi, la plupart des études se contentent de réaliser des WB contre des protéines marqueurs afin de déterminer la fraction du gradient de densité contenant les rafts. Avec l'utilisation de spectrométrie de masse, notre étude a permis d'identifier et de caractériser 894 protéines des rafts des LT. Afin de créer notre base de données, nous nous sommes appuyés sur la sélection de protéines ayant le même comportement que les protéines marqueurs des rafts, la flotilline-1, flotilline-2 et LAT (Linker for Activation of T-cells), à savoir une présence augmentée dans la fraction 2 par rapport aux autres fractions du gradient d'iodixanol. Enfin, nous avons appliqué le S-Trap sur des rafts des LT de souris, non stimulés et stimulés par les anticorps contre CD3 et CD28 à 15 minutes. L'analyse statistique comparative des différentes conditions démontre qu'une faible quantité de protéines des rafts ont un recrutement différentiel après stimulation des lymphocytes T à 15min. Après sélection des protéines complètement présentes dans une condition et absentes dans l'autre, 3 protéines sont recrutées dans les rafts à T0 tandis que 39 protéines sont recrutées dans les rafts à T15. Parmi ces protéines, Akt2 et NCK1 sont connues pour être impliquées dans l'activation du LT. Ces résultats ont finalement été confirmés par la technologie WES (Western Immunoassay), qui permet de détecter les protéines de faible abondance, pour les protéines Akt2 et NCK1.

### **Conclusions**

Nous avons mis au point une méthode permettant l'analyse protéomique des rafts (raftome) isolés par gradient d'iodixanol à partir d'une souris et créé une base de données *in-house* de protéines de rafts de LT murins.

# A sensitive S-trap-based approach to the analysis of T cell lipid raft proteome<sup>§</sup>

Cerina Chhuon<sup>1,2</sup>, Shao-Yu Zhang<sup>2</sup>, Vincent Jung<sup>1</sup>, Daniel Lewandowski<sup>3-6</sup>, Joanna Lipecka<sup>1</sup>, André Pawlak<sup>2</sup>, Dil Sahali<sup>2,7,8</sup>, Mario Ollero<sup>2,8,\*†‡</sup>, and Ida Chiara Guerrera<sup>1,‡‡</sup>

<sup>1</sup>Proteomic Platform Necker, PPN-3P5, Structure Fédérative de Recherche SFR Necker US24, Paris, France, <sup>2</sup>Institut Mondor de Recherche Biomédicale, INSERM, U955, Créteil, France, <sup>3</sup>CEA/DRF/IBFJ/iRCM/LRTS, Fontenay-aux-Roses Cedex, France, <sup>4</sup>INSERM, UMR1274, Fontenay-aux-Roses Cedex, France, <sup>5</sup>Université Paris-Diderot, Paris, France, <sup>6</sup>Université Paris-Sud, Paris, France, <sup>7</sup>AP-HP (Assistance Publique des Hôpitaux de Paris), Department of Nephrology and Renal Transplantation, Groupe Hospitalier Henri-Mondor, Créteil, France, and <sup>8</sup>Université Paris Est Créteil, Créteil, France

[AQ1]

[AQ2]

**Abstract** The analysis of T cell lipid raft proteome is challenging due to the highly dynamic nature of rafts and the hydrophobic character of raft-resident proteins. We explored an innovative strategy for bottom-up lipid raftomics based on suspension-trapping (S-trap) sample preparation. Mouse T cells were prepared from splenocytes by negative immunoselection, and rafts were isolated by a detergent-free method and OptiPrep gradient ultracentrifugation. Microdomains enriched in flotillin-1, LAT, and cholesterol were subjected to proteomic analysis through an optimized protocol based on S-trap and high pH fractionation, followed by nano-LC-MS/MS. Using this method, we identified 2,680 proteins in the raft-rich fraction and established a database of 894 T cell raft proteins. We then performed a differential analysis on the raft-rich fraction from nonstimulated versus anti-CD3/CD28 T cell receptor (TCR)-stimulated T cells. Our results revealed 42 proteins present in one condition and absent in the other. For the first time, we performed a proteomic analysis on rafts from ex vivo T cells obtained from individual mice, before and after TCR activation. This work demonstrates that the proposed method utilizing an S-trap-based approach for sample preparation increases the specificity and sensitivity of lipid raftomics.

**Supplementary key words** immunology • lymphocytes • membranes • tandem mass spectrometry • cell signaling • detergent-free • filter-aided sample preparation • OptiPrep • raftomics

Rafts (lipid rafts or membrane rafts) are subcellular entities defined as dynamic lateral membrane microdomains (1, 2). Their formation and dynamics have been associated, by a strong body of experimental evidence, with the regulation of cellular functions. Nevertheless, for many years their existence has been questioned owing to: *i*) the fact that their definition is based on experimental concepts, such as detergent resistance; and *ii*) the limited sensitivity of the methods available for their study. A consensus

official definition resulted from a Keystone Symposium back in 2006 (3). This definition establishes their size limits (10–200 nm) and composition (sterol- and sphingolipid-enriched domains), as well as their highly dynamic nature.

If almost any cell type can contain raft-like structures, the scientific community has widely accepted and integrated this concept in the context of lymphocytes. Compelling evidence indicates that T cell activation encompasses membrane reorganization events involving lipid and protein rearrangement, as well as specific protein interactions that orchestrate the clustering of cholesterol and sphingolipid-rich domains (4). It is broadly acknowledged that raft dynamics play a significant and direct role in T cell activation via T cell receptor (TCR) stimulation (5–13) and T cell migration induction via chemokine receptor stimulation (14–19).

The comprehensive characterization of the lipid raft proteome of T cells has been a challenging goal due to difficulties in the isolation of microdomains, their highly dynamic nature, and the hydrophobic character of raft-resident proteins. Nevertheless, several groups have addressed this question using state-of-the-art approaches significantly contributing to deciphering some of the mechanisms involved in T cell activation (4, 9, 17, 20–27) [reviewed in (23, 28–30)]. The numerous studies on rafts in any cell types published to date [reviewed in (31, 32)] have contributed to the generation of a curated growing mammalian lipid raft protein database ([www.raftprot.org](http://www.raftprot.org)) (33, 34). This includes proteins identified by biochemical approaches, either positively by biochemical isolation or negatively by cyclodextrin-based raft-disruption experiments. Proteins identified in proteomic studies are also included, although it is specified whether their presence in rafts has been validated or not by alternative methods. This underlines the issue of purity and contamination in raft preparations.

The golden standard methods for raft isolation are based on, first, cell activity arrest at 4°C followed by differential solubilization of membrane microdomains in nonionic detergents, such as Triton X-100, Lubrol WX, and Brij 35 (35). This procedure may introduce a serious artifactual bias in that detergents are likely to alter membrane properties

This article contains supplemental data.

† These authors share senior authorship.

\* For correspondence: Mario Ollero, [mario.ollero@inserm.fr](mailto:mario.ollero@inserm.fr)

ASBMB

Copyright © 2020 Chhuon et al. Published under exclusive license by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

*J. Lipid Res.* (2020) 61(10) 1–12 1

DOI 10.1194/jlr.D120000672

and, consequently, experimental resistant domains might differ significantly from those existing in physiologic conditions (36). It has been shown that detergent-based methods scramble lipid content and therefore create new artifactual detergent-resistant lipid rafts (37). Detergent-free methods have been developed to minimize this problem. They are based on membrane fragmentation by physical methods, like ultrasound treatment of cells (38) or immunoisolation targeting specific raft-resident proteins (36). These methods are considered to yield a better purity of raft fractions (38).

Detergent treatment of cell membranes is followed by ultracentrifugation on a discontinuous density gradient. Sucrose gradients are usually performed overnight, which represents a timely limitation. Shorter preparation procedures include the use of colloidal solutions, such as OptiPrep™ (36, 39, 40). The latter provides a rapid, highly reproducible, and selective isolation of raft-like microdomains, where selectivity is demonstrated by raft marker enrichment. However, OptiPrep gradients have been scarcely used as a preparation step for proteomics. The few reported cases to date correspond to proteomic analyses on extracellular vesicles (41–49), exosomes (50–53), mitosomes (54), isolated insulin secretory granules (55), synaptosomes (56), and plant organelles (57–60). To date, OptiPrep isolation has been applied to raft proteomics in a study on virus-infected algae (61). Globally, OptiPrep interferes with the LC-MS/MS analysis and needs to be eliminated thoroughly from the sample. However, efficient cleanup steps, like SDS-PAGE short separation, lead to protein loss and are not compatible with very low abundant samples, such as T cell rafts from one single mouse. Hence, there is a need for a simplified and sensitive method for proteomic analysis of T cell rafts.

In this work, we explore an innovative strategy, based on a single device suspension-trapping (S-trap) preparation technique for proteomics on raft-like [flotillin-1-, linker for activation of T cells (LAT)-, and cholesterol-rich] microdomains. For the first time, a global proteomic analysis is performed on purified rafts from ex vivo mouse T cells, before and after activation by TCR costimulation. Our results show an increased specificity and sensitivity of the proposed method. In addition, we have created a new database of T cell raft proteins.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture

HEK 293 cells (American Type Culture Collection) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% FCS. Mouse podocytes were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% FCS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml), and interferon- $\gamma$  (50 U/ml) at 33°C. Differentiation was induced by maintaining stable podocyte cell lines at 37°C without interferon- $\gamma$  for 14 days in the presence of blasticidin and zeocin. Jurkat T cells (American Type Culture Collection) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 mg/ml) at 37°C.

### Mouse T cell isolation and synchronization

Balb/C mice were bred following the standards established by the National Ethics Committee (COMETH) under accreditation number 29/01/13-I. Four individual mice were used as biological replicates ( $n = 4$ ). After euthanization, spleens were harvested, gently minced with a scalpel, and passed through a 40  $\mu$ M nylon mesh filter. T cells were isolated by negative immunoselection using the Pan T Cell isolation kit (Miltenyi Biotec GmbH, Germany). Immunoselected cells were confirmed as CD4+ and CD3+ by flow cytometry (supplemental Fig. S1). Before stimulation, T cells were synchronized at the G1 phase of the cell cycle by serum starvation in 2% FCS for 6 h. Synchronized T cells were then activated for 15 min with soluble 1  $\mu$ g/ml anti-CD3 and anti-CD28 (eBiosciences, San Diego, CA) in RPMI complete medium supplemented with 10% FCS.

### Lipid raft preparation using OptiPrep™ and sucrose gradients

Lipid raft-like microdomains were obtained by a detergent-free method based on the one described by McDonald and Pike (38). Between one and five million cells per sample were washed twice in cold PBS, resuspended in 800  $\mu$ l of MBS/ $\text{Na}_2\text{CO}_3$  buffer [25 mM MES, 150 mM NaCl, 250 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH 6); supplemented with 1 mM PMSF and phosphatase and protease inhibitor cocktails] and lysed by passaging 20 times through a 21 gauge needle, followed by sonication three times for 60 s in a Vibra Cell 75022 sonicator. The homogenate was mixed with two volumes of either 60% OptiPrep™ (Axis Shield) or 60% sucrose for a final volume of 2 ml of either 40% OptiPrep™ or 40% sucrose. A three-step discontinuous density gradient was made by sequentially placing 2 ml of either 30% OptiPrep™ or 30% sucrose in MBS/ $\text{Na}_2\text{CO}_3$  buffer, and 1 ml of 5% OptiPrep™ or 5% sucrose sequentially on top of the homogenate. The mixture was spun in a TL-100 rotor at 268,000  $g$  for 2 h in an Optima MAX-XP ultracentrifuge (Beckman Coulter). After spinning, one fraction of 600  $\mu$ l followed by five fractions of 900  $\mu$ l were collected from top to bottom. Fraction 2 containing rafts was subjected to subsequent analysis. [AQ3]

To analyze the distribution of flotillin-1, fractions were precipitated by addition of 10% trichloroacetic acid (final concentration), incubated overnight at  $-20^\circ\text{C}$ , and washed three times in cold ethanol. The resulting dry protein pellets were solubilized in equal volumes of 1 $\times$  Laemmli buffer and analyzed by Western blot.

### Filter-aided sample preparation

Filter-aided sample preparation (FASP) was performed on OptiPrep™ raft fractions according to (62). Briefly, samples were reduced with 0.1 M DTT at 60°C for 1 h. Proteins were transferred to Microcon filter units (30 kDa cut-off) and washed twice with 200  $\mu$ l of UA buffer [0.1 M Tris, 8 M urea (pH 8.9)] and concentrated by centrifugation at 14,000  $g$  for 15 min. Proteins were alkylated with 100  $\mu$ l of IAA buffer [0.05 M iodoacetamide, 0.1 M Tris (pH 8.9)] at room temperature in the dark for 20 min and centrifuged at 14,000  $g$  for 10 min. Proteins were then washed twice by adding 100  $\mu$ l of UA buffer before centrifugation at 14,000  $g$  for 10 min, and twice with 100  $\mu$ l of ABC buffer (0.05 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) before centrifugation at 14,000  $g$  for 10 min. Filter units were transferred to new collection tubes and samples were incubated with 40  $\mu$ l of ABC buffer containing 1.6  $\mu$ g of trypsin in a humidity chamber at 37°C for 18 h. Tubes were centrifuged at 14,000  $g$  for 10 min, 40  $\mu$ l of ABC buffer were added, and tubes were centrifuged again. Peptides were finally recovered in collection tubes.

### Suspension trapping

S-Trap™ micro spin column digestion was performed on OptiPrep™ raft fractions according to the manufacturer's protocol.

Briefly, proteins were precipitated overnight using a 10% TCA final concentration and washed four times with cold ethanol. Proteins were resuspended and solubilized in 5% SDS, 50 mM triethylammonium bicarbonate (TEAB; pH 7.55), reduced with 100 mM DTT solution, and alkylated with the addition of iodoacetamide to a final concentration of 40 mM. Aqueous phosphoric acid was added to a final concentration of 1.2%. Colloidal protein particulate was formed with the addition of 231  $\mu$ l of S-Trap binding buffer [90% aqueous methanol, 100 mM TEAB (pH 7.1)]. The mixture was placed on S-Trap micro 1.7 ml columns and centrifuged at 4,000 *g* for 10 s. Columns were washed five times with 150  $\mu$ l of S-Trap binding buffer and centrifuged at 4,000 *g* for 10 s with 180° rotation of the columns between washes. Samples were digested with 2  $\mu$ g of trypsin (Promega) at 47°C for 1 h. Peptides were eluted with 40  $\mu$ l of 50 mM TEAB followed by 40  $\mu$ l of 0.2% aqueous formic acid and by 35  $\mu$ l of 50% acetonitrile containing 0.2% formic acid. Peptides were finally vacuum dried.

### High pH fractionation

For library building, peptides were resuspended for high pH fractionation in 50  $\mu$ l of 0.1% TFA. Tips were homemade with one layer of Empore disk C8 and 1 mg of C18 (C18-AQ, Maisch). After washing and conditioning of C18, peptides were bound by centrifugation to C18 in acidic conditions. Peptides were sequentially eluted in eight fractions at basic pH (5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, and 50% ACN in triethylamine 0.1%). Eluted peptides were concatenated pairwise to obtain four final fractions (F1F5, F2F6, F3F7, and F4F8). Samples were then vacuum dried.

### Automated capillary immunoassay (WES)

Automated capillary immunoassay (Simple Western) was performed on a WES system (Protein Simple, San Jose, CA). Akt (Cell Signaling Technologies) and Nck1/2 (Santa Cruz Biotechnology) antibodies were used at a 1:50 dilution. The analyses were performed on a 12–230 kDa separation module (SM-W004) according to the manufacturer's instructions.

### Nano-LC-MS/MS protein identification and quantification

Samples were resuspended in 35  $\mu$ l of 1% ACN, 0.1% TFA in HPLC-grade water. For each run, 5  $\mu$ l were injected in a nanoRSLC-Q Exactive PLUS (RSLC Ultimate 3000) (Thermo Scientific, Waltham MA). Peptides were loaded onto a  $\mu$ -precolumn (Acclaim PepMap 100 C18, cartridge, 300  $\mu$ m ID.  $\times$  5 mm, 5  $\mu$ m) (Thermo Scientific) and separated on a 50 cm reversed-phase LC column (0.075 mm ID; Acclaim PepMap 100, C18, 2  $\mu$ m) (Thermo Scientific). Chromatography solvents were (A) 0.1% formic acid in water, and (B) 80% acetonitrile and 0.08% formic acid. Peptides were eluted from the column with the following gradient: 5% to 40% B (120 min), 40% to 80% (5 min). At 125 min, the gradient returned to 5% to re-equilibrate the column for 20 min before the next injection. Two blanks were run between samples to prevent sample carryover. Peptides eluting from the column were analyzed by data-dependent MS/MS, using a top-10 acquisition method. Peptides were fragmented using higher-energy collisional dissociation. 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 with maximum injection time set to 200 ms, while MS/MS AGC target was set to 1.105 with maximum injection time set to 120 ms. The MS scan range was from *m/z* 400 to 2,000. Dynamic exclusion was set to 30 s duration. Three separate MS runs (i.e., technical replicates) were acquired for each biological replicate under the identical mass spectrometric conditions to account for instrument-related variability and to improve accuracy of the label-free quantification.

### MS data processing and bioinformatic analysis

MS data processing and bioinformatics were done as previously described with some modifications (63). Briefly, raw MS files were processed with the MaxQuant software version 1.5.2.8 and searched with the Andromeda search engine against the human UniProt database (release May 2019, 20,199 entries). To search for parent mass and fragment ions, we set the mass deviation at 4.5 and 20 ppm, respectively. The minimum peptide length was set to seven amino acids and strict specificity for trypsin cleavage was required, allowing up to two missed cleavage sites. Match between runs was allowed. Carbamidomethylation (Cys) was set as fixed modification, whereas oxidation (Met) and protein N-terminal acetylation were set as variable modifications. The false discovery rates at the protein and peptide level were set to 1%. Scores were calculated in MaxQuant as described previously (63).

Statistical and bioinformatic analyses, including heatmaps, were performed with Perseus software (version 1.5.5.3) (freely available at [www.perseus-framework.org](http://www.perseus-framework.org)). GO annotation was performed on Perseus software. Proteins for GO analysis were selected if annotated with the terms membrane, mitochondrion, and nucleus in the Gene Ontology Slim Cellular Component database. RaftProt comparison was performed with the mouse database (freely available at [raftprot.org](http://raftprot.org)).

For the T cell raft database, we used protein intensities to calculate a ratio between fraction 2 and the mean of the other fractions (fractions 3, 4, 5, and 6). Proteins with a ratio superior or equal to two were classified as “enriched in rafts,” and proteins with ratio inferior to two were classified as “non-enriched in rafts”.

For the T cell raft analysis in resting versus activating conditions, we selected proteins based on the following criteria: proteins were detected in all four samples in one condition and completely absent in the other condition. Proteins only identified by site, matching the reverse database and the potential contaminant database were filtered out. Selected proteins were identified with at least two peptides and at least five MS/MS to ensure robust identification of the proteins.

Proteome Discoverer™ software (Thermo Scientific, version 1.4) was used to evaluate the number of identified proteins for the different precipitation tests.

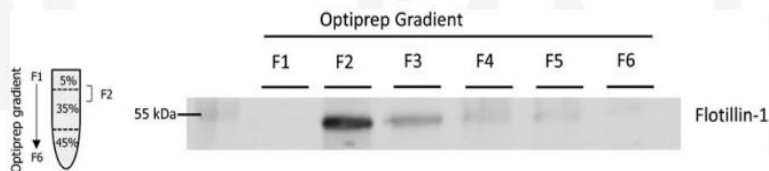
The MS proteomics data have been deposited in the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [1] partner repository with the dataset identifier PXD016476 and MS Viewer.

## RESULTS

### Membrane raft preparation

We optimized membrane raft preparation starting from T cells immunoselected from a single mouse. We aimed to perform biological experiments on single mice rather than on pooled mice in order to maintain higher statistical power. Membrane raft proteins were enriched by ultracentrifugation using an OptiPrep™ density gradient on a limited number of cells (2–10 million) after a detergent-free cell disruption.

We optimized the method in order to collect raft proteins in a single fraction by adapting the volumes of fractions recovered after ultracentrifugation. As lipid rafts are enriched in flotillin-1, a protein that constitutes assembly sites for active signaling platforms (64), we first evaluated the distribution of flotillin-1 in the gradient fractions. As shown in **Fig. 1**, a strong flotillin-1 signal was detected in fraction 2, with lesser amounts in soluble protein-rich fractions



**Fig. 1.** Optimization of OptiPrep™ gradient and detection of lipid raft marker, flotillin-1, in fractions obtained from Jurkat T cells. Cells were lysed and subjected to OptiPrep density gradient separation. The diagram on the left indicates the gradient region expected to contain rafts. Six hundred microliter fractions collected from top to bottom were analyzed by Western blot with an antibody recognizing the raft marker flotillin-1. Optimization of gradient consisted of pooling fractions 2, 3, and 4 into a single combined fraction 2. The Western blot analysis of all fractions shows a strong signal for flotillin-1 in combined fraction 2.

3–6, providing support that fraction 2 from the OptiPrep™ gradient is actually enriched in the membrane rafts.

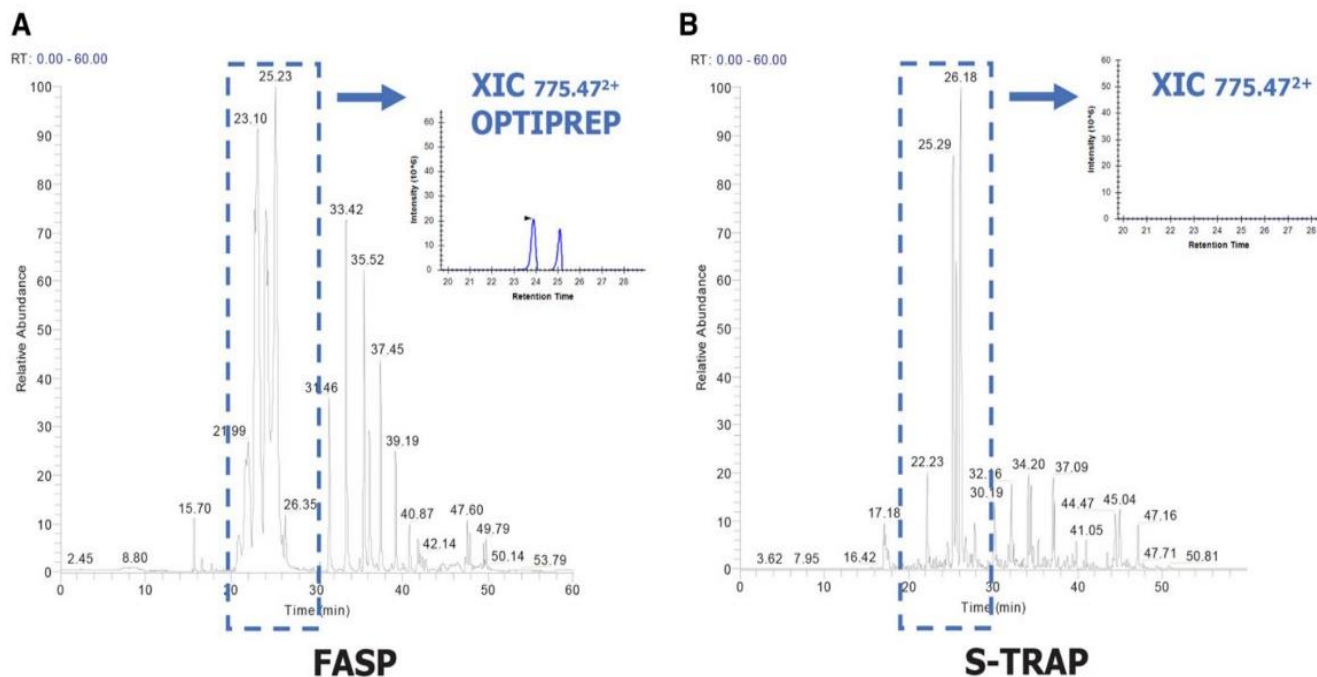
### Proteomic analysis of membrane rafts following different sample preparation methods

In order to identify the proteins contained in the raft-enriched fraction (F2) by LC-MS/MS analysis, we performed a classic workflow based on FASP, as we previously described (62). However, we encountered an unexpected challenge in analyzing this fraction. FASP-digested raft proteins yielded an inconsistent number of identified proteins, and flotillin-1 was not detected at all, possibly due to OptiPrep™ contamination interfering with MS analysis. Indeed, a close analysis of the base peak chromatogram of the F2 raft fraction revealed the strong presence of a doubly charged ion,  $m/z$  775.47, corresponding to the OptiPrep™ compound iodixanol (**Fig. 2A**).

To remove this persistent contamination, we combined FASP with complementary cleaning-up steps before digestion. We conducted the optimization tests on two immor-

tized cell lines, HEK298 cells and mouse podocytes, which constituted a nonrestricted starting material. In a first attempt we performed TCA precipitation before FASP digestion, but we could still not eliminate contamination. Also, we used an additional 3 h-long ultracentrifugation step on F2 fractions, in order to wash out contaminants and spin down membrane rafts, followed by TCA precipitation and FASP digestion. OptiPrep™ was still present when we associated these three steps together (supplemental Fig. S2). Other types of digestion were performed, including in-solution digestion and in-gel digestion, all of them leading to similar results (data not shown).

We decided to test a more recent sample preparation method, S-Trap, based on suspension-trapping filters that potentially facilitate the washing out of contaminants, such as OptiPrep™ (65). We performed S-trap either alone or in combination with TCA precipitation and with additional SDS in the lysis step. All combinations tested led to complete and reproducible elimination of OptiPrep™ contaminants, with higher protein yields observed with the combination



**Fig. 2.** Comparison of FASP and S-Trap protein digestion on mouse T cell lipid rafts isolated by OptiPrep™ gradient. A: Base peak chromatogram of fraction 2 after digestion by the FASP method. The extracted ion chromatogram (in blue) shows an iodixanol ion (OptiPrep™, doubly charged ion  $m/z$  775.47). B: Base peak chromatogram of fraction 2 digested by the S-Trap method. No iodixanol ion was detected, as shown by the extracted ion chromatogram.

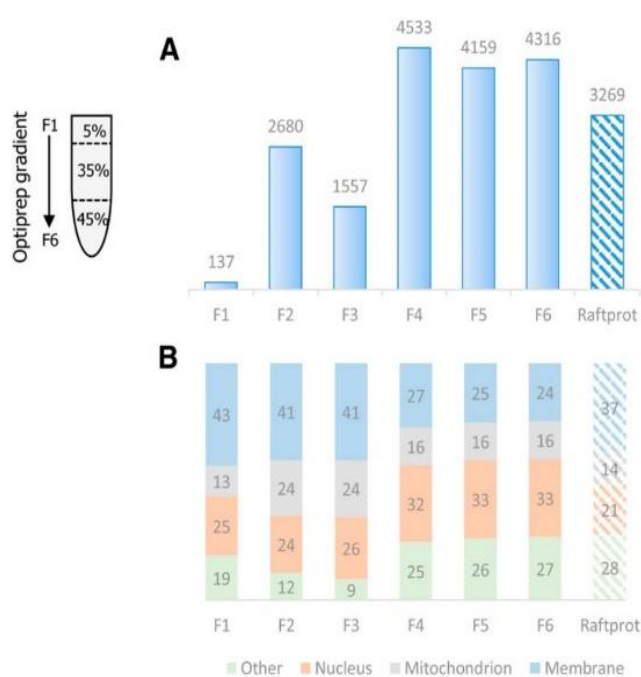


of TCA precipitation and S-trap (supplemental Fig. S3). To verify the suitability of the procedure on low abundant samples, we applied this method to 2–10 million T cells immunoselected from a single mouse spleen, and we succeeded in consistently eliminating contamination (Fig. 2B). TCA precipitation allowed us to concentrate the sample and resolubilize it in 5% SDS, which contributes to solubilization of membrane proteins contained in the raft fraction. Furthermore, the S-Trap protocol proved to be faster than the other tested methods, as well as easier to perform.

### Purity of raft preparation and generation of a T cell raft protein database

To further assess the purity of the raft-enriched fraction from nonstimulated T cells, we analyzed all OptiPrep™ gradient fractions by LC-MS/MS. We performed TCA precipitation with S-Trap digestion, and we performed high pH fractionation of the peptides for all six fractions in order to gain depth in the analysis. The number of proteins identified ranged from 137 to 4,533, with 2,680 proteins identified in fraction 2 (Fig. 3A).

In order to determine the percentage of membrane, nuclear, and mitochondrial proteins, a Gene Ontology cellular component analysis was performed for each fraction.



**Fig. 3.** Number of proteins identified and cell compartment distribution of OptiPrep gradient fractions. T cells were immunoselected from four mice and subjected to raft isolation by the simplified OptiPrep™ density gradient procedure, depicted on the left. Then, proteins were extracted separately by the S-Trap method, pooled, and analyzed by MS. A: Histogram showing the total number of proteins identified in each of the six gradient fractions in comparison with the total number of proteins present in the RaftProt database (right column). B: For each gradient fraction, the cell compartment distribution of identified proteins is indicated, as the percentage of membrane, mitochondrion, nuclear, and other localizations, according to Gene Ontology. The right column shows the global cell compartment distribution of all RaftProt database proteins according to Gene Ontology.

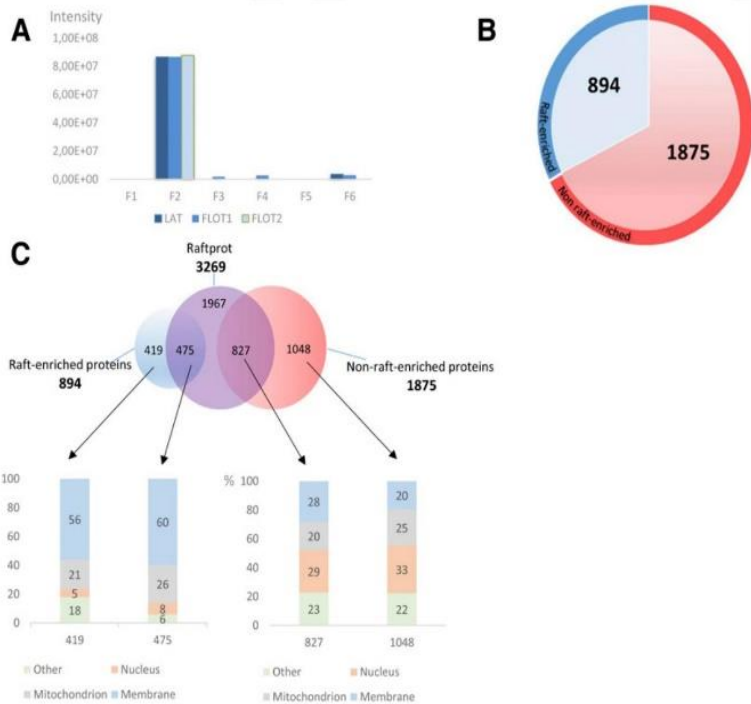
In fraction 2, as expected, we observed a higher percentage of membrane proteins as compared with the other fractions (Fig. 3B). We could identify with a high intensity count of  $8 \times 10^4$  a number of proteins frequently used as raft markers: LAT, which is a raft marker specific to T cells, flotillin-1 (as confirmed above by Western blot), and flotillin-2. All of these three proteins were abundantly identified in fraction 2 and at a much lower intensity (50-fold less) in the other fractions (Fig. 4A).

To establish a raft protein database by following as stringent criteria as possible, we assumed that raft-residing proteins should present the same intensity profile in gradient fractions as LAT, flotillin-1, and flotillin-2, i.e., at least two times more abundant in fraction 2 compared with other fractions. Based on our LC-MS/MS data, we could establish a raft database of 894 proteins (in blue, Fig. 4B). Those proteins not falling into these criteria were classified as “nonenriched in protein rafts” (1,875 proteins in red, Fig. 3B; supplemental Table S1). We believe that these proteins can still be associated with rafts, but they are also or mainly present in cytoplasm, hence their profile in the gradient.

Our database containing 894 proteins was compared with the RaftProt database (3,269 proteins, one-star experiment). Notably, 475 proteins from murine RaftProt overlap with our raft’s T cell database, although the overlap increases to 669 when both human and murine RaftProt databases are used. Gene Ontology analysis revealed the presence of nearly 60% of membrane proteins in our database, regardless of whether they are common to RaftProt or unique (Fig. 4C, supplemental Table S2). On the contrary, the group of proteins contained in F2 and classified as nonenriched in the protein raft database corresponded to a low percentage of membrane localized proteins (28%). This Gene Ontology analysis provides support to consider the 894 proteins in F2 as true raft proteins and could be used as a reference database for nonstimulated T cells. To determine the most significantly enriched pathways and cellular location for the 894 proteins in our raft database, we performed a Fisher’s exact test using keywords and KEGG pathways. The analysis showed a clear enrichment in membrane proteins and related membrane protein pathways as compared with all the proteins identified in all fractions (supplemental Table S3).

### T cell raft protein analysis in resting versus activating conditions

To verify the suitability of the method on low abundant samples purified by OptiPrep gradient, we used T cells from four single Balb/c mice. After negative immunoselection (yield between two and eight million cells), T cells from each mouse were split into two groups: one group ( $n = 4$ ) was not stimulated (T0 minutes) and the other group ( $n = 4$ ) was stimulated for 15 min (T15 minutes) with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Next, we performed membrane raft preparation, TCA precipitation, and S-Trap digestion on gradient fraction 2 and analyzed proteins by LC-MS/MS. The number of identified raft proteins significantly increased in activated T cells compared with resting T cells (supplemental Fig. S4A). Likewise, the abundance



**Fig. 4.** Purity of raft preparation and generation of a T cell raft protein database. T cells were immunoselected from four mice and subjected to raft isolation by the simplified OptiPrep™ density gradient procedure. Then, proteins were extracted separately by the S-trap method, pooled, and analyzed by MS. **A:** Intensities calculated by MaxQuant for three raft markers, namely LAT, flotillin-1 (FLOT1), and flotillin-2 (FLOT2) in all six OptiPrep™ gradient fractions. **B:** Representation of the generated T cell raft protein database. Proteins are divided into those enriched in rafts (abundance ratio in raft over nonraft fractions  $<2$ , red color). **C:** Protein comparison of generated database with RaftProt database and Gene Ontology analysis. The number of exclusive and common proteins is indicated for each case in the upper diagram. The columns in the lower side indicate the percentage of proteins corresponding to each cellular compartment, according to Gene Ontology.

of flotillin-1 was also significantly increased in activated T cells (supplemental Fig. S4B), suggesting that the abundance of rafts is increased in these cells. However, no significant differences were obtained after label-free-based quantitation between the two conditions ( $t$ -test, false discovery rate = 0.01). We therefore proceeded with a manual selection of proteins that were exclusively present in rafts either in stimulating or nonstimulating conditions. This selection was based on the detection in rafts in one condition in all four samples and nondetection in rafts in the other condition in at least four samples. A heatmap showing the selected proteins is presented in **Fig. 5** (supplemental Table S4). Three proteins were found present in the raft fraction selectively at T0, while 39 proteins were selectively detected in rafts at T15. Some of these proteins are known to be involved in T cell activation at the raft level. Among them, we found as the most relevant in the context of T cell activation and raft dynamics the following: Akt2, Nck1, Tgfb1, Tbc1d10, Pdlim1, and intersectin-2. The TGF- $\beta$  ligand, Tgfb1, is a key molecule involved in cell signaling regulating T cell activation and polarization. Akt2 is a key player in the proximal signaling events participating in TCR activation. Nck1, is an adaptor protein involved in actin cytoskeleton remodeling. Tbc1d10 is an activator of the Rab35 GTPase. Pdlim1 has a role in the regulation of actin cytoskeleton networks. Intersectin-2 (Itsn2) is known to participate in TCR internalization.

In order to validate the mass spectrometric results, Akt2 and Nck1 were selected for capillary Western immunoassay, (WES) a method that allows detection of very small amounts of proteins (a few micrograms). WES analysis demonstrated the effective recruitment of Akt2 and Nck1 in rafts at T15, which is consistent with our mass spectrometric data (**Fig. 6**).

Altogether, these data demonstrate that the described method for OptiPrep™ gradient raft isolation and S-Trap

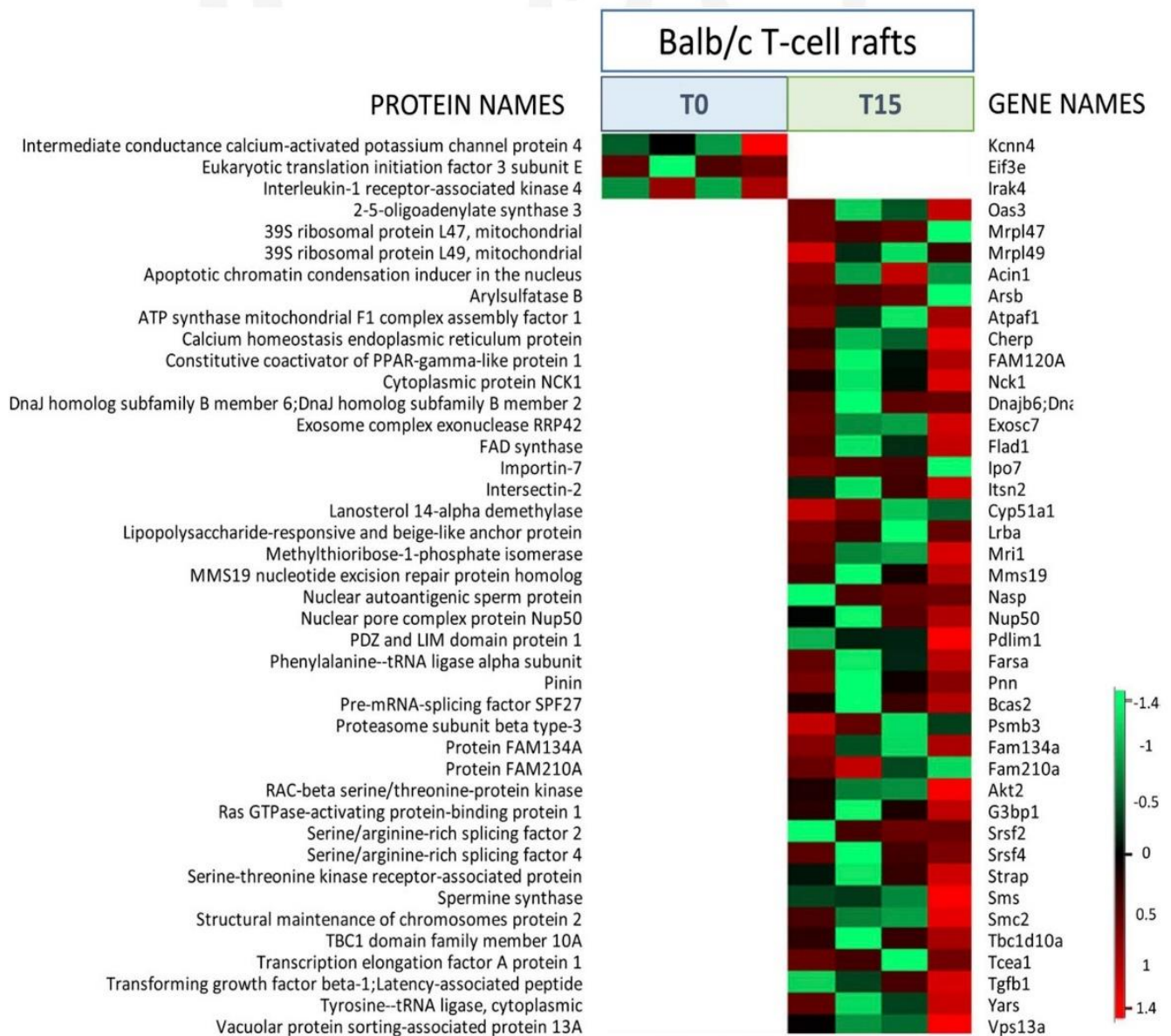
protein preparation is suitable for the differential analysis of low abundant raft proteins in T cells.

## DISCUSSION

The present work shows, for the first time, a global analysis of the membrane raft proteome of ex vivo T cells isolated from individual mice. Moreover, we propose a method that combines several improving features, such as the isolation capacity of OptiPrep-based density gradient, a straightforward sample preparation (S-Trap), and a label-free quantitation, globally providing a high yield of identified proteins.

The first isolation of proteins from T cells contained in triton-insoluble membranes was done back in the nineties (66). Given the early understanding that membrane rafts play a fundamental role in T cell activation (67–71), knowing the protein composition of these microdomains has represented a key objective to understand their structure, dynamics, and function. A pioneering characterization of the proteome of T cell membrane microdomains was performed on the leukemia cell line Jurkat T (20) by LC-MS/MS, while the first study of T cell proteome in activating conditions was approached by flotillin-1 immunoprecipitation (27) and MS.

Gel electrophoresis-based approaches were among the first used to address this question. For example, 1D and 2D gels with staining and MS have been used to resolve and identify proteins associated with TCR activation complexes in Jurkat cells (20). 2D fluorescence difference gel electrophoresis, based on differential fluorochrome labeling, has been applied to study lipid raft proteins after TCR costimulation (22). Bini et al. (20) succeeded in studying the variation in intensity of more than 800 spots in Jurkat cells subjected to TCR costimulation for up to 15 min using a



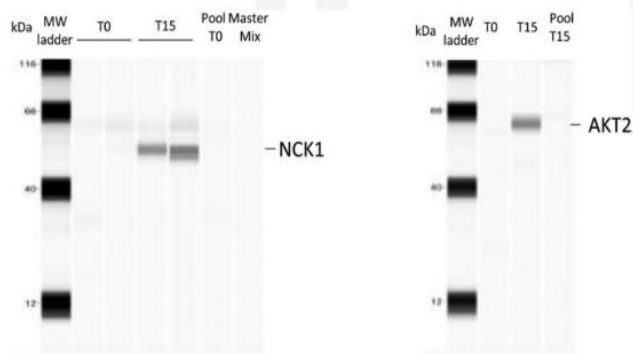
**Fig. 5.** Raft protein analysis on Balb/c T cells with or without anti-CD3/CD28 TCR activation. Heatmap representation from Perseus software of proteins detected (in color) or not detected (in white) in T cell rafts from four individual mice. T cells immunoselected from each mouse were split and either nonstimulated (T0) or stimulated for 15 min (T15) with anti-CD3/anti-CD28 antibodies. The color scale denotes abundance variation (red for more abundant, green for less abundant).

classic 2D gel electrophoresis and MALDI-TOF setting. In the same experimental conditions, von Haller et al. (25) used a gel-free method based on LC separation.

Detergent solubility has been the landmark technique of raft (or DRM, for detergent-resistant microdomain) isolation (20, 25, 26). In our study, a detergent-free method has been used, in which mechanical disruption of membranes is performed, with a high enrichment of raft-like fractions in raft protein markers. Any study on membrane rafts must always be taken cautiously, because cellular membranes may contain a broad range of microdomains that can differ in composition, function, and dynamics (72). The experimental purification approach in all cases will determine the type of microdomain that is targeted. In our work, we have chosen a procedure that allows the purification of low-density membrane fragments highly enriched in bona fide T cell raft markers, such as flotillins, caveolins, and LAT. The high yield of RaftProt-listed proteins strongly

suggests that the microdomains described in this study are close to those existing in living cells. Nevertheless, alternative methods will be needed to validate the results obtained in further functional studies on T cells.

Iodixanol, the chemical component of OptiPrep, was developed as an efficient and rapid way to isolate rat liver peroxisomes (73). Later, it replaced other density gradient procedures in the purification of subcellular structures, including rafts (36, 39, 40, 61, 74–86). The only report to date of a proteomic study following iodixanol-based raft isolation is that of Rose et al. (61), in which DRM from virus-infected plankton species *Emiliania huxleyi* were subjected in parallel to lipidomic and proteomic characterization. The authors reported the identification of 116 proteins from the infected cells and 86 proteins from control cells. With speed being the main advantage of iodixanol with respect to sucrose gradients, its limiting characteristic is the spectral interference with protein identification by MS,



**Fig. 6.** WES analysis of Akt2 and Nck1. Capillary Western immunoassay (WES) was used to validate some of the proteins (Akt2 and Nck1) identified as differentially recruited by MS. Two hundred microliters of raft fraction collected from the OptiPrep gradient were precipitated with 10% TCA (final concentration) and analyzed by WES. Two biological replicates for T0 and T15 were used for Nck1 detection and one biological replicate for T0 and T15 was used to detect Akt2. Nck1 and Akt2 are detected in the condition T15 only. We used a pool T0 and T15 (rabbit IgG control) and a Master Mix (primary antibodies and secondary antibodies with no protein) to rule out nonspecific binding of antibodies. No bands were detected in these lanes.

resulting in a limited and variable number of identified proteins. This drawback has limited proteomics on raft fractions isolated by this method.

Suspension trapping or S-trap as a preparation technique for bottom-up proteomics applied to low protein amounts was recently developed for cell lysates, membrane preparations, and immunoprecipitates (65). It has been shown as more efficient than other methods, such as direct FASP and in-solution digestion, and compatible with common extraction buffers and detergents (87–89). Very recently S-trap has been applied in the study of mouse brain microglial proteome (90) and in the search for oral squamous cell carcinoma biomarkers in saliva (91). Here, we have applied, for the first time, S-trap to T cell proteomics and to the analysis of a submembranous fraction (rafts). Guergues et al. (90) succeeded to identify and quantify nearly 4,700 proteins in microglial cells from one single mouse, which represents a number comparable to that obtained in the current work, but from an even smaller number of cells (300,000 vs. two million). Even if the greater size of microglial cells as compared with lymphocytes could account for this difference, this suggests that our method could be further optimized to the analysis of rafts from T cell subpopulations. Due to the multiple advantages of this technique, it is likely to consolidate as a reference procedure in bottom-up proteomics in the years to come.

Interestingly, in our study comparing nonstimulated cells with cells stimulated with anti-CD3/CD28 antibodies for 15 min, label-free quantitation did not result in any statistically significant difference. It could be argued that this is due to the fact that 15 min of stimulation might be a too long lapse to find subtle protein recruitment changes in rafts. In fact, although the immunological synapse can be assembled within seconds or a few minutes, costimulation of TCR provides a more sustained response and raft redistribution is observable after at least 20 min (1). Another

potential explanation is the fact that TCR stimulation induces mostly a clustering and reorganization of existing rafts, along with their resident proteins, rather than a new recruitment of proteins. Most likely, our results are due to the combination of both hypotheses. Nonetheless, several proteins were found specifically present or absent in rafts after T cell activation.

Among the 39 proteins we identified selectively recruited in rafts after 15 min of TCR stimulation, we found some that are known to play a role in T cell function and/or in raft dynamics: Akt2, Nck1, Tgf $\beta$ 1, Tbc1d10, Pdlim1, intersectin-2, and Cherp. Akt2, a member of the PKB/Akt family, plays a key role in the signaling events leading to activation, differentiation, and survival of Jurkat and human primary T cells after TCR activation (92–96). Akt is recruited at the plasma membrane upon TCR activation via the interaction between its pleckstrin homology domain and membrane phosphoinositides and phosphorylated by PKC at Ser473 (97). The presence of Akt2 isoform in rafts has been specifically reported in intestinal cells (98) and platelets (99).

The adaptor protein, Nck1, is also known to interact with the TCR via its SH3.1 and SH2 domains and thereby participates in T cell activation via Erk and MEK phosphorylation (100–102). Its presence in T cell rafts has not been reported to date. Conversely, it has been found in nonraft compartments in human neuroblastoma cells and embryonic cortical neurons (103).

The increased presence of the Tgf $\beta$ 1 ligand in raft-like domains strongly suggests the presence of the cognate receptor. The TGF- $\beta$  receptor has been associated with lipid rafts in previous reports (2). Most interestingly, it has been shown that TCR activation induces the recruitment of TGF- $\beta$  receptor in rafts, subsequently inhibiting SMAD signaling and ultimately resulting in Th1 and Th2 differentiation (3). Intriguingly, serine-threonine kinase receptor-associated protein (Strap), known to interact with both TGF- $\beta$  receptor and PDK1 and to inhibit TGF- $\beta$ -dependent signaling (4), is also present within the proteins found increased in rafts in the current study. Strap has never been reported as associated with rafts or TCR activation, which evokes a complex subjacent regulatory mechanism.


Other proteins of interest include Tbc1d10, an activating protein of the GTPase Rab35. Rab35 participates in the formation of the immunological synapse by regulating TCR transport. Tbc1d10 and Rab35 colocalize with TCR in Jurkat T cells, and knockdown of the former inhibits immunological synapse relocation of the latter (5). Pdlim1 is involved in the formation of actin networks and could play a role in the structuration of lipid raft clusters characteristic of immunological synapse. Pdlim1 expression is increased along with that of caveolin in cells treated with dexamethasone (6), while its role in T cell activation is currently unknown. Intersectin-2 is a recently described protein participating in TCR internalization, via association with Wiskott Aldrich Syndrome protein (WASp) and Cdc42, with maximum interaction with the former at 10 min post-TCR activation (7). Internalization of TCR is a key step in the regulation of T cell activation. It involves

actin cytoskeleton rearrangement and clathrin-dependent endocytosis. Intriguingly, intersectin-2 is found here recruited in lipid rafts, whereas it has been reported to be involved in non-raft-dependent endocytosis (7). Finally, the calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein (Cherp) is likely to play a role in the activation and proliferation of T cells, as its knocking down has been found to impair those processes in Jurkat cells (8). Although its localization to rafts has never been reported before, this finding is intriguing, as  $\text{Ca}^{2+}$  levels are known to rise rapidly following TCR engagement.

In line with the calcium homeostasis events characteristic of TCR stimulation, one of the three proteins excluded from rafts at 15 min postactivation, according to our results, was the potassium calcium-activated channel 4 (KCa3.1 or Kcnn4). This transporter, shown to be associated with rafts upon cell swelling (9), is critical for  $\text{Ca}^{2+}$  influx associated with T cell activation, and so its inhibition blocks T cell activation (10). Another raft-excluded protein, the tyrosine kinase, Irak4, has been shown to participate in TCR activation. In Jurkat cells, Irak4 was found to relocalize to rafts after stimulation with anti-CD3 antibodies, and to induce downstream signals including PKC and NF- $\kappa$ B activation (11). Irak4 was found in rafts in our unstimulating conditions, like in the previous report by Suzuki and colleagues, but to our surprise, it would disappear from those fractions after stimulation instead of being increased. These unexpected and somehow contradictory results could be due either to the different cell models (mouse T cells vs. Jurkat) or to the differences in raft isolation procedures and, subsequently, in the kind of microdomains obtained. The exclusion of these two proteins from rafts 15 min after TCR stimulation warrants a closer study of their raft localization dynamics and functional implications.

In conclusion, our work shows the relevance of an S-Trap-based methodological strategy to deepen into the molecular mechanisms that govern T cell activation. We also provide a new database of T cell raft proteins. Our approach can be applied to other aspects of the biology of T cells and other cell types involving membrane rafts.

#### Data availability

All data are contained either within the article or as supporting information. The MS proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD016476.

#### Author contributions

■■■

#### Author ORCIDs

Mario Ollero  <https://orcid.org/0000-0003-3590-706X>

#### Funding and additional information

This work was partially supported by Fondation du Rein, Fondation Recherche Médicale Grant R13063JJ, and Fondation de l'Avenir Grant AP-RM-17020.

#### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

#### Abbreviations

FASP, filter-aided sample preparation; LAT, linker for activation of T cells; TCR, T cell receptor; TEAB, triethylammonium bicarbonate.

[AQ12]

Manuscript received February 7, 2020, and in revised form August 1, 2020. Published, JLR Papers in Press, August 7, 2020, DOI 10.1194/jlr.D120000672.

## REFERENCES

- Lingwood, D., and K. Simons. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*. **327**: 46–50.
- Simons, K., and M. J. Gerl. 2010. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**: 688–699.
- Pike, L. J. 2006. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* **47**: 1597–1598.
- Jordan, S., and W. Rodgers. 2003. T cell glycolipid-enriched membrane domains are constitutively assembled as membrane patches that translocate to immune synapses. *J. Immunol.* **171**: 78–87.
- Garofalo, T., L. Lenti, A. Longo, R. Misasi, V. Mattei, G. M. Pontieri, A. Pavan, and M. Sorice. 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.
- Khoshnan, A., D. Bae, C. A. Tindell, and A. E. Nel. 2000. The physical association of protein kinase C theta with a lipid raft-associated inhibitor of kappa B factor kinase (IKK) complex plays a role in the activation of the NF-kappa B cascade by TCR and CD28. *J. Immunol.* **165**: 6933–6940.
- Langhorst, M. F., A. Reuter, G. Luxenhofer, E. M. Boneberg, D. F. Legler, H. Plattner, and C. A. Stuermer. 2006. Preformed reggie/flotillin caps: stable priming platforms for macrodomain assembly in T cells. *FASEB J.* **20**: 711–713.
- Martin, M., H. Schneider, A. Azouz, and C. E. Rudd. 2001. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function. *J. Exp. Med.* **194**: 1675–1681.
- Qu, X., K. Kawachi-Kamata, S. M. Miah, T. Hatani, H. Yamamura, and K. Sada. 2005. Tyrosine phosphorylation of adaptor protein 3BP2 induces T cell receptor-mediated activation of transcription factor. *Biochemistry*. **44**: 3891–3898.
- Stuermer, C. A., M. F. Langhorst, M. F. Wiechers, D. F. Legler, S. H. Von Hanwehr, A. H. Guse, and H. Plattner. 2004. PrPc capping in T cells promotes its association with the lipid raft proteins reggie-1 and reggie-2 and leads to signal transduction. *FASEB J.* **18**: 1731–1733.
- Villalba, M., K. Bi, J. Hu, Y. Altman, P. Bushway, E. Reits, J. Neefjes, G. Baier, R. T. Abraham, and A. Altman. 2002. Translocation of PKC[theta] in T cells is mediated by a nonconventional, PI3-K- and Vav-dependent pathway, but does not absolutely require phospholipase C. *J. Cell Biol.* **157**: 253–263.
- Viola, A., S. Schroeder, Y. Sakakibara, and A. Lanzavecchia. 1999. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science*. **283**: 680–682.
- Yashiro-Ohtani, Y., X. Y. Zhou, K. Toyo-Oka, X. G. Tai, C. S. Park, T. Hamaoka, R. Abe, K. Miyake, and H. Fujiwara. 2000. Non-CD28 costimulatory molecules present in T cell rafts induce T cell costimulation by enhancing the association of TCR with rafts. *J. Immunol.* **164**: 1251–1259.
- Giri, B., V. D. Dixit, M. C. Ghosh, G. D. Collins, I. U. Khan, K. Madara, A. T. Weeraratna, and D. D. Taub. 2007. CXCL12-induced partitioning of flotillin-1 with lipid rafts plays a role in CXCR4 function. *Eur. J. Immunol.* **37**: 2104–2116.
- Gómez-Moutón, C., R. A. Lacalle, E. Mira, S. Jimenez-Baranda, D. F. Barber, A. C. Carrera, A. C. Martinez, and S. Manes. 2004. Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis. *J. Cell Biol.* **164**: 759–768.

[AQ10]

[AQ11]

16. Jiao, X., N. Zhang, X. Xu, J. J. Oppenheim, and T. Jin. 2005. Ligand-induced partitioning of human CXCR1 chemokine receptors with lipid raft microenvironments facilitates G-protein-dependent signaling. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 5752–5762.
17. Lin, S. L., C. W. Chien, C. L. Han, E. S. Chen, S. H. Kao, Y. J. Chen, and F. Liao. 2010. Temporal proteomics profiling of lipid rafts in CCR6-activated T cells reveals the integration of actin cytoskeleton dynamics. *J. Proteome Res.* **9**: 283–297.
18. Nguyen, D. H., J. C. Espinoza, and D. D. Taub. 2004. Cellular cholesterol enrichment impairs T cell activation and chemotaxis. *Mech. Ageing Dev.* **125**: 641–650.
19. Nguyen, D. H., B. Giri, G. Collins, and D. D. Taub. 2005. Dynamic reorganization of chemokine receptors, cholesterol, lipid rafts, and adhesion molecules to sites of CD4 engagement. *Exp. Cell Res.* **304**: 559–569.
20. Bini, L., S. Pacini, S. Liberatori, S. Valensin, M. Pellegrini, R. Raggiacchi, V. Pallini, and C. T. Baldari. 2003. Extensive temporally regulated reorganization of the lipid raft proteome following T cell antigen receptor triggering. *Biochem. J.* **369**: 301–309.
21. Gupta, N., B. Wollscheid, J. D. Watts, B. Scheer, R. Aebbersold, and A. L. DeFranco. 2006. Quantitative proteomic analysis of B cell lipid rafts reveals that ezrin regulates antigen receptor-mediated lipid raft dynamics. *Nat. Immunol.* **7**: 625–633.
22. Kobayashi, M., T. Katagiri, H. Kosako, N. Iida, and S. Hattori. 2007. Global analysis of dynamic changes in lipid raft proteins during T cell activation. *Electrophoresis.* **28**: 2035–2043.
23. Razaq, T. M., P. Ozegbe, E. C. Jury, P. Sembi, N. M. Blackwell, and P. S. Kabouridis. 2004. Regulation of T cell receptor signalling by membrane microdomains. *Immunology.* **113**: 413–426.
24. Thomé, C. H., G. A. dos Santos, G. A. Ferreira, P. S. Scheucher, C. Izumi, A. M. Leopoldino, A. M. Simao, P. Ciancaglini, K. T. de Oliveira, A. Chin, et al. 2012. Linker for activation of T cell family member2 (LAT2) a lipid raft adaptor protein for AKT signaling, is an early mediator of alkylphospholipid anti-leukemic activity. *Mol. Cell. Proteomics.* **11**: 1898–1912.
25. von Haller, P. D., S. Donohoe, D. R. Goodlett, R. Aebbersold, and J. D. Watts. 2001. Mass spectrometric characterization of proteins extracted from Jurkat T cell detergent-resistant membrane domains. *Proteomics.* **1**: 1010–1021.
26. von Haller, P. D., E. Yi, S. Donohoe, K. Vaughn, A. Keller, A. I. Nesvizhskii, J. Eng, X. J. Li, D. R. Goodlett, R. Aebbersold, et al. 2003. The application of new software tools to quantitative protein profiling via isotope-coded affinity tag (ICAT) and tandem mass spectrometry: II. Evaluation of tandem mass spectrometry methodologies for large-scale protein analysis, and the application of statistical tools for data analysis and interpretation. *Mol. Cell. Proteomics.* **2**: 428–442.
27. Tu, X., A. Huang, D. Bae, N. Slaughter, J. Whitelegge, T. Crother, P. E. Bickel, and A. Nel. 2004. Proteome analysis of lipid rafts in Jurkat cells characterizes a raft subset that is involved in NF-kappaB activation. *J. Proteome Res.* **3**: 445–454.
28. Grant, M. M., D. Scheel-Toellner, and H. R. Griffiths. 2007. Contributions to our understanding of T cell physiology through unveiling the T cell proteome. *Clin. Exp. Immunol.* **149**: 9–15.
29. Shaw, A. R., and L. Li. 2003. Exploration of the functional proteome: lessons from lipid rafts. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **5**: 294–301.
30. Wollscheid, B., P. D. von Haller, E. Yi, S. Donohoe, K. Vaughn, A. Keller, A. I. Nesvizhskii, J. Eng, X. J. Li, D. R. Goodlett, et al. 2004. Lipid raft proteins and their identification in T lymphocytes. *Subcell. Biochem.* **37**: 121–152.
31. Mohamed, A., H. Robinson, P. J. Erramouspe, and M. M. Hill. 2018. Advances and challenges in understanding the role of the lipid raft proteome in human health. *Expert Rev. Proteomics.* **15**: 1053–1063.
32. Zheng, Y. Z., and L. J. Foster. 2009. Contributions of quantitative proteomics to understanding membrane microdomains. *J. Lipid Res.* **50**: 1976–1985.
33. Mohamed, A., A. D. Shah, D. Chen, and M. M. Hill. 2019. RaftProt V2: understanding membrane microdomain function through lipid raft proteomes. *Nucleic Acids Res.* **47**: D459–D463.
34. Shah, A., D. Chen, A. R. Boda, L. J. Foster, M. J. Davis, and M. M. Hill. 2015. RaftProt: mammalian lipid raft proteome database. *Nucleic Acids Res.* **43**: D335–D338.
35. Rabani, V., S. Davani, S. Gambert-Nicot, N. Meneveau, and D. Montange. 2016. Comparative lipidomics and proteomics analysis of platelet lipid rafts using different detergents. *Platelets.* **27**: 634–641.
36. Shah, M. B., and P. B. Sehgal. 2007. Nondetergent isolation of rafts. *Methods Mol. Biol.* **398**: 21–28.
37. Gaus, K., M. Rodriguez, K. R. Ruberu, I. Gelissen, T. M. Sloane, L. Kritharides, and W. Jessup. 2005. Domain-specific lipid distribution in macrophage plasma membranes. *J. Lipid Res.* **46**: 1526–1538.
38. Macdonald, J. L., and L. J. Pike. 2005. A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J. Lipid Res.* **46**: 1061–1067.
39. Badana, A., M. Chintala, G. Varikuti, N. Pudi, S. Kumari, V. R. Kappala, and R. R. Malla. 2016. Lipid raft integrity is required for survival of triple negative breast cancer cells. *J. Breast Cancer.* **19**: 372–384.
40. Liu, L., K. Zhang, L. Tan, Y. H. Chen, and Y. P. Cao. 2015. Alterations in cholesterol and ganglioside GM1 content of lipid rafts in platelets from patients with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **29**: 63–69.
41. Aatonen, M., S. Valkonen, A. Boing, Y. Yuana, R. Nieuwland, and P. Siljander. 2017. Isolation of platelet-derived extracellular vesicles. *Methods Mol. Biol.* **1545**: 177–188.
42. Aatonen, M. T., T. Ohman, T. A. Nyman, S. Laitinen, M. Gronholm, and P. R. Siljander. 2014. Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. *J. Extracell. Vesicles.* **3**: doi:10.3402/jev.v3.24692.
43. Cao, Z., C. Li, J. N. Higginbotham, J. L. Franklin, D. L. Tabb, R. Graves-Deal, S. Hill, K. Check, W. G. Jerome, L. A. Lapierre, et al. 2008. Use of fluorescence-activated vesicle sorting for isolation of Naked2-associated, basolaterally targeted exocytic vesicles for proteomics analysis. *Mol. Cell. Proteomics.* **7**: 1651–1667.
44. Eichenberger, R. M., M. H. Talukder, M. A. Field, P. Wangchuk, P. Giacomini, A. Loukas, and J. Sotillo. 2018. Characterization of *Trichuris muris* secreted proteins and extracellular vesicles provides new insights into host-parasite communication. *J. Extracell. Vesicles.* **7**: 1428004.
45. Hurwitz, S. N., L. Sun, K. Y. Cole, C. R. Ford 3rd, J. M. Olcese, and D. G. Meckes, Jr. 2018. An optimized method for enrichment of whole brain-derived extracellular vesicles reveals insight into neurodegenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Methods.* **307**: 210–220.
46. Minciacchi, V. R., S. You, C. Spinelli, S. Morley, M. Zandian, P. J. Aspuria, L. Cavallini, C. Giardiello, M. Reis Sobreiro, M. Morello, et al. 2015. Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles. *Oncotarget.* **6**: 11327–11341.
47. Rutter, B. D., and R. W. Innes. 2017. Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins. *Plant Physiol.* **173**: 728–741.
48. Sotillo, J., M. Pearson, J. Potriquet, L. Becker, D. Pickering, J. Mulvenna, and A. Loukas. 2016. Extracellular vesicles secreted by *Schistosoma mansoni* contain protein vaccine candidates. *Int. J. Parasitol.* **46**: 1–5.
49. Suwakulsiri, W., A. Rai, R. Xu, M. Chen, D. W. Greening, and R. J. Simpson. 2019. Proteomic profiling reveals key cancer progression modulators in shed microvesicles released from isogenic human primary and metastatic colorectal cancer cell lines. *Biochim. Biophys. Acta. Proteins Proteomics.* **1867**: 140171.
50. Abramowicz, A., P. Widlak, and M. Pietrowska. 2016. Proteomic analysis of exosomal cargo: the challenge of high purity vesicle isolation. *Mol. Biosyst.* **12**: 1407–1419.
51. Clark, D. J., W. E. Fondrie, Z. Liao, P. I. Hanson, A. Fulton, L. Mao, and A. J. Yang. 2015. Redefining the breast cancer exosome proteome by tandem mass tag quantitative proteomics and multivariate cluster analysis. *Anal. Chem.* **87**: 10462–10469.
52. Kalra, H., C. G. Adda, M. Liem, C. S. Ang, A. Mechler, R. J. Simpson, M. D. Hulett, and S. Mathivanan. 2013. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics.* **13**: 3354–3364.
53. Samuel, M., D. Chisanga, M. Liem, S. Keerthikumar, S. Anand, C. S. Ang, C. G. Adda, E. Versteegen, M. Jois, and S. Mathivanan. 2017. Bovine milk-derived exosomes from colostrum are enriched with proteins implicated in immune response and growth. *Sci. Rep.* **7**: 5933.
54. Jedelský, P. L., P. Dolezal, P. Rada, J. Pýřih, O. Smid, I. Hrdý, M. Sedínová, M. Marcinciková, L. Voleman, A. J. Perry, et al. 2011. The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. *PLoS One.* **6**: e17285.

55. Li, M., W. Du, M. Zhou, L. Zheng, E. Song, and J. Hou. 2018. Proteomic analysis of insulin secretory granules in INS-1 cells by protein correlation profiling. *Biophys. Rep.* **4**: 329–338.
56. Plum, S., S. Helling, C. Theiss, R. E. P. Leite, C. May, W. Jacob-Filho, M. Eisenacher, K. Kuhlmann, H. E. Meyer, P. Riederer, et al. 2013. Combined enrichment of neuromelanin granules and synaptosomes from human substantia nigra pars compacta tissue for proteomic analysis. *J. Proteomics.* **94**: 202–206.
57. Arai, Y., M. Hayashi, and M. Nishimura. 2008. Proteomic analysis of highly purified peroxisomes from etiolated soybean cotyledons. *Plant Cell Physiol.* **49**: 526–539.
58. Joseph, M., M. D. Ludevid, M. Torrent, V. Rofidal, M. Tauzin, M. Rossignol, and J. B. Peltier. 2012. Proteomic characterisation of endoplasmic reticulum-derived protein bodies in tobacco leaves. *BMC Plant Biol.* **12**: 36.
59. Liu, R., Y. Wang, G. Qin, and S. Tian. 2016. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals the role of the tonoplast in fruit senescence. *J. Proteomics.* **146**: 80–89.
60. Shen, H., Z. He, H. Yan, Z. Xing, Y. Chen, W. Xu, and M. Ma. 2014. The fronds tonoplast quantitative proteomic analysis in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *J. Proteomics.* **105**: 46–57.
61. Rose, S. L., J. M. Fulton, C. M. Brown, F. Natale, B. A. Van Mooy, and K. D. Bidle. 2014. Isolation and characterization of lipid rafts in *Emiliania huxleyi*: a role for membrane microdomains in host-virus interactions. *Environ. Microbiol.* **16**: 1150–1166.
62. Lipecka, J., C. Chhuon, M. Bourderioux, M. A. Bessard, P. van Endert, A. Edelman, and I. C. Guerrero. 2016. Sensitivity of mass spectrometry analysis depends on the shape of the filtration unit used for filter aided sample preparation (FASP). *Proteomics.* **16**: 1852–1857.
63. Tyanova, S., T. Temu, P. Sinitcyn, A. Carlson, M. Y. Hein, T. Geiger, M. Mann, and J. Cox. 2016. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods.* **13**: 731–740.
64. Otto, G. P., and B. J. Nichols. 2011. The roles of flotillin microdomains—endocytosis and beyond. *J. Cell Sci.* **124**: 3933–3940.
65. Zougman, A., P. J. Selby, and R. E. Banks. 2014. Suspension trapping (S-Trap) sample preparation method for bottom-up proteomics analysis. *Proteomics.* **14**: 1006–0.
66. Caplan, S., S. Zeliger, L. Wang, and M. Baniyash. 1995. Cell-surface-expressed T cell antigen-receptor zeta chain is associated with the cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 4768–4772.
67. Janes, P. W., S. C. Ley, and A. I. Magee. 1999. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J. Cell Biol.* **147**: 447–461.
68. Kabouridis, P. S. 2006. Lipid rafts in T cell receptor signalling. *Mol. Membr. Biol.* **23**: 49–57.
69. Montixi, C., C. Langlet, A. M. Bernard, J. Thimonier, C. Dubois, M. A. Wurbel, J. P. Chauvin, M. Pierres, and H. T. He. 1998. Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J.* **17**: 5334–5348.
70. Schade, A. E., and A. D. Levine. 2002. Lipid raft heterogeneity in human peripheral blood T lymphoblasts: a mechanism for regulating the initiation of TCR signal transduction. *J. Immunol.* **168**: 2233–2239.
71. Xavier, R., T. Brennan, Q. Li, C. McCormack, and B. Seed. 1998. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity.* **8**: 723–732.
72. Nicolson, G. L. 2014. The fluid-mosaic model of membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim. Biophys. Acta.* **1838**: 1451–1466.
73. Van Veldhoven, P. P., E. Baumgart, and G. P. Mannaerts. 1996. Iodixanol (Optiprep), an improved density gradient medium for the iso-osmotic isolation of rat liver peroxisomes. *Anal. Biochem.* **237**: 17–23.
74. Annaba, F., P. Kumar, A. K. Dudeja, S. Saksena, R. K. Gill, and W. A. Alrefai. 2010. Green tea catechin EGCG inhibits ileal apical sodium bile acid transporter ASBT. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **298**: G467–G473.
75. Berrou, E., and M. Bryckaert. 2009. Recruitment of protein phosphatase 2A to dorsal ruffles by platelet-derived growth factor in smooth muscle cells: dephosphorylation of Hsp27. *Exp. Cell Res.* **315**: 836–848.
76. Gangalum, R. K., I. C. Atanasov, Z. H. Zhou, and S. P. Bhat. 2011. AlphaB-crystallin is found in detergent-resistant membrane microdomains and is secreted via exosomes from human retinal pigment epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **286**: 3261–3269.
77. Li, X., and M. Donowitz. 2008. Fractionation of subcellular membrane vesicles of epithelial and nonepithelial cells by OptiPrep density gradient ultracentrifugation. *Methods Mol. Biol.* **440**: 97–110.
78. Morita, S. Y., T. Tsuda, M. Horikami, R. Teraoka, S. Kitagawa, and T. Terada. 2013. Bile salt-stimulated phospholipid efflux mediated by ABCB4 localized in nonraft membranes. *J. Lipid Res.* **54**: 1221–1230.
79. Norambuena, A., M. I. Poblete, M. V. Donoso, C. S. Espinoza, A. Gonzalez, and J. P. Huidobro-Toro. 2008. P2Y1 receptor activation elicits its partition out of membrane rafts and its rapid internalization from human blood vessels: implications for receptor signaling. *Mol. Pharmacol.* **74**: 1666–1677.
80. Persaud-Sawin, D. A., S. Lightcap, and G. J. Harry. 2009. Isolation of rafts from mouse brain tissue by a detergent-free method. *J. Lipid Res.* **50**: 759–767.
81. Qiu, Y., Y. Wang, P. Y. Law, H. Z. Chen, and H. H. Loh. 2011. Cholesterol regulates micro-opioid receptor-induced beta-arrestin 2 translocation to membrane lipid rafts. *Mol. Pharmacol.* **80**: 210–218.
82. Rimmerman, N., H. B. Bradshaw, E. Kozela, R. Levy, A. Juknat, and Z. Vogel. 2012. Compartmentalization of endocannabinoids into lipid rafts in a microglial cell line devoid of caveolin-1. *Br. J. Pharmacol.* **165**: 2436–2449.
83. Riquier, A. D., D. H. Lee, and A. A. McDonough. 2009. Renal NHE3 and NaPi2 partition into distinct membrane domains. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **296**: C900–C910.
84. Siddiqi, S., A. Sheth, F. Patel, M. Barnes, and C. M. Mansbach 2nd. 2013. Intestinal caveolin-1 is important for dietary fatty acid absorption. *Biochim. Biophys. Acta.* **1831**: 1311–1321.
85. Sultan, A., M. Luo, Q. Yu, B. Riederer, W. Xia, M. Chen, S. Lissner, J. E. Gessner, M. Donowitz, C. C. Yun, et al. 2013. Differential association of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor (NHERF) family of adaptor proteins with the raft- and the non-raft brush border membrane fractions of NHE3. *Cell. Physiol. Biochem.* **32**: 1386–1402.
86. Wani, N. A., and J. Kaur. 2011. Reduced levels of folate transporters (PCFT and RFC) in membrane lipid rafts result in colonic folate malabsorption in chronic alcoholism. *J. Cell. Physiol.* **226**: 579–587.
87. Elinger, D., A. Gabashvili, and Y. Levin. 2019. Suspension trapping (S-Trap) is compatible with typical protein extraction buffers and detergents for bottom-up proteomics. *J. Proteome Res.* **18**: 1441–1445.
88. HaileMariam, M., R. V. Eguez, H. Singh, S. Bekele, G. Ameni, R. Pieper, and Y. Yu. 2018. S-Trap, an ultrafast sample-preparation approach for shotgun proteomics. *J. Proteome Res.* **17**: 2917–2924.
89. Ludwig, K. R., M. M. Schroll, and A. B. Hummon. 2018. Comparison of in-solution, FASP, and S-Trap based digestion methods for bottom-up proteomic studies. *J. Proteome Res.* **17**: 2480–2490.
90. Guergues, J., P. Zhang, B. Liu, and S. M. Stevens, Jr. 2019. Improved methodology for sensitive and rapid quantitative proteomic analysis of adult-derived mouse microglia: application to a novel in vitro mouse microglial cell model. *Proteomics.* **19**: e1800469.
91. Lin, Y. H., R. V. Eguez, M. G. Torralba, H. Singh, P. Golusinski, W. Golusinski, M. Masternak, K. E. Nelson, M. Freire, and Y. Yu. 2019. Self-assembled S-Trap for global proteomics and salivary biomarker discovery. *J. Proteome Res.* **18**: 1907–1915.
92. Bauer, B., and G. Baier. 2002. Protein kinase C and AKT/protein kinase B in CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes: new partners in TCR/CD28 signal integration. *Mol. Immunol.* **38**: 1087–1099.
93. Genot, E. M., C. Arriemerlou, G. Ku, B. M. Burgering, A. Weiss, and I. M. Kramer. 2000. The T cell receptor regulates Akt (protein kinase B) via a pathway involving Rac1 and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol. Cell Biol.* **20**: 5469–5478.
94. Juntilla, M. M., J. A. Wofford, M. J. Birnbaum, J. C. Rathmell, and G. A. Koretzky. 2007. Akt1 and Akt2 are required for alphabeta thymocyte survival and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**: 12105–12110.
95. Lafont, V., E. Astoul, A. Laurence, J. Liautard, and D. Cantrell. 2000. The T cell antigen receptor activates phosphatidylinositol 3-kinase-regulated serine kinases protein kinase B and ribosomal S6 kinase 1. *FEBS Lett.* **486**: 38–42.
96. Parry, R. V., K. Reif, G. Smith, D. M. Sansom, B. A. Hemmings, and S. G. Ward. 1997. Ligation of the T cell co-stimulatory receptor

- CD28 activates the serine-threonine protein kinase protein kinase B. *Eur. J. Immunol.* **27**: 2495–2501.
97. Yang, L., G. Qiao, H. Ying, J. Zhang, and F. Yin. 2010. TCR-induced Akt serine 473 phosphorylation is regulated by protein kinase C- $\alpha$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **400**: 16–20.
98. Li, X., S. Leu, A. Cheong, H. Zhang, B. Baibakov, C. Shih, M. J. Birnbaum, and M. Donowitz. 2004. Akt2, phosphatidylinositol 3-kinase, and PTEN are in lipid rafts of intestinal cells: role in absorption and differentiation. *Gastroenterology.* **126**: 122–135.
99. Ohtsuka, H., T. Iguchi, M. Hayashi, M. Kaneda, K. Iida, M. Shimonaka, T. Hara, M. Arai, Y. Koike, N. Yamamoto, et al. 2017. SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 Signaling in Lipid Rafts Induces Platelet Aggregation via PI3 Kinase-Dependent Akt Phosphorylation. *PLoS One.* **12**: e0169609.
100. Ngoenkam, J., P. Paensuwana, K. Preechanukul, B. Khamsri, I. Yiemwattana, E. Beck-Garcia, S. Minguet, W. W. Schamel, and S. Pongcharoen. 2014. Non-overlapping functions of Nck1 and Nck2 adaptor proteins in T cell activation. *Cell Commun. Signal.* **12**: 21.
101. Paensuwana, P., F. A. Hartl, O. S. Yousefi, J. Ngoenkam, P. Wipa, E. Beck-Garcia, E. P. Dopfer, B. Khamsri, D. Sanguansersri, S. Minguet, et al. 2016. Nck binds to the T cell antigen receptor using its SH3.1 and SH2 domains in a cooperative manner, promoting TCR functioning. *J. Immunol.* **196**: 448–458.
102. Paensuwana, P., J. Ngoenkam, B. Khamsri, K. Preechanukul, D. Sanguansersri, and S. Pongcharoen. 2015. Evidence for inducible recruitment of Wiskott-Aldrich syndrome protein to T cell receptor-CD3 complex in Jurkat T cells. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* **33**: 189–195.
103. Petrie, R. J., B. Zhao, F. Bedford, and N. Lamarche-Vane. 2009. Compartmentalized DCC signalling is distinct from DCC localized to lipid rafts. *Biol. Cell.* **101**: 77–90.



#### 1.4.4 IMPACT DE L'EXPRESSION DE CMIP SUR LE PROTEOME DES RAFTS DES LT

##### **Introduction**

Afin d'étudier l'impact de CMIP dans l'activation du LT, nous avons appliqué le même type d'analyse sur les LT purifiés à partir d'un modèle murin de surexpression de CMIP humain spécifique du LT. Les résultats préliminaires montrent l'inhibition par CMIP des voies de signalisation PI3K/Akt et NF- $\kappa$ B, ainsi que l'interaction spécifique de CMIP avec les phosphoinositides membranaires, sa présence dans les rafts des podocytes et un rôle majeur dans l'organisation de ces microdomaines membranaires dans le lymphocyte T.

##### **Objectifs de l'étude**

Les analyses réalisées sur ce modèle nous permettraient de mieux comprendre l'effet de CMIP sur le protéome des rafts lors de l'activation du LT. Les résultats de notre laboratoire suggèrent que CMIP pourrait constituer une cible thérapeutique dans le contexte du SNI. Par conséquent, une meilleure compréhension de sa fonction aurait un impact significatif sur la prise en charge des malades.

##### **Résultats obtenus**

Les LT provenant de rates de 4 souris différentes ont été immunosélectionnés par colonne magnétique, synchronisés puis stimulés ou non par les anticorps ciblant CD3 et CD28 pendant 15 minutes. Les protéines des rafts ont été purifiées après ultracentrifugation dans un gradient de densité en utilisant une solution d'iodixanol. L'analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier et de quantifier en moyenne 2222 protéines en condition non activée et 2320 protéines en condition activée.

D'après les résultats obtenus sur les souris WT, Nck1 est recrutée dans des conditions normales d'activation dans les rafts ou associée à des protéines des rafts lors de l'activation du TCR du LT. Cette protéine, qui joue un rôle crucial dans l'organisation du cytosquelette, n'est plus recrutée ou associée aux protéines des rafts en présence de CMIP. Par ailleurs, Akt2, recrutée dans les rafts dans des conditions d'activation chez les souris WT, est constitutivement localisée dans les rafts en présence de CMIP, même avant l'activation. Cette protéine est également présente dans les rafts de LT de souris LCK dans des conditions non activées. A l'instar de Nck1, les protéines Itsn2, Pdlim1, Tbc1d10a et Tgfb1 jouant un rôle dans la fonction du LT et/ou dans la dynamique des protéines des rafts, ne sont plus recrutées dans les rafts chez les souris LCK, à l'exception de Cherp (Figure 20).

## Conclusions

Nos résultats suggèrent que CMIP a un impact sur l'activation et la prolifération des LT mais aussi sur l'organisation du cytosquelette via Nck1 dans le LT, ce qui reflète les résultats obtenus dans le podocyte (Zhang *et al.*, 2010). Des confirmations par WES sont en cours.



Figure 20. Recrutement différentiel des protéines dans les rafts en fonction de la présence de CMIP

#### 1.4.5 SIGNALISATION PROXIMALE DU PODOCYTE SOUS L'EFFET DES ECHANGES PLASMATIQUES DE PATIENTS EN RECIDIVE POST-GREFFE DE LA HSF

##### **Introduction**

Le lien physiopathologique entre le lymphocyte T et le podocyte dans le contexte du SNI reste un terrain insuffisamment exploré. Les hypothèses actuelles penchent sur la sécrétion d'un facteur soluble par le LT ayant un effet direct délétère pour les podocytes. Nous avons choisi de travailler avec des échanges plasmatiques car les grandes quantités (3L) récupérées après une session de plasmaphérèse permettent de réaliser un grand nombre d'expériences à partir du même échantillon.

##### **Objectifs de l'étude**

Nous avons décidé d'explorer le protéome des rafts et le phosphoprotéome des podocytes incubés en présence de fluide d'échange plasmatique de patients de SNI, afin de mettre en évidence les modifications des voies de signalisation proximales altérées dans le podocyte, afin de mieux comprendre l'effet des potentiels facteurs circulants responsables de la récidence.

##### **Résultats obtenus**

Nous avons collecté les échanges plasmatiques de patients HSF venant d'être greffés en récidence (rFSGS) ainsi que des échanges plasmatiques de patients contrôles (non HSF) afin d'identifier les mécanismes qui sont spécifiques à la récidence. Etant donné que les traitements ont une influence sur le protéome, nous avons choisi d'inclure dans notre groupe contrôle des patients qui ont également eu une greffe rénale et ayant reçu les mêmes traitements que les patients HSF récidivants, à savoir des corticostéroïdes et des immunosuppresseurs pour prévenir les rejets de greffe.

Les résultats raftomiques ont permis d'identifier et de quantifier 3163 protéines au total. La pureté de l'analyse des rafts a été évaluée par Western-Blot mais également par les intensités des ions MS des protéines marqueurs des rafts : la flotilline-1 et la flotilline-2. De plus, une analyse Gene Ontology Cellular Component a permis de déterminer quelle fraction cellulaire était la plus représentée. Sans surprises, les protéines membranaires sont plus représentées dans la purification des rafts par rapport au total, ainsi que les protéines membranaires plasmatiques et les exosomes. L'analyse raftomique a mis en évidence une augmentation du recrutement des protéines du complexe Ragulator (LAMTOR-2, LAMTOR-3, LAMTOR-4 et LAMTOR-5) chez les patients rFSGS concomitant avec une diminution du recrutement des protéines mitochondriales. Le complexe Ragulator est essentiel pour l'activation de mTORC1 dans la voie mTOR et des études ont montré que mTOR contrôlait la dynamique des protéines mitochondriales. Ces résultats suggèrent une dérégulation de la voie mTOR dans les podocytes traités avec du plasma de patients rFSGS.

Les données phosphoprotéomiques ont permis de quantifier 5084 phosphosites au total dont 66 sites de phosphorylation qui sont statistiquement différentes entre les deux groupes. Sur ces 66 phosphoprotéines, 32 sites étaient surexprimés ou seulement détectés dans le groupe rFSGS par rapport au contrôle tandis que 34 sites étaient sous-exprimés ou non détectés dans le groupe rFSGS par rapport au contrôle. Parmi les 66 phosphoprotéines dont l'expression est modulée : 13 phosphoprotéines sont associées à un réarrangement du cytosquelette et 5 phosphoprotéines sont impliquées dans l'activation de mTOR.

### **Conclusions**

Nos résultats suggèrent une dérégulation de la voie mTOR et du cytosquelette d'actine au niveau du recrutement des protéines dans les rafts ainsi qu'au niveau des phosphorylations.

**Early global signaling response of human podocytes to recurrent idiopathic nephrotic syndrome plasma**

Cerina Chhuon<sup>1,2</sup>, Shao-Yu Zhang<sup>2</sup>, Berkan Savas<sup>2</sup>, Cécile Charrière-Bertrand<sup>2</sup>, Vincent Jung<sup>1</sup>, Joanna Lipecka<sup>1</sup>, André Pawlak<sup>2</sup>, Vincent Audard<sup>2,3</sup>, Dil Sahali<sup>2,3,4</sup>, Ida Chiara Guerrera<sup>1</sup>, Mario Ollero<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Proteomic Platform Necker, PPN, Structure Fédérative de Recherche SFR Necker US24, 75015, Paris, France

<sup>2</sup>Institut Mondor de Recherche Biomédicale, INSERM, U955, 94010 Créteil, France

<sup>3</sup>AP-HP (Assistance Publique des Hôpitaux de Paris), Department of Nephrology and Renal Transplantation, Groupe Hospitalier Henri-Mondor, 94010 Créteil, France

<sup>4</sup>Université Paris Est Créteil, 94010, Créteil, France

## ABSTRACT

Non-genetic idiopathic nephrotic syndrome (INS) is a rare glomerulopathy attributed to direct or indirect interaction of putative circulating factors with podocytes. One of the manifestations of the disease is the recurrence of focal and segmental glomerulosclerosis (rFSGS) within hours after renal transplant in certain individuals. To date, the nature and identity of circulating factors has not been confirmed, while the pathogenic mechanisms in the podocyte are partially understood. We aimed to study the early proximal signaling events in podocytes to the plasma from post-transplant recurrent patients, by a combination of phosphoproteomics and lipid raft proteomics (raftomics). We incubated differentiated human podocytes for 30min with 10% plasma exchange (PE) fluid from either rFSGS patients or from non-INS patients having undergone transplant rejection, the latter used as controls. We performed differential phosphoproteomics after phosphopeptide enrichment in a TiO<sub>2</sub> column. In parallel, we isolated lipid rafts and performed differential proteomics by LC-MS/MS analysis. The ensemble of results revealed profound differences in proteins involved in the mTOR pathway, in autophagy, and in cytoskeleton organization. Validation experiments suggested an altered phosphorylation pattern of Hsp27. The observed changes associated with rFSGS plasma incubation highlight some of the mechanisms involved in FSGS recurrence and could be used as specific early markers of circulating factor activity on podocytes.

## INTRODUCTION

Non-genetic Idiopathic nephrotic syndrome (INS) is a group of chronic diseases characterized by proteinuria, hypoalbuminemia, dyslipidemia and edema (1). The ultimate origin of this pathological condition is currently unknown, but a strong body of evidence points at an immune dysfunction (2-6). No specific treatment is available, but corticosteroids and immunosuppressants constitute at present the first line therapy. Nevertheless, a high proportion of INS patients do not respond to corticosteroid treatment, or develop resistance, which ultimately leads to chronic renal failure and the only perspective of replacement therapy, namely dialysis or kidney transplantation (7). In the latter case, recurrence of INS after transplantation occurs in 30 to 50% of patients (8). A number of observations suggest the association of INS recurrence with an extrarenal circulating factor of protein nature, also called glomerular permeability factor (9-15). This has been the subject of intense research, leading to identifying several potential candidates, though none of them confirmed to date as a bona fide glomerular permeability factor (16) (17) (18) (19). Research has been focused either on a direct search in patient serum or plasma (20,21), urine (22) (23) or on the response to patient material of either glomeruli (15) (24) or podocytes (25,26), the main cell type in the glomerular permeability barrier.

The study of podocyte signaling events in response to recurrent INS plasma/serum has unveiled or confirmed the involvement of several pathways and proteins in the pathogenesis of INS recurrence, such as TNF- $\alpha$  (25) and  $\beta$ 3-integrin (16,27) pathways, proteins of the slit diaphragm like podocin and nephrin (28), TRPC channels (26), protease activated receptor 1 (PAR1) activity and vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) phosphorylation (29), the small GTPase Rac1 (30) and cytoskeletal proteins (31). Many of these components are present or associated with in raft-like membrane microdomains, suggesting that the dynamics of raft recruitment of proteins can trigger intracellular signaling responses. This implies that early proximal events are decisive in the fate of podocyte structure and thereby of glomerular function. Global molecular approaches have never been used in this context.

In the present work, we have analyzed the response of human podocytes to a short contact – 30 minutes- with plasma exchange fluid from patients with recurrent INS. We combined the analysis of both raft proteome and total cell phosphoproteome.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

Four control patients (CTRL1, CTRL2, CTRL3 and CTRL4, three male and 1 female aged between 45 and 74 years old) clinically diagnosed with nephropathies other than FSGS, such as IgA nephropathy or diabetic nephropathy (Table 1). Control patients faced humoral rejection month or years after renal transplantation and consequently received several sessions of plasma exchange (PE). Date of sampling corresponds to the first session plasma exchange. Four FSGS patients (rFSGS1, rFSGS2, rFSGS3, rFSGS4) developed recurrence of FSGS days or months after renal transplantation. Among these patients, two were male and two were female. The age of the patients ranged from 21 and 70 years old. ProtU/CreatU levels ( $>100$  mg/mmol for FSGS patients) and serum creatinine levels are reported in the table at the date of sampling, Number of transplantations per patient is indicated in the table. All patients were submitted to similar immunosuppressor therapy before (or after) plasma exchange session. For all patients, plasma exchange was collected and stored

## Cell culture and treatment

Immortalized human podocytes (AB 8/13) were cultured in collagen A coated-plates (0.1mg/mL) in RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum (FCS), 1% penicillin, 1% streptomycin, and 1% Insulin-transferrin-selenium at 33°C. Differentiation was induced by maintaining stable podocyte cell lines at 37°C for 10 days. Before treatment, podocytes were starved in 2% FCS for 4 hours. Podocytes were then treated with 10% plasma exchange from 8 different patients (4 controls and 4 rFSGS, table 1) for 30min. After treatment, cells were washed thoroughly three times with ice-cold PBS. For lipid raft analysis, cells were directly prepared without freezing the cells pellet. For the phosphoproteome, cells were lysed for 1h at 4°C under rotary agitation with RIPA 1X with 1% SDS final concentration, with PhosSTOP™, complete protease inhibitor cocktail (Roche), 1µL of MgCl<sub>2</sub> 100mM and 1µL Benzonase and stored at -80°C before analysis. In a separate series of experiments, podocytes were incubated with 10% plasma exchange fluid for 30min, 1h, 4h and 24h. Cell protein extracts were prepared in lysis buffer B (150 mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH 7.5, 2 mM DTT, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 1% NP40, 1 mM protease inhibitors, 1 mM NaF, and 1 mM sodium orthovanadate).

## Lipid raft preparation using OptiPrep™

Lipid raft-like microdomains were obtained by a detergent-free method based on the one described by McDonald and Pike (32). Podocytes were resuspended in 800µl of MBS/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer (25mM MES, 150mM NaCl, 250mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH6; supplemented with 1mM PMSF and phosphatase and protease inhibitor cocktails) and lysed by passaging 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 either 60% OptiPrep™ (Axis Shield) for a final volume of 2ml of 40% OptiPrep™. A three-step discontinuous density gradient was made by sequentially placing 2ml of either 30% OptiPrep™ in MBS/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer, and 1ml of 5% OptiPrep™. The mixture was spun in a TL-100 rotor at 268,000×g for 2h in an Optima MAX-XP ultracentrifuge (Beckman Coulter). After spinning, one fraction of 600µl followed by 5 fractions of 900µl were collected from top to bottom. After verification, fraction 2 containing rafts was subjected to subsequent analysis.

To analyze the distribution of flotillin-1, fractions were precipitated by addition of 10% trichloroacetic acid (final concentration), incubated overnight at -20°C and washed three times in cold ethanol. The resulting dry protein pellets were solubilized in equal volumes of 1× Laemmli buffer and analyzed by western blot.

## Suspension trapping (S-Trap)

S-Trap™ micro spin column digestion was performed on OptiPrep™ raft fractions according to our previous study (33). Briefly, proteins were precipitated overnight using a 10% TCA final concentration and washed four times with cold ethanol. Proteins were resuspended and solubilized in 5% SDS, 50mM triethylammonium bicarbonate (TEAB, pH 7.55), reduced with 20mM TCEP solution and alkylated with the addition of chloroacetamide to a final concentration of 50mM. Aqueous phosphoric acid was added to a final concentration of 1.2%. Colloidal protein particulate was formed with the addition of 231µL S-Trap binding buffer (90% aqueous methanol, 100mM TEAB, pH7.1). The mixture was placed on S-Trap micro 1.7mL columns and centrifuged at 4,000g for 10 seconds. Columns were washed five times with 150µL S-Trap binding buffer and centrifuged at 4,000g for 10 seconds with 180-degree rotation of the columns between washes. Samples were digested with 2µg of trypsin (Promega) at 47°C for 1h. Peptides were eluted with 40µL of 50mM TEAB followed by 40µL of 0.2% aqueous formic acid and by 35µL 50% acetonitrile containing 0.2% formic acid. Peptides were finally vacuum dried.

## Filter aided sample preparation (FASP)



FASP was performed on 200µg of proteins according to (Lipecka *et al.*, 2016) to digest proteins for the phosphoproteome. Briefly, samples were reduced with 0.1 M dithiothreitol (DTT) at 60°C for 1 hour. Proteins were transferred to Microcon filter units (30 kDa cut-off) and washed twice with 200 µl of UA buffer (0.1M Tris, 8M urea, pH 8.9) and concentrated by centrifugation at 14,000 x g for 15 minutes. Proteins were alkylated with 100 µl of IAA buffer (0.05M iodoacetamide, 0.1M Tris, pH 8.9) at room temperature in the dark for 20 minutes and centrifuged at 14,000 x g for 10 minutes. Proteins were then washed twice by adding 100 µl of UA buffer before centrifugation at 14,000 x g for 10 minutes, and twice with 100 µl of ABC buffer (0.05M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) before centrifugation at 14,000 x g for 10 minutes. Filter units were transferred to new collection tubes and samples were incubated with 40 µl of ABC buffer containing 1.6 µg of trypsin in a humidity chamber at 37°C for 18 hours. Tubes were centrifuged at 14,000 x g for 10 minutes, 40 µl of ABC buffer were added and tubes were centrifuged again. Peptides were finally recovered in collection tubes.

### **Phosphopeptide enrichment by titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) and phosphopeptide purification by graphite carbon (GC).**

Samples were clarified by centrifugation at 14,000g for 10min. Protein concentration was determined with DC assay (Biorad) on clarified lysates. 210µg of protein were digested by FASP (34). After digestion, 20µg of protein were saved for total proteome analysis while 190µg were used for subsequent phosphopeptide enrichment. Phosphopeptide enrichment was carried out using a Titansphere TiO<sub>2</sub> Spin tip (3 mg/200 µL, Titansphere PHOS-TiO, GL Sciences Inc, Japan) an estimated 1.2 mg of digested proteins for each biological replicate. Briefly, the TiO<sub>2</sub> Spin tips were conditioned with 20 µL of solution A (80% acetonitrile, 0,1% TFA), centrifuged at 3,000 x g for 2min and equilibrated with 20µL of solution B (75% acetonitrile, 0,075% TFA, 25% lactic acid) followed by centrifugation at 3,000 x g for 2 min. Peptides were resuspended in 10 µL of 2% TFA, mixed with 100 µL of solution B and centrifuged at 1,000 x g for 10min. Sample was applied back to the TiO<sub>2</sub> Spin tips two more times in order to increase the adsorption of the phosphopeptides to the TiO<sub>2</sub>. Spin tips were washed with, sequentially, 20 µL of solution B and two times with 20 µL of solution A. Phosphopeptides were eluted by the sequential addition of 50 µL of 5% NH<sub>4</sub>OH and 50 µL of 5% pyrrolidine. Centrifugation was carried out at 1,000 x g for 5 min.

Phosphopeptides were further purified using GC Spin tips (GL-Tip, Titansphere, GL Sciences Inc, Japan). Briefly, the GC Spin tips were conditioned with 20 µL of solution A, centrifuged at 3,000 x g for 2 min and equilibrated with 20 µL of solution C (0,1% TFA in HPLC-grade water) followed by centrifugation at 3,000 x g for 2 min. Eluted phosphopeptides from the TiO<sub>2</sub> Spin tips were added to the GC Spin tips and centrifuged at 1,000 x g for 5 min. GC Spin tips were washed with 20 µL of solution C. Phosphopeptides were eluted with 70 µL of solution A (1,000 x g for 3 min) and vacuum dried.

### **NanoLC-MS/MS protein identification and quantification**

Samples were resuspended in 35 µL of 1% ACN, 0.1% TFA in HPLC-grade water. For each run, 5 µL was injected in a nanoRSLC-Q Exactive PLUS (RSLC Ultimate 3000) (Thermo Scientific, Waltham MA, USA). Peptides were loaded onto a µ-precolumn (Acclaim PepMap 100 C18, cartridge, 300 µm i.d.×5 mm, 5 µm) (Thermo Scientific), and separated on a 50 cm reversed-phase liquid chromatography column (0.075 mm ID, Acclaim PepMap 100, C18, 2 µm) (Thermo Scientific). 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 minutes), 40% to 80% (5 minutes). At 125 minutes, the gradient returned to 5% to re-equilibrate the column for 20 minutes before the next injection. Two blanks were run between samples to prevent sample carryover. Peptides eluting from the column were analyzed by data dependent MS/MS, using a top-10 acquisition method. Peptides were fragmented using higher-energy collisional dissociation (HCD). 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  $3.10^6$  counts with maximum injection time set to 200 ms, while MS/MS AGC target was set to  $1.10^5$  with maximum injection time set to 120 ms. The MS scan range was from 400 to 2000 m/z. Dynamic exclusion was set to 30 seconds duration. Three separate mass spectrometry runs (i.e. technical replicates) were acquired for each biological replicate under the identical mass spectrometric conditions to account for instrument-related variability and to improve accuracy of the label-free quantification.

### **MS data processing and bioinformatic analysis**

MS data processing and bioinformatics were done as previously described with some modifications (63). Briefly, raw MS files were processed with the MaxQuant software version 1.5.8.3 and searched with the Andromeda search engine against the human UniProt database (release May 2019, 20,199 entries). To search for parent mass and fragment ions, we set the mass deviation at 4.5 ppm and 20 ppm, respectively. The minimum peptide length was set to seven amino acids and strict specificity for trypsin cleavage was required, allowing up to two missed cleavage sites. Match between runs was allowed. Carbamidomethylation (Cys) was set as fixed modification, whereas oxidation (Met) and protein N-terminal acetylation phosphorylation (Ser, Thr, Tyr) were set as variable modifications (only for phosphoproteomics analysis) 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 (63)

Statistical and bioinformatic analysis, including heatmaps were performed with Perseus software (version 1.5.5.3) freely available at [www.perseus-framework.org](http://www.perseus-framework.org). Gene Ontology (GO) annotation was performed on Perseus software. We retrieved annotations to the GO cellular component terms “membrane”, “extracellular vesicular exosome”, “plasma membrane”, “mitochondrion” and “endoplasmic reticulum membrane”.

The phosphopeptides output table and the corresponding logarithmic intensities were used for phosphopeptide analysis. The phosphopeptide table was expanded to separate individual phosphosites, and we kept all sites identified in four replicates in at least one group (CTRL vs rFSGS). Missing values were imputed using width=0.2 and down-shift=3. We represented on a heatmap the significantly altered phosphosites (t-test  $S_0=0.1$ , FDR=0.05).

The protein groups output table was used for total proteome analysis, we kept only proteins identified in all four replicates in at least one group (CTRL vs rFSGS). Missing values were imputed using width=0.3 and down-shift=2.5. For volcano plot we used t-test,  $S_0=0.5$ , FDR=0.01 (for class B proteins) and the outer volcano using  $S_0=0.5$ , FDR=0.001 (class A proteins).

### **Immunodetection and fluorescence microscopy**

Selected markers were validated by western blot analysis. Protein extracts (35 $\mu$ g) were subjected to SDS page electrophoresis on 10% polyacrylamide gels. Primary antibodies targeted human Flotillin-1 (mouse monoclonal, BD Biosciences, 1:1000), LAMTOR2 (rabbit polyclonal, Invitrogen, 1:1000), p62-sequestosome 1 (rabbit polyclonal, Proteintech, 1:1000), phosphorylated S6 kinase (mouse monoclonal, Santa Cruz, 1:1000), total S6 kinase (mouse monoclonal, Santa Cruz, 1:1000), LC3B (rabbit polyclonal, Cell Signaling, 1:1000), phosphorylated Hsp27 (Ser82, rabbit monoclonal, Abcam, 1:1000), total Hsp27 (rabbit monoclonal, Abcam, 1:1000), alpha-tubulin (rat monoclonal, Abcam, 1:2000), and GAPDH (rabbit polyclonal, Cell Signaling, 1:3000). HRP-coupled secondary antibodies were used at 1:3000 (anti-rabbit and anti-mouse) and 1:2500 (anti-rat) dilutions. Chemiluminescence detection and band quantitation was done in a Vilber Lourmat camera and associated software. Band intensities were statistically analyzed by the ratio paired T-test with the Graph Pad 8 software package. Statistical significance was attributed to  $p<0.05$  values. Cytoskeletal F-actin fibers were visualized by incubation with FITC-conjugated phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). The slides were covered with Vectashield mounting medium containing DAPI, and viewed with a fluorescence microscope (Zeiss, Germany) using blue and green filters.

## RESULTS

### Experimental design and clinical characteristics of patients

In this study, we sought to characterize the changes in podocyte signaling networks in response to short exposure to first plasma exchange (PE) fluid obtained from four post-transplant recurrent FSGS (rFSGS) patients and four non-INS patients undergoing immunological graft rejection, the latter used as controls as they receive the same immunosuppressive therapy (**Figure 1**). rFSGS patients developed proteinuria immediately or within days after surgery. To prevent allograft rejection, patients were treated with corticosteroids and immunosuppressive agents. As drugs are known to induce profound changes in protein expression, we selected control patients who underwent the same treatment as the rFSGS patients and therefore also had a renal transplantation. The clinical characteristics of the patients who received PE therapy are summarized in **Table 1**. First PE samples were drawn from patients, immediately frozen and stored at -80°C until use. Human podocytes were incubated for 30 minutes with 10% PE capture early signaling pathways and mechanisms occurring in podocytes and potentially involved in FSGS recurrence. Next, we analyzed the raftome of the stimulated cells as well as their global phosphoproteome. We also performed a total proteome analysis to discriminate changes in protein localization and phosphorylation from changes in protein expression. In all cases we compared the proteome changes differentially induced by rFSGS PE and by control PE (CTRL).

### Raftomic analysis of podocytes incubated with rFSGS and control PE

At first, we investigated the changes occurring at the podocyte membrane upon PE incubation by analyzing lipid rafts using a proteomic approach we have recently developed (33). We identified an average of 2626 and 2601 proteins in the raft fraction (3163 proteins in total) from podocytes treated with rFSGS and controls PE respectively. Purity of the raft preparation was verified by Western-Blot for all the fractions from the Optiprep density gradient. We performed immunostaining of flotillin-1, a known protein marker of rafts (35), and of b-actin, a cytosolic protein, as a marker of non-rafts. As shown in **Figure 2A**, a strong flotillin-1 and a low actin signal were detected in fraction 2, suggesting that this fraction is enriched in lipid rafts. This result was also confirmed by MS analysis (**Figure 2B**), as the intensities of both flotillin-1 and flotillin-2 were 23-fold higher in raft preparation compared to the total proteome. Finally, a Gene Ontology cellular component analysis was performed for all the 3163 proteins identified in the raft fraction (**Figure 2C**). As expected, we observed a high number of membrane proteins (2139/3163) and plasma membrane proteins (703/3163). We also detected a high number of extracellular vesicular exosomes (1094/3163), which is also expected, as exosomes are associated with lipid rafts (36).

Changes in protein recruitment into lipid rafts after stimulation with rFSGS vs CTRL PE are depicted as a heatmap in **Figure 3A**. A total of four biological replicates for each condition were analyzed. Statistical analysis (Student's t-test with permutation-based FDR<0,05) of lipid rafts led to the identification of 52 significantly modulated proteins in response to PE, which were separated into two major clusters by hierarchical clustering. Twenty-four proteins were more recruited into rafts and twenty-eight were less recruited into rafts following rFSGS PE incubation as compared to control PE incubation (**Supplementary Table S1**). Interestingly, four of the proteins (LAMTOR-2, LAMTOR-3, LAMTOR-4 and LAMTOR-5) in the top cluster belong to the regulator complex, while seven of the proteins in the bottom cluster (ATP5O, ATP5D, ATP5F1, ATP6C1, MT-CO3, COX7A2, COX7C) are involved in mitochondrial function. **Figure 3B** shows validation western blots for LAMTOR2 and sequestosome-1-p62 in raft fractions from rFSGS-PE and control-PE incubated podocytes.

### Phosphoproteomic analysis of podocytes incubated with rFSGS and control PE

To further investigate the cellular pathway deregulation, we carried out phosphoproteomic analysis to determine the phosphorylation changes in total cell extracts upon PE treatment. Podocytes were processed separately for both total proteome analysis and phosphoproteome analysis. For phosphoproteome analysis, enrichment of phosphopeptides with TiO<sub>2</sub> tips was performed on four biological replicates for each group. As expected for this phosphoenrichment method, the majority of the phosphoproteins are singly phosphorylated, with only 22% of the phosphoproteins were identified had more than one phosphosite (**Figure 4A**). We achieved a high specificity enrichment, as 91% of all identified peptides were phosphopeptides (**Figure 4B**). Phosphorylation on Ser residues was predominantly identified (92,6%) followed by phosphorylation on Thr (7,1%) and Tyr (0,3%) residues as shown in **Figure 4C**. A total of 7884 phosphosites were identified at least once from a total of 8688 peptides. On average, we identified 4870 and 4900 phosphosites (5084 phosphosites in total) in podocytes treated with rFSGS and Control PE respectively, with a minimum of 4 values in at least one group and localization probability of phosphosites over 75%, as shown in **Figure 4D** (corresponding to the quantification of 1972 and 1990 phosphoproteins). When we applied a Student t-test (Permutation-based FDR<0.05), we detected 66 phosphorylation sites as significantly modulated following rFSGS incubation: 32 phosphosites were upregulated and 34 phosphosites were downregulated. These differentially displayed phosphosites are shown in **Supplementary Table 2**. Among these phosphoproteins, 13 were associated with cytoskeleton rearrangement (MPRIIP, OSBPL3, HSPB1, PLEC, LARP1, AKAP12, MAP7D1, LMNA, NUFIP1, SIPA1L2, CLIP2, NCK2, SASH1) and 5 were involved in mTOR activation (EIF4ENIF1, NUFIP1, BRD4, LARP1, SLC12A7).

### Data Integration of proteomic analysis

The results obtained by our two complementary proteomic analyses were integrated in multiple volcano plots: proteins differentially recruited in rafts, differentially expressed proteins, along with differentially modulated phosphosites (**Figure 5**). We labeled proteins involved in the mTOR signaling pathway in red (**Figure 5A**) and cytoskeleton associated proteins in blue (**Figure 5B**) in the three different analyses performed (raft proteome on left panels, total proteome on center panels, and phosphoproteome on right panels). Total proteome was analyzed in parallel to verify that changes in phosphorylation levels or in raft-recruitment were not linked to changes in total protein levels in the cell after PE stimulation. Among the phosphoproteins involved in cytoskeleton rearrangement, 8 phosphoproteins were quantified in total proteome analysis, while 5 were not detectable. No significant expression changes were observed in total cell extracts, confirming an actual change in the phosphorylation of these proteins. Likewise, those proteins differentially recruited in rafts were not differentially expressed in the total cell except a slight difference in MT-CO3 and LAMTOR 3, but in the opposed sense as in rafts. Altogether, total cell expression data comfort the hypothesis that the observed changes correspond to differences in raft recruitment. Among the differential phosphoproteins involved in cytoskeleton regulation, only LRRC16A, a protein playing a role in the regulation of actin polymerization (37), was shown to be more recruited into rafts after rFSGS PE incubation. Integration of raft proteome and phosphoproteome analyses showed that proteins participating in mTOR activation were modulated at both the raft proteome and phosphoproteome sides. Raft proteome analysis showed that the regulator complex and some mitochondrial proteins were more recruited into rafts by rFSGS PE, while 5 phosphosites belonging to 5 phosphorylated proteins involved in the mTOR pathway were upregulated by the effect of plasma exchange on podocytes.

### Targeted analysis of selected proteins

To further investigate the relevance of our results we sought to analyze by western blot the expression of several effector markers of mTOR activity (S6 kinase phosphorylation) and autophagy (p62 and LC3B). In this series of experiments, podocytes were incubated with PE for 30min and for longer periods (1h, 4h and 24h), in a time-course fashion and total cell protein extracts obtained. We used non-treated cells as an additional control. We postulated that early signaling changes after 30 min of incubation would result in effector protein changes after longer exposure. The results are shown in **Figure 6**. Phosphorylation of S6 kinase, which is a target of mTORC1, was decreased at 30min, 1h and 4h of incubation with both rFSGS and control PE indistinctly, as compared to non-treated cells. The basal phosphorylation levels were recovered at 24h of incubation. p62 expression remained stable in podocytes treated with control-PE, but in rFSGS-PE treated cells the levels went down after 4h and especially 24h of incubation. The autophagy marker LC3B was consistently downregulated in rFSGS-PE-treated as compared to non-treated and control-PE-treated podocytes.

Most of the differentially expressed phosphosites identified in our work have only been described in previous phosphoproteomic studies, and no specific detection antibodies are currently available. This is the case of Hsp27 (HspB1), which we chose within this group for further analysis, since we had found a significantly increased phosphorylation of the Ser63 site at 30min of rFSGS-PE incubation. We analyzed instead the time course evolution of Ser82 phosphorylation, and the results are shown on **Figure 7**. Remarkably, after 4h of incubation the phosphorylation levels differed significantly between rFSGS and control PE treated cells, the former increased and the latter decreased as compared with non-treated cells. This difference was maintained after 24h but the differences were not statistically significant. These results were consistent in three independent experiments. Since Hsp27 is involved in cytoskeleton regulation we evaluated the morphology of F-actin fibers by phalloidin staining and fluorescence microscopy. As shown in Figure 8, rFSGS PE incubation resulted in cell retraction, especially after 24h, but stress fibers were still present like in the other conditions.

## DISCUSSION

The present work addresses the proximal signaling changes –comprising protein recruitment in lipid rafts and protein phosphorylation- undergone by human podocytes when they are put in contact with blood plasma –plasma exchange fluid- from rFSGS patients for a short period of time. Some original aspects of our work are the following. First, given the fact that recurrence can be a very rapid event –hours from kidney graft- we seek very early events induced by plasma. Second, we have chosen as controls, for the first time, patients having followed a similar therapeutic protocol as FSGS before kidney graft, eliminating potential artefacts in cells due to the effect of immunosuppressive drugs. Third, we chose subproteomics as an alternative approach to unveil early and proximal changes in cells. Actually, our results also include a total cell proteome analysis, which yielded almost no significant differences. This underlines the advantage of choosing subproteomic approaches, in the present case both raftomics and phosphoproteomics.

A global view of the results obtained point to two main blocks of cell functions differentially altered when podocytes are incubated with either rFSGS or control plasma (**Figure 8**). The first one corresponds to functions regulated by the mTOR pathway, while the second one relates to the regulation of cytoskeleton. As shown on Figure 5, mTOR associated proteins were mainly revealed in the raftomic set, whereas cytoskeleton related proteins were mostly identified in the phosphoproteomics experiment. In addition, 5 proteins related to mTOR signaling were differentially recruited in rafts.

Within those proteins upregulated in rafts from rFSGS PE-treated cells, we identified 4 subunits of the mTORC1 complex, namely LAMTOR 2, 3, 4, and 5. This was concomitant with a decrease in 4 mitochondrial proteins, all subunits of ATPase 5. The Ragulator complex is critical for mTORC1 lysosomal recruitment (38) and subsequent activation (39). Ragulator consists of 5 subunits and acts as an adaptor and a GTP exchange factor for Rag small GTPases. The function of this complex in podocytes has been studied by LAMTOR1 ablation in mouse, resulting in attenuation of renal phenotype (40). Surprisingly, LAMTOR1 is the only component of Ragulator that we have not found increased in the rafts from rFSGS-treated cells. This could be either resulting from a sensitivity limitation of our approach, or a real result. Whether the whole Ragulator complex is recruited in rafts by exposure to rFSGS plasma, or just in part, remains to be confirmed. Globally, our results suggest a dysregulation of mTORC1 activation in response to rFSGS-PE.

Aberrant activation of mTORC1 results in negative feedback to PI3K activation (41) and in podocytes it leads to cell injury mimicking a feature of diabetic nephropathy (42) (43). Conversely, mTORC1 invalidation leads to podocyte dysfunction and proteinuria through disruption of the autophagic flux (44). Administration of the mTORC1 inhibitor rapamycin to patients of glomerulopathies results in proteinuria (45). Altogether, these results suggest that mTOR signaling is finely tuned to ensure podocyte function. Negative regulation of mTORC1 is driven by the TSC (tuberous sclerosis complex). Inhibition of TSC results in mTORC1 activation, in response to multiple stimuli, such as growth factors, glucose, oxidative stress (46). To establish the actual impact of the Ragulator raft recruitment suggested by our results on mTORC1 activity, we assessed S6 kinase phosphorylation status as an effector of mTORC1 activation. Our results show that S6 kinase expression –both total and phosphorylated- is decreased following PE incubation of podocytes, but similarly in the case of rFSGS and control PE. Consequently, we cannot establish a link between Ragulator raft recruitment and a decrease in mTORC1 activity and further investigation will be necessary.

If LAMTOR subunits are the most relevant proteins upregulated in rafts in the presence of rFSGS plasma, their counterparts (decreased in rFSGS-treated or increased in control-treated rafts) are four ATP5 ATP synthase (complex V) subunits involved in mitochondrial electron transport, along with sequestosome/p62, the latter a capital actor in the regulation of autophagy. Recent studies have shown that mTOR signaling controls mitochondrial dynamics (47,48) and thereby participates in the progression of mitochondrial myopathy (49) and cancer (50). ATP synthase complexes might not be necessarily restricted to mitochondria, since they have been reported as associated with detergent-resistant raft membranes (51) (52) (53) (54) (55) (56). Raft localization of these complexes has been reported either as mitochondrial (56) or as ectopic (53), the latter associated with diverse functions. Therefore, our results could be indicative of an impairment in ATP synthase functions in rFSGS-PE treated podocytes, as compared to control-PE treated cells.

Differential phosphoproteins associated with mTORC1 included EIF4ENIF1, LARP1, SLC4A2 (upregulated in rFSGS-PE incubated cells) and BRD4 and NUFIP1 (downregulated). EIF4ENIF1 and LARP1 are involved in protein synthesis. EIF4ENIF1 (eIF4E nuclear import factor 1) is a shuttle protein ensuring the nuclear import of the eucaryotic translation initiation factor eIF4E, resulting in translation inhibition via interaction with importin 8 (57). LARP1 is an RNA-binding protein that regulates translation (Burrows). LARP1 can be phosphorylated by PINK1 (Zhang 2019), the cyclin dependent kinase CDK9 (Beauchamp 2019, Haneke), and by mTORC1 and S6K (Hong 2017). The latter results in dissociation from the 5' UTR of mRNA and association to the 3' UTR resulting in activated translation. Therefore, LARP1 has been described as a molecular switch for mTORC1 activation of protein translation (Hong). Conversely, LARP1 phosphorylation by PINK1 has been associated with inhibition

of protein synthesis in mitochondria (Zhang 2019). In our study, only T376 phosphorylation is differentially present after rFSGS plasma incubation, and the kinase responsible for this phosphorylation has not been identified. A specific study of protein translation in the conditions studied would be necessary to clarify the role of mTORC1 in the cellular response to rFSGS plasma.

BRD4 and NUFIP1 phosphorylation, along with p62 decrease in rafts suggest an impact on autophagy, one of the cellular functions targeted by mTOR signaling. BRD4 phosphorylation is characteristic of mitosis (58), but has not been described in the context of autophagy. BRD4 inhibition is associated with autophagy activation (59) (60) (61). NUFIP1 is a receptor for the autophagic selective degradation of ribosomes in response to starvation (62) and to mechanical stress (63). In both cases, no link has been established between phosphorylation and autophagy. Likewise, our study represents the first report of Sequestosome-1/p62 with lipid rafts. p62 is a scaffold protein involved in selective autophagy through interaction with polyubiquitinated proteins. Inhibition of the autophagic flow with increased p62 expression has been described in podocytes subjected to high glucose conditions (64) (65). An increase in the autophagy flux has been reported in podocytes in response to high glucose, and protective from diabetes-induced glomerulosclerosis, which is characterized by mTOR activation (66). Diabetic mice present high LC3B levels in podocytes. This opposed to our observation in rFSGS-PE-incubated podocytes. Indeed, our results show, at 30min and 1h of incubation, lower levels of LCRB, while p62 levels are maintained as compared to control-PE treated and non-treated cells. Altogether, we can speculate that rFSGS-PE induces a decrease in the autophagy flow, and hypothesize that the opposed presence of Ragulator and p62 in lipid rafts plays a role in this inhibition. These argumentations will need further investigation to be confirmed or rejected.

Another striking, though not unexpected, observation arising from our results is the presence of changes in the phosphorylation status of a number of cytoskeletal proteins in cells incubated with rFSGS-PE. However, assessment of the cytoskeletal status up to 24h by phalloidin staining only showed modest differences between cells treated with the two kinds of plasma. In all cases, podocytes seemed to maintain a fairly normal distribution of actin stress fibers. Although changes in cell morphology with increased cytoplasmic retraction was observed in rFSGS-PE treated cells, these alterations are far from a complete disorganization. The observed differences at 30min may be, therefore, subtle early indicators of morphological changes that should be detected after longer exposure periods.

Out of the 11 proteins linked with cytoskeletal function displaying significant differences in phosphopeptide abundance, 6 were upregulated in rFSGS-treated and 7 upregulated in control-treated cells, suggesting a unique phosphorylation pattern for each condition. Among the increased phosphopeptides in rFSGS-treated cells, Hsp27 (HspB1) phosphorylation has been extensively studied with regards to the regulation of actin polymerization, cytoskeleton structure and cell morphology, and particularly in the podocyte (67). It is acknowledged that actin polymerization is a phenomenon associated with decreased cell motility and a less migratory phenotype. In podocytes, a migratory phenotype is a characteristic of a disorganized filtration barrier. Two phosphopeptides of Hsp27 were detected at 30min incubation, Ser82 and Ser65. Ser82, the most studied to date, was unchanged between the two studied conditions, while Ser65 was significantly increased in rFSGS-treated. Conversely, we found by Western blot that Ser82 was significantly increased in rFSGS-treated after 4h of incubation, which indicates a decreased actin polymerization and increased cell motility. This is in line with seminal studies on Hsp27 role in actin polymerization in the podocyte. Hsp27 phosphorylation at this residue was found increased in a *in vivo* puromycin model of glomerulopathy (68), and correlated with its ability to inhibit actin polymerization (69,70). However, while Ser15, 78 and 82 have been extensively studied, little is known about the phosphorylation of Ser65, which according to our observation is exclusive of rFSGS-treated cells at an early stage.

Plectin (PLEC) phosphopeptides were also found upregulated in rFSGS-treated cells. PLEC is a key actor in cytoskeletal organization, as a linker between microfilaments, intermediate filaments and microtubules. PLEC and HSP27 are suspected to interact with each other in human cells, as their homologous proteins in other species appear in datasets as interacting (71). PLEC has been scarcely studied in podocytes. PLEC expression is repressed in the adriamycin model of nephropathy, and siRNA silencing results in podocyte injury via increased phosphorylation of integrin  $\alpha$ 6 $\beta$ 4, FAK and p38 MAPK (72). In our study, no changes were observed between the two experimental conditions in the total PLEC expression of podocytes. Conversely, we found a differential phosphorylation of S4396. This phosphosite has only been reported in phagosomes of IFN- $\gamma$ -activated macrophages (73), while the close C-terminus phospho-S4642 decreases the ability of PLEC to interact with intermediate filaments (74).

Among the rest of phosphoproteins augmented by rFSGS plasma, MPRIP (p116RIP) is a myosin phosphatase and RhoA GTPase-interacting protein. While its silencing leads to loss of stress fiber-associated RhoA, suggesting it acts as a scaffold linking RhoA to regulate myosin phosphatase at the stress fiber (75), its phosphorylation at S891 has been found in global phosphoproteomic studies in the context of mitosis (76,77) and cancer (78). ORP3 (OSBPL3) is also linked with GTPases, as it interacts with R-Ras, which regulates cell adhesion and migration (79). ORP3 is a protein kinase linking phosphoinositide metabolism with cytoskeleton dynamics and endocytosis and it is phosphorylated in response to the loss of cell-cell contacts. Phosphorylation has been found to lead to interaction with VAPA, inducing R-RAS activation, Akt phosphorylation and  $\beta$ 1-integrin activity (80). This involves, among others, the S304 site that we found in the current study. This seems to be contradictory, as integrin  $\beta$ 1 activation is the result of nephrin signaling (81) and its expression in podocytes is essential for glomerular integrity (82). In the present case ORP3 phosphorylation could be understood as a response of the cell to a receptor-mediated sensing of cell adhesion loss.

An unexpected finding was the higher level of phosphorylated AKAP12 in podocytes treated with rFSGS plasma. AKAP12, a PKA anchoring protein, has been described as a marker of early FSGS lesions in glomerular parietal epithelial cells (PEC), but its expression in podocytes was not detected in the same work (83). Therefore, we report for the first time the expression of AKAP12 by the podocyte and a potential link of its phosphorylated form to an early response to rFSGS plasma.

On the other side, some phosphoproteins appeared as comparatively decreased in cells treated with rFSGS PE. Among them, the cytoplasmic adaptor NCK2 is of particular interest, as a known partner of nephrin and regulator of actin assembly. Invalidation of this gene in podocytes results in decreased podocyte migration, without affecting proliferation or expression of podocyte markers (84). Decreased interaction between NCK2 and nephrin is part of the effects observed in podocytes in response to Angiotensin II stimulation resulting in glomerular permeability and proteinuria (85). No implications of NCK2 phosphorylation in podocyte biology have been reported to date.

In addition to these cytoskeleton-related phosphoproteins, our results show an increased presence in rafts from rFSGS plasma-treated cells of LRRC16A, appertaining to the CARMIL family, an inhibitor of the actin capping protein, which interferes with actin polymerization and results in cytoskeleton disruption (37) (84). No previous association of this protein with lipid rafts has been reported to date. Interestingly, only one protein, LARP1, is both associated with cytoskeleton regulation and with mTORC1 associated signaling, and make a link between the two main differential pathways identified.

One of the limitations of our study is the different setup from the *in vivo* situation, in that our model of plasma incubation does not reproduce the glomerular filtration barrier, where the contact of



podocyte membranes with plasma proteins is limited by the presence of the glomerular basement membrane. Our setup could represent a second hit of circulating proteins, the first hit leading to a fragilization of the membrane. Globally, the observed specific changes in the raftome and the phosphoproteome in response to rFSGS PE, point to a dysregulation of mTORC1, autophagy and cytoskeletal organization. Subsequent targeted studies should clarify whether these events are associated and what is their temporal sequence. It also remains to be confirmed their in vivo relevance. Also, if any of these changes is confirmed as specific of rFSGS plasma, it could constitute a valuable in vitro marker.

## FIGURE LEGENDS

### Table 1 : Clinical characteristics of patients

Four control patients (CTRL1, CTRL2, CTRL3 and CTRL4, three male and 1 female aged between 45 and 74 years old) clinically diagnosed with nephropathies other than FSGS, such as IgA nephropathy or diabetic nephropathy. Among these patients, three were male and one were female. The age of the patients ranged from 45 and 74 years old. Control patients faced humoral rejection month or years after renal transplantation and consequently received several sessions of plasma exchange. Date of sampling corresponds to the first session plasma exchange. Four FSGS patients (rFSGS1, rFSGS2, rFSGS3, rFSGS4) developed recurrence of FSGS days or months after renal transplantation. Among these patients, two were male and two were female. The age of the patients ranged from 21 and 70 years old. ProtU/CreatU levels (>100 mg/mmol for FSGS patients) and serum creatinine levels are reported in the table at the date of sampling, Number of transplantation per patient is indicated in the table.

### Figure 1 : Experimental workflow to investigate podocyte proximal signaling upon PE treatment.

Immortalized human podocytes were cultured in T75 flasks. After podocyte starvation for 4h, PE fluid from individual patients was added to each flask at 10% final concentration and kept for 30min. For raft analysis, cells were lysed using a detergent-free method with probe sonication. A discontinuous Optiprep gradient (45%, 35% and 5%) was layered from bottom to top onto the cell lysate and ultracentrifuged at 268,000g for 2h at 4°C. Fraction 2, containing the lipid rafts, was collected and precipitated with 10% TCA O/N at 4°C. Precipitated proteins were washed and digested with trypsin using S-Trap and analysed by LC-MS/MS. For phosphoproteomic analysis, cells were lysed with RIPA buffer with 1% SDS final concentration to completely lyse cells. Proteins were digested using the FASP method. Peptides were either subjected to total proteome analysis or used for phosphopeptide enrichment by TiO<sub>2</sub>. Phosphopeptides were purified using GC Spin tips (Graphite Carbone) and analysed by LC-MS/MS.

### Figure 2 : Raft purity assessment.

**(A)** Detection of lipid raft marker, flotillin-1 and non-lipid raft marker, actin, in fractions obtained from immortalized human podocytes treated with control and rFSGS PE. Cells were lysed and subjected to Optiprep density gradient. Proteins were precipitated with 10% TCA final concentration and resuspended in Laemmli buffer 1X for WB. **(B)** Intensities calculated by Maxquant for flotillin-1 and flotillin-2. Proteins were digested by S-Trap and analysed by LC-MS/MS. Intensities were calculated as the sum of all the intensities of the two proteins across all samples. **(C)** Gene Ontology Analysis of the 3163 proteins identified in raft analysis. Histograms indicate the number of proteins annotated with “membrane”, “plasma membrane”, “ER membrane” (for Endoplasmic Reticulum membrane), “Mitochondrion”, “EV exosome” (for Extracellular Vesicular Exosome) terms.

### Figure 3 : Heatmap visualization of proteins differentially recruited to lipid rafts

**(A)** Heatmap of fifty-two proteins whose recruitment profiles were significantly different between control PE and rFSGS PE incubated podocytes. Each column represents a biological replicate (n=4 for CTRL and n=4 for rFSGS). Protein signals (rows) were ranked and grouped according to their distribution signals in the clustering heatmap. The color scale shown on the right side denotes the relative recruitment level to lipid rafts across all samples. Twenty-eight proteins with significantly decreased recruitment in lipid rafts (t-test, Permutation-based FDR<0,05) are shown in green, while twenty-four proteins with significantly increased recruitment in lipid rafts (t-test, Permutation-based FDR<0,05) are noted in red. **(B)** Validation of proteomic results using Western-Blot analysis of raft protein fraction with antibodies against p62 and LAMTOR-2. Protein extracts from podocytes treated with one control PE and 2 rFSGS PE were used for p62 detection. Protein extracts from podocytes treated with two controls PE and 1 rFSGS PE were used for LAMTOR-2 detection.

### Figure 4 : Characteristics of phosphoproteomic results.

**(A)** Number of singly, doubly and triply phosphorylated peptides. **(B)** Specificity of phosphoenrichment. Donut chart indicating the percentage of phosphorylated (91%) and unmodified peptides (9%). **(C)** Pie chart representing the distribution of phosphorylation sites on serine (92,6%), threonine (7,1%) and tyrosine sites (0,3%). **(D)** Venn diagram showing the number of peptides, phosphosites and peptides with confident phosphosite quantification (with localization probability>0.75, at least 4 values for each group).

### Figure 5 : Volcano plots of differentially expressed proteins involved in mTOR activation and cytoskeleton rearrangement.

**(A)** Volcano plots representing the log<sub>2</sub> fold change (Difference, x-axis) against the -log<sub>10</sub> p-value (y-axis) for proteins differentially expressed or recruited between control-PE (left of plot) and rFSGS-PE (right of plot) incubated podocytes. Raft proteome (left plot), total proteome (center plot) and phosphoproteome (right plot) at 30min are represented. Proteins linked to mTOR activation are labeled in red. **(B)** Volcano plots representing the fold change (Difference, x-axis) against the -log<sub>10</sub> p-value (y-axis) for proteins differentially expressed or recruited between control-PE (left of plot) and rFSGS-PE (right of plot) incubated podocytes. Raft proteome (left plot), total proteome (center plot) and phosphoproteome (right plot) at 30min are represented. Proteins linked to cytoskeleton regulation are labeled in blue.

### Figure 6 : Western-Blot analysis of mTOR activity and autophagy markers

Human podocytes were subjected to 4h starvation, then incubated for 30min, 1h, 4h or 24h in the presence of 10% rFSGS or control PE fluid. Non treated cells (NT) were used as controls. Total protein extracts were subjected to SDS-page electrophoresis and western blot, using specific antibodies to phosphorylated and total S6 kinase, sequestosome 1/p62, LC3B and GAPDH as a loading marker.

### Figure 7: Western-Blot analysis of Hsp27 and cytoskeleton microscopic assessment

**(A)** Human podocytes were subjected to 4h starvation, then incubated for 30min, 1h, 4h or 24h in the presence of 10% rFSGS or control PE fluid. Non treated cells (NT) were used as controls. Total protein extracts were subjected to SDS-page electrophoresis and western blot, using specific antibodies to phosphorylated (Ser82) and total Hsp27. The bar diagram shows the phospho-Hsp27/total Hsp27 ratio after quantification of bands from three independent experiments. **(B)**

Fluorescence microscope images of podocytes stained with FITC-tagged phalloidin, which labels actin fibers.

**Figure 8 : Proposed model of mTOR activation and cytoskeleton rearrangement upon PE treatment.** Color squares indicate upregulation (light red) or downregulation (light green) in podocytes incubated with rFSGS PE. P-tagged proteins correspond to those identified in the phosphoproteomic experiment. Non-P-tagged proteins correspond to those identified in the raft proteomic study. General functions are indicated.

**Supplementary Table S1 :** List of proteins from the raftome analysis with their Gene Ontology Cellular Component slim name for mapping of the different compartments. Significant proteins are labeled “+”. LFQ values for each sample were logarithmized. P-values, q-values, difference from the t-test are reported in the table.

**Supplementary Table S2 :** List of proteins from the phosphoproteome analysis. Significant proteins are labeled “+”. Intensity values for each sample were logarithmized. P-values, q-values, difference from the t-test are reported in the table. Positions of the phosphorylation sites are reported in the table.

## REFERENCES

1. Saleem, M. A. (2019) Molecular stratification of idiopathic nephrotic syndrome. *Nat Rev Nephrol* 15, 750-765
2. Shao, X. S., Yang, X. Q., Zhao, X. D., Li, Q., Xie, Y. Y., Wang, X. G., Wang, M., and Zhang, W. (2009) The prevalence of Th17 cells and FOXP3 regulate T cells (Treg) in children with primary nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 24, 1683-1690
3. Araya, C., Diaz, L., Wasserfall, C., Atkinson, M., Mu, W., Johnson, R., and Garin, E. (2009) T regulatory cell function in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 24, 1691-1698
4. Bertelli, R., Bodria, M., Nobile, M., Alloisio, S., Barbieri, R., Montobbio, G., Patrone, P., and Ghiggeri, G. M. (2011) Regulation of innate immunity by the nucleotide pathway in children with idiopathic nephrotic syndrome. *Clin Exp Immunol* 166, 55-63
5. Liu, L. L., Qin, Y., Cai, J. F., Wang, H. Y., Tao, J. L., Li, H., Chen, L. M., Li, M. X., Li, X. M., and Li, X. W. (2011) Th17/Treg imbalance in adult patients with minimal change nephrotic syndrome. *Clin Immunol* 139, 314-320
6. Boumediene, A., Vachin, P., Sendeyo, K., Oniszczuk, J., Zhang, S. Y., Henique, C., Pawlak, A., Audard, V., Ollero, M., Guignon, V., and Sahali, D. (2018) NEPHRUTIX: A randomized, double-blind, placebo vs Rituximab-controlled trial assessing T-cell subset changes in Minimal Change Nephrotic Syndrome. *J Autoimmun* 88, 91-102
7. Kim, J. S., Bellew, C. A., Silverstein, D. M., Aviles, D. H., Boineau, F. G., and Vehaskari, V. M. (2005) High incidence of initial and late steroid resistance in childhood nephrotic syndrome. *Kidney Int* 68, 1275-1281
8. Ramos, E. L. (1991) Recurrent diseases in the renal allograft. *J Am Soc Nephrol* 2, 109-121
9. Hoyer, J. R., Vernier, R. L., Najarian, J. S., Raij, L., Simmons, R. L., and Michael, A. F. (1972) Recurrence of idiopathic nephrotic syndrome after renal transplantation. *Lancet* 2, 343-348
10. Dantal, J., Bigot, E., Bogers, W., Testa, A., Kriaa, F., Jacques, Y., Hurault de Ligny, B., Niaudet, P., Charpentier, B., and Soulillou, J. P. (1994) Effect of plasma protein adsorption on protein

- excretion in kidney-transplant recipients with recurrent nephrotic syndrome. *N Engl J Med* 330, 7-14
11. Rea, R., Smith, C., Sandhu, K., Kwan, J., and Tomson, C. (2001) Successful transplant of a kidney with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 16, 416-417
  12. Feld, S. M., Figueroa, P., Savin, V., Nast, C. C., Sharma, R., Sharma, M., Hirschberg, R., and Adler, S. G. (1998) Plasmapheresis in the treatment of steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis in native kidneys. *Am J Kidney Dis* 32, 230-237
  13. Lagrue, G., Branellec, A., Niaudet, P., Heslan, J. M., Guillot, F., and Lang, P. (1991) [Transmission of nephrotic syndrome to two neonates. Spontaneous regression]. *Presse Med* 20, 255-257
  14. Kemper, M. J., Wolf, G., and Muller-Wiefel, D. E. (2001) Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child. *N Engl J Med* 344, 386-387
  15. Savin, V. J., Sharma, R., Sharma, M., McCarthy, E. T., Swan, S. K., Ellis, E., Lovell, H., Warady, B., Gunwar, S., Chonko, A. M., Artero, M., and Vincenti, F. (1996) Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med* 334, 878-883
  16. Wei, C., El Hindi, S., Li, J., Fornoni, A., Goes, N., Sageshima, J., Maignel, D., Karumanchi, S. A., Yap, H. K., Saleem, M., Zhang, Q., Nikolic, B., Chaudhuri, A., Daftarian, P., Salido, E., Torres, A., Salifu, M., Sarwal, M. M., Schaefer, F., Morath, C., Schwenger, V., Zeier, M., Gupta, V., Roth, D., Rastaldi, M. P., Burke, G., Ruiz, P., and Reiser, J. (2011) Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med* 17, 952-960
  17. Sharma, M., Zhou, J., Gauchat, J. F., Sharma, R., McCarthy, E. T., Srivastava, T., and Savin, V. J. (2015) Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 inhibitors attenuate the effect of cardiotrophin-like cytokine factor 1 and human focal segmental glomerulosclerosis serum on glomerular filtration barrier. *Transl Res* 166, 384-398
  18. Beaudreuil, S., Zhang, X., Herr, F., Harper, F., Candelier, J. J., Fan, Y., Yeter, H., Dudreuilh, C., Lecru, L., Vazquez, A., Charpentier, B., Lorenzo, H. K., and Durrbach, A. (2019) Circulating CASK is associated with recurrent focal segmental glomerulosclerosis after transplantation. *PLoS One* 14, e0219353
  19. Doublier, S., Zennaro, C., Musante, L., Spatola, T., Candiano, G., Bruschi, M., Besso, L., Cedrino, M., Carraro, M., Ghiggeri, G. M., Camussi, G., and Lupia, E. (2017) Soluble CD40 ligand directly alters glomerular permeability and may act as a circulating permeability factor in FSGS. *PLoS One* 12, e0188045
  20. Bruschi, M., Catarsi, P., Candiano, G., Rastaldi, M. P., Musante, L., Scolari, F., Artero, M., Carraro, M., Carrea, A., Caridi, G., Zennaro, C., Sanna-Cherchi, S., Viola, F. B., Ferrario, F., Perfumo, F., and Ghiggeri, G. M. (2003) Apolipoprotein E in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 63, 686-695
  21. Savin, V. J., McCarthy, E. T., Sharma, R., Charba, D., and Sharma, M. (2008) Galactose binds to focal segmental glomerulosclerosis permeability factor and inhibits its activity. *Transl Res* 151, 288-292
  22. Puig-Gay, N., Jacobs-Cacha, C., Sellares, J., Guirado, L., Gonzalez Roncero, F., Jimenez, C., Zarraga, S., Paul, J., Lauzurica, R., Alonso, A., Fernandez, A., Beneyto, I., Mazuecos, A., Hernandez, D., Rodriguez-Benot, A., Franco, A., Jimeno, L., Crespo, M., Meseguer, A., Moreso, F., Seron, D., Lopez-Hellin, J., and Cantarell, C. (2019) Apolipoprotein A-Ib as a biomarker of focal segmental glomerulosclerosis recurrence after kidney transplantation: diagnostic performance and assessment of its prognostic value - a multi-centre cohort study. *Transpl Int* 32, 313-322
  23. Lopez-Hellin, J., Cantarell, C., Jimeno, L., Sanchez-Fructuoso, A., Puig-Gay, N., Guirado, L., Vilarino, N., Gonzalez-Roncero, F. M., Mazuecos, A., Lauzurica, R., Burgos, D., Plumed, J. S., Jacobs-Cacha, C., Jimenez, C., Fernandez, A., Fernandez-Alvarez, P., Torregrosa, V., Nieto, J. L., Meseguer, A., and Alonso, A. (2013) A form of apolipoprotein a-I is found specifically in

- relapses of focal segmental glomerulosclerosis following transplantation. *Am J Transplant* 13, 493-500
24. Li, M., Alfieri, C. M., Morello, W., Cellesi, F., Armelloni, S., Mattinzoli, D., Montini, G., and Messa, P. (2020) Assessment of increased glomerular permeability associated with recurrent focal segmental glomerulosclerosis using an in vitro model of the glomerular filtration barrier. *J Nephrol* 33, 747-755
  25. Chung, C. F., Kitzler, T., Kachurina, N., Pessina, K., Babayeva, S., Bitzan, M., Kaskel, F., Colmegna, I., Alachkar, N., Goodyer, P., Cybulsky, A. V., and Torban, E. (2019) Intrinsic tumor necrosis factor-alpha pathway is activated in a subset of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *PLoS One* 14, e0216426
  26. Kim, E. Y., Roshanravan, H., and Dryer, S. E. (2017) Changes in podocyte TRPC channels evoked by plasma and sera from patients with recurrent FSGS and by putative glomerular permeability factors. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863, 2342-2354
  27. Hattori, M., Akioka, Y., Chikamoto, H., Kobayashi, N., Tsuchiya, K., Shimizu, M., Kagami, S., and Tsukaguchi, H. (2008) Increase of integrin-linked kinase activity in cultured podocytes upon stimulation with plasma from patients with recurrent FSGS. *Am J Transplant* 8, 1550-1556
  28. Doublier, S., Musante, L., Lupia, E., Candiano, G., Spatola, T., Caridi, G., Zennaro, C., Carraro, M., Ghiggeri, G. M., and Camussi, G. (2005) Direct effect of plasma permeability factors from patients with idiopathic FSGS on nephrin and podocin expression in human podocytes. *Int J Mol Med* 16, 49-58
  29. Harris, J. J., McCarthy, H. J., Ni, L., Wherlock, M., Kang, H., Wetzels, J. F., Welsh, G. I., and Saleem, M. A. (2013) Active proteases in nephrotic plasma lead to a podocin-dependent phosphorylation of VASP in podocytes via protease activated receptor-1. *J Pathol* 229, 660-671
  30. Robins, R., Baldwin, C., Aoudjit, L., Cote, J. F., Gupta, I. R., and Takano, T. (2017) Rac1 activation in podocytes induces the spectrum of nephrotic syndrome. *Kidney Int* 92, 349-364
  31. Babayeva, S., Miller, M., Zilber, Y., El Kares, R., Bernard, C., Bitzan, M., Goodyer, P., and Torban, E. (2011) Plasma from a case of recurrent idiopathic FSGS perturbs non-muscle myosin IIA (MYH9 protein) in human podocytes. *Pediatr Nephrol* 26, 1071-1081
  32. 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
  33. Chhuon, C., Zhang, S. Y., Jung, V., Lewandowski, D., Lipecka, J., Pawlak, A., Sahali, D., Ollero, M., and Guerrero, I. C. (2020) A sensitive S-trap-based approach to the analysis of T cell lipid raft proteome. *J Lipid Res*
  34. Lipecka, J., Chhuon, C., Bourderioux, M., Bessard, M. A., van Endert, P., Edelman, A., and Guerrero, I. C. (2016) Sensitivity of mass spectrometry analysis depends on the shape of the filtration unit used for filter aided sample preparation (FASP). *Proteomics* 16, 1852-1857
  35. Otto, G. P., and Nichols, B. J. (2011) The roles of flotillin microdomains--endocytosis and beyond. *J Cell Sci* 124, 3933-3940
  36. Skryabin, G. O., Komelkov, A. V., Savelyeva, E. E., and Tchevkina, E. M. (2020) Lipid Rafts in Exosome Biogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 85, 177-191
  37. Sakiyama, M., Matsuo, H., Shimizu, S., Chiba, T., Nakayama, A., Takada, Y., Nakamura, T., Takada, T., Morita, E., Naito, M., Wakai, K., Inoue, H., Tatsukawa, S., Sato, J., Shimono, K., Makino, T., Satoh, T., Suzuki, H., Kanai, Y., Hamajima, N., Sakurai, Y., Ichida, K., Shimizu, T., and Shinomiya, N. (2014) Common variant of leucine-rich repeat-containing 16A (LRRC16A) gene is associated with gout susceptibility. *Hum Cell* 27, 1-4
  38. Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A. L., Nada, S., and Sabatini, D. M. (2010) Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141, 290-303
  39. Mu, Z., Wang, L., Deng, W., Wang, J., and Wu, G. (2017) Structural insight into the Ragulator complex which anchors mTORC1 to the lysosomal membrane. *Cell Discov* 3, 17049

40. Yao, Y., Wang, J., Yoshida, S., Nada, S., Okada, M., and Inoki, K. (2016) Role of Ragulator in the Regulation of Mechanistic Target of Rapamycin Signaling in Podocytes and Glomerular Function. *J Am Soc Nephrol* 27, 3653-3665
41. Um, S. H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., Fumagalli, S., Allegrini, P. R., Kozma, S. C., Auwerx, J., and Thomas, G. (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431, 200-205
42. Inoki, K., Mori, H., Wang, J., Suzuki, T., Hong, S., Yoshida, S., Blattner, S. M., Ikenoue, T., Ruegg, M. A., Hall, M. N., Kwiatkowski, D. J., Rastaldi, M. P., Huber, T. B., Kretzler, M., Holzman, L. B., Wiggins, R. C., and Guan, K. L. (2011) mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. *J Clin Invest* 121, 2181-2196
43. Godel, M., Hartleben, B., Herbach, N., Liu, S., Zschiedrich, S., Lu, S., Debreczeni-Mor, A., Lindenmeyer, M. T., Rastaldi, M. P., Hartleben, G., Wiech, T., Fornoni, A., Nelson, R. G., Kretzler, M., Wanke, R., Pavenstadt, H., Kerjaschki, D., Cohen, C. D., Hall, M. N., Ruegg, M. A., Inoki, K., Walz, G., and Huber, T. B. (2011) Role of mTOR in podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice. *J Clin Invest* 121, 2197-2209
44. Cina, D. P., Onay, T., Paltoo, A., Li, C., Maezawa, Y., De Arteaga, J., Jurisicova, A., and Quaggin, S. E. (2012) Inhibition of MTOR disrupts autophagic flux in podocytes. *J Am Soc Nephrol* 23, 412-420
45. Fervenza, F. C., Fitzpatrick, P. M., Mertz, J., Erickson, S. B., Liggett, S., Popham, S., Wochos, D. N., Synhavsky, A., Hippler, S., Larson, T. S., Bagniewski, S. M., and Velosa, J. A. (2004) Acute rapamycin nephrotoxicity in native kidneys of patients with chronic glomerulopathies. *Nephrol Dial Transplant* 19, 1288-1292
46. Sengupta, S., Peterson, T. R., and Sabatini, D. M. (2010) Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell* 40, 310-322
47. Morita, M., Prudent, J., Basu, K., Goyon, V., Katsumura, S., Hulea, L., Pearl, D., Siddiqui, N., Strack, S., McGuirk, S., St-Pierre, J., Larsson, O., Topisirovic, I., Vali, H., McBride, H. M., Bergeron, J. J., and Sonenberg, N. (2017) mTOR Controls Mitochondrial Dynamics and Cell Survival via MTFP1. *Mol Cell* 67, 922-935 e925
48. Ramanathan, A., and Schreiber, S. L. (2009) Direct control of mitochondrial function by mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 22229-22232
49. Khan, N. A., Nikkanen, J., Yatsuga, S., Jackson, C., Wang, L., Pradhan, S., Kivela, R., Pessia, A., Velagapudi, V., and Suomalainen, A. (2017) mTORC1 Regulates Mitochondrial Integrated Stress Response and Mitochondrial Myopathy Progression. *Cell Metab* 26, 419-428 e415
50. de la Cruz Lopez, K. G., Toledo Guzman, M. E., Sanchez, E. O., and Garcia Carranca, A. (2019) mTORC1 as a Regulator of Mitochondrial Functions and a Therapeutic Target in Cancer. *Front Oncol* 9, 1373
51. Allen-Worthington, K., Xie, J., Brown, J. L., Edmunson, A. M., Dowling, A., Navratil, A. M., Scavelli, K., Yoon, H., Kim, D. G., Bynoe, M. S., Clarke, I., and Roberson, M. S. (2016) The F0F1 ATP Synthase Complex Localizes to Membrane Rafts in Gonadotrope Cells. *Mol Endocrinol* 30, 996-1011
52. Yonally, S. K., and Capaldi, R. A. (2006) The F(1)F(0) ATP synthase and mitochondrial respiratory chain complexes are present on the plasma membrane of an osteosarcoma cell line: An immunocytochemical study. *Mitochondrion* 6, 305-314
53. Champagne, E., Martinez, L. O., Collet, X., and Barbaras, R. (2006) Ecto-F1Fo ATP synthase/F1 ATPase: metabolic and immunological functions. *Curr Opin Lipidol* 17, 279-284
54. Bae, T. J., Kim, M. S., Kim, J. W., Kim, B. W., Choo, H. J., Lee, J. W., Kim, K. B., Lee, C. S., Kim, J. H., Chang, S. Y., Kang, C. Y., Lee, S. W., and Ko, Y. G. (2004) Lipid raft proteome reveals ATP synthase complex in the cell surface. *Proteomics* 4, 3536-3548
55. Xing, S. L., Yan, J., Yu, Z. H., and Zhu, C. Q. (2011) Neuronal cell surface ATP synthase mediates synthesis of extracellular ATP and regulation of intracellular pH. *Cell Biol Int* 35, 81-86

56. Kim, B. W., Lee, C. S., Yi, J. S., Lee, J. H., Lee, J. W., Choo, H. J., Jung, S. Y., Kim, M. S., Lee, S. W., Lee, M. S., Yoon, G., and Ko, Y. G. (2010) Lipid raft proteome reveals that oxidative phosphorylation system is associated with the plasma membrane. *Expert Rev Proteomics* 7, 849-866
57. Volpon, L., Culjkovic-Kraljacic, B., Osborne, M. J., Ramteke, A., Sun, Q., Niesman, A., Chook, Y. M., and Borden, K. L. (2016) Importin 8 mediates m7G cap-sensitive nuclear import of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 5263-5268
58. Wang, R., Yang, J. F., Ho, F., Robertson, E. S., and You, J. (2020) Bromodomain-Containing Protein BRD4 Is Hyperphosphorylated in Mitosis. *Cancers (Basel)* 12
59. Li, Y., Xiang, J., Zhang, J., Lin, J., Wu, Y., and Wang, X. (2020) Inhibition of Brd4 by JQ1 Promotes Functional Recovery From Spinal Cord Injury by Activating Autophagy. *Front Cell Neurosci* 14, 555591
60. Mu, J., Zhang, D., Tian, Y., Xie, Z., and Zou, M. H. (2020) BRD4 inhibition by JQ1 prevents high-fat diet-induced diabetic cardiomyopathy by activating PINK1/Parkin-mediated mitophagy in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 149, 1-14
61. Shen, S., Li, B., Dai, J., Wu, Z., He, Y., Wen, L., Wang, X., and Hu, G. (2020) BRD4 Inhibition Protects Against Acute Pancreatitis Through Restoring Impaired Autophagic Flux. *Front Pharmacol* 11, 618
62. Wyant, G. A., Abu-Remaileh, M., Frenkel, E. M., Laqtom, N. N., Dharamdasani, V., Lewis, C. A., Chan, S. H., Heinze, I., Ori, A., and Sabatini, D. M. (2018) NUFIP1 is a ribosome receptor for starvation-induced ribophagy. *Science* 360, 751-758
63. Shim, M. S., Nettesheim, A., Hirt, J., and Liton, P. B. (2020) The autophagic protein LC3 translocates to the nucleus and localizes in the nucleolus associated to NUFIP1 in response to cyclic mechanical stress. *Autophagy* 16, 1248-1261
64. Li, Z., Yuan, Y., Meng, Y., Rong, Y., Bai, H., and Chen, L. (2017) Autophagy upregulation ameliorates cell injury in Sequestosome 1 knockout podocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 490, 98-103
65. Xin, W., Li, Z., Xu, Y., Yu, Y., Zhou, Q., Chen, L., and Wan, Q. (2016) Autophagy protects human podocytes from high glucose-induced injury by preventing insulin resistance. *Metabolism* 65, 1307-1315
66. Lenoir, O., Jasiek, M., Henique, C., Guyonnet, L., Hartleben, B., Bork, T., Chipont, A., Flosseau, K., Bensaada, I., Schmitt, A., Masse, J. M., Souyri, M., Huber, T. B., and Tharaux, P. L. (2015) Endothelial cell and podocyte autophagy synergistically protect from diabetes-induced glomerulosclerosis. *Autophagy* 11, 1130-1145
67. Smoyer, W. E., and Ransom, R. F. (2002) Hsp27 regulates podocyte cytoskeletal changes in an in vitro model of podocyte process retraction. *FASEB J* 16, 315-326
68. Smoyer, W. E., Gupta, A., Mundel, P., Ballew, J. D., and Welsh, M. J. (1996) Altered expression of glomerular heat shock protein 27 in experimental nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 97, 2697-2704
69. Lavoie, J. N., Hickey, E., Weber, L. A., and Landry, J. (1993) Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem* 268, 24210-24214
70. Lavoie, J. N., Lambert, H., Hickey, E., Weber, L. A., and Landry, J. (1995) Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Mol Cell Biol* 15, 505-516
71. Lundby, A., Rossin, E. J., Steffensen, A. B., Acha, M. R., Newton-Cheh, C., Pfeufer, A., Lynch, S. N., Olesen, S. P., Brunak, S., Ellinor, P. T., Jukema, J. W., Trompet, S., Ford, I., Macfarlane, P. W., Krijthe, B. P., Hofman, A., Uitterlinden, A. G., Stricker, B. H., Nathoe, H. M., Spiering, W., Daly, M. J., Asselbergs, F. W., van der Harst, P., Milan, D. J., de Bakker, P. I., Lage, K., and Olsen, J. V. (2014) Annotation of loci from genome-wide association studies using tissue-specific quantitative interaction proteomics. *Nat Methods* 11, 868-874

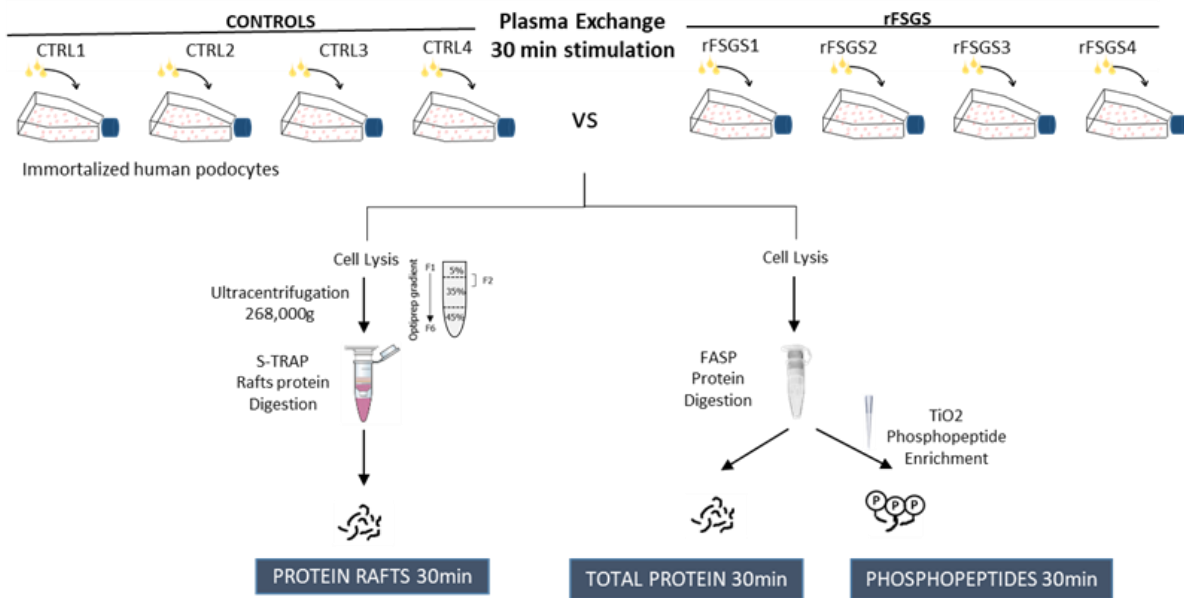
72. Ni, Y., Wang, X., Yin, X., Li, Y., Liu, X., Wang, H., Zhang, J., Gao, H., Shi, B., and Zhao, S. (2018) Plectin protects podocytes from adriamycin-induced apoptosis and F-actin cytoskeletal disruption through the integrin alpha6beta4/FAK/p38 MAPK pathway. *J Cell Mol Med* 22, 5450-5467
73. Trost, M., English, L., Lemieux, S., Courcelles, M., Desjardins, M., and Thibault, P. (2009) The phagosomal proteome in interferon-gamma-activated macrophages. *Immunity* 30, 143-154
74. Bouameur, J. E., Schneider, Y., Begre, N., Hobbs, R. P., Lingasamy, P., Fontao, L., Green, K. J., Favre, B., and Borradori, L. (2013) Phosphorylation of serine 4,642 in the C-terminus of plectin by MNK2 and PKA modulates its interaction with intermediate filaments. *J Cell Sci* 126, 4195-4207
75. Riddick, N., Ohtani, K., and Surks, H. K. (2008) Targeting by myosin phosphatase-RhoA interacting protein mediates RhoA/ROCK regulation of myosin phosphatase. *J Cell Biochem* 103, 1158-1170
76. Dephoure, N., Zhou, C., Villen, J., Beausoleil, S. A., Bakalarski, C. E., Elledge, S. J., and Gygi, S. P. (2008) A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci US A* 105, 10762-10767
77. Olsen, J. V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M. L., Jensen, L. J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T. S., Nigg, E. A., Brunak, S., and Mann, M. (2010) Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal* 3, ra3
78. Zhou, H., Di Palma, S., Preisinger, C., Peng, M., Polat, A. N., Heck, A. J., and Mohammed, S. (2013) Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome. *J Proteome Res* 12, 260-271
79. Lehto, M., Mayranpaa, M. I., Pellinen, T., Ihalmo, P., Lehtonen, S., Kovanen, P. T., Groop, P. H., Ivaska, J., and Olkkonen, V. M. (2008) The R-Ras interaction partner ORP3 regulates cell adhesion. *J Cell Sci* 121, 695-705
80. Weber-Boyvat, M., Kentala, H., Lilja, J., Vihervaara, T., Hanninen, R., Zhou, Y., Peranen, J., Nyman, T. A., Ivaska, J., and Olkkonen, V. M. (2015) OSBP-related protein 3 (ORP3) coupling with VAMP-associated protein A regulates R-Ras activity. *Exp Cell Res* 331, 278-291
81. Dlugos, C. P., Picciotto, C., Lepa, C., Krakow, M., Stober, A., Eddy, M. L., Weide, T., Jeibmann, A., M, P. K., Van Marck, V., Klingauf, J., Ricker, A., Wedlich-Soldner, R., Pavenstadt, H., Klambt, C., and George, B. (2019) Nephrin Signaling Results in Integrin beta1 Activation. *J Am Soc Nephrol* 30, 1006-1019
82. Pozzi, A., Jarad, G., Moeckel, G. W., Coffa, S., Zhang, X., Gewin, L., Eremina, V., Hudson, B. G., Borza, D. B., Harris, R. C., Holzman, L. B., Phillips, C. L., Fassler, R., Quaggin, S. E., Miner, J. H., and Zent, R. (2008) Beta1 integrin expression by podocytes is required to maintain glomerular structural integrity. *Dev Biol* 316, 288-301
83. Smeets, B., Stucker, F., Wetzels, J., Brocheriou, I., Ronco, P., Grone, H. J., D'Agati, V., Fogo, A. B., van Kuppevelt, T. H., Fischer, H. P., Boor, P., Floege, J., Ostendorf, T., and Moeller, M. J. (2014) Detection of activated parietal epithelial cells on the glomerular tuft distinguishes early focal segmental glomerulosclerosis from minimal change disease. *Am J Pathol* 184, 3239-3248
84. Kim, T., Ravilious, G. E., Sept, D., and Cooper, J. A. (2012) Mechanism for CARMIL protein inhibition of heterodimeric actin-capping protein. *J Biol Chem* 287, 15251-15262
85. Konigshausen, E., Zierhut, U. M., Ruetze, M., Potthoff, S. A., Stegbauer, J., Woznowski, M., Quack, I., Rump, L. C., and Sellin, L. (2016) Angiotensin II increases glomerular permeability by beta-arrestin mediated nephrin endocytosis. *Sci Rep* 6, 39513



**Table 1 : Patients description**

Group	Sex (M/F)	Age	Diagnosis	ProtU/CréatU (mg/mmol)	Serum creatinine (μmol/L)	Date transplantation	Date of sampling	Number of transplantation	Complications post-transplantation
CTRL1	M	74	Other nephropathy	32,67	351	06/02/2018	15/03/2018	2nd	Humoral rejection
CTRL2	M	60	Other nephropathy	37,93	154	18/07/2013	25/06/2018	1st	Humoral rejection
CTRL3	M	62	IgA nephropathy	91,49	363	janv-08	15/05/2018	1st	Humoral rejection
CTRL4	F	45	Diabetic nephropathy	67,1	241	24/05/2004	16/04/2018	1st	Humoral rejection
FSGS1	M	31	FSGS	229,59	418	17/05/2015	19/05/2015	2nd	FSGS Recurrence
FSGS2	M	21	FSGS	436	668	01/11/2018	29/10/2018	1st	FSGS Recurrence
FSGS3	F	70	FSGS	129,34	155	déc-07	27/02/2018	1st	FSGS Recurrence
FSGS4	F	48	FSGS	800	170	27/12/2005	10/07/2005	2nd	FSGS Recurrence

**Figure 1 : Experimental workflow to investigate the podocytes proximal signaling upon PE treatment**



**Figure 2 : Rafts purity assessment**

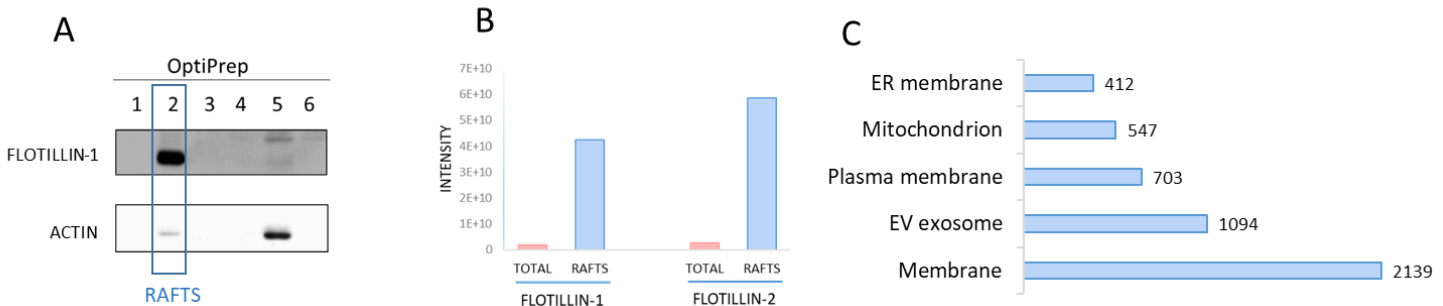


Figure 3 : Heatmap rafts

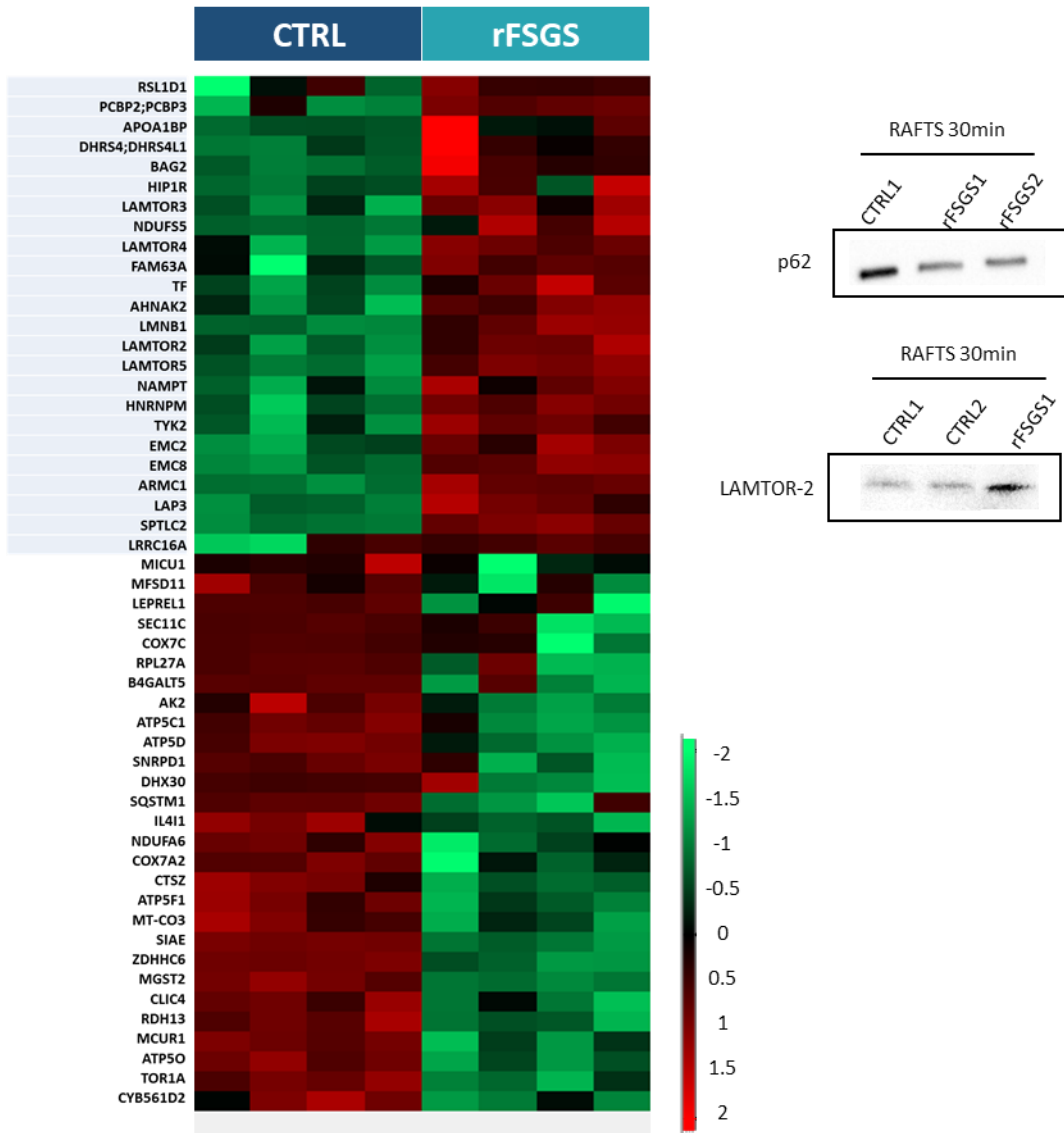


Figure 4 : Characteristics of phosphoproteomics

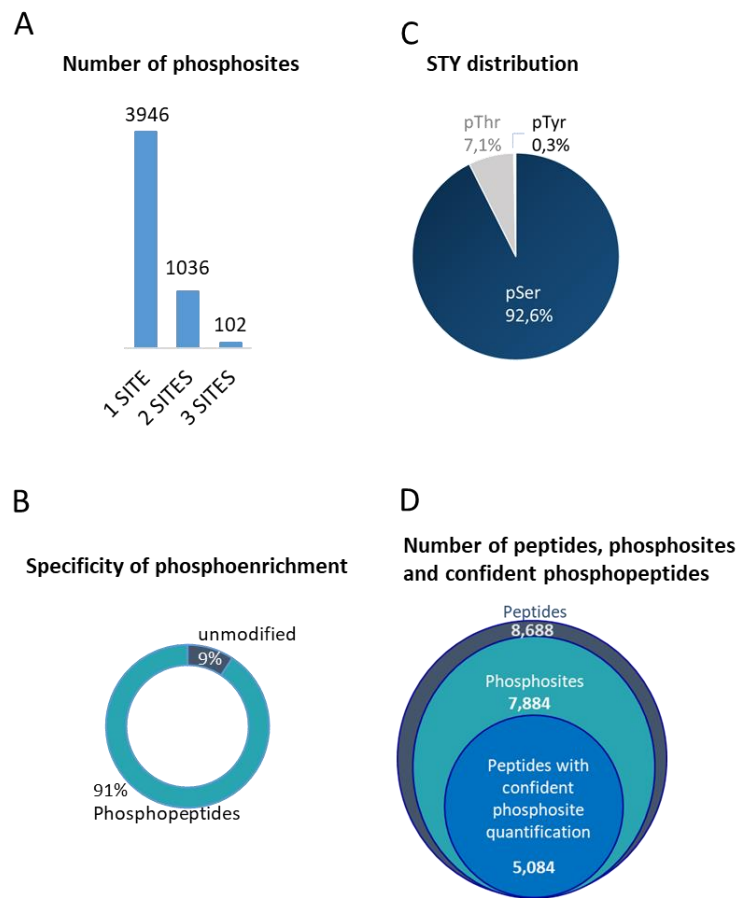


Figure 5 : Volcano plots of rafts, total proteins and phosphoproteins

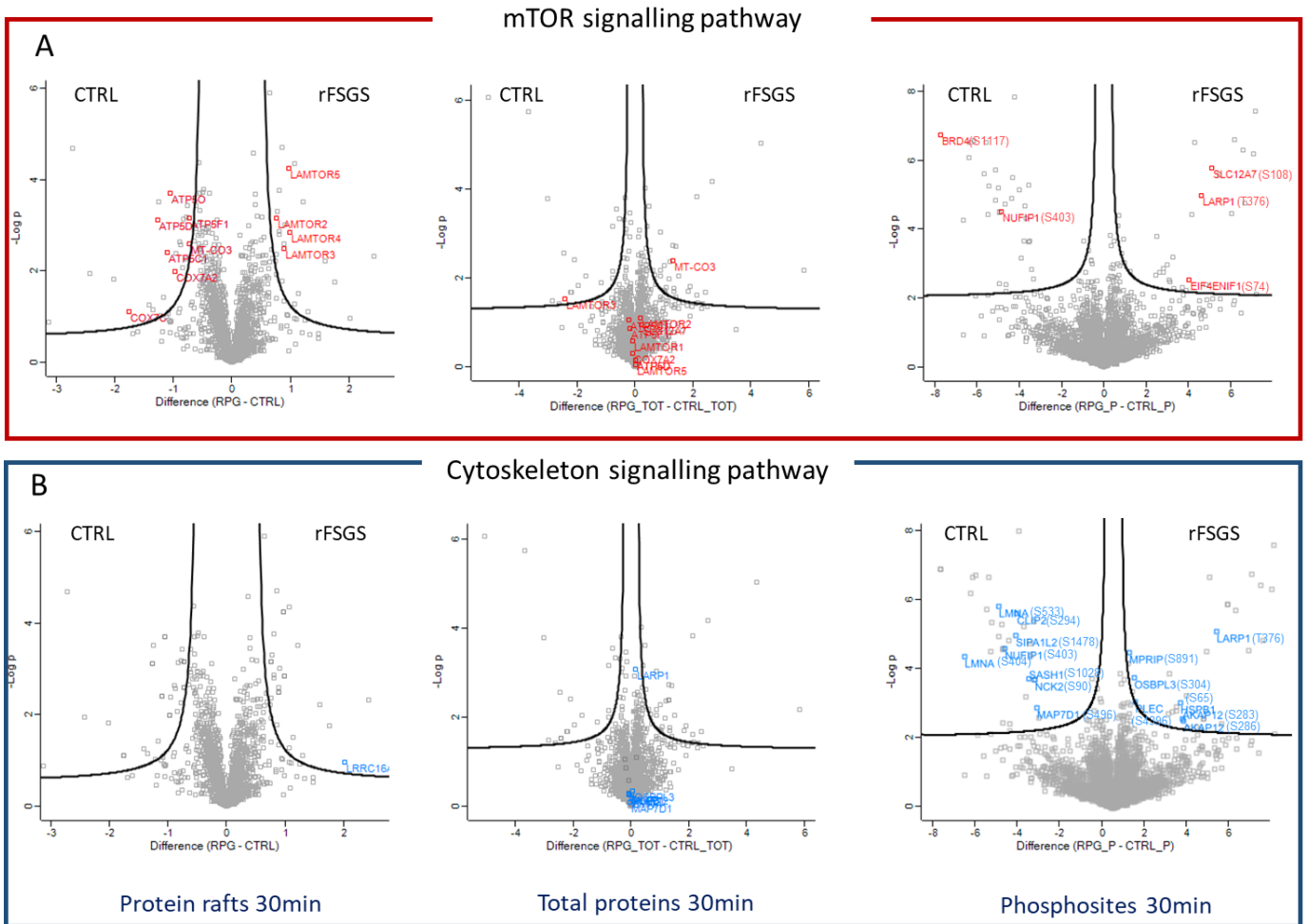


Figure 6 : Western blot of mTOR activity and autophagy markers

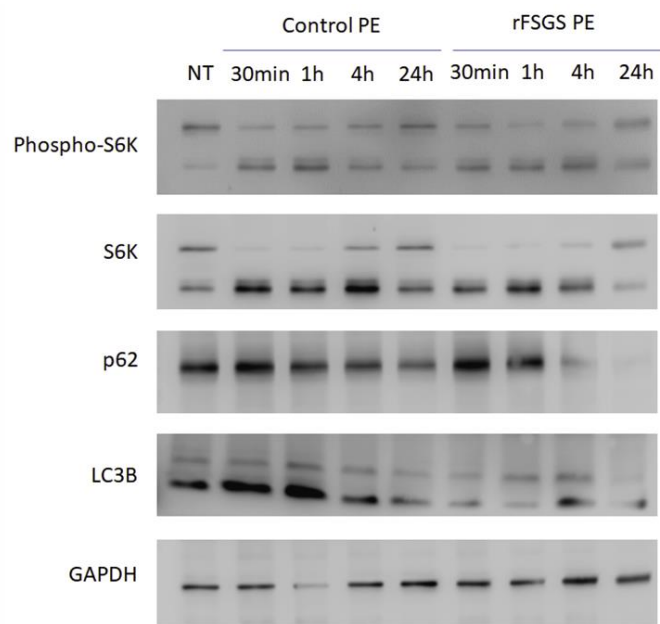
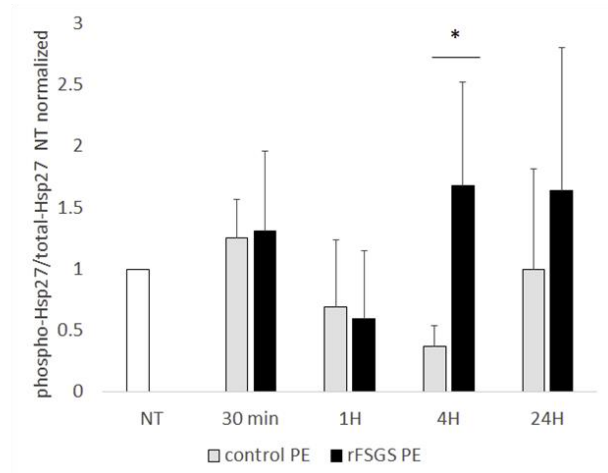
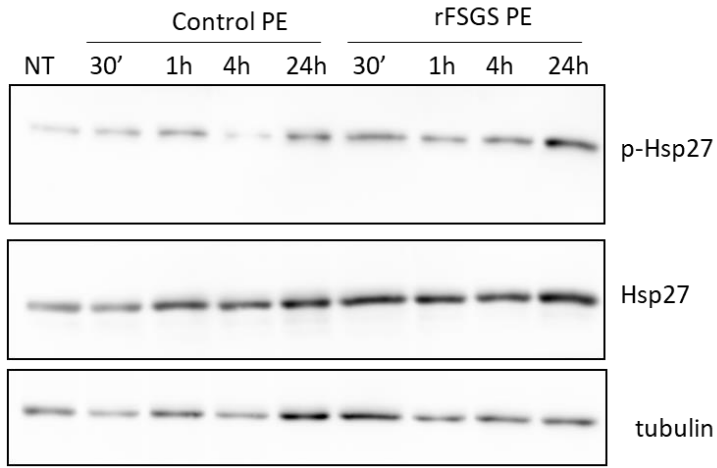


Figure 7 :

A Phosphorylation of Hsp27



B F-actin fiber distribution

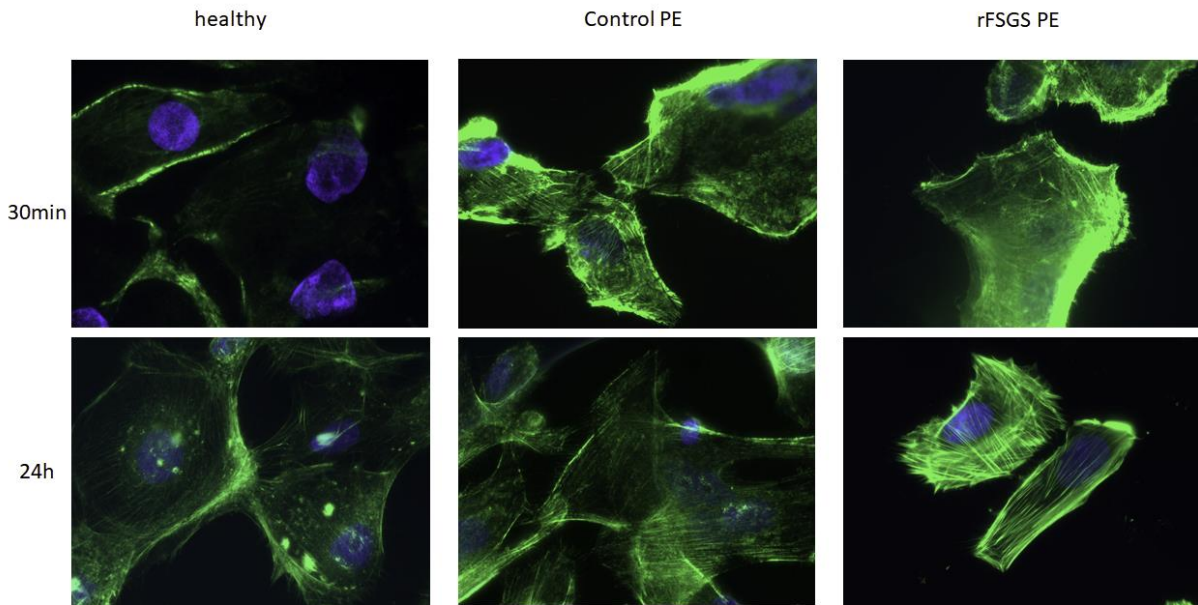
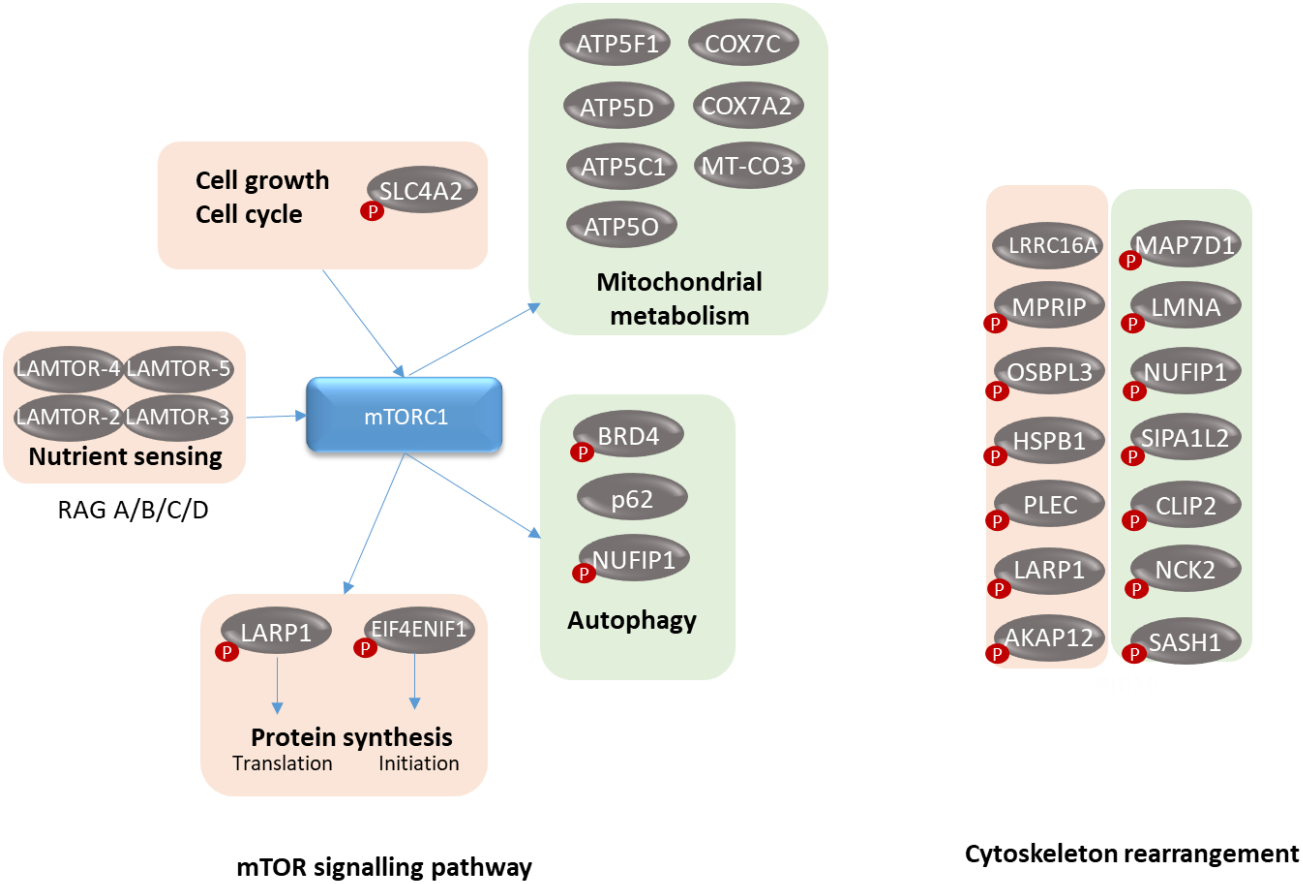


Figure 8 : Proposed model of mTOR activation and cytoskeleton rearrangement upon PE treatment



## 1.5 AXE CLINIQUE

### 1.5.1 Etude protéomique des échanges plasmatiques de patients en récurrences post-greffe de la HSF

#### **Introduction**

Le diagnostic du SNI repose exclusivement sur l'analyse histologique du rein et est basé sur la pratique d'une biopsie rénale qui est un geste médical invasif et qui peut mener à des complications. De nos jours, il n'est pas possible de prédire le risque de rechute ou de récurrence du SNI avec des conséquences évidentes sur le plan scolaire mais également dans la vie socioprofessionnelle.

#### **Objectifs de l'étude**

Notre but est de comparer les échanges plasmatiques des patients HSF en récurrence post-greffe afin de trouver des biomarqueurs diagnostics ou prédictifs de la récurrence.

#### **Résultats obtenus**

Pour cette étude, nous avons comparé les PE de 4 patients rFSGS, les PE de 3 patients contrôles et le plasma de 4 individus sains. Nous avons réalisé l'analyse par spectrométrie de masse des vésicules extracellulaires et des protéines plasmatiques déplétées des 12 protéines les plus abondantes du plasma. Nous espérons réaliser une analyse exhaustive du plasma en ne se limitant pas aux protéines solubles. Pour commencer, nous avons essayé de dépletter le plasma de différentes façons, en commençant par la précipitation des protéines de haut poids moléculaire par sulfate d'ammonium, puis par déplétion de l'albumine par le cibacron. Cependant, ces techniques n'ont pas permis d'identifier en profondeur le protéome plasmatique. Nous avons choisi de réaliser une librairie à partir de protéines plasmatiques déplétées des 12 protéines les plus abondantes du plasma, en séparant les peptides plasmatiques en 13 fractions qui ont été analysées par spectrométrie de masse avec des gradients de 2h. Ce fractionnement demande de longs temps d'analyses : 26h pour un seul échantillon.

Ensuite, nous avons voulu nous assurer que nous pouvions comparer du plasma avec des échanges plasmatiques. Pour comparer les deux, nous avons prélevé le sang d'un patient avant sa séance de plasmaphérese puis 1h plus tard, nous avons récupéré la poche d'échanges plasmatiques du même patient. Sur ces échantillons, nous avons réalisé une déplétion (TOP12) et un isolement des microvésicules. Les intensités label-free déterminées par le logiciel Maxquant montrent que les plasmas déplétés sont très similaires, voire identiques aux échanges plasmatiques du même patient ( $r > 0,99$ ). Les microvésicules sont moins similaires ( $r = 0,9$ ). Ceci est peut-être dû au fait que la préparation des microvésicules est moins reproductible que celle visant à dépletter le plasma. Ainsi, nous avons conclu que nous pouvions comparer des plasmas aux échanges plasmatiques.



Pour revenir à l'étude initiale, afin d'identifier des biomarqueurs pertinents et témoignant de la récurrence des patients HSF, nous avons démontré que, parmi les protéines statistiquement différentes entre les patients HSF et les CTRL et les sains, la dégranulation du neutrophile semble plus prononcée chez ces patients HSF comparé aux deux contrôles, plus particulièrement des protéines solubles contenues dans les granules de neutrophiles mais également une libération accrue de microvésicules provenant de la dégranulation du neutrophile. Cette dégranulation du neutrophile est accompagnée d'une diminution de la dégranulation des plaquettes et une diminution des protéines impliquées dans les liaisons aux lipides. De façon très intéressante, 3 protéines pouvant être impliquées dans la réorganisation du cytosquelette podocytaire (PODXL, EZR et IQGAP1) sont retrouvées augmentées dans les microvésicules des patients HSF comparé aux 2 contrôles. De plus, les microvésicules transportant des protéines impliquées dans le transport des acides aminés et dans la voie mTOR sont augmentés chez les patients HSF.

### **Conclusions**

Les protéines identifiées dans cette étude pourraient être impliquées dans les mécanismes de récurrence et être considérées comme de potentiels candidats marqueurs de l'HSF.

**Unraveling the plasma proteome of focal segmental glomerulosclerosis patients: soluble proteins and extracellular vesicles**

Cerina Chhuon<sup>1,2</sup>, Shao-Yu Zhang<sup>2</sup>, Vincent Jung<sup>1</sup>, Joanna Lipecka<sup>1</sup>, André Pawlak<sup>2</sup>, Vincent Audard<sup>2,3</sup>, Dil Sahali<sup>2,3,4</sup>, Mario Ollero<sup>2,4</sup>, Ida Chiara Guerrera<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Proteomic Platform Necker, PPN, Structure Fédérative de Recherche SFR Necker US24, 75015, Paris, France

<sup>2</sup>Institut Mondor de Recherche Biomédicale, INSERM, U955, 94010 Créteil, France

<sup>3</sup>AP-HP (Assistance Publique des Hôpitaux de Paris), Department of Nephrology and Renal Transplantation, Groupe Hospitalier Henri-Mondor, 94010 Créteil, France

<sup>4</sup>Université Paris Est Créteil, 94010, Créteil, France

## ABSTRACT

Focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS) is a severe form of idiopathic nephrotic syndrome, of presumable immune origin and attributed to extrarenal pathogenic circulating factors. Diagnosis is based on kidney biopsy and to date there are no available biomarkers to predict FSGS recurrence (rFSGS) after transplant, which occurs in 30 to 50% of cases. Direct analysis of patient plasma proteome has not been addressed to date, mainly due to methodological difficulties associated with plasma complexity and dynamic range. In the present study we compared different methods of plasma preparation by depletion of the most abundant proteins. By a combination of immunodepletion and high pH fractionation, we performed in parallel a differential proteomic analysis of soluble plasma proteins and of extracellular vesicles (EV) obtained from healthy controls, non-INS patient controls, and rFSGS patients (n=4). In both soluble and EV protein sets from rFSGS patients we found a statistically significant increase in a cluster of proteins involved in neutrophil degranulation. A group of lipid binding proteins, generally associated with lipoproteins, was found decreased in the soluble set from rFSGS patients. In addition, three aminoacid transporters involved in mTORC1 activation were found significantly increased in EV from rFSGS individuals. Further research will be necessary to investigate the implication of neutrophil activation, lipoprotein dynamics and mTOR signalling in the pathogenesis of FSGS, as well as the potential of some of the identified differential proteins as FSGS biomarkers.

## INTRODUCTION

Focal and Segmental Glomerulosclerosis (FSGS) is the most frequent form of idiopathic nephrotic syndrome among adults. The disease is progressive, can be unresponsive to corticosteroids and immunosuppressive treatment and eventually leads to end stage renal insufficiency requiring lifetime dialysis or kidney transplantation. For most of the patients, kidney transplantation is considered as the only therapeutic alternative. However, 30% of the individuals develop recurrence of the disease (rFSGS) in the hours or days following renal graft (1). Compelling evidence point to the existence of a causative permeability factor responsible for rFSGS (2). The latter is commonly managed by plasma exchange (PE) or plasmapheresis, a therapy where plasma is removed and replaced by an albumin solution. PE is used for the removal of deleterious proteins or antibodies and widely employed in autoimmune diseases, neurologic pathologies, hepatic insufficiency, and familial hypercholesterolemia (3). This intervention has proven to be an effective treatment for rFSGS by removing the potential permeability factor, but the benefits from this method is usually limited to several months.

In the context of FSGS disease, several groups have tried to identify the permeability factor or factors responsible for disease recurrence by various methods and several potential candidates have been suggested (for review see(4-6)). Some studies focused their efforts on molecules known to modify the kidney barrier function (7). Only a limited number of studies have used mass spectrometry to identify novel candidates in plasma, following affinity chromatography (8) or two-dimensional electrophoresis (9).

FSGS diagnosis relies exclusively on kidney biopsy, a highly invasive procedure, due to the lack of diagnostic and prognostic biomarkers. In order to identify biomarkers in plasma, in-depth characterization of low and medium abundance proteins is mandatory. Depletion of high abundance proteins has been used to dig deeper into the plasma proteome (10). However, a growing number of studies have focused on extracellular vesicles (EVs). The latter have been found involved in the pathogenesis of kidney diseases (11) (12) and play important roles in immune regulation, including activation and inhibition of immune cell responses (13). EVs are especially important because they provide a snapshot of the cell from which they originate at one particular moment. Therefore, EVs are an invaluable tool for diagnosis, prognosis and progression assessment of diseases. To date, a few studies have analyzed EVs in PE samples, in the search for miRNA signatures (14) and proteomic signatures (15) of patients.

In the present work, we compared the protein composition (encompassing both EVs and soluble proteins) of peripheral blood plasma and PE fluid from a single individual. We also compared the proteomic profiles of EVs and depleted PE proteins between rFSGS patients and control patients in order to identify novel noninvasive biomarkers of the disease.

## MATERIALS AND METHODS

### Plasma exchange and plasma collection

Healthy volunteers as well as nephropathic patients from Henri Mondor CHU Hospital (Créteil, France) provided informed consent. The study enrolled five healthy individuals (two women and three men between 32 and 50 years old) with no clinical history of kidney disease, four patients with post-transplant recurrent FSGS (rFSGS) and four patients with other nephropathies, used as patient controls (table1). Plasma (2mL) was obtained from peripheral blood by centrifugation twice at 1,500g for 10min. First post-transplant PE fluid was collected immediately after plasmapheresis session and frozen at -80°C.

### Extracellular vesicles preparation

Extracellular vesicles were obtained by a centrifugation method based on the protocol published by Geiger's laboratory (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4390257/>).

All the steps were carried out at 4°C. Briefly, plasma was centrifuged at 3,300g for 20min to remove platelets. Supernatants were collected in clean tubes and diluted 2-fold with ice-cold PBS and centrifuged at 20,000g for 1h. Pelleted extracellular vesicles were then washed two times with the same volume of ice-cold PBS and suspended in 5% SDS, 50mM triethylammonium bicarbonate (TEAB).

#### **Plasma immunodepletion using Proteome Purify™ kit**

Proteome Purify™ 12 Human Serum Protein Immunodepletion Resin kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) was used to deplete the TOP12 most abundant proteins according to the manufacturer's protocol with some modifications. Resin (1mL) was centrifuged for 30s at 1000g. PE and plasma were thawed on ice, 10µL of each sample were mixed with 500µL of PBS and incubated with the resin under rotary agitation for 1h at room temperature. After incubation, samples were centrifuged on Spin-X 0.22µm cellulose acetate membrane filters (Corning Costar®, NY, USA) to remove the resin and further centrifuged on 3kDa Microcon (Millipore, Bedford, MA, USA) to concentrate the depleted samples.

#### **Plasma depletion using Cibacron Blue**

Cibacron blue (Pierce Albumin Removal Kit, Thermo Scientific, IL, USA) was used to deplete albumin from samples according to the manufacturer's protocol. Slurry (200µL) was centrifuged at 12,000g for 1min and washed once with 100µL of 25mM Tris-HCl pH 7.5. Plasma or PE (10µL) were incubated with slurries and 40µL of 25mM Tris-HCl pH 7.5 for 2min at room temperature. Samples were centrifuged at 12,000g for 1min. Depleted samples were then eluted five times with 50µL of 25mM Tris-HCl pH 7.5.

#### **Plasma depletion using ammonium sulfate**

Fifty mL of PE were thawed, centrifuge at 1,600g for 30min at 4°C. The supernatant was recovered and supplemented with protease inhibitors (Roche Complete Mini), then 0.2 volumes of 50mM Tris-HCl pH 8.6 were added. Next, 131.23 mL of saturated ammonium sulfate were added drop by drop under constant agitation at 4°C. The mixture was left agitating for additional 20min, then centrifuged at 1,600g for 30min at 4°C. The supernatant was recovered and subjected to proteomic analysis.

#### **Suspension trapping (S-Trap)**

S-Trap™ micro spin column digestion was performed on OptiPrep™ raft fractions according to the manufacturer's protocol. Briefly, proteins were precipitated overnight using 10% TCA final concentration and washed four times with cold ethanol. Proteins were resuspended and solubilized in 5% SDS, 50mM TEAB (pH 7.55), reduced with 20mM tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) solution and alkylated by the addition of chloroacetamide to a final concentration of 50mM. Aqueous phosphoric acid was added to a final concentration of 1.2%. Colloidal protein particulate was formed with the addition of 231µL of S-Trap binding buffer (90% aqueous methanol, 100mM TEAB, pH7.1). The mixture was placed on S-Trap micro 1.7mL columns and centrifuged at 4,000g for 10 seconds. Columns were washed five times with 150µL S-Trap binding buffer and centrifuged at 4,000g for 10 seconds with 180-degree rotation of the columns between washes. Samples were digested with 2µg of trypsin (Promega) at 47°C for 1h. Peptides were eluted with 40µL of 50mM TEAB followed by 40µL of 0.2% aqueous formic acid and by 35µL 50% acetonitrile containing 0.2% formic acid. Peptides were finally vacuum dried. Samples were resuspended in 20 µL of 1% ACN, 0.1% TFA in HPLC-grade water.

#### **High pH fractionation**

Samples were fractionated by in-tip high pH reverse phase chromatography, using 1 mg of C18-AQ 5 µm beads (Dr. Maisch, GmbH, Ammerbuch, Germany) per sample. Beads were conditioned twice with 50 µL of 50% ACN and twice with 50 µL of 0.1% TFA, centrifuged 2 min at 1500g. Peptides were resuspended in 50 µL of 0.1% TFA and added onto the stage tip centrifuged 2 min at 1500g. The stage tip was washed with 50 µL of HPLC-grade water and the peptides were sequentially eluted with 0.1% trimethylamine and an increasing percentage of ACN (5%, 7.5%, 10%, 12.5%, 15%, 17.5%, 20% and

50%). The 26 fractions were concatenated in 13 fractions (F1-F14, F2-F15, F3-F16... F12-F25, F13-F26). These 13 fractions were dried and resuspended in 14  $\mu$ L of 10% ACN, 0.1% TFA in HPLC-grade water.

#### **NanoLC-MS/MS protein identification and quantification**

For each run, 1  $\mu$ L was injected in a nanoRSLC-Q Exactive PLUS (RSLC Ultimate 3000) (Thermo Scientific, Waltham MA, USA). Peptides were loaded onto a  $\mu$ -precolumn (Acclaim PepMap 100 C18, cartridge, 300  $\mu$ m i.d. $\times$ 5 mm, 5  $\mu$ m) (Thermo Scientific), and separated on a 50 cm reversed-phase liquid chromatography column (0.075 mm ID, Acclaim PepMap 100, C18, 2  $\mu$ m) (Thermo Scientific). 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 minutes), 40% to 80% (5 minutes). At 125 minutes, the gradient returned to 5% to re-equilibrate the column for 20 minutes before the next injection. Two blanks were run between samples to prevent sample carryover. Peptides eluting from the column were analyzed by data dependent MS/MS, using a top-10 acquisition method. Peptides were fragmented using higher-energy collisional dissociation (HCD). 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 with maximum injection time set to 200 ms, while MS/MS AGC target was set to 1.105 with maximum injection time set to 120 ms. The MS scan range was from 400 to 2000 m/z. Dynamic exclusion was set to 30 seconds duration. Three separate mass spectrometry runs (i.e. technical replicates) were acquired for each biological replicate under the identical mass spectrometric conditions to account for instrument-related variability and to improve accuracy of the label-free quantification.

#### **MS data processing and bioinformatic analysis**

MS data processing and bioinformatics were done as previously described with some modifications (63). Briefly, raw MS files were processed with the MaxQuant software version 1.6.14.0 and searched with the Andromeda search engine against the human UniProt database (release May 2019, 20,199 entries). To search for parent mass and fragment ions, we set the mass deviation at 4.5 ppm and 20 ppm, respectively. The minimum peptide length was set to seven amino acids and strict specificity for trypsin cleavage was required, allowing up to two missed cleavage sites. Match between runs was allowed. Carbamidomethylation (Cys) was set as fixed modification, whereas oxidation (Met) and protein N-terminal 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 (63).

Statistical and bioinformatic analysis, including heatmaps, volcano plots and multi-scatter plots were performed with Perseus software (version 1.6.12.0) freely available at [www.perseus-framework.org](http://www.perseus-framework.org). Functional enrichment analysis of significant proteins was performed using String-DB.

## RESULTS

### Different depletion methods and library building

To date, no global proteomic analysis of plasma in the context of FSGS disease has been conducted and (4) (5) (6) Some studies concentrated their efforts on molecules known to modify the kidney barrier function (7). Only a limited number of studies have used mass spectrometry to identify novel candidates in plasma, after affinity chromatography (PMID : 12631135) or two-dimensional electrophoresis (PMID : 23205849) previous proteomic studies conducted on other clinical samples from FSGS patients are relatively outdated. In this study, we aimed to explore the plasma proteome of rFSGS patients in order to identify low abundant and potentially clinically discriminating proteins. Early studies led by the group of Savin, suggested that 70% ammonium sulfate would precipitate most of the high molecular weight plasma proteins while leaving the permeability factor in the supernatant (16). As a starting point, we tested the ammonium sulfate precipitation protocol on a sample from a control and rFSGS patient and analyzed the proteins in the supernatant by mass spectrometry. We used plasma exchange samples, readily available in high quantity from these patients. Before precipitation, we identified 262 and 260 proteins for control and rFSGS patients respectively. After precipitation, the number of identified proteins dropped to 123 and 143 proteins. We estimated the abundance of proteins by the number of MS/MS spectra acquired for a selection of proteins in each sample. As expected, proteins with high molecular weight (>60kDa) precipitated while leaving proteins like albumin (ALB, 60kDa) or alpha-1-antitrypsin (SERPINA1, 45kDa) in the supernatant (**Figure 1A**). The relatively lower number of proteins identified after precipitation is probably due to the fact that 70% ammonium sulfate leads to the precipitation of most of the high MW plasmatic proteins and, as a consequence, to the concentration of albumin in the supernatant. Albumin is the most abundant protein in plasma and it is known to interfere with the identification of lower abundance proteins. In these analytical conditions the deeper plasma proteome remains hidden.

We therefore performed albumin depletion of plasma with a dye-ligand method using Cibacron Blue, a dye showing a structural similarity with bilirubin that strongly binds albumin and other plasma molecules (17). As shown in **Figure 1B**, albumin depletion allowed the identification of a similar number of proteins to non-depleted. In fact, albumin depletion was confirmed (decrease of albumin intensity of 634%), but other high abundance plasma proteins (SERPINA1, alpha-2-macroglobulin, serotransferrin and ceruloplasmin) were identified with a higher number of MS/MS (increase of 58% to 189%) as compared to non-depleted samples. In albumin depleted samples, the mass spectrometer spent a significantly higher amount of time collecting MS/MS for the top remaining high abundance proteins, leaving again the deeper plasma proteome hidden.

As demonstrated before, ammonium sulfate precipitation could separate a putative permeability factor from high molecular weight proteins like immunoglobulins (Savin et al), yet this method is not suited for in-depth plasma identification. Likewise, simple depletion of albumin does not improve the MS depth of analysis.

To obtain in-depth plasma identification, we chose to build a spectral library through a combination of immunodepletion -allowing to deplete the top 12 most abundant protein in the plasma (TOP12)- and extensive high-pH reverse phase peptide fractionation (13 fractions, up to 26h of machine time per sample). The library allowed us to transfer peptide identifications from one sample to another, without the need to fractionate every sample, which is time-consuming. The in-house plasma library contained 917 plasma proteins (Figure 1C). For comparison, immunodepletion alone allowed the identification of 358 proteins (2h of machine time), while extensive fractionation alone led to the identification of 406 proteins (26h of machine time). Using the library, we could identify a higher

number of proteins in these samples using a 2h LC MSMS analysis time (**Figure 1C**). A summary of the tests performed in plasma preparation and the results obtained is reported in Figure 1D.

### **Comparison of proteome from plasma and plasma exchange samples**

For this study, we only had access to PE samples from rFSGS patients. As these patients are subjected to plasmapheresis for therapeutic reasons, PE samples are readily available and stored in large quantities. However, we wanted to compare the plasma proteome to healthy donors, for whom only peripheral blood plasma is available.

According to how the plasmapheresis device operates, there is no clear evidence of any compositional difference between plasma and PE samples. In order to be able to compare peripheral blood plasma from healthy donors along with PE from nephropathic patients in this study, we compared first the plasma and the PE proteomes.

To enlarge the spectrum of proteins analyzed within the plasma of patients, we decided to additionally analyze proteins contained in plasma extracellular vesicles (EVs). By exploring the soluble plasma proteome and the EVs proteome we cover two major fractions of plasmatic proteins, the soluble and the intracellular-derived fraction. Plasma EVs are prepared by centrifugation and extensive washings in order to eliminate any contamination from high abundance soluble proteins.

Given the interest of both soluble proteins and EVs protein profiles, we performed immunodepletion and EV isolation on plasma drawn from a patient who received PE therapy on the same day. PE was collected immediately after the plasmapheresis session (**Figure 2**). Each sample was divided into three parts and they were analyzed in parallel. The number of identified proteins was comparable between plasma and the PE samples for soluble proteins, although we identified slightly lower EVs proteins from PE (supplementary Figure 2). To evaluate the similarity of plasma and PE proteomes, we calculated Pearson correlation coefficient values of LFQ intensities for soluble and EV proteins. Comparison of soluble proteins showed high correlation ( $r=0.995-0.998$ ) (**Figure 2**, blue shades). EV plasma proteins showed a slightly lower correlation ( $0.77-0.942$ ) between the plasma EV and the PE EVs (**Figure 2**, pink shades). Nonetheless, a certain variability was also observed between vesicles prepared independently from the same sample, suggesting that the EV preparation *per se* can be the reason for the observed variability. The average Pearson correlation coefficient values of LFQ intensities for each group was  $>0.8$  for soluble proteins and EVs proteins. Furthermore, to confirm the similarity of proteomes, we plotted logarithmized LFQ intensities of alpha-2-macroglobulin (A2M) and serotransferrin (TF) soluble plasma proteins, showing no significant difference (**Supplementary Figure 1**). The same results were found for EV marker proteins, such as CD9 and integrins, which were also not significantly different.

### **Analysis of soluble and EV plasma proteome from rFSGS patients**

For this study, we collected PE from rFSGS patients and compared them with two sets of controls (detailed in Experimental Section) to find specific disease-associated proteins. These two sets of controls include peripheral blood plasma (from healthy donors) and PE (from CTRL patients).

As no significant differences between plasma and PE proteome profiles were found in the preceding study, we compared proteins from plasma of healthy donors and PE of rFSGS patients (**Figure 3C**). A total of 480 soluble plasma proteins and 1312 EVs proteins were identified across all samples with 269 proteins in common (**Figure 3B**). Interestingly, we found EVs markers of several immune cells in EV (CD45 for leucocytes, CD8/81/82 for T-cells and CD19/29/37 for B-cells) that we did not identify among soluble proteins (**Supplementary figure 2**). Changes in plasmatic protein abundance are depicted in the heatmaps in **Figure 3C**. An ANOVA test (permutation-based  $FDR < 0,05$ )



led to the quantification of 88 significantly different proteins among the three groups for plasma soluble proteins and 478 significantly modulated proteins for EVs. In both cases, hierarchical clustering of the samples indicates that the significant proteins can clearly discriminate healthy donors, control patients and rFSGS patients. The two groups of patients show a more similar profile, compared to healthy controls.

In order to select disease-related proteins, we chose those differentially abundant in rFSGS patients compared to healthy donors and to control patients. Among soluble proteins, 58 were modulated (47 upregulated and 11 downregulated) in rFSGS patients relative to the two sets of controls. These proteins were subjected to functional enrichment analysis using String-DB. Among the 47 upregulated proteins, 13 (B4GALT1, QSOX1, ORM1, ORM2, LRG1, FTL, GM2A, GIG25, TXNDC5, S100A8, S100A9, CD93, SIGLEC14) are involved in neutrophil degranulation (FDR =1.17e-08) (**Figure 4**). Among the 11 downregulated proteins, 3 (TLN1, TF and APOA1) are implicated in platelet degranulation (FDR=0.0077) and 5 proteins (TLN1, APOA1, GC, APOF and PLA2G7) are lipid binding (FDR=0.0018) (Figure 4). All these proteins are highlighted in the volcano plots respecting the same color code.

For EV proteins, 38 were modulated (30 upregulated and 8 downregulated) in rFSGS patients compared to the two groups of controls. Of these, 11 proteins (PRTN3, MPO, FTL, FPR1, CYBB, IQGAP1, CYSTM1, FCAR, ITGAL, DOCK2, LILRB3) are involved in neutrophil degranulation (FDR=8.36e-09). Therefore, this functional class was significantly enriched in rFSGS in both soluble and EV fraction, despite the fact that none of the proteins, except FTL, appear in both sets. Another class enriched and increased specifically was that of amino acid transporters, composed of the SLC7A5/SLC3A2 heterodimer along with SLC1A5, which have been previously described to be involved in activation of mTORC1 through nutrient sensing (18). Of note, among the EV identified proteins in this study and overrepresented in rFSGS patients, we observed one interaction between IQGAP1 and podocalyxin, which interacts with ezrin through NHERF1, all involved in podocyte cytoskeleton organization.

For both soluble and EV proteomes, the groups of significant proteins were also represented in volcano plots (FDR<0.05, s0=0.1, 250 randomizations) respecting the same color code as the functional annotations (**Figure 4**).

## DISCUSSION

Compelling evidence suggests that one or several permeability factors are responsible for the pathological process leading to FSGS recurrence in some transplanted patients. To date, no global proteomic analysis of plasma in the context of FSGS disease has been conducted and previous proteomic studies conducted on other clinical samples from FSGS patients are relatively outdated. In the context of post-transplant FSGS recurrence (for review see (4) (5) (6) elegant and hypothesis-driven strategies have circumvented the technical limitations in the search for potential circulating factors. Some studies concentrated their efforts on molecules known to modify the kidney barrier function (7). Only a limited number of studies have used mass spectrometry to identify novel candidates in plasma, after affinity chromatography (8) or two-dimensional electrophoresis (9). In the present work we address the subject of circulating factor research using state of the art strategies in proteomics leading to an in-depth screening of the plasma proteome.

Plasma is a biologic fluid commonly used in basic research. Large amounts of plasma are often required for research aiming at the purification of low abundant molecules, for diagnosis, prediction,

and tracking progression of a disease, such as circulating DNA (19), mRNA (20), miRNA (21), and proteins (22). Plasma availability and the yield of bioactive molecules represent serious limitations in quantity and quality in regard to clinical applications. Plasma proteome has a large dynamic range (23), the concentration of high and low abundance proteins spanning 12 orders of magnitude with the top 10 most abundant proteins representing 90% of the total protein mass. High-abundant proteins are well characterized and understood while low-abundant proteins are thought to be of great interest for their biological relevance and functions (24). Immunodepletion using antibodies raised against the most abundant proteins is the most common method to access to the identification of the low abundant proteins. Other methods for plasma depletion include dye-ligand, protein-ligand, precipitation, use of combinatorial peptide ligand library and enrichment of a protein population of interest like extracellular vesicles (25).

Extracellular vesicles (EV), comprising microvesicles and exosomes, are released by most cells in human body fluids. They act as cellular messengers for cell to cell communication. Their composition has been found to differ in various pathologies and to be modulated by different stress condition (chronic inflammation, infection, hypoxia, oxidative and mechanical stress etc.) (26). EVs from blood mostly originate from platelets, endothelial cells, erythrocytes, leukocytes but also from other cells in the body, releasing EVs in the circulating fluids. Technical challenges have been encountered in the isolation of EVs from urine (27), sweat (28), cerebrospinal fluid (29), and bronchoalveolar lavage (30). Arguably, isolation and purity of EVs are even more difficult to achieve in blood because of the physicochemical properties of this fluid (ie. viscosity and the high abundance of some plasma proteins). Yet, although plasma EV isolation is challenging, their analysis represents an alternative in the search for protein plasma markers. Nevertheless, soluble and EV proteins may represent different cellular origins and pathways, and consequently their analysis is complementary.

In the current work we have followed a step-to-step procedure to develop an optimized strategy to dig into the plasma proteome in the search for proteins potentially relevant to the post-transplant recurrence of FSGS. First, we have compared the efficiency of different methods for highly abundant protein depletion and chosen the one providing a higher rate of low abundant proteins identified. Second, we evaluated the differences in protein content between peripheral blood plasma and PE fluid from the same individual. This part of the study was particularly important in that our results justify the comparison of both types of sample, arguably corresponding to the same biological material. Third, we implemented a method for EV proteomics and performed in parallel, in the best possible conditions, the differential analysis of rFSGS material with that from two types of controls, namely healthy individuals and control patients. The latter corresponds to non FSGS patients having been subjected to kidney transplant and, consequently, having received the same immunosuppressant therapy.

In the best analytical setting that we could establish, we found consistently, both within soluble proteins and EV associated proteins, an enrichment of rFSGS upregulated proteins associated with neutrophil degranulation, where FTL (ferritin light chain) was the one appearing increased in both soluble and EV protein sets. A neutrophil protein and granule component (gelatinase-associated lipocalin, NGAL) has appeared in a urine proteomic study as a biomarker of FSGS as compared to MCNS, another form of INS, and its expression correlated with the degree of tubulointerstitial lesions (31), confirming previous reports (32) (33) (34) (35) in which NGAL is presented as a reliable biomarker to distinguish both forms of INS. In line with our findings, FSGS has been reported in patients of severe neutrophilic leukemia (36). Interestingly, we found NGAL in both soluble and EV sets. While in the soluble set NGAL was increased in both rFSGS and control patients as compared to healthy controls, in EV the increase was significant and specific of rFSGS samples. Our results comfort the previous reports of NGAL as an FSGS marker and the hypothesis and the observations of increased neutrophil activation in FSGS.

Conversely, a set of 3 proteins involved on platelet degranulation were downregulated in rFSGS in soluble plasma protein samples. Little is known about platelet activity in FSGS. In a comparative study of different forms of idiopathic nephrotic syndrome, FSGS and MCNS patients showed a decreased platelet reactivity as compared to idiopathic membranous nephropathy (37). Higher platelet counts have been reported in children with FSGS than in children with steroid sensitive nephrotic syndrome (38). Thromboembolism has been reported in some patients with INS (39), as well as essential thrombocythemia (40).

Even though it cannot be clearly inferred from our results an alteration of platelet activation in rFSGS, two of these 3 proteins (TLN1 and APOA1) are included in another cluster described as lipid binding, along with GC, APOF and PLA2G7. Of these, APOA1, APOF and PLA2G7 are components of lipoproteins. Indeed, dyslipidemia is one of the hallmarks of idiopathic nephrotic syndrome (41). Remarkably, LDL apheresis has been proposed and tested as an alternative therapeutic approach in FSGS (42) (43) (44), and several genetic variants in apolipoprotein genes, namely APOE5 (45) and APOL1 (46) have been found associated with FSGS susceptibility. Familial hypercholesterolemia has also been described (47). It would be, therefore, expected to find changes in lipoprotein-associated proteins in rFSGS soluble plasma samples. The specific role in FSGS of APOA1, APOF and PLA2G7, and the relevance of their decreased presence remain to be established.

A final major observation of our study is the increased presence of aminoacid transporters in rFSGS EV. The presence of SLC7A5/SLC3A2 couple, known to heterodimerize, and of SLC1A5 can represent a link between FSGS and mTOR signaling. In fact, these transporters have been previously described to be involved in the activation of mTORC1 through nutrient sensing (18). Inhibition of mTOR signaling (48), and more precisely of mTORC1 (49) have been shown to decrease proteinuria and prevent the progression of FSGS. Our results contribute to the increasing evidence of a role for mTOR signaling in the pathogenic mechanisms of FSGS. In a recent study we have found that human podocytes incubated in the presence of rFSGS PE present a relocalization of the Ragulator complex, which is key in the regulation of mTORC1 activity, to lipid rafts (unpublished observations). Altogether, these results point to a pathogenic mechanism that deserves further investigation.

To conclude, the differential proteins that we have identified in the present can be considered as candidate markers of FSGS. However, there are no arguments in our study to suggest they could be specific of FSGS recurrence. For this purpose, a study comparing recurrent vs. non-recurrent patients would be necessary, along with the choice of additional control groups and in vitro and in vivo tests to confirm any pathogenic effects on renal glomeruli. The analytical procedure that we describe in the current work represents a step forward in the direct analysis of the plasma proteome, with clinical evaluation applications in many other pathologies.

## FIGURE LEGENDS

**FIGURE 1 :** (A) Ammonium sulfate precipitation (AS) in plasma exchange. Number of proteins identified in plasma exchange before and after AS precipitation (pre-AS and post-AS). Number of MS/MS spectra were also reported in histograms for albumin (ALB), alpha-1-antitrypsin (SERPINA1), alpha-2-macroglobuline (A2M), serotransferrin (TF) and ceruloplasmin (CP). Molecular weight were indicated (>60kDa or <60kDa) for these proteins. (B) Albumin depletion of plasma exchange. Number of proteins identified in plasma exchange before and after albumin depletion. Number of MS/MS spectra were also reported in histograms for ALB, SERPINA1, A2M, TF and CP.

(C) Building of a spectral library with TOP12 depletion and extensive fractionation. For comparison, samples were also depleted or non-depleted with or without fractionation. High-pH fractionation was performed on plasma exchange, 26 fractions were collected and pooled in 13 fractions. Each fraction was run in a 2-h gradient. Number of proteins for each analysis was reported in histograms (in light blue). Additional proteins (in pink) identified with the library were also indicated. (D) Summary of different depletion and fractionation performed in these tests.

**FIGURE 2 :** Similarity between plasma and PE from same individual. Plasma and PE were collected on a the very same day from a patient treated with plasmapheresis (non-recurrent FSGS facing humoral rejection). After collection, 500 $\mu$ L (for EV preparation) and 10 $\mu$ L (for soluble proteins preparation) of each sample were placed in 3 different tubes to generate separate sample triplicates for the analysis. Triplicates of plasma (P1, P2 and P3) and plasma exchange (PE1, PE2 and PE3) were analyzed to assess reproducibility of the preparation. Soluble (in blue) and EV (in red) plasma proteins were performed on both type of sample. Pearson correlation coefficient were calculated for the LFQ intensities of the triplicates to assess the similarity between plasma and PE.

**FIGURE 3 :** (A) Study workflow and design. For this study, plasma of four healthy donors (H1, H2, H3 and H4), and plasma exchange of 3 controls patients (C1, C2 and C3, facing humoral rejection post-transplantation) and 4 rFSGS patients (rF1, rF2, rF3 and rF4, facing recurrent FSGS post-transplantation) were obtained to perform TOP12 depletion for the analysis of soluble plasma proteins (in blue) and EV isolation for the analysis of microvesicules plasma proteins (in pink). (B) Venn diagram represented the overlap between identified EV proteins and soluble plasma proteins. (C) Heatmap representation from Perseus software of significantly different proteins (ANOVA test,  $s_0=0.1$ , Permutation-based FDR<0.05) between rFSGS patients, healthy donors and controls patients. LFQ intensities of each protein (rows) were ranked and grouped according to their distribution signals in the clustering heatmap. Each column represents samples from each group. The color scale denotes abundance variation (red for more abundant, green for less abundant).

**FIGURE 4 :** Significant proteins in soluble and EV experiments. For soluble and EV plasma proteins, two volcano plots are depicted and represents the log<sub>2</sub> fold change (Difference, x-axis) against the  $-\log_{10}$  p-value (y-axis) for proteins differentially expressed between control-PE (right of plot) and healthy plasma (left of plot), and between rFSGS-PE (right of plot) vs healthy plasma (left of plot). STRING network representation (bottom) of significantly different proteins interactions. Proteins linked to neutrophil degranulation (in orange), platelet degranulation (in blue), lipid binding (in red), podocyte cytoskeleton (in purple), amino acids transporters (in green) were depicted in the STRING analysis.

**Supplementary figure 1 :** Difference between TOP12 plasma and PE from same individual. For soluble and EV plasma proteins, number of identified proteins were reported. Comparison of log<sub>2</sub> LFQ

intensities of plasma proteins (A2M and TF) and protein markers of EV (CD9 and integrins). Pearson correlation coefficient values between plasma and PE were shown on the bottom of this figure.

**Supplementary figure 2** : Proteins identified in plasma and PE proteome from patients. (A) Number of proteins identified in soluble and EV plasma proteins experiments for each healthy donor, control patients and rFSGS patients. (B) Specific markers of leukocytes, t-cells and b-cells found in EV experiments but not found in soluble plasma experiments.

## REFERENCES

1. Uffing, A., Perez-Saez, M. J., Mazzali, M., Manfro, R. C., Bauer, A. C., de Sottomaio Drumond, F., O'Shaughnessy, M. M., Cheng, X. S., Chin, K. K., Ventura, C. G., Avena, F., David-Neto, E., Mansur, J. B., Kirsztajn, G. M., Tedesco-Silva, H., Jr., Neto, G. M. V., Arias-Cabrales, C., Buxeda, A., Bugnazet, M., Jouve, T., Malvezzi, P., Akalin, E., Alani, O., Agrawal, N., La Manna, G., Comai, G., Bini, C., Muhsin, S. A., Riella, M. C., Hokazono, S. R., Farouk, S. S., Haverly, M., Mothi, S. S., Berger, S. P., Cravedi, P., and Riella, L. V. (2020) Recurrence of FSGS after Kidney Transplantation in Adults. *Clin J Am Soc Nephrol* **15**, 247-256
2. Reiser, J., Nast, C. C., and Alachkar, N. (2014) Permeability factors in focal and segmental glomerulosclerosis. *Adv Chronic Kidney Dis* **21**, 417-421
3. Nguyen, T. C., Kiss, J. E., Goldman, J. R., and Carcillo, J. A. (2012) The role of plasmapheresis in critical illness. *Crit Care Clin* **28**, 453-468, vii
4. Candelier, J. J., and Lorenzo, H. K. (2020) Idiopathic nephrotic syndrome and serum permeability factors: a molecular jigsaw puzzle. *Cell Tissue Res* **379**, 231-243
5. Konigshausen, E., and Sellin, L. (2016) Circulating Permeability Factors in Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis: A Review of Proposed Candidates. *Biomed Res Int* **2016**, 3765608
6. Maas, R. J., Deegens, J. K., and Wetzels, J. F. (2014) Permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome: historical perspectives and lessons for the future. *Nephrol Dial Transplant* **29**, 2207-2216
7. Wei, C., El Hindi, S., Li, J., Fornoni, A., Goes, N., Sageshima, J., Maignel, D., Karumanchi, S. A., Yap, H. K., Saleem, M., Zhang, Q., Nikolic, B., Chaudhuri, A., Daftarian, P., Salido, E., Torres, A., Salifu, M., Sarwal, M. M., Schaefer, F., Morath, C., Schwenger, V., Zeier, M., Gupta, V., Roth, D., Rastaldi, M. P., Burke, G., Ruiz, P., and Reiser, J. (2011) Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med* **17**, 952-960
8. Bruschi, M., Catarsi, P., Candiano, G., Rastaldi, M. P., Musante, L., Scolari, F., Artero, M., Carraro, M., Carrea, A., Caridi, G., Zennaro, C., Sanna-Cherchi, S., Viola, F. B., Ferrario, F., Perfumo, F., and Ghiggeri, G. M. (2003) Apolipoprotein E in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* **63**, 686-695
9. Lopez-Hellin, J., Cantarell, C., Jimeno, L., Sanchez-Fructuoso, A., Puig-Gay, N., Guirado, L., Vilarino, N., Gonzalez-Roncero, F. M., Mazuecos, A., Lauzurica, R., Burgos, D., Plumed, J. S., Jacobs-Cacha, C., Jimenez, C., Fernandez, A., Fernandez-Alvarez, P., Torregrosa, V., Nieto, J. L., Meseguer, A., and Alonso, A. (2013) A form of apolipoprotein a-I is found specifically in relapses of focal segmental glomerulosclerosis following transplantation. *Am J Transplant* **13**, 493-500
10. Tu, C., Rudnick, P. A., Martinez, M. Y., Cheek, K. L., Stein, S. E., Slebos, R. J., and Liebler, D. C. (2010) Depletion of abundant plasma proteins and limitations of plasma proteomics. *J Proteome Res* **9**, 4982-4991
11. Pocsfalvi, G., Raj, D. A., Fiume, I., Vilasi, A., Trepiccione, F., and Capasso, G. (2015) Urinary extracellular vesicles as reservoirs of altered proteins during the pathogenesis of polycystic kidney disease. *Proteomics Clin Appl* **9**, 552-567
12. Lu, C. C., Ma, K. L., Ruan, X. Z., and Liu, B. C. (2017) The Emerging Roles of Microparticles in Diabetic Nephropathy. *Int J Biol Sci* **13**, 1118-1125
13. Caruso, S., and Poon, I. K. H. (2018) Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles: More Than Just Debris. *Front Immunol* **9**, 1486
14. Stahl, A. L., Johansson, K., Mossberg, M., Kahn, R., and Karpman, D. (2019) Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. *Pediatr Nephrol* **34**, 11-30

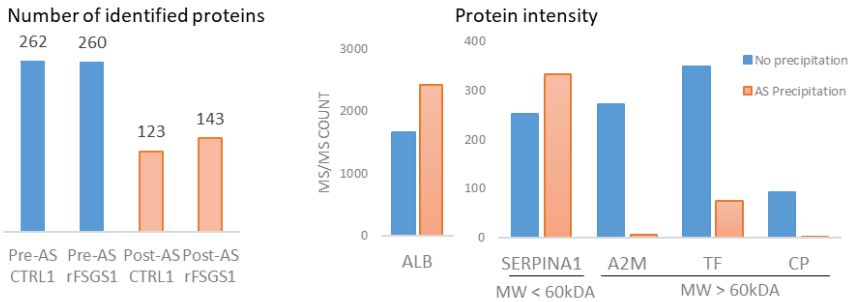
15. Ma, C., Wang, S., Wang, G., Wu, Y., Yang, T., Shen, W., Zhuang, Y., Zhang, L., Liu, X., Yang, L., Feng, Y., Yu, Y., Liu, Z., and Wang, D. (2020) Protein spectrum changes in exosomes after therapeutic plasma exchange in patients with neuromyelitis optica. *J Clin Apher* **35**, 206-216
16. Sharma, M., Sharma, R., McCarthy, E. T., and Savin, V. J. (1999) "The FSGS factor:" enrichment and in vivo effect of activity from focal segmental glomerulosclerosis plasma. *J Am Soc Nephrol* **10**, 552-561
17. Leatherbarrow, R. J., and Dean, P. D. (1980) Studies on the mechanism of binding of serum albumins to immobilized cibacron blue F3G A. *Biochem J* **189**, 27-34
18. Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., Myer, V. E., MacKeigan, J. P., Porter, J. A., Wang, Y. K., Cantley, L. C., Finan, P. M., and Murphy, L. O. (2009) Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* **136**, 521-534
19. Gormally, E., Caboux, E., Vineis, P., and Hainaut, P. (2007) Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat Res* **635**, 105-117
20. Miura, N., Hasegawa, J., and Shiota, G. (2008) Serum messenger RNA as a biomarker and its clinical usefulness in malignancies. *Clin Med Oncol* **2**, 511-527
21. Backes, C., Meese, E., and Keller, A. (2016) Specific miRNA Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects. *Mol Diagn Ther* **20**, 509-518
22. Surinova, S., Schiess, R., Huttenhain, R., Cerciello, F., Wollscheid, B., and Aebersold, R. (2011) On the development of plasma protein biomarkers. *J Proteome Res* **10**, 5-16
23. Anderson, N. L., and Anderson, N. G. (2002) The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* **1**, 845-867
24. Du, R., Zhu, L., Gan, J., Wang, Y., Qiao, L., and Liu, B. (2016) Ultrasensitive Detection of Low-Abundance Protein Biomarkers by Mass Spectrometry Signal Amplification Assay. *Anal Chem* **88**, 6767-6772
25. Lee, P. Y., Osman, J., Low, T. Y., and Jamal, R. (2019) Plasma/serum proteomics: depletion strategies for reducing high-abundance proteins for biomarker discovery. *Bioanalysis* **11**, 1799-1812
26. Abramowicz, A., Widlak, P., and Pietrowska, M. (2019) Different Types of Cellular Stress Affect the Proteome Composition of Small Extracellular Vesicles: A Mini Review. *Proteomes* **7**
27. Bourderioux, M., Nguyen-Khoa, T., Chhuon, C., Jeanson, L., Tondelier, D., Walczak, M., Ollero, M., Bekri, S., Knebelmann, B., Escudier, E., Escudier, B., Edelman, A., and Guerrero, I. C. (2015) A new workflow for proteomic analysis of urinary exosomes and assessment in cystinuria patients. *J Proteome Res* **14**, 567-577
28. Wu, C. X., and Liu, Z. F. (2018) Proteomic Profiling of Sweat Exosome Suggests its Involvement in Skin Immunity. *J Invest Dermatol* **138**, 89-97
29. Welton, J. L., Loveless, S., Stone, T., von Ruhland, C., Robertson, N. P., and Clayton, A. (2017) Cerebrospinal fluid extracellular vesicle enrichment for protein biomarker discovery in neurological disease; multiple sclerosis. *J Extracell Vesicles* **6**, 1369805
30. Qazi, K. R., Torregrosa Paredes, P., Dahlberg, B., Grunewald, J., Eklund, A., and Gabrielsson, S. (2010) Proinflammatory exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis. *Thorax* **65**, 1016-1024
31. Zhang, Q., Jiang, C., Tang, T., Wang, H., Xia, Y., Shao, Q., and Zhang, M. (2018) Clinical Significance of Urinary Biomarkers in Patients With Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Am J Med Sci* **355**, 314-321
32. Bienias, B., Zajackowska, M., Borzecka, H., Sikora, P., Wiczorkiewicz-Plaza, A., and Wilczynska, B. (2015) Early Markers of Tubulointerstitial Fibrosis in Children With Idiopathic Nephrotic Syndrome: Preliminary Report. *Medicine (Baltimore)* **94**, e1746
33. Chehade, H., Parvex, P., Poncet, A., Werner, D., Mosig, D., Cachat, F., and Girardin, E. (2013) Urinary low-molecular-weight protein excretion in pediatric idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* **28**, 2299-2306

34. Korzeniecka-Kozerska, A., Wasilewska, A., Tenderenda, E., Sulik, A., and Cybulski, K. (2013) Urinary MMP-9/NGAL ratio as a potential marker of FSGS in nephrotic children. *Dis Markers* **34**, 357-362
35. Youssef, D. M., and El-Shal, A. A. (2012) Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin and kidney injury in children with focal segmental glomerulosclerosis. *Iran J Kidney Dis* **6**, 355-360
36. Wang, R., Tong, H., Wang, H., Chen, Z., Wang, L., and Chen, J. (2014) Nephrotic syndrome related to chronic neutrophilic leukemia. *Intern Med* **53**, 2505-2509
37. Lu, C., Zuo, K., Le, W., Chen, W., Qin, W., Zhang, F., Liang, S., Zeng, C., and Wang, J. (2020) Characterization of thromboelastography of patients with different pathological types of nephrotic syndrome. *Medicine (Baltimore)* **99**, e18960
38. Gulleroglu, K., Yazar, B., Sakalli, H., Ozdemir, H., and Baskin, E. (2014) Clinical importance of mean platelet volume in children with nephrotic syndrome. *Ren Fail* **36**, 663-665
39. Medjeral-Thomas, N., Ziaj, S., Condon, M., Galliford, J., Levy, J., Cairns, T., and Griffith, M. (2014) Retrospective analysis of a novel regimen for the prevention of venous thromboembolism in nephrotic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* **9**, 478-483
40. Haraguchi, K., Shimura, H., Ogata, R., Inoue, H., Saito, T., Kondo, T., Nagata, M., and Kobayashi, T. (2006) Focal segmental glomerulosclerosis associated with essential thrombocythemia. *Clin Exp Nephrol* **10**, 74-77
41. Sethna, C. B., Ng, D. K., Jiang, S., Saland, J., Warady, B. A., Furth, S., and Meyers, K. E. (2019) Cardiovascular disease risk among children with focal segmental glomerulosclerosis: a report from the chronic kidney disease in children study. *Pediatr Nephrol* **34**, 1403-1412
42. Raina, R., and Krishnappa, V. (2019) An update on LDL apheresis for nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* **34**, 1655-1669
43. Kawasaki, Y., Suzuki, S., Matsumoto, A., Takano, K., Suyama, K., Hashimoto, K., Suzuki, J., Suzuki, H., and Hosoya, M. (2007) Long-term efficacy of low-density lipoprotein apheresis for focal and segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol* **22**, 889-892
44. Hattori, M., Chikamoto, H., Akioka, Y., Nakakura, H., Ogino, D., Matsunaga, A., Fukazawa, A., Miyakawa, S., Khono, M., Kawaguchi, H., and Ito, K. (2003) A combined low-density lipoprotein apheresis and prednisone therapy for steroid-resistant primary focal segmental glomerulosclerosis in children. *Am J Kidney Dis* **42**, 1121-1130
45. Sasaki, M., Yasuno, T., Ito, K., Matsunaga, A., Hisano, S., Abe, Y., Miyake, K., Masutani, K., Nakashima, H., and Saito, T. (2018) Focal segmental glomerulosclerosis with heterozygous apolipoprotein E5 (Glu3Lys). *CEN Case Rep* **7**, 225-228
46. Freedman, B. I., Limou, S., Ma, L., and Kopp, J. B. (2018) APOL1-Associated Nephropathy: A Key Contributor to Racial Disparities in CKD. *Am J Kidney Dis* **72**, S8-S16
47. Elmaci, A. M., Peru, H., Akin, F., Akcoren, Z., Caglar, M., and Ozel, A. (2007) A case of homozygous familial hypercholesterolemia with focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol* **22**, 1803-1805
48. Zschiedrich, S., Bork, T., Liang, W., Wanner, N., Eulenbruch, K., Munder, S., Hartleben, B., Kretz, O., Gerber, S., Simons, M., Viau, A., Burtin, M., Wei, C., Reiser, J., Herbach, N., Rastaldi, M. P., Cohen, C. D., Tharoux, P. L., Terzi, F., Walz, G., Godel, M., and Huber, T. B. (2017) Targeting mTOR Signaling Can Prevent the Progression of FSGS. *J Am Soc Nephrol* **28**, 2144-2157
49. Das, R., Kim, S. J., Nguyen, N. T., Kwon, H. J., Cha, S. K., and Park, K. S. (2019) Inhibition of the ERK1/2-mTORC1 axis ameliorates proteinuria and the fibrogenic action of transforming growth factor-beta in Adriamycin-induced glomerulosclerosis. *Kidney Int* **96**, 927-941

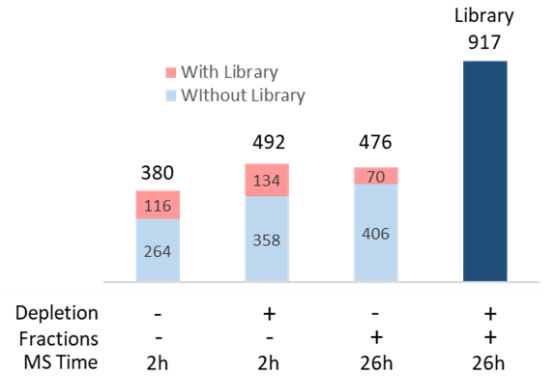


**Figure 1 : Different depletion methods and fractionation**

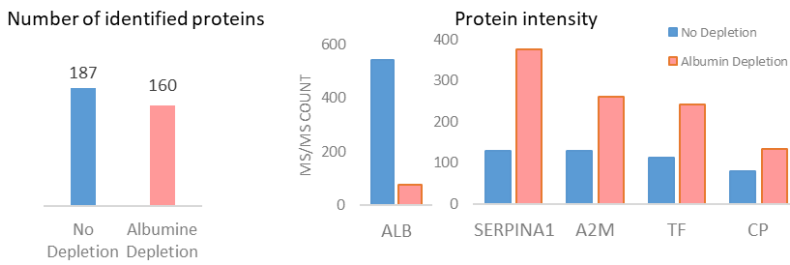
**A Ammonium Sulfate precipitation in plasma exchange**



**C Top12 depletion and fractionation**



**B Albumine depletion in Plasma by Cibacron Blue**



**D Summary of different depletion and fractionation**

DEPLETION	Ammonium Sulfate	Cibacron Blue	No		Top12	
FRACTIONATION	NO	NO	NO	YES	NO	YES
Plasma proteins	Ca. 130	Ca.160	380	476	496	917

**Figure 2 : Similarity between plasma and plasma exchange from same individual**

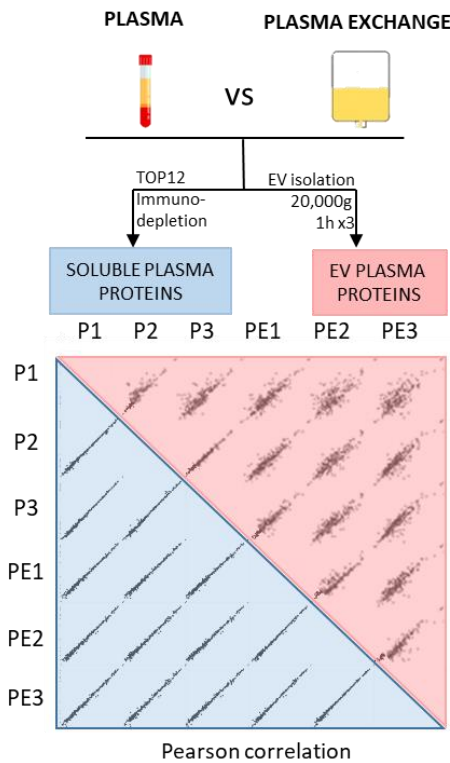


Figure 3 : Workflow and EV

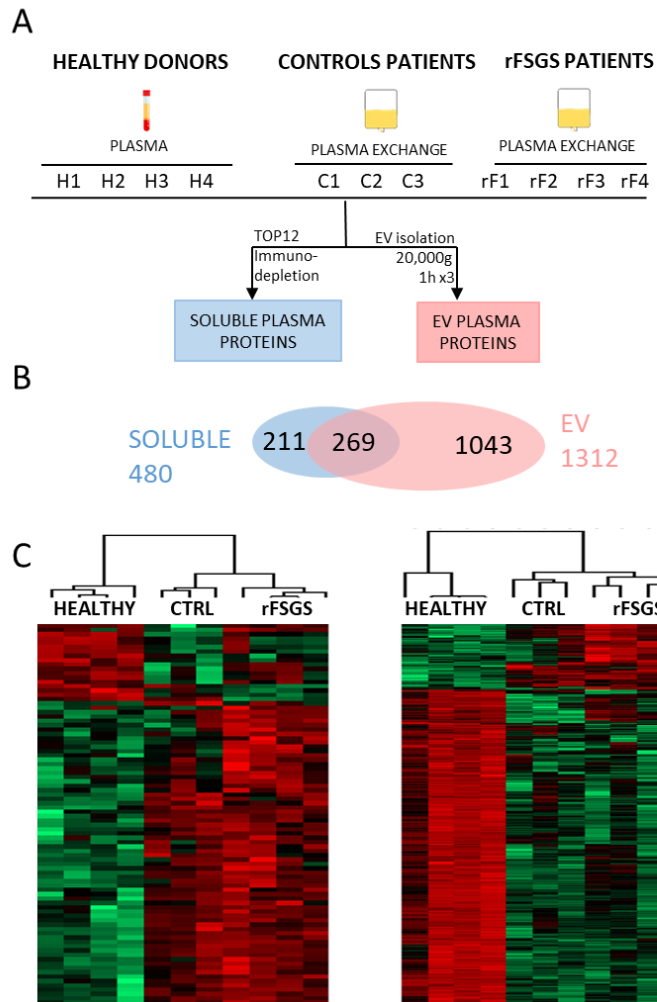
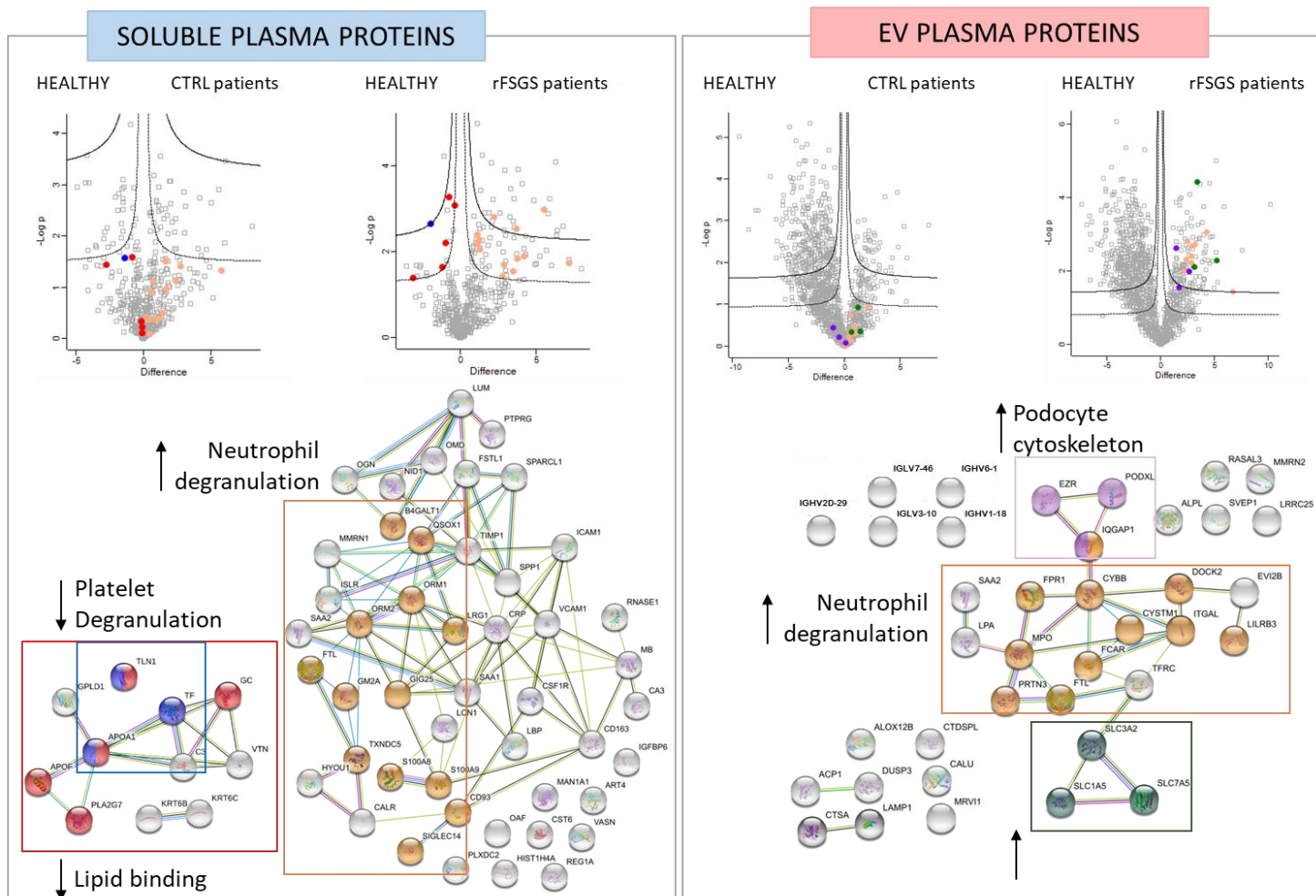


Figure 4 : Significant proteins in soluble and EV experiments



## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le syndrome néphrotique idiopathique est une maladie rare dont la pathogénie reste encore partiellement élucidée mais de nombreuses avancées ont permis de mieux comprendre l'implication du système immunitaire et des podocytes, cellules cibles de la pathologie. La recherche de facteurs de perméabilité glomérulaire impliqués dans la pathogenèse du SNI a commencé il y a 70 ans, de nombreuses hypothèses ont été émises mais l'ensemble de ces travaux n'ont pu, à ce jour, clairement confirmer l'identité de ce ou ces facteurs pathogènes. L'essor des nouvelles technologies de pointe, telles que la spectrométrie de masse, ouvre la voie à de multiples découvertes et de nouveaux développements thérapeutiques. Dans le contexte de cette maladie rare, seulement peu d'études ont utilisé la spectrométrie de masse pour mieux appréhender ses mécanismes physiopathologiques.

Dans ce cadre, deux approches complémentaires ont été suivies dans cette thèse et montrent la contribution des approches protéomiques dans la compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans le SNI. Dans un premier temps, une approche fondamentale a été menée sur les LT et les podocytes, suivie dans un second temps par une approche clinique dont l'objectif était d'identifier de nouveaux biomarqueurs plasmatiques permettant le diagnostic ou la prédiction de la récurrence post-greffe de la maladie.

### **Développement et mise en place de méthodes pour l'analyse protéomique totale et des rafts (raftomique)**

Le succès des analyses protéomiques réside autant dans la préparation biochimique des échantillons que dans les analyses MS et bio-informatique.

Au cours de ma thèse, les méthodes protéomiques ont beaucoup évolué selon les besoins. Ainsi, après avoir développé une première fois une méthode de préparation, la méthode FASP, appliquée à l'analyse des LT, celle-ci s'est révélée insuffisamment adaptée aux études protéomiques des rafts qui ont suivi. Nous avons alors introduit un nouveau type de préparation des protéines compatible avec la séparation des rafts par ultracentrifugation en gradient d'iodixanol, la méthode S-Trap. Nous avons démontré pour la première fois que cette méthode, initialement utilisée pour éliminer de fortes concentrations de détergents, s'avère également très efficace pour l'élimination de l'iodixanol.

De plus, de nombreux progrès ont été réalisés au niveau de l'analyse MS, plus particulièrement sur le plan instrumental, rendant les spectromètres de masse plus sensibles, robustes et permettant de gagner en profondeur dans l'analyse protéomique. Ces nouveaux spectromètres de masse tirent avantage d'une première séparation par mobilité ionique suivi de l'éjection séquentielle des ions.

Ainsi, ces innovations permettent de minimiser les problèmes de sous-échantillonnage et donnent accès aux protéines les moins abondantes. Pendant ma thèse j'ai travaillé uniquement avec un Q-Exactive plus MS, un instrument très robuste et à haute résolution mais pas aussi sensible que les tous derniers instruments.

Au cours de mes travaux, l'analyse des données quantitatives a été très discutée au sein de notre laboratoire, notamment sur la validité des données quantitatives des protéines identifiées avec 1 ou 2 peptides. Bien que Maxquant soit le logiciel de prédilection pour les analyses quantitatives label-free grâce à sa qualité d'analyse et sa performance dans la quantification des protéines, il nécessite de connaître ses limitations. Si la quantification LFQ est réalisée sur 2 peptides, Maxquant ne renvoie aucune valeur de quantification même s'il a détecté 1 peptide pour la protéine, ce qui peut se révéler trompeur pour nos analyses. En effet, nos analyses de rafts nécessitaient d'extraire les données quantitatives de protéines totalement présentes ou totalement absentes dans les rafts. Par ailleurs, un deuxième problème s'est présenté à nous et concerne les peptides partagés par plusieurs protéines. Maxquant renvoie la mention « unique » sur certains peptides alors que, d'après une inspection manuelle des données, ceux-ci ne sont pas réellement uniques. Pour conclure, j'ai choisi de réaliser les quantifications LFQ avec 1 peptide, pour réduire le nombre de données manquantes, mais en excluant ensuite manuellement les protéines qui n'étaient identifiées qu'avec seulement 1 peptide dans tous les échantillons. De plus, j'ai retenu pour validation seulement les protéines quantifiées par MS avec au moins 3 peptides, ayant eu de nombreuses déconvenues au cours de ma thèse sur les protéines quantifiées avec 1 ou 2 peptides.

### **Rôle de CMIP dans les LT et dans le recrutement des rafts dans les LT**

Nos premiers résultats montrent que l'effet de CMIP est multiple et agit à plusieurs niveaux : lors de l'activation et la prolifération du LT, en passant par une dérégulation du métabolisme des sphingolipides et enfin, en désorganisant le cytosquelette du LT. Cependant, les variations observées en termes d'expression protéique étaient de très faible intensité.

Une des limitations de l'analyse des rafts des LT dans le modèle murin du laboratoire est le temps d'activation lymphocytaire choisi initialement (15min). Notre but était de connaître l'impact de CMIP sur le protéome des rafts du LT. D'après nos données publiées récemment (Oniszczyk *et al.*, 2019), l'expression protéique du transgène CMIP humain devient significativement augmentée à 15min avec un pic à 60min où son expression est la plus forte. En revanche, il est connu que le recrutement et agrégation des rafts au site de la synapse immunologique s'opère très rapidement dans les secondes ou minutes après stimulus externe, bien que des études montrent que les rafts subsistent

jusqu'à 20min après activation du LT (Viola *et al.*, 1999). Probablement, à 15 minutes les évènements de signalisation liées à l'activation déjà partiellement achevés.

Une deuxième limitation de cette partie du travail, est que, afin de réaliser une étude exhaustive de la signalisation cellulaire du LT en présence de CMIP qui soit lié étroitement au raftome, des analyses phosphoprotéomiques auraient dû être effectuées. Bien qu'envisagé, cela n'a pas été possible au cours de ma thèse à cause des faibles quantités de protéines récupérées après immunosélection des LT de souris. Ceci constitue une perspective pour la suite des travaux.

### **Effet des échanges plasmatiques sur la signalisation proximale podocytaire**

Un autre volet de cette étude était de mieux comprendre les effets des échanges plasmatiques sur les podocytes en analysant les voies de signalisation médiées par le recrutement des protéines dans les rafts et par la phosphorylation des protéines podocytaires. Dans cette étude, les échanges plasmatiques (EP) de patients post-greffe rénale ont été directement mis en contact avec des podocytes humains en culture. Les résultats obtenus pointent vers une dérégulation de mTORC1, de l'autophagie et une désorganisation du cytosquelette. L'analyse raftomique a mis en évidence une augmentation du recrutement des protéines du complexe Ragulator (LAMTOR-2, LAMTOR-3, LAMTOR-4 et LAMTOR-5) chez les podocytes mis en contact avec les EP de patients rFSGS après 30 minutes d'incubation. Le complexe Ragulator est essentiel pour l'activation de mTORC1 dans la voie mTOR.

Cette activation entraîne la phosphorylation de la S6K. Nous avons alors étudié cette phosphorylation par Western-Blot et avons observé une diminution de S6K phosphorylée dans les podocytes à 30min, 1h et 4h de contact avec les échanges plasmatiques. Une étude publiée (Zschiedrich *et al.*, 2017) récemment démontre qu'une hyperactivation ou une inhibition complète de mTORC1 est associée à une progression de la glomérulosclérose dans des modèles animaux présentant des lésions HSF consécutifs à l'administration d'adriamycine. Ces résultats mettent en lumière l'importance d'une régulation fine de cette voie de signalisation. Les auteurs ont également mis en contact des EP de patients en récurrence post-greffe sur une lignée podocytaire humaine. Leurs résultats montrent qu'ils n'ont pas d'effet sur la phosphorylation de S6K, ce qui n'est pas en accord avec nos données. Cette discordance de résultats peut s'expliquer par le fait que les auteurs n'ont pas utilisé les mêmes conditions cellulaires (seulement 5% en concentration finale des échanges plasmatiques vs 10% pour notre étude), ont quantifié les changements de S6K phosphorylée après 24h de contact et surtout, ont utilisé des individus sains comme contrôles. Dans notre étude, les cellules, après 24h d'incubation avec les EP, semblent récupérer les niveaux basaux de S6K phosphorylée. Néanmoins, l'effet que nous avons observé ne semble pas spécifique des EP rFSGS, car il est comparable à l'effet

des EP des patients contrôles. Ainsi, le recrutement différentiel de Ragulator dans les rafts pourrait ne pas être associé à cet effet et avoir d'autres conséquences sur le podocyte.

Les conditions utilisées dans l'étude ne reproduisent pas exactement ce qu'il se passe dans des conditions physiologiques où les podocytes ne sont pas en contact direct avec le plasma sanguin. Ainsi, les données présentées peuvent ne pas être représentatives du processus physiopathologique initial de la maladie mais peuvent reproduire une situation avancée, où la membrane basale déjà fragilisée, laisse passer les protéines plasmatiques. De façon générale, nous rencontrons la même limitation que pour toutes les études sur des lignées cellulaires : le manque de « crosstalk » entre les différents types cellulaires présents dans le glomérule *in vivo*. Une solution possible pour contourner cette difficulté serait d'utiliser les organoïdes. Ils représentent une avancée très prometteuse dans l'étude des processus pathologiques, supérieure aux lignées cellulaires, et permettent de reproduire une architecture cellulaire et une fonctionnalité proche du rein (Homan *et al.*, 2019).

Par ailleurs, les protéines des rafts podocytaires et les phosphoprotéines ont été analysées au bout de 30 min de contact avec les échanges plasmatiques de patients. Ainsi, les résultats obtenus ne montrent qu'une photographie du raftome et du phosphoprotéome à un moment donné et ne donnent pas d'informations sur les événements pendant les premières minutes de la récurrence de la maladie, ni de la souffrance podocytaire observée dans les stades plus tardifs. En revanche, nos premières expériences de validation des résultats protéomiques, certaines faisant partie des manuscrits présentés dans ce mémoire, ont consisté à des incubations plus longues, jusqu'à 24h. Ceci a permis de suivre des effets différés sur certains marqueurs et effecteurs (24h) des modifications précoces du protéome (30min).

### **Analyse protéomique des échanges plasmatiques et recherche de biomarqueurs**

Parallèlement à ce travail, nous nous sommes intéressés à la composition protéique des EP des patients rFSGS. La principale limitation de cette étude est le nombre limité de patients inclus dans l'analyse. Cette limitation peut s'expliquer simplement par le fait que nous travaillons sur une maladie rare et que le nombre de patients qui satisfont les critères d'inclusion est par conséquent limité. Le succès des analyses impliquant des cohortes de patients repose sur leur homogénéité en termes d'âge, de sexe, de comorbidités et de traitements. Dans notre étude, nous n'avons pas la possibilité d'inclure un groupe homogène de patients, nous nous sommes focalisés sur l'homogénéité des traitements, qui est plus facilement contrôlable, c'est pourquoi nous avons choisi d'inclure des patients en rejet de greffe comme contrôles. L'idéal aurait été d'inclure des EP de patients en post-greffe n'ayant pas récidivé comme contrôles, mais ces patients ne sont pas soumis à des cycles de plasmaphérèse.

Le biomarqueur idéal dans notre contexte serait une protéine ou un panel de protéines détectables facilement et qui pourrait prédire, avant de procéder à une transplantation rénale, les patients qui sont plus à risque de subir une récurrence et ainsi éviter les effets physiques et psychologiques associés à une procédure délicate et inutile, ainsi que les coûts de l'intervention.

Parmi les potentiels facteurs de perméabilité impliqués dans le SNI et reportés dans la littérature, seule l'hémopexine a été identifiée dans notre étude et son expression n'est pas significativement différente entre les HSF et les contrôles. Son expression différentielle a surtout été rapportée dans la littérature chez les patients LGM plutôt que les HSF (Bakker *et al.*, 2005). Les protéines suPAR, CLCF-1 et CD40 n'ont pas été identifiées dans notre étude. Une explication possible pourrait être la sensibilité limitée du spectromètre de masse utilisé. En effet, nous avons quantifié seulement 480 protéines solubles. D'après les données de l'initiative Human Plasma Proteome Project, qui a permis de quantifier de manière absolue 3500 protéines plasmatiques par spectrométrie de masse (Nanjappa *et al.*, 2014), suPAR est la 1736<sup>ème</sup> protéine la plus abondante dans le plasma et CD40 est en 3010<sup>ème</sup> position. La protéine CLCF-1 n'est pas présente dans cette liste.

Nos résultats suggèrent de manière relativement surprenante l'implication des neutrophiles dans la pathogenèse de la HSF. Néanmoins, ils confirment les observations précédentes qui signalent la lipocaline comme un marqueur spécifique de la HSF par rapport à d'autres formes de syndrome néphrotique. Nos observations incluent également la diminution significative des apolipoprotéines, et une PLA2 spécifique des lipoprotéines, et à nouveau l'implication possible de la voie mTOR, suite à l'identification de trois transporteurs d'acides aminés augmentés dans le protéome des vésicules extracellulaires des patients HSF récidivants. La suite de ce travail devrait correspondre à la validation et investigation de ces trois axes (activation des neutrophiles, lipoprotéines et voie mTOR) dans des modèles *in vivo* et la confirmation de leur pertinence chez les patients. De plus, une sélection de certaines protéines augmentées dans le plasma des patients devrait mener à une analyse par ELISA à partir de prélèvements sanguins sur une cohorte de patients récidivants, avec une sélection de plusieurs groupes contrôles, afin de confirmer leur potentiel comme biomarqueurs prédictifs de la récurrence. Ces analyses devraient inclure, au moins, des individus sains, des patients LGM, des patients de néphropathie extra-membraneuse, des patients HSF greffés avec un prélèvement pré-greffe (en dialyse) et un autre post-greffe, éventuellement divisés en deux groupes, récidivants et non-récidivants. Idéalement un dernier groupe contrôle pourrait inclure des patients en dialyse avec d'autres pathologies. Pour confirmer la valeur du biomarqueur, l'étude devrait être multicentrique et internationale.



## **Conclusions**

En partant de trois analyses différentes, la première portant sur le système immunitaire sous l'effet de CMIP, la seconde sur les effets des échanges plasmatiques sur les podocytes et enfin la troisième sur les échanges plasmatiques directement, ces analyses se rejoignent toutes sur un thème récurrent : celui de l'altération du cytosquelette du podocyte. Deux de ces analyses pointent vers une dérégulation de mTORC1. Finalement, les études à partir des échanges plasmatiques de patients de récurrence post greffe de la maladie suggèrent à nouveau l'implication de la voie mTOR, ainsi que l'activation des neutrophiles et la dérégulation du métabolisme lipidique. La suite des travaux devrait correspondre à la validation et investigation de ces voies, ainsi que l'évaluation de biomarqueurs prédictifs de la récurrence parmi les protéines trouvées spécifiquement présentes dans le plasma des patients.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Hafez, M. *et al.* (2009) 'Idiopathic Nephrotic Syndrome and Atopy: Is There a Common Link?', *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 54(5), pp. 945–953. doi: 10.1053/j.ajkd.2009.03.019.
- Abramowicz, A., Widłak, P. and Pietrowska, M. (2019) 'Different Types of Cellular Stress Affect the Proteome Composition of Small Extracellular Vesicles: A Mini Review', *Proteomes*, 7(2). doi: 10.3390/proteomes7020023.
- Agrawal, S. *et al.* (2019) 'Predicting and Defining Steroid Resistance in Pediatric Nephrotic Syndrome Using Plasma Proteomics', *Kidney International Reports*, 5(1), pp. 66–80. doi: 10.1016/j.ekir.2019.09.009.
- Akilesh, S. *et al.* (2011) 'Arhgap24 inactivates Rac1 in mouse podocytes, and a mutant form is associated with familial focal segmental glomerulosclerosis', *The Journal of Clinical Investigation*, 121(10), pp. 4127–4137. doi: 10.1172/JCI46458.
- Andersen, R. F. *et al.* (2012) 'Plasma and urine proteomic profiles in childhood idiopathic nephrotic syndrome', *Proteomics. Clinical Applications*, 6(7–8), pp. 382–393. doi: 10.1002/prca.201100081.
- Anderson, N. L. and Anderson, N. G. (2002) 'The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects', *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 1(11), pp. 845–867. doi: 10.1074/mcp.r200007-mcp200.
- Ardito, F. *et al.* (2017) 'The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review)', *International Journal of Molecular Medicine*, 40(2), pp. 271–280. doi: 10.3892/ijmm.2017.3036.
- Audard, V. *et al.* (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(18), pp. 3756–3762. doi: 10.1182/blood-2009-11-251132.
- Bagnat, M. *et al.* (2000) 'Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), pp. 3254–3259. doi: 10.1073/pnas.060034697.
- Bakker, W. W. *et al.* (2005) 'Altered activity of plasma hemopexin in patients with minimal change disease in relapse', *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, 20(10), pp. 1410–1415. doi: 10.1007/s00467-005-1936-3.
- Banchereau, J. *et al.* (1994) 'The CD40 antigen and its ligand', *Annual Review of Immunology*, 12, pp. 881–922. doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.004313.
- Beaudreuil, S. *et al.* (2014) 'Protein A immunoabsorption cannot significantly remove the soluble receptor of urokinase from sera of patients with recurrent focal segmental glomerulosclerosis', *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 29(2), pp. 458–463. doi: 10.1093/ndt/gft453.
- Beaudreuil, S. *et al.* (2019) 'Circulating CASK is associated with recurrent focal segmental glomerulosclerosis after transplantation', *PloS One*, 14(7), p. e0219353. doi: 10.1371/journal.pone.0219353.
- Benigni, A. *et al.* (2011) 'Inhibiting Angiotensin-Converting Enzyme Promotes Renal Repair by Limiting Progenitor Cell Proliferation and Restoring the Glomerular Architecture', *The American Journal of Pathology*, 179(2), pp. 628–638. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.04.003.
- Benz, K. *et al.* (2010) 'Characterisation of renal immune cell infiltrates in children with nephrotic syndrome', *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, 25(7), pp. 1291–1298. doi: 10.1007/s00467-010-1507-0.
- Benzing, T. (2004) 'Signaling at the Slit Diaphragm', *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(6), pp. 1382–1391. doi: 10.1097/01.ASN.0000130167.30769.55.
- Boerries, M. *et al.* (2013) 'Molecular fingerprinting of the podocyte reveals novel gene and protein regulatory networks', *Kidney International*, 83(6), pp. 1052–1064. doi: 10.1038/ki.2012.487.

- Boesze-Battaglia, K. (2006) 'Isolation of Membrane Rafts and Signaling Complexes', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 332, pp. 169–179. doi: 10.1385/1-59745-048-0:167.
- Boucher, J., Kleinridders, A. and Kahn, C. R. (2014) 'Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(1). doi: 10.1101/cshperspect.a009191.
- Boumediene, A. *et al.* (2018) 'NEPHRUTIX: A randomized, double-blind, placebo vs Rituximab-controlled trial assessing T-cell subset changes in Minimal Change Nephrotic Syndrome', *Journal of Autoimmunity*, 88, pp. 91–102. doi: 10.1016/j.jaut.2017.10.006.
- Bourderioux, M. *et al.* (2015) 'A new workflow for proteomic analysis of urinary exosomes and assessment in cystinuria patients', *Journal of Proteome Research*, 14(1), pp. 567–577. doi: 10.1021/pr501003q.
- Breuss, J. M. and Uhrin, P. (2012) 'VEGF-initiated angiogenesis and the uPA/uPAR system', *Cell Adhesion & Migration*, 6(6), pp. 535–540. doi: 10.4161/cam.22243.
- Chang, J.-W. *et al.* (2012) 'Podocyte foot process effacement in postreperfusion allograft biopsies correlates with early recurrence of proteinuria in focal segmental glomerulosclerosis', *Transplantation*, 93(12), pp. 1238–1244. doi: 10.1097/TP.0b013e318250234a.
- Choi, Y. W. *et al.* (2017) 'Potential urine proteomics biomarkers for primary nephrotic syndrome', *Clinical Proteomics*, 14. doi: 10.1186/s12014-017-9153-1.
- Costacou, T. *et al.* (2009) 'Haptoglobin genotype and renal function decline in type 1 diabetes', *Diabetes*, 58(12), pp. 2904–2909. doi: 10.2337/db09-0874.
- Coward, R. J. M. *et al.* (2005) 'Nephrotic plasma alters slit diaphragm-dependent signaling and translocates nephrin, Podocin, and CD2 associated protein in cultured human podocytes', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 16(3), pp. 629–637. doi: 10.1681/ASN.2004030172.
- Cox, J. *et al.* (2011) 'Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment', *Journal of Proteome Research*, 10(4), pp. 1794–1805. doi: 10.1021/pr101065j.
- Cox, J. *et al.* (2014) 'Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ', *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 13(9), pp. 2513–2526. doi: 10.1074/mcp.M113.031591.
- Cox, J. and Mann, M. (2008) 'MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification', *Nature Biotechnology*, 26(12), pp. 1367–1372. doi: 10.1038/nbt.1511.
- D'Agati, V. D., Kaskel, F. J. and Falk, R. J. (2011) 'Focal segmental glomerulosclerosis', *The New England Journal of Medicine*, 365(25), pp. 2398–2411. doi: 10.1056/NEJMra1106556.
- Deegens, J. K. J. and Wetzels, J. F. M. (2011) 'Immunosuppressive treatment of focal segmental glomerulosclerosis: lessons from a randomized controlled trial', *Kidney International*, 80(8), pp. 798–801. doi: 10.1038/ki.2011.191.
- Delville, M. *et al.* (2014) 'A circulating antibody panel for pretransplant prediction of FSGS recurrence after kidney transplantation', *Science translational medicine*, 6(256), p. 256ra136. doi: 10.1126/scitranslmed.3008538.
- Dinic, J. *et al.* (2015) 'The T cell receptor resides in ordered plasma membrane nanodomains that aggregate upon patching of the receptor', *Scientific Reports*, 5, p. 10082. doi: 10.1038/srep10082.
- Drenckhahn, D. and Franke, R. P. (1988) 'Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man', *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 59(5), pp. 673–682.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002) 'Rho GTPases in cell biology', *Nature*, 420(6916), pp. 629–635. doi: 10.1038/nature01148.
- Faul, C. *et al.* (2008) 'The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A', *Nature medicine*, 14(9), pp. 931–938. doi: 10.1038/nm.1857.

- Feng, D. *et al.* (2018) 'Disease-causing mutation in  $\alpha$ -actinin-4 promotes podocyte detachment through maladaptation to periodic stretch', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(7), pp. 1517–1522. doi: 10.1073/pnas.1717870115.
- Feng, D. (2020) 'Phosphorylation of key podocyte proteins and the association with proteinuric kidney disease', *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 319(2), pp. F284–F291. doi: 10.1152/ajprenal.00002.2020.
- Gallon, L. *et al.* (2012) 'Resolution of recurrent focal segmental glomerulosclerosis after retransplantation', *The New England Journal of Medicine*, 366(17), pp. 1648–1649. doi: 10.1056/NEJMc1202500.
- Gao, X. *et al.* (2011) 'PI3K/Akt signaling requires spatial compartmentalization in plasma membrane microdomains', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(35), pp. 14509–14514. doi: 10.1073/pnas.1019386108.
- Gentili, A., Tangheroni, W. and Gelli, G. (1954) '[Proteinuria caused by transfusion of blood from nephrotic to non-nephrotic individuals]', *Minerva Medica*, 45(74), pp. 603–608.
- Gessulat, S. *et al.* (2019) 'Prosit: proteome-wide prediction of peptide tandem mass spectra by deep learning', *Nature Methods*, 16(6), pp. 509–518. doi: 10.1038/s41592-019-0426-7.
- Gilar, M. *et al.* (2005) 'Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography', *Analytical Chemistry*, 77(19), pp. 6426–6434. doi: 10.1021/ac050923i.
- González, E. *et al.* (2009) 'Proteomic analysis of mononuclear cells of patients with minimal-change nephrotic syndrome of childhood', *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 24(1), pp. 149–155. doi: 10.1093/ndt/gfn459.
- Griffin, S. V. *et al.* (2003) 'Podocyte proliferation and differentiation in glomerular disease: role of cell-cycle regulatory proteins', *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 18 Suppl 6, pp. vi8-13. doi: 10.1093/ndt/gfg1069.
- Grimbert, P. *et al.* (2003) 'Truncation of C-mip (Tc-mip), a New Proximal Signaling Protein, Induces c-maf Th2 Transcription Factor and Cytoskeleton Reorganization', *The Journal of Experimental Medicine*, 198(5), pp. 797–807. doi: 10.1084/jem.20030566.
- Haider, S. and Pal, R. (2013) 'Integrated Analysis of Transcriptomic and Proteomic Data', *Current Genomics*, 14(2), pp. 91–110. doi: 10.2174/1389202911314020003.
- Hancock, J. F. (2006) 'Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(6), pp. 456–462. doi: 10.1038/nrm1925.
- Harris, J. J. *et al.* (2013) 'Active proteases in nephrotic plasma lead to a podocin-dependent phosphorylation of VASP in podocytes via protease activated receptor-1', *The Journal of Pathology*, 229(5), pp. 660–671. doi: 10.1002/path.4149.
- Havele, C. and Paetkau, V. (1988) 'Cyclosporine blocks the activation of antigen-dependent cytotoxic T lymphocytes directly by an IL-2-independent mechanism.', *The Journal of Immunology*, 140(10), pp. 3303–3308.
- Heffer-Lauc, M. *et al.* (2005) 'Membrane redistribution of gangliosides and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in brain tissue sections under conditions of lipid raft isolation', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1686(3), pp. 200–208. doi: 10.1016/j.bbailip.2004.10.002.
- Herrod, H. G. *et al.* (1983) 'Evaluation of T lymphocyte subpopulations in children with nephrotic syndrome', *Clinical and Experimental Immunology*, 52(3), pp. 581–585.
- Hildenbrand, R. *et al.* (2008) 'The urokinase-system--role of cell proliferation and apoptosis', *Histology and Histopathology*, 23(2), pp. 227–236. doi: 10.14670/HH-23.227.
- Hogan, M. C. *et al.* (2014) 'Subfractionation, characterization, and in-depth proteomic analysis of glomerular membrane vesicles in human urine', *Kidney International*, 85(5), pp. 1225–1237. doi: 10.1038/ki.2013.422.
- Höhne, M. *et al.* (2018) 'Single-nephron proteomes connect morphology and function in proteinuric kidney disease', *Kidney International*, 93(6), pp. 1308–1319. doi: 10.1016/j.kint.2017.12.012.

- Homan, K. A. *et al.* (2019) 'Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro', *Nature methods*, 16(3), pp. 255–262. doi: 10.1038/s41592-019-0325-y.
- Hornbeck, P. V. *et al.* (2012) 'PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse', *Nucleic Acids Research*, 40(Database issue), pp. D261-270. doi: 10.1093/nar/gkr1122.
- Huber, T. B. *et al.* (2001) 'Interaction with podocin facilitates nephrin signaling', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(45), pp. 41543–41546. doi: 10.1074/jbc.C100452200.
- Hughes, C. S. *et al.* (2019) 'Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments', *Nature Protocols*, 14(1), pp. 68–85. doi: 10.1038/s41596-018-0082-x.
- Humphrey, R. L. *et al.* (1977) 'Levels of serum ribonuclease as an indicator of renal insufficiency in patients with leukemia', *Cancer Research*, 37(7 Pt 1), pp. 2015–2022.
- Hunter, T. (2009) 'Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting', *Current opinion in cell biology*, 21(2), pp. 140–146. doi: 10.1016/j.ceb.2009.01.028.
- Iliuk, A. *et al.* (2020) 'Plasma-Derived Extracellular Vesicle Phosphoproteomics through Chemical Affinity Purification', *Journal of Proteome Research*, 19(7), pp. 2563–2574. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00151.
- Jung, Y. H. *et al.* (2020) 'Proteomic identification of early urinary-biomarkers of acute kidney injury in preterm infants', *Scientific Reports*, 10(1), p. 4057. doi: 10.1038/s41598-020-60890-x.
- Kalantari, S. *et al.* (2014) 'Predictive urinary biomarkers for steroid-resistant and steroid-sensitive focal segmental glomerulosclerosis using high resolution mass spectrometry and multivariate statistical analysis', *BMC Nephrology*, 15, p. 141. doi: 10.1186/1471-2369-15-141.
- Kamal, M. *et al.* (2010) '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 letters*, 584(3), pp. 500–506. doi: 10.1016/j.febslet.2009.12.015.
- Kamei, K. *et al.* (2020) 'Rituximab therapy for refractory steroid-resistant nephrotic syndrome in children', *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, 35(1), pp. 17–24. doi: 10.1007/s00467-018-4166-1.
- Karpievitch, Y. V., Dabney, A. R. and Smith, R. D. (2012) 'Normalization and missing value imputation for label-free LC-MS analysis', *BMC Bioinformatics*, 13(Suppl 16), p. S5. doi: 10.1186/1471-2105-13-S16-S5.
- Kim, E. Y., Roshanravan, H. and Dryer, S. E. (2017) 'Changes in podocyte TRPC channels evoked by plasma and sera from patients with recurrent FSGS and by putative glomerular permeability factors', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(9), pp. 2342–2354. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.06.010.
- Kim, J. M. *et al.* (2003) 'CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility', *Science (New York, N.Y.)*, 300(5623), pp. 1298–1300. doi: 10.1126/science.1081068.
- Koehler, S. *et al.* (2020) 'Proteome Analysis of Isolated Podocytes Reveals Stress Responses in Glomerular Sclerosis', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 31(3), pp. 544–559. doi: 10.1681/ASN.2019030312.
- Komura, N. *et al.* (2016) 'Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor', *Nature Chemical Biology*, 12(6), pp. 402–410. doi: 10.1038/nchembio.2059.
- Kr, L., Mm, S. and Ab, H. (2018) *Comparison of In-Solution, FASP, and S-Trap Based Digestion Methods for Bottom-Up Proteomic Studies*, *Journal of proteome research*. J Proteome Res. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00235.
- Kulak, N. A. *et al.* (2014) 'Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells', *Nature Methods*, 11(3), pp. 319–324. doi: 10.1038/nmeth.2834.
- Le Berre, L. *et al.* (2000) 'Effect of plasma fractions from patients with focal and segmental glomerulosclerosis on rat proteinuria', *Kidney International*, 58(6), pp. 2502–2511. doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.00434.x.

- Lee, P. Y. *et al.* (2019) 'Plasma/serum proteomics: depletion strategies for reducing high-abundance proteins for biomarker discovery', *Bioanalysis*, 11(19), pp. 1799–1812. doi: 10.4155/bio-2019-0145.
- León, I. R. *et al.* (2013) 'Quantitative Assessment of In-solution Digestion Efficiency Identifies Optimal Protocols for Unbiased Protein Analysis', *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 12(10), pp. 2992–3005. doi: 10.1074/mcp.M112.025585.
- Lin, C. Y. and Hsu, H. C. (1986) 'Histopathological and immunological studies in spontaneous remission of nephrotic syndrome after intercurrent measles infection', *Nephron*, 42(2), pp. 110–115. doi: 10.1159/000183647.
- Lin, S.-Y. *et al.* (2018) 'Association of Exposure to Fine-Particulate Air Pollution and Acidic Gases with Incidence of Nephrotic Syndrome', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(12). doi: 10.3390/ijerph15122860.
- Lingwood, D. and Simons, K. (2007) 'Detergent resistance as a tool in membrane research', *Nature Protocols*, 2(9), pp. 2159–2165. doi: 10.1038/nprot.2007.294.
- Lipecka, J. *et al.* (2016) 'Sensitivity of mass spectrometry analysis depends on the shape of the filtration unit used for filter aided sample preparation (FASP)', *Proteomics*, 16(13), pp. 1852–1857. doi: 10.1002/pmic.201600103.
- Lopez-Hellin, J. *et al.* (2013) 'A form of apolipoprotein a-I is found specifically in relapses of focal segmental glomerulosclerosis following transplantation', *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 13(2), pp. 493–500. doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04338.x.
- M, H. *et al.* (2018) *S-Trap, an Ultrafast Sample-Preparation Approach for Shotgun Proteomics*, *Journal of proteome research*. J Proteome Res. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00505.
- M, K., Cw, van den B. and Tj, R. (2019) 'Stem cell-derived kidney organoids: engineering the vasculature.', *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 77(12), pp. 2257–2273. doi: 10.1007/s00018-019-03401-0.
- Ma, C. *et al.* (2020) 'Protein spectrum changes in exosomes after therapeutic plasma exchange in patients with neuromyelitis optica', *Journal of Clinical Apheresis*, 35(3), pp. 206–216. doi: 10.1002/jca.21781.
- Maas, R. J. *et al.* (2016) 'Minimal change disease and idiopathic FSGS: manifestations of the same disease', *Nature Reviews. Nephrology*, 12(12), pp. 768–776. doi: 10.1038/nrneph.2016.147.
- Maas, R. J., Deegens, J. K. and Wetzels, J. F. (2014) 'Permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome: historical perspectives and lessons for the future', *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 29(12), pp. 2207–2216. doi: 10.1093/ndt/gfu355.
- Maas, R. J. H., Wetzels, J. F. M. and Deegens, J. K. J. (2012) 'Serum-soluble urokinase receptor concentration in primary FSGS', *Kidney International*, 81(10), pp. 1043–1044. doi: 10.1038/ki.2012.32.
- Macdonald, J. L. and Pike, L. J. (2005) 'A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts', *Journal of Lipid Research*, 46(5), pp. 1061–1067. doi: 10.1194/jlr.D400041-JLR200.
- Mancuso, F. *et al.* (2012) 'Data extraction from proteomics raw data: An evaluation of nine tandem MS tools using a large Orbitrap data set', *Journal of Proteomics*, 75(17), pp. 5293–5303. doi: 10.1016/j.jprot.2012.06.012.
- Manza, L. L. *et al.* (2005) 'Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters', *Proteomics*, 5(7), pp. 1742–1745. doi: 10.1002/pmic.200401063.
- Martin, C. E. and Jones, N. (2018) 'Nephrin Signaling in the Podocyte: An Updated View of Signal Regulation at the Slit Diaphragm and Beyond', *Frontiers in Endocrinology*, 9. doi: 10.3389/fendo.2018.00302.
- Mishra, O. P. *et al.* (2013) 'Can We Predict Relapses in Children with Idiopathic Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome?', *Journal of Tropical Pediatrics*, 59(5), pp. 343–349. doi: 10.1093/tropej/fmt029.

- Mohamed, A. *et al.* (2019) 'RaftProt V2: understanding membrane microdomain function through lipid raft proteomes', *Nucleic Acids Research*, 47(D1), pp. D459–D463. doi: 10.1093/nar/gky948.
- Mollet, G. *et al.* (2009) 'Podocin Inactivation in Mature Kidneys Causes Focal Segmental Glomerulosclerosis and Nephrotic Syndrome', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 20(10), pp. 2181–2189. doi: 10.1681/ASN.2009040379.
- Montixi, C. *et al.* (1998) 'Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains', *The EMBO journal*, 17(18), pp. 5334–5348. doi: 10.1093/emboj/17.18.5334.
- Murray, J. I., Spivey, A. C. and Woscholski, R. (2013) 'Alternative synthetic tools to phospho-specific antibodies for phosphoproteome analysis: progress and prospects', *Journal of Chemical Biology*, 6(4), pp. 175–184. doi: 10.1007/s12154-013-0100-y.
- Nafar, M. *et al.* (2014) 'The novel diagnostic biomarkers for focal segmental glomerulosclerosis', *International Journal of Nephrology*, 2014, p. 574261. doi: 10.1155/2014/574261.
- Nakamura, T. *et al.* (1986) 'Sclerotic lesions in the glomeruli of Buffalo/Mna rats', *Nephron*, 43(1), pp. 50–55. doi: 10.1159/000183718.
- Nanjappa, V. *et al.* (2014) 'Plasma Proteome Database as a resource for proteomics research: 2014 update', *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), pp. D959-965. doi: 10.1093/nar/gkt1251.
- Ni, L., Saleem, M. and Mathieson, P. W. (2012) 'Podocyte culture: tricks of the trade', *Nephrology (Carlton, Vic.)*, 17(6), pp. 525–531. doi: 10.1111/j.1440-1797.2012.01619.x.
- Olsen, J. V. *et al.* (2006) 'Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks', *Cell*, 127(3), pp. 635–648. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.026.
- Oniszczyk, J. *et al.* (2019) 'CMIP is a negative regulator of T cell signaling', *Cellular & Molecular Immunology*. doi: 10.1038/s41423-019-0266-5.
- O'Shaughnessy, M. M. *et al.* (2017) 'Temporal and Demographic Trends in Glomerular Disease Epidemiology in the Southeastern United States, 1986-2015', *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 12(4), pp. 614–623. doi: 10.2215/CJN.10871016.
- Ouweneel, A. B., Thomas, M. J. and Sorci-Thomas, M. G. (2020) 'The ins and outs of lipid rafts: functions in intracellular cholesterol homeostasis, microparticles, and cell membranes', *Journal of Lipid Research*, 61(5), pp. 676–686. doi: 10.1194/jlr.TR119000383.
- Owen, D. M. *et al.* (2012) 'Sub-resolution lipid domains exist in the plasma membrane and regulate protein diffusion and distribution', *Nature Communications*, 3, p. 1256. doi: 10.1038/ncomms2273.
- Peng, X. *et al.* (1996) 'Accessory signaling by CD40 for T cell activation: induction of Th1 and Th2 cytokines and synergy with interleukin-12 for interferon-gamma production', *European Journal of Immunology*, 26(7), pp. 1621–1627. doi: 10.1002/eji.1830260732.
- Pérez, V. *et al.* (2014) 'Urinary Peptide Profiling to Differentiate between Minimal Change Disease and Focal Segmental Glomerulosclerosis', *PLoS ONE*, 9(1). doi: 10.1371/journal.pone.0087731.
- Pérez, V. *et al.* (2017) 'Comparative differential proteomic analysis of minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis', *BMC nephrology*, 18(1), p. 49. doi: 10.1186/s12882-017-0452-6.
- Popowicz, G. M. *et al.* (2006) 'Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton', *Trends in Biochemical Sciences*, 31(7), pp. 411–419. doi: 10.1016/j.tibs.2006.05.006.
- Pralle, A. *et al.* (2000) 'Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells', *The Journal of Cell Biology*, 148(5), pp. 997–1008. doi: 10.1083/jcb.148.5.997.
- Prior, I. A. *et al.* (2003) 'Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains', *The Journal of Cell Biology*, 160(2), pp. 165–170. doi: 10.1083/jcb.200209091.

- Prunotto, M. *et al.* (2013) 'Proteomic analysis of podocyte exosome-enriched fraction from normal human urine', *Journal of Proteomics*, 82, pp. 193–229. doi: 10.1016/j.jprot.2013.01.012.
- Puelles, V. G. *et al.* (2015) 'Podocyte Number in Children and Adults: Associations with Glomerular Size and Numbers of Other Glomerular Resident Cells', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 26(9), pp. 2277–2288. doi: 10.1681/ASN.2014070641.
- Regele, H. M. *et al.* (2000) 'Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 11(3), pp. 403–412.
- Reiser, J. *et al.* (2005) 'TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function', *Nature Genetics*, 37(7), pp. 739–744. doi: 10.1038/ng1592.
- Rinschen, M. M. *et al.* (2014) 'Phosphoproteomic Analysis Reveals Regulatory Mechanisms at the Kidney Filtration Barrier', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 25(7), pp. 1509–1522. doi: 10.1681/ASN.2013070760.
- Rinschen, M. M. *et al.* (2016) 'Quantitative deep mapping of the cultured podocyte proteome uncovers shifts in proteostatic mechanisms during differentiation', *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 311(3), pp. C404–417. doi: 10.1152/ajpcell.00121.2016.
- Sahali, D. *et al.* (2002) 'A novel approach to investigation of the pathogenesis of active minimal-change nephrotic syndrome using subtracted cDNA library screening', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 13(5), pp. 1238–1247.
- Saleem, M. A. *et al.* (2002) 'A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 13(3), pp. 630–638.
- Savin, V. J. *et al.* (1996) 'Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis', *The New England Journal of Medicine*, 334(14), pp. 878–883. doi: 10.1056/NEJM199604043341402.
- Savin, V. J. *et al.* (2008) 'Galactose binds to focal segmental glomerulosclerosis permeability factor and inhibits its activity', *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 151(6), pp. 288–292. doi: 10.1016/j.trsl.2008.04.001.
- Schell, C. and Huber, T. B. (2017) 'The Evolving Complexity of the Podocyte Cytoskeleton', *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(11), pp. 3166–3174. doi: 10.1681/ASN.2017020143.
- Schenk, L. K. *et al.* (2017) 'Angiotensin II regulates phosphorylation of actin-associated proteins in human podocytes', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 31(11), pp. 5019–5035. doi: 10.1096/fj.201700142R.
- Schwarz, K. *et al.* (2001) 'Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin', *Journal of Clinical Investigation*, 108(11), pp. 1621–1629.
- Sendo, F. and Araki, Y. (1999) 'Regulation of leukocyte adherence and migration by glycosylphosphatidyl-inositol-anchored proteins', *Journal of Leukocyte Biology*, 66(3), pp. 369–374. doi: 10.1002/jlb.66.3.369.
- Sezgin, E. *et al.* (2019) 'Measuring nanoscale diffusion dynamics in cellular membranes with super-resolution STED-FCS', *Nature Protocols*, 14(4), pp. 1054–1083. doi: 10.1038/s41596-019-0127-9.
- Shalhoub, R. J. (1974) 'Pathogenesis of lipid nephrosis: a disorder of T-cell function', *Lancet (London, England)*, 2(7880), pp. 556–560. doi: 10.1016/s0140-6736(74)91880-7.
- Sharma, K. *et al.* (2014) 'Ultradeep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of Tyr and Ser/Thr-based signaling', *Cell Reports*, 8(5), pp. 1583–1594. doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.036.
- Sharma, M. *et al.* (2015) 'JAK2/STAT3 Inhibitors Attenuate the Effect of Cardiotrophin-Like Cytokine Factor-1 and Human Focal Segmental Glomerulosclerosis Serum on Glomerular Filtration Barrier', *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*, 166(4), pp. 384–398. doi: 10.1016/j.trsl.2015.03.002.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997) 'Functional rafts in cell membranes', *Nature*, 387(6633), pp. 569–572. doi: 10.1038/42408.



- Simons, K. and Toomre, D. (2000) 'Lipid rafts and signal transduction', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1(1), pp. 31–39. doi: 10.1038/35036052.
- Simons, M. *et al.* (2001) 'Involvement of lipid rafts in nephrin phosphorylation and organization of the glomerular slit diaphragm', *The American Journal of Pathology*, 159(3), pp. 1069–1077. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61782-8.
- Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972) 'The fluid mosaic model of the structure of cell membranes', *Science (New York, N.Y.)*, 175(4023), pp. 720–731. doi: 10.1126/science.175.4023.720.
- Smart, E. J. *et al.* (1995) 'A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(22), pp. 10104–10108.
- Song, K. S. *et al.* (1996) 'Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains', *The Journal of Biological Chemistry*, 271(16), pp. 9690–9697. doi: 10.1074/jbc.271.16.9690.
- Stone, M. B. and Veatch, S. L. (2015) 'Steady-state cross-correlations for live two-colour super-resolution localization data sets', *Nature Communications*, 6, p. 7347. doi: 10.1038/ncomms8347.
- Straatmann, C. *et al.* (2014) 'Success with plasmapheresis treatment for recurrent focal segmental glomerulosclerosis in pediatric renal transplant recipients', *Pediatric Transplantation*, 18(1), pp. 29–34. doi: 10.1111/petr.12185.
- Takemoto, M. *et al.* (2006) 'Large-scale identification of genes implicated in kidney glomerulus development and function', *The EMBO Journal*, 25(5), pp. 1160–1174. doi: 10.1038/sj.emboj.7601014.
- Tanimura, N. *et al.* (2003) 'Dynamic changes in the mobility of LAT in aggregated lipid rafts upon T cell activation', *The Journal of Cell Biology*, 160(1), pp. 125–135. doi: 10.1083/jcb.200207096.
- Tao, J. *et al.* (2018) 'JAK-STAT signaling is activated in the kidney and peripheral blood cells of patients with focal segmental glomerulosclerosis.', *Kidney international*, 94(4), pp. 795–808. doi: 10.1016/j.kint.2018.05.022.
- Tapon, N. and Hall, A. (1997) 'Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton', *Current Opinion in Cell Biology*, 9(1), pp. 86–92. doi: 10.1016/s0955-0674(97)80156-1.
- Taus, T. *et al.* (2011) 'Universal and confident phosphorylation site localization using phosphoRS', *Journal of Proteome Research*, 10(12), pp. 5354–5362. doi: 10.1021/pr200611n.
- Tenreiro, S., Eckermann, K. and Outeiro, T. F. (2014) 'Protein phosphorylation in neurodegeneration: friend or foe?', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7. doi: 10.3389/fnmol.2014.00042.
- Thingholm, T. E., Jensen, O. N. and Larsen, M. R. (2009) 'Analytical strategies for phosphoproteomics', *Proteomics*, 9(6), pp. 1451–1468. doi: 10.1002/pmic.200800454.
- Tonks, N. K. (2006) 'Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(11), pp. 833–846. doi: 10.1038/nrm2039.
- Tonna, S. J. *et al.* (2008) 'NPHS2 variation in focal and segmental glomerulosclerosis', *BMC Nephrology*, 9, p. 13. doi: 10.1186/1471-2369-9-13.
- Tyanova, S. *et al.* (2016) 'The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data', *Nature Methods*, 13(9), pp. 731–740. doi: 10.1038/nmeth.3901.
- Ubersax, J. A. and Ferrell, J. E. (2007) 'Mechanisms of specificity in protein phosphorylation', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(7), pp. 530–541. doi: 10.1038/nrm2203.
- Välkängas, T., Suomi, T. and Elo, L. L. (2018) 'A comprehensive evaluation of popular proteomics software workflows for label-free proteome quantification and imputation', *Briefings in Bioinformatics*, 19(6), pp. 1344–1355. doi: 10.1093/bib/bbx054.
- Venable, J. D. *et al.* (2004) 'Automated approach for quantitative analysis of complex peptide mixtures from tandem mass spectra', *Nature Methods*, 1(1), pp. 39–45. doi: 10.1038/nmeth705.

- Verma, R. *et al.* (2006) 'Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization', *The Journal of Clinical Investigation*, 116(5), pp. 1346–1359. doi: 10.1172/JCI27414.
- Viola, A. *et al.* (1999) 'T Lymphocyte Costimulation Mediated by Reorganization of Membrane Microdomains', *Science*, 283(5402), pp. 680–682. doi: 10.1126/science.283.5402.680.
- Wang, B. *et al.* (2016) 'Mesenchymal Stem Cells Deliver Exogenous MicroRNA-let7c via Exosomes to Attenuate Renal Fibrosis', *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 24(7), pp. 1290–1301. doi: 10.1038/mt.2016.90.
- Wang, L. *et al.* (2012) 'Mechanisms of the proteinuria induced by Rho GTPases', *Kidney international*, 81(11), pp. 1075–1085. doi: 10.1038/ki.2011.472.
- Wang, Li *et al.* (2013) 'The role of Th17/IL-17 in the pathogenesis of primary nephrotic syndrome in children', *Kidney & Blood Pressure Research*, 37(4–5), pp. 332–345. doi: 10.1159/000350161.
- Wang, Y. *et al.* (2017) 'Proteomic profile-based screening of potential protein biomarkers in the urine of patients with nephrotic syndrome', *Molecular Medicine Reports*, 16(5), pp. 6276–6284. doi: 10.3892/mmr.2017.7329.
- Wang, Y. M. *et al.* (2008) 'Regulatory T Cells in Renal Disease', *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 1(4), pp. 294–304.
- Wei, C. *et al.* (2011) 'Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis', *Nature Medicine*, 17(8), pp. 952–960. doi: 10.1038/nm.2411.
- Wharram, B. L. *et al.* (2005) 'Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 16(10), pp. 2941–2952. doi: 10.1681/ASN.2005010055.
- Whittier, W. L. and Korbet, S. M. (2004) 'Renal biopsy: update', *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 13(6), pp. 661–665. doi: 10.1097/00041552-200411000-00013.
- Wilhelm, M. *et al.* (2014) 'Mass-spectrometry-based draft of the human proteome', *Nature*, 509(7502), pp. 582–587. doi: 10.1038/nature13319.
- Wiśniewski, J. R. *et al.* (2009) 'Universal sample preparation method for proteome analysis', *Nature Methods*, 6(5), pp. 359–362. doi: 10.1038/nmeth.1322.
- Xu, B. J. *et al.* (2005) 'Proteomic patterns and prediction of glomerulosclerosis and its mechanisms', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 16(10), pp. 2967–2975. doi: 10.1681/ASN.2005030262.
- Yang, Y. *et al.* (2020) 'In silico spectral libraries by deep learning facilitate data-independent acquisition proteomics', *Nature Communications*, 11(1), p. 146. doi: 10.1038/s41467-019-13866-z.
- Yu, L. *et al.* (2017) 'c-Maf inducing protein inhibits cofilin-1 activity and alters podocyte cytoskeleton organization', *Molecular Medicine Reports*, 16(4), pp. 4955–4963. doi: 10.3892/mmr.2017.7156.
- Zager, R. A., Johnson, A. C. M. and Frostad, K. B. (2014) 'Rapid renal alpha-1 antitrypsin gene induction in experimental and clinical acute kidney injury', *PloS One*, 9(5), p. e98380. doi: 10.1371/journal.pone.0098380.
- Zhang, H. *et al.* (2017) 'Plasma Exosomes From HLA-Sensitized Kidney Transplant Recipients Contain mRNA Transcripts Which Predict Development of Antibody-Mediated Rejection', *Transplantation*, 101(10), pp. 2419–2428. doi: 10.1097/TP.0000000000001834.
- Zhang, S.-Y. *et al.* (2010) 'c-mip impairs podocyte proximal signaling and induces heavy proteinuria', *Science Signaling*, 3(122), p. ra39. doi: 10.1126/scisignal.2000678.
- Zhang, Y. *et al.* (2013) 'Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics', *Chemical reviews*, 113(4), pp. 2343–2394. doi: 10.1021/cr3003533.
- Zhou, H. *et al.* (2013) 'Urinary exosomal Wilms' tumor-1 as a potential biomarker for podocyte injury', *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 305(4), pp. F553-559. doi: 10.1152/ajprenal.00056.2013.

- Zhu, J. *et al.* (2008) 'Nephrin mediates actin reorganization via phosphoinositide 3-kinase in podocytes', *Kidney International*, 73(5), pp. 556–566. doi: 10.1038/sj.ki.5002691.
- Zhu, J. *et al.* (2010) 'p21-activated kinases regulate actin remodeling in glomerular podocytes', *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 298(4), pp. F951-961. doi: 10.1152/ajprenal.00536.2009.
- Zschiedrich, S. *et al.* (2017) 'Targeting mTOR Signaling Can Prevent the Progression of FSGS', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 28(7), pp. 2144–2157. doi: 10.1681/ASN.2016050519.
- Zumerle, S., Molon, B. and Viola, A. (2017) 'Membrane Rafts in T Cell Activation: A Spotlight on CD28 Costimulation', *Frontiers in Immunology*, 8. doi: 10.3389/fimmu.2017.01467.

## RÉSUMÉ

Le syndrome néphrotique idiopathique (SNI) est une podocytopathie d'origine immunitaire dont la pathogenèse n'est pas bien connue. Notre équipe a identifié un gène (CMIP) dont l'expression est associée à certaines formes de SNI. Le principal objectif de cette étude est de mieux comprendre la physiopathologie du SNI par des approches protéomiques. Après avoir optimisé la méthode FASP pour l'analyse des lymphocytes T (LT) afin d'améliorer la sensibilité de l'analyse protéomique, nous avons étudié le protéome total du LT en fonction de la présence de CMIP. Nous avons ainsi montré l'implication de CMIP dans la désorganisation du cytosquelette du LT. CMIP pouvant être localisée dans les rafts, nous avons alors développé une méthode très sensible permettant l'analyse de ces microdomaines par spectrométrie de masse afin d'évaluer l'impact de CMIP sur le raftome de LT obtenus à partir d'une souris. Nos résultats suggèrent un recrutement différent des protéines de signalisation des LT stimulés en fonction de la présence de CMIP. Nous avons également exploré la signalisation proximale podocytaire pour comprendre l'effet sur ces cellules du plasma des patients SNI. En étudiant le raftome et le phosphoprotéome des podocytes, nous avons observé une dérégulation de mTORC1, de l'autophagie et une désorganisation du cytosquelette podocytaire. Enfin, les échanges plasmatiques (la fraction soluble et les vésicules extracellulaires -EVs-) des patients SNI en récurrence post-greffe ont été analysés, afin de mettre en évidence des biomarqueurs de la récurrence. Nos expériences ont montré que les EVs des patients SNI présentent une augmentation des transporteurs d'acides aminés, impliqués dans la voie mTOR. De plus, nous observons une plus forte présence des protéines de la dégranulation du neutrophile chez ces patients. En conclusion, mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence la désorganisation du cytosquelette au niveau des LT exprimant CMIP et des podocytes incubés en présence de plasma SNI, ainsi que l'implication de la voie mTOR dans les podocytes dans ce contexte. Les résultats issus de l'analyse du plasma des patients a permis d'ouvrir la voie à de nouvelles hypothèses sur l'implication des neutrophiles dans la récurrence de la maladie.

## ABSTRACT

Idiopathic nephrotic syndrome (INS) is a podocytopathy of presumable immune origin and poorly understood pathogenesis. Our team has identified a gene (CMIP) whose expression is associated with certain forms of INS. The main objective of my thesis is to better understand the pathophysiology of INS by using proteomic approaches. After optimizing the FASP method to improve sensitivity, we studied the proteome of T-cells overexpressing CMIP. The results show, among other effects, the link between CMIP expression and T-cell cytoskeleton disorganization. As CMIP can locate in membrane rafts, we developed a very sensitive method for raft protein analysis by mass spectrometry. We observed the impact of CMIP on raft-mediated signaling in T-cells via altered recruitment of proteins in these microdomains. We also explored the proximal signaling in podocytes exposed to plasma from SNI patients. By studying the raftome and phosphoproteome of plasma-stimulated podocytes, we highlighted a deregulation of mTORC1, of autophagy, and a disorganization of the podocyte cytoskeleton. Finally, we analyzed plasma exchanges (both the soluble fraction and extracellular vesicles -EVs-) from post-transplant INS patients to identify proteins potentially involved in INS recurrence. We found in the EV fraction from SNI patients the differential presence of amino acid transporters, known to be involved in the mTOR pathway. We also observed a high presence of neutrophil degranulation proteins in both the soluble fraction and EV from these patients. In conclusion, my PhD work has highlighted the dysregulation of cytoskeleton organization in both T-cells and podocytes, as well as the implication of the mTOR pathway in INS pathogenesis in podocytes. The results of the study on post-transplant patient plasma open new perspectives on the potential involvement of neutrophils in the recurrence of the disease.