



HAL
open science

Rôle des médiateurs inflammatoires au cours de la néphropathie à IgA primitive

Nicolas Maillard

► **To cite this version:**

Nicolas Maillard. Rôle des médiateurs inflammatoires au cours de la néphropathie à IgA primitive. Médecine humaine et pathologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2014. Français. NNT : 2014STET006T . tel-01187524

HAL Id: tel-01187524

<https://theses.hal.science/tel-01187524>

Submitted on 27 Aug 2015

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

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

UNIVERSITE JEAN MONNET – SAINT-ETIENNE
Ecole Doctorale : Sciences, Ingénieries, Santé, ED488

THESE

Présentée et soutenue en vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JEAN MONNET

Spécialité : SCIENCES DE LA VIE

Le 29 octobre 2014

Par

Nicolas MAILLARD

**ROLE DES MEDIATEURS INFLAMMATOIRES AU
COURS DE LA NEPHROPATHIE A IGA PRIMITIVE**

Directeur de Thèse :

Pr. Christophe Mariat

JURY

Monsieur le Professeur Eric ALAMARTINE	Président
Madame le Docteur Véronique FREMEAUX-BACCHI	Rapporteur
Monsieur le Professeur Jean-Claude ALDIGIER	Rapporteur
Monsieur le Professeur Christophe MARIAT	Directeur de Thèse

Liste des Tables et Figures

Tableau 1. Classifications en grades histologiques

Tableau 2. Exemple de score histologique quantitatif.

Tableau 3. Classification d'Oxford.

Figure 1. Structure d'une IgA1. Détail de la région charnière.

Figure 2. Profils de O-Glycosylation des résidus Ser ou Thr de la région charnière des IgA1.

Figure 3. Enzymes impliquées dans l'allongement de la chaîne de O-glycosylation des IgA1

Figure 4. Récepteurs aux IgA, d'après Monteiro et al.

Figure 5. Rôles du CD89 en fonction du caractère monomérique vs. Polymérique des IgA le liant et en fonction de la présence d'une chaîne γ .

Figure 6. Voies d'activation du complément.

Figure 7. Protéolyse du C3.

Figure 8. Structure du Facteur H, de CFHR1 et CFHR3, par correspondance des SCR par homologie de séquence.

Figure 9. Hypothèse mécanistique sous-tendant le rôle protecteur de la délétion CFH1/3 vis-à-vis de la NIgA.

Tableau 3. Fréquence des différents génotypes et allèles parmi les populations de patients présentant la maladie par rapport aux volontaires sains.

Tableau 4. Caractéristiques des patients de la cohorte 1979-1999

Figure 10. a. Courbe de survie ; b. Table de survie ; c. Survies moyennes, test du LogRank

Tableau 5. Modèles de Cox univariable (a.) et multivariable (b.)

Figure 11. Comparaison des lymphocytes totaux entre groupes NIgA et VS. En éléments/mm³

Figure 12. Comparaison des populations lymphocytaires entre groupes NIgA et VS. En éléments/mm³

Figure 13. Comparaison des populations T CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low}. En % des lymphocytes T CD4⁺.

Figure 14. Expression relative de Tbet après activation anti-CD3 et anti-CD28 (J2)

Figure 15. Expression relative de ROR γ T (à gauche) et IL17A (à droite) après stimulation (J2).

Figure 16. Expression de FoxP3 (à gauche) et IL10 (à droite) après activation.

Figure 17. Expression relative du gène TGF β après stimulation

Figure 18. En haut : prolifération des cellules mésangiales en culture induite par les fractions de poids moléculaires décroissants. Les fractions 30 à 42 induisent une prolifération (Immuns Complexes Artificiels). En bas : quantification des IgA totales par fraction

Figure 19. Gel d'électrophorèse marqué à l'argent et immunoblot anti-C3.

Tableau 6. Identification par spectrométrie de masse des fragments de C3 présents au sein des fractions de très haut poids moléculaire.

Résumé

La Néphropathie à IgA est la glomérulonéphrite primitive la plus fréquente, responsable d'une évolution vers l'insuffisance rénale terminale dans 10 à 30% des cas après 20 ans d'évolution. Les déterminants de cette maladie sont nombreux, impliquant de multiples acteurs de l'inflammation, qu'ils soient cellulaires ou humoraux. La physiopathologie générale de la maladie est actuellement considérée comme se déroulant en quatre « coups », (i) la production d'IgA1 polymériques présentant un déficit de galactosylation de la région charnière, (ii) l'existence d'un élément circulant capable de complexer ces IgA1 anormales, pouvant être une IgG anti-glycane ou la portion soluble du récepteur de type I aux IgA (sCD89), (iii) la constitution de complexes immuns circulants et (iv) le dépôt glomérulaire de ces complexes, générant des lésions inflammatoires puis cicatricielles responsables de l'évolution vers la maladie rénale chronique. La médiation inflammatoire est impliquée à différents niveaux comprenant entre autres le rôle de l'infiltration de macrophages dans le tissu rénal, l'orchestration de cette réponse inflammatoire glomérulaire par les sous-populations de lymphocytes T et l'importance de l'activation du complément sur le déterminisme des lésions glomérulaires inflammatoires médiées par les complexes immuns déposés.

Au cours de ce travail de thèse, l'implication de ces différents acteurs a été explorée. Les macrophages expriment le récepteur de type I aux IgA (CD89, issu du gène FCAR), dont une mutation de la portion intracytoplasmique modifie *in vitro* la transduction du signal. La première étude a visé à évaluer sur une grande cohorte rétrospective l'impact de cette mutation sur le risque d'occurrence de la maladie ainsi que son impact pronostique. Le rôle des sous-populations T a été abordé au cours d'une seconde étude, suivant l'hypothèse que l'orientation pro-inflammatoire au cours de la NIGa pourrait être liée à un déficit de régulation par une sous-population de lymphocytes T, les Tregs. Cette étude prospective a évalué la représentation de la sous-population CD4⁺CD25⁺CD127^{low} et le profil d'expression génique de gènes prototypiques des sous-populations Th1, Tregs et Th17. Le rôle du complément comme médiateur inflammatoire à l'interface entre les complexes immuns à IgA1 et les cellules mésangiales a été exploré par une étude *in vitro*.

La mutation 844 A->G de FCAR n'a pas été associée à un risque supplémentaire de développer la maladie et n'impactait pas le pronostic des patients. L'étude des lymphocytes T n'a pas montré de différence de quantité de cellules CD4⁺CD25⁺CD127^{low} entre patients et volontaires sains et ne suggérait qu'une tendance en faveur d'un déficit fonctionnel de régulation (plus faible expression des gènes FoxP3, IL10, TGFβ chez les patients). Enfin, des fragments issus de l'activation et de la protéolyse par le facteur I de C3 ont été mis en évidence par immunoblot et spectrométrie de masse au sein des complexes immuns générés artificiellement en présence de serum.

Ces études suggèrent qu'une modification du rôle fonctionnel du CD89 n'impacte pas le devenir de la NIgA, ce qui est en défaveur d'un rôle critique de ce récepteur dans la pathogénie de la maladie. La tendance au déficit fonctionnel Tregs nécessite d'être confirmée au sein d'un effectif plus conséquent et présentant une forme plus active de la maladie, mais elle corrobore deux autres études comparables dans leur méthodologie. Enfin, le rôle du complément se situe à l'interface entre les complexes immuns et les effecteurs inflammatoires glomérulaires tels que les cellules mésangiales.

Mots clés : Néphropathie à IgA primitive, FCAR, CD89, Tregs, Th17, Th1, complément, complexes immuns

Résumé en anglais

IgA Nephropathy (IgAN) is the most common primary glomerulonephritis, leading to end stage renal failure in 10 to 30% of cases after 20 years. This disease is determined by numerous inflammatory players, including cells and molecules. The pathogeny of the disease is likely to be driven by a 4 « hits » model, (i) increased systemic production of aberrantly O-galactosylated polymeric IgA1, (ii) the existence of circulating abnormal IgA1 binding element, which could be either an anti-glycan IgG or the soluble fragment of the main IgA receptor (sCD89), (iii) the formation of circulating immune complexes, and (iv) the glomerular deposition of these complexes, that accounts for a variable local inflammation leading to scarring processes and finally to the chronic kidney disease. Inflammatory mechanisms operate at several levels, including the macrophage cells infiltration in the kidney tissue, the orchestration of the immune response by T-cells subsets, including regulatory T-cells, and the role of complement activation to induce the glomerular inflammatory response from the immune complexes deposition.

In the present work, we aimed to explore the implication of these inflammation response players. Macrophages express the type I IgA receptor (CD89, downstream from its gene FCAR), whose function can be affected *in vitro* by a common mutation of its intracytoplasmic portion. A first study evaluated the impact of this mutation on the risk to develop the disease as well as on the global prognosis. A second study evaluated the role of T-cell subsets during IgAN, following the hypothesis that the pro-inflammatory balance of the disease could be a consequence of a defect in the immune regulation by the Tregs. This prospective study aimed to assessing the frequency of CD4⁺CD25⁺CD127^{low} cells in peripheral blood and the characteristic gene expression profile from Th1, Th17 and Tregs subsets. The role of complement as an inflammatory player at the interface between IgA1 containing immune complexes and mesangial cells was explored by an *in vitro* study.

The single nucleotide polymorphism 844 A->G of FCAR had no impact neither on disease risk of occurrence neither on the renal survival. The T-cell subsets study failed to demonstrate any difference in the proportion of CD4⁺CD25⁺CD127^{low} cells and only suggested a defect in functional activity of Tregs, according to a lower expression of FoxP3, IL10, TGFβ genes. The third *in vitro* study demonstrated by

immunoblot and mass spectrometry the presence of C3 breakdown products accompanying IgA1 based engineered immune complexes formed in presence of normal immunoglobulin depleted serum.

The lack of effect of the mutation of FCAR on the IgAN prognosis is not in favour to a critical role of this receptor on the pathogeny of the disease. The trend in the functional defect of Tregs subset needs to be confirmed in a larger study, including patients with a more severe form of their disease. This result is however consistent with two other studies displaying a similar methodology. The role of complement is confirmed to be a key player, as it is likely to act at the interface between the IgAN particular immune complexes and mesangial cells.

Keywords : IgA Nephropathy, FCAR, CD89, Tregs, Th17, Th1, complement, immune complexes

SOMMAIRE

Résumé	4
Résumé en anglais	6
SOMMAIRE.....	8
Liste des abréviations	11
1. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	13
1.1.Aspects cliniques	14
1.1.1. Histoire de la Néphropathie à IgA.....	14
1.1.2. Epidémiologie de la Néphropathie primitive à dépôts mésangiaux d'IgA	15
1.1.3. Diagnostic de la Néphropathie à IgA primitive	16
1.1.4. Prise en charge thérapeutique.....	23
1.1.4.1. Support thérapeutique commun	24
1.1.4.2. Corticothérapie.....	24
1.1.4.3. Traitements immunosuppresseurs.....	25
1.1.4.4. Autres traitements	26
1.1.4.5. Situations cliniques particulières	27
1.1.5. Récidive en transplantation rénale	28
1.2.Physiopathologie	28
1.2.1. Physiologie des IgA et de leur récepteurs.....	28
1.2.1.1. Structure et fonction des IgA	29
1.2.1.2. Les récepteurs des IgA	32
1.2.2. Pathogénie séquentielle.....	36
1.2.2.1. Anomalies des IgA au cours de la Néphropathie à IgA primitive	36
1.2.2.2. Formation des complexes immuns circulants à IgA1 polymériques.....	38
1.2.2.2.1. Auto-agrégation des IgA1 anormales.....	39
1.2.2.2.2. Rôle des récepteurs.....	39
1.2.2.2.2.1. Formation de complexes solubles	39
1.2.2.2.2.2. Rôle des récepteurs dans la clairance des IgA	41
1.2.2.2.2.3. Rôle des récepteurs pour la constitution des dépôts mésangiaux.....	41
1.2.2.2.3. Anticorps anti-glycanes.....	42

1.2.2.3. Réponse inflammatoire glomérulaire aux dépôts mésangiaux d'IgA.....	44
1.2.2.3.1. Activation du complément	44
1.2.2.3.2. Activation des cellules mésangiales	50
1.2.2.3.3. Rôle de la polarisation des lymphocytes T.....	50
1.2.2.3.4. Infiltration macrophagique glomérulaire.....	52
1.2.2. Aspects génétiques de la Néphropathie à IgA	53
1.2.2.1. Néphropathies à IgA Familiales	53
1.2.2.2. Hérité des anomalies de glycosylation des IgA.....	54
1.2.2.3. Etudes génétiques moléculaires	55
1.2.2.4. Les études d'association à l'échelle du génome (Genome Wide Association Study, GWAS)	58
2. PARTIE EXPERIMENTALE.....	60
2.1. Justification de la recherche et hypothèse de travail	61
2.2. Matériel et méthodes	63
2.2.1. Exploration du rôle des monocytes/macrophages : étude du polymorphisme de CD89	63
2.2.1.1. Populations étudiées	63
2.2.1.2. Extraction de l'ADN	63
2.2.1.3. Discrimination allélique par PCR quantitative en temps réel	64
2.2.1.4. Analyse statistique.....	65
2.2.2. Etude du rôle des lymphocytes T : étude de la polarisation lymphocytaire T au cours de la NIgA	66
2.2.2.1. Patients	66
2.2.2.2. Extraction des cellules mononucléées du sang périphérique	67
2.2.2.3. Analyse en cytométrie de flux de la sous-population CD4+CD25+CD127low	67
2.2.2.4. Activation des cellules T.....	67
2.2.2.5. Extraction de l'ARN	68
2.2.2.6. Rétrotranscription des ARN en ADN complémentaires	68
2.2.2.7. RT-PCR quantitative en temps réel	68
2.2.3. Etude du C3 au sein des complexes immuns IgA1-dg / IgG antiglycane	71
2.2.3.1. Formation des complexes immuns artificiels	71

2.2.3.2. Chromatographie	72
2.2.3.1.1. Application des fractions en culture de cellules mésangiales.....	72
2.2.3.1.2. ELISA de mesure des IgA et des IgG totales par fraction.....	73
2.2.3.1.3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunoblot anti-C3	74
2.2.3.1.4. Analyse en spectrométrie de masse	74
2.3. Résultats.....	76
2.3.1. Exploration du rôle des monocytes/macrophages : étude du polymorphisme du CD89	76
2.3.1.1. Etude de susceptibilité génétique	76
2.3.1.2. Etude d'association génétique pronostique.....	77
2.3.2. Etude du rôle des lymphocytes T : étude de la polarisation lymphocytaire T au cours de la NIgA	81
2.3.2.1. Patients	81
2.3.2.2. Populations cellulaires T	82
2.3.2.3. Profil transcriptionnel des lymphocytes T	84
2.3.2.3.1. Expression des gènes Th1	84
2.3.2.3.2. Expression des gènes Th17	84
2.3.2.3.3. Expression des gènes Tregs.....	85
2.3.3. Etude du C3 au sein des complexes immuns IgA1-dg / IgG antiglycane.....	87
2.3.3.1. La prolifération mésangiale induite par les complexes immuns est influencée par la présence d'un facteur sérique	87
2.3.3.2. Les fractions de haut poids moléculaire contiennent des éléments de C3	88
2.3. Discussion générale.....	91
2.4. Conclusion générale	97
Références	99
3.PUBLICATIONS	118

Liste des abréviations

ADCC antibody dependant cell-mediated cytotoxicity

ADN acide desoxyribonucléique

ANCA : anti-neutrophil cytoplasmic antibodies

APRIL

ARA2 antagoniste des récepteurs de type de l'angiotensine II

ASGPR récepteur des asialoglycoprotéines

Cosmc core 1 β 3GalT specific molecular chaperone

DFG débit de filtration glomérulaire

DFGe DFG estimé

DMLA dégénérescence maculaire liée à l'âge

EBV Epstein Barr virus

Fc α / μ R récepteur aux fragments Fc α / μ

Fc α RI ou CD89 récepteur au fragment Fc de la chaîne α

FoxP3 forkhead box protein 3

GalNac N-acétylgalactosamine

GWAS Genome Wide Association Study

HAA Helix Aspersa agglutinin

HLA human leucocyte antigen

HMR hématurie macroscopique récidivante

HP helicobacter pylori

HTA hypertension artérielle

IEC inhibiteur de l'enzyme de conversion

Asn asparagine

BAFF B-cell activating factor

C1GALT1 core 1 β 3GalT1

C5b-9 complexe terminal du complement

CCR5 récepteur à CC-chimiokine 5

CFHR complement facteur H related genes

CMH complexe majeur d'histocompatibilité

IFN γ interféron γ

IgA immunoglobuline A

IgA1-dg IgA1 galactose déficiente

IgG immunoglobuline G

IgM immunoglobuline M

IL10 interleukine 10

IL1 α interleukine 1 α

IL21 interleukine 21

IL6 interleukine 6

IL8 interleukine 8

IP10 interferon γ induced protein 10

IRC insuffisance rénale chronique

IRCT insuffisance rénale chronique terminale

ITAM Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

ITAMi ITAM inhibitor

KDIGO Kidney Diseases : Improving Global Outcomes

LOD Logarithm of Odds

MAPK/ERK Mitogen-activated protein kinases	ROC receiver operating characteristic
MASP MBL associated serine protease	sCD89 CD89 soluble
MBL mannose binding lectin	SCR short consensus repeats
MCP-1 Monocyte chemoattractant protein-1	Ser serine
MIP2 macrophage inflammatory protein 2	SHUa syndrome hémolytique urémique
NF- κB nuclear factor κ B	SNP polymorphisme mononucléotidique
NIgA Néphropathie primitive à dépôts mésangiaux d'IgA	TfR ou CD71 récepteur à la transferrine
PCR polymerase chain reaction	Tg2 transglutaminase 2
PDGF platelet derived growth factor	TGFβ tumor growth factor β
pIgR récepteur aux immunoglobulines polymériques	Thr thréonine
	TNFα tumor necrosis factor alpha
	Tregs lymphocytes T régulateurs
	TT anatoxine tétanique

1.PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1.Aspects cliniques

1.1.1. Histoire de la Néphropathie à IgA

Les premières descriptions véritables de glomérulonéphrites peuvent être datées de 1827 par Richard Bright(1), associant la description d'urine albumineuse à une atrophie granuleuse rénale diffuse dans un contexte clinique d'oedèmes généralisés. La coagulation à la chaleur ou à l'acide acétique des urines permettait d'évaluer la présence d'une protéinurie. Jusqu'au milieu du XIXème siècle, la description de ces états protéinuriques dominaient l'intérêt des pionniers de la Néphrologie. L'observation d'urines sanglantes (hématurie) était faite depuis de nombreux siècles mais rapportée à des anomalies du tractus urinaire (calculs). La fin du XIXème siècle est marquée par l'observation au microscope de globules rouges altérés (acanthocytes), et progressivement l'intérêt pour la recherche d'une hématurie microscopique ou macroscopique dans l'évaluation des maladies rénales va s'imposer jusqu'en 1920 où Thomas Addis décrit une méthode de quantification des hématies dans les urines(2). Des descriptions de patients présentant des hématuries macroscopiques récidivantes associées à la persistance d'hématurie microscopique entre les crises apparaissent à la fin du XIXème siècle(3). L'existence d'une protéinurie et/ou d'une hématurie sont finalement les principaux éléments diagnostics in vitro des maladies rénales au début du XXème siècle.

L'évaluation histologique n'était alors réalisée qu'à partir de prélèvements autopsiques qui n'avaient pas permis de mettre en relation l'expression clinique et morphologique de façon utilisable par les cliniciens. L'apparition de la biopsie rénale dans les années 1950 a transformé la connaissance des correspondances anatomo-cliniques(4). La description de 10 cas de jeunes patients présentant une hématurie macroscopique post-pharyngitique immédiate récurrente par Bates et al. en 1957 apporte un premier élément en faveur d'une individualisation de la future Néphropathie à IgA(5). Les biopsies rénales retrouvaient la présence d'hématies dans la lumière tubulaire et certaines altérations glomérulaires segmentaires et focales. De façon marquante, et pour la première fois, la description de dépôts mésangiaux, denses aux électrons, « fibrinoïdes », était faite en microscopie électronique par Galle

et Berger en 1962(6). Ces dépôts étaient déjà pressentis être formés de complexes immuns.

L'étape suivante a été le développement de l'immunohistochimie. Des anti-séras anti-IgA, anti-IgG et anti-IgM étaient disponibles dans quelques laboratoires en 1963, mais manquaient pour la plupart de spécificité. La plupart des laboratoires implémentant les immunomarquages sur biopsie rénale utilisaient un anti-IgG seul.

Finalement Jean Berger et Nicole Hinglais utilisaient un anticorps anti-IgA très spécifique préparé par l'immunologiste Maxime Seligmann, et mirent en évidence les dépôts d'IgA intercapillaires, souvent associés à des dépôts d'IgG. La description princeps était diffusée au congrès de la Société Française de Néphrologie en 1968 puis publiée la même année dans un journal francophone(7). Entre 1968 et 1973, cette néphropathie n'était décrite que par des équipes françaises, le scepticisme de la communauté anglophone restant prédominant(8, 9). C'est à partir de 1973 que quelques descriptions par des équipes d'autres nationalités (Néerlandaises, Japonaises, Américaines, du Royaume-Uni) permettaient de reclassifier un grand nombre de glomérulonéphrites segmentaires et focales hématurique en Néphropathies mésangiales à IgA(10-13).

La généralisation de l'immunomarquage anti-IgA a permis l'acceptation finale de cette nouvelle entité diagnostique et le développement exponentiel des travaux la concernant à partir de 1980.

1.1.2. Epidémiologie de la Néphropathie primitive à dépôts mésangiaux d'IgA

Cette néphropathie est la première cause mondiale de néphropathie glomérulaire primitive. Son incidence varie de façon importante avec des valeurs maximales en Asie (5,7 nouveaux cas par 100000 habitants) et minimales en Afrique (0,2/100000 habitants). En France, l'incidence est intermédiaire (2,5/100000), alors qu'elle est forte dans le Nord de l'Italie(14). La prévalence a été estimée à partir de séries autopsiques à 1,3% en Finlande(15) et 3,7% au Japon. Ces valeurs sont issues de séries autopsiques dont les causes de mort étaient accidentelles, en ne retenant que les cas associant les dépôts mésangiaux d'IgA à des anomalies du sédiment urinaire. D'autres études retenant les décès toutes causes retrouvaient des dépôts mésangiaux d'IgA jusque dans 10% des cas(16). Mais les causes de décès étaient fréquemment des cirrhoses, des infections et des cancers, représentant autant de causes de

Néphropathies à IgA secondaires. Cependant, les dépôts mésangiaux asymptomatiques d'IgA sans autre anomalie histologique sont fréquents (6,8%, série finlandaise), mais n'étaient jamais associés à des codépôts de C3(15). Une étude montrait une fréquence proche de 10% de dépôts mésangiaux d'IgA sur des biopsies pré-implantatoires de donneurs vivants pour transplantation rénale(17).

Une caractéristique majeure de la NIgA est une expression de la maladie très variable, allant de formes complètement bénignes (formes asymptomatiques ou responsables d'hématurie microscopique isolée) à des formes d'évolution rapidement progressive(18). Les séries de patients présentant une NIgA prouvée par biopsie rénale évoluaient vers l'insuffisance rénale terminale dans 9 à 43% des cas à 10 ans. Ces différences pronostiques majeures entre les séries tiennent au moins en partie aux disparités d'indication de biopsie. La série Stéphanoise (19) est caractérisée par un taux important de biopsies pour hématurie microscopique isolée (27%), expliquant l'apparent très bon pronostic de cette cohorte (91% de survie rénale à 10 ans, 86% à 20 ans). La plupart des études relatent la survie rénale à partir du moment de la biopsie, alors que celle-ci est active dans un grand nombre de cas depuis de nombreuses années avant cet acte diagnostique. Dater le début de la maladie est possible dans les cas aigus symptomatiques (hématurie macroscopique per-infectieuse, syndromes néphritiques ou néphrotiques) qui représentent un tiers des patients, mais cela se révèle moins évident dans les formes asymptomatiques où le dépistage (par exemple en médecine du travail) est le seul mode possible de détection. Ceci explique les grandes variations pronostiques entre les différents centres en fonction de la stratégie de dépistage, et de la politique de biopsie rénale. En France, la NIgA est responsable de 3,5% (20) des patients incidents en Insuffisance Rénale Chronique Terminale (IRCT), soit un taux d'incidence brut de 5,5 par millions d'habitants, représentant le tiers des patients présentant une glomérulonéphrite (10,4%). Cette valeur est probablement légèrement sous-estimée, le taux de biopsie pour syndrome glomérulaire n'étant que de 68% des cas incidents d'insuffisance rénale terminale. C'est la première cause d'IRCT au sein des glomérulonéphrites primitives.

1.1.3. Diagnostic de la Néphropathie à IgA primitive

Le symptôme le plus fréquent au cours de la NIgA est l'hématurie (90% des patients)(21). Celle-ci est typiquement macroscopique sous forme de poussées pendant des épisodes d'infections de la muqueuse respiratoire. Ces épisodes sont spontanément régressifs mais récidivent. Environ un quart des patients présentent ce symptôme, assez caractéristique de la maladie, d'hématurie macroscopique récidivante (HMR). Mais la forme la plus fréquente est l'hématurie microscopique chronique, détectable uniquement par dépistage (bandelette urinaire, cytologie urinaire quantitative).

La présence d'une protéinurie supérieure à 1g/24h est moins fréquente (29% au moment de la biopsie, série Stéphanoise 1990-1999). De fortes protéinuries (>3g/24h) peuvent être présentes et les syndromes néphrotiques sont possibles (environ 3% des patients). La protéinurie est un marqueur pronostique puissant.

L'hypertension artérielle est également un symptôme fréquent, présent chez 21% des patients au début de la maladie et 35% au moment du diagnostic dans notre série. L'HTA est également un marqueur pronostique.

L'insuffisance rénale chronique, définie comme un Débit de Filtration Glomérulaire (DFG) inférieur à 60 mL/min/1,73m², est présente au moment du diagnostic dans 21% des cas.

L'association de ces symptômes clinico-biologiques à l'élévation des IgA sériques est également un élément en faveur du diagnostic de NIgA. Environ 40% des patients présentant une NIgA primitive présentent une élévation du taux d'IgA sériques. Les performances diagnostiques de cette anomalie sont toutefois décevantes (sensibilité 0,33 pour une spécificité de 0,9) et l'absence de cette anomalie n'élimine pas le diagnostic(22).

Le diagnostic de certitude repose sur l'examen anatomo-pathologique du tissu rénal, obtenu par ponction biopsie.

La seule condition diagnostique est la présence dominante de dépôts d'IgA dans le mésangium glomérulaire de façon généralisée et diffuse, révélée par l'étude en immunohistochimie. Ces dépôts sont granulaires et réalisent un aspect en « arbre mort ». Ces dépôts s'associent très fréquemment aux dépôts de C3 (90%) et d'IgG (50%)(23).

Les lésions histologiques en microscopie optique sont par contre inconstantes et volontiers segmentaires et focales(24). Elles comprennent différentes lésions glomérulaires parmi l'épaississement mésangial, la prolifération mésangiale, la prolifération endocapillaire, les lésions de hyalinose segmentaire et focale(25, 26), la prolifération extracapillaire et possiblement des lésions de microangiopathie thrombotique(27). Ces lésions glomérulaires peuvent s'associer à des lésions tubulo-interstitielles (atrophie tubulaire et fibrose interstitielle) et vasculaires (néphroangiosclérose).

Ces lésions visibles en microscopie optique constituent un marqueur pronostique de la maladie. En effet, de nombreuses classifications histologiques ont été développées à partir de séries monocentriques, dans le but de stratifier le risque d'évolution vers la mort rénale. Deux approches différentes ont été menées : une première en grades de sévérité et une seconde par l'accumulation de critères quantitatifs. L'approche en grades est centrée sur l'atteinte glomérulaire alors que les approches quantitatives prennent en compte également l'atteinte vasculaire, tubulaire et interstitielle. Les principales classifications en grade de sévérité sont celles de Haas(28), de Meadow(29), et de Lee (30)(Tableau 1). Les approches quantitatives sont plus nombreuses parmi lesquelles prend place la classification développée à Saint Etienne(31). De nombreuses études retrouvent un pouvoir pronostique prédictif de ces classifications, le plus souvent par une analyse univariable. Les classifications en grades de sévérité permettent la prédiction de la mort rénale et ce de façon robuste à l'analyse multivariable(18). Les sous critères les plus fortement associées à la mort rénale sont la sclérose glomérulaire et l'atteinte tubulo-interstitielle. Le pouvoir pronostique de la présence de croissants extracapillaires et de l'atteinte vasculaire est moins constant parmi les études.

Grade	Haas	Meadow (Purpura rhumatoïde)	Lee
I	Lésions histologiques minimales ; Hypercellularité mésangiale minimale, sans sclérose segmentaire ou croissant	Glomérules normaux	Glomérules normaux
II	Glomérulosclérose segmentaire et focale avec au maximum une discrète hypercellularité mésangiale sans croissant	Moins de 50% des glomérules présentant une hypercellularité mésangiale segmentaire avec rares synéchies ou petits croissants	Moins de 50% des glomérules présentant une hypercellularité mésangiale et sclérose segmentaire. Rares petits croissants
III	Glomérulonéphrite proliférative focale. Moins de 50% des glomérules présentent une hypercellularité mésangiale ou endocapillaire. Croissants possibles	Prolifération mésangiale diffuse avec synéchies occasionnelles et petits croissants	Prolifération mésangiale diffuse avec synéchies occasionnelles et petits croissants
IV	Glomérulonéphrite proliférative diffuse. Plus de 50% des glomérules présentent une hypercellularité mésangiale ou endocapillaire segmentaire ou globale. Croissants possibles	Prolifération mésangiale diffuse marquée; moins de 50% de glomérules présentant des croissants ou des synéchies avec sclérose segmentaire ou globale fréquente	Prolifération mésangiale diffuse marquée, moins de 45% de glomérules présentant un croissant épithélial avec sclérose segmentaire ou globale
V	Glomérulonéphrite chronique évoluée. Plus de 40% des glomérules sont scléreux et/ou plus de 40% d'atrophie tubulaire	Idem stade IV mais plus sévère; >50% des glomérules présentant un croissant épithélial important	Idem stade IV, mais plus sévère; plus de 45% des glomérules présentant un croissant épithélial

Tableau 1. Classifications en grades histologiques (28-30)

<u>GLOMERULES</u>		SCORE	<u>VAISSEAUX</u>	SCORE
Nombre total de glomérules			Endothélie (0 à 2+)	
Nombre total de PAC			Dépôts sous endothéliaux (0 à 2+)	
Prolifération cellulaire extra capillaire			Tromboses (0 à 1+)	
Nombre total de croissants Cellulaires Fibreux ou fibro-cellulaires			SCORE VASCULAIRE (maxi=5)	
			<u>TUBES</u>	SCORE
Exsudation fibrine			Nécrose tubulaire (0 à 2+)	
Prolifération cellulaire endo capillaire (0 à 2+)			Atrophie tubulaire (0 à 2+)	
Scérose mésangiale (0 à 2+)			SCORE TUBULAIRE (maxi=4)	
Hyalinose segmentaire et focale (0 à 2+)			<u>INTERSTITIUM</u>	SCORE
% de glomérules atteints				
Croissants extra-capillaires (0 à 2) 0 - 12,5 % : 1 13 - 25 % : 2		Infiltration cellulaire (0 à 2+)	
PAC si >25 % (0 à 2) 25 - 50 % : 1 >50 % : 2		Œdème interstitiel (0 à 1+)	
Cotation additionnelle (0 à 4)		=	Fibrose interstitielle (0 à 2+)	
SCORE GLOMERULAIRE (maxi=6)				
<u>SCORE GLOBAL</u> (maxi=20) (glomérulaire+vasculaire+tubulaire+interstitiel)			SCORE INTERSTITIEL (maxi=5)	

Tableau 2. Exemple de score histologique quantitatif. (31)

Ces classifications présentent de multiples limites : (i) elles sont issues le plus souvent d'une expérience monocentrique et générées à partir de l'expérience de pathologistes isolés, (ii) les critères histologiques peuvent être soumis à la subjectivité du lecteur, occasionnant une variabilité intra- et inter-centre (iii) les différents critères au sein d'une même classification peuvent être covariables et créer une redondance (iv) les critères n'ont pas été sélectionnés à partir d'un travail statistique rigoureux permettant de restreindre leur nombre aux seuls prédicteurs pronostiques indépendants des données cliniques déjà en possession du praticien avant la biopsie rénale

Pour pallier ces limites, la classification d'Oxford a été développée suite à l'impulsion du groupement international « IgA Nephropathy Network ». La particularité de cette classification est sa robustesse méthodologique(32, 33).

La cohorte de patients concernait plusieurs types de population (62 asiatiques, 94 européens, et 109 américains), présentant une néphropathie à IgA primitive de sévérité moyenne (protéinurie 1,7 g/j, pression artérielle moyenne 98mmHg, stades 1, 2, 3 de maladie rénale chronique), avec une évolution vers le stade 5 dans 13% après un suivi médian de 69 mois.

Les critères histologiques ont été retenus sur plusieurs critères : la reproductibilité (par le degré de concordance entre pathologistes), l'indépendance des critères entre eux et enfin leur rôle prédictif. Ce dernier était évalué de façon uni puis multivariée, en intégrant les critères cliniques « durs » (protéinurie, hypertension artérielle et fonction rénale) pour la prédiction de l'évolution vers l'IRCt, de la perte de plus de 50% du DFG et d'une pente forte de décroissance du DFG.

Les variables répondant à l'ensemble de ces critères étaient l' hypercellularité mésangiale (notée M), la sclérose glomérulaire segmentaire (notée S), et l'atrophie tubulaire/ fibrose interstitielle (notée T). La présence d'une prolifération endo ou extracapillaire n'était pas associée à une évolution clinique péjorative, mais la prolifération endocapillaire seule était fortement associée à la présence d'un traitement immunosuppresseur, représentant un biais potentiel. Ce critère (prolifération endocapillaire), noté E, a finalement été retenu en raison de son caractère prédictif après censure des patients traités. La prolifération extracapillaire n'a pas été retenue dans la classification. Ces 4 critères sont colligés dans le tableau.

Plusieurs études ont évalué la validité de cette classification pour prédire le pronostic néphrologique de la néphropathie à IgA primitive. La plus importante est une étude japonaise (n=702)(34). La sévérité était comparable à l'étude princeps. Les auteurs retrouvent le rôle pronostic indépendant des critères S et T alors que le critère M atteignait la limite de significativité et le critère E n'était pas associé au pronostic. Par contre, la présence d'une prolifération extracapillaire était un critère prédictif indépendant dans cette étude. Cette différence peut être expliquée par le fait que des patients évoluant vers l'IRCt lors de la première année après le diagnostic ont été inclus, ce qui n'était pas le cas lors de l'étude princeps. Une étude chinoise concernant 410 patients retrouvait le rôle pronostic indépendant des critères S et T(35). Parallèlement, notre équipe a montré dans une population française (183

patients) l'absence de pouvoir pronostique indépendant des critères de la classification, en raison de caractéristiques initiales différentes de l'étude princeps (14% des patients avaient un DFG initial inférieur à 30 mL/min/1,73m², avec un niveau moyen de protéinurie initial plus faible)(36). Enfin, une étude américaine multicentrique portant sur 187 individus, retrouvait un rôle prédictif sur la pente de décroissance du DFG des seules variables S et T(37). En somme, les critères S et T semblent les critères les plus robustes.

Cette classification résulte d'une démarche rigoureuse sur le plan méthodologique, mais plusieurs limites peuvent être objectées. La première critique est liée au fait qu'une proportion de patients avaient fait l'objet d'un traitement par corticostéroïdes, modifiant leur évolution de manière non maîtrisée sur le plan statistique. Cet écueil a été identifié et contourné par la récupération du critère E, mais pourrait diminuer les performances de cette classification à définir des groupes de patients relevant d'un traitement spécifique. Il est possible que d'autres lésions (par exemple la prolifération extracapillaire) aient perdu leur pouvoir prédictif par l'effet du traitement immunosuppresseur, laissant les critères de lésions cicatricielles seuls ou presque à prédire la sévérité. La deuxième critique est l'absence de patient arrivant au stade d'IRCt avant la première année de suivi. Là encore, les formes histologiques inflammatoires les plus graves pourraient être moins représentées et constituer finalement un biais. D'autre part, il a été montré que les lésions de microangiopathie thrombotique pouvaient être fréquentes dans la NIgA et associées à un pronostic péjoratif indépendant(27), alors qu'elles étaient rares dans la cohorte de la classification d'Oxford. Cette même équipe a également décrit le rôle différentiel des sous types de lésions de glomérulosclérose segmentaire dans le pronostic de la maladie (hyalinose segmentaire et focale, lésions « collapsantes», « tip lesion »..), ainsi que l'importance de leur caractère isolé ou avec lésions associées(25, 26).

Cette classification permet donc un réel progrès, répondant de manière rigoureuse aux exigences nécessaires au consensus et donc à son utilisation généralisée (simplicité, reproductibilité, caractère prédictif indépendant). Toutefois, ses performances sont variables lors des études de validation, et elle ne prend pas en compte les patients les plus sévères (exclus au moment de la sélection).

Variable	Définition	Score
Histopathologique		
Hypercellularité mésangiale	<4 cellules mésangiales par axe mésangial (moyenne)	M0
	>5 cellules mésangiales par axe mésangial (moyenne)	M1
Glomerulosclérose segmentaire	Sclérose d'une partie du flocculus ou synéchie flocculocapsulaire	S0 (absent)
		S1 (présent)
Hypercellularité endocapillaire	Présence de cellules dans la lumière des capillaires glomérulaires réduisant cette lumière	E0 (absent)
		E1 (présent)
Atrophie tubulaire / Fibrose Interstitielle	Pourcentage de la surface corticale atteinte : 0-25%	T0
	26-50%	T1
	> 50%	T2

Tableau 3. Classification d'Oxford. (32)

1.1.4. Prise en charge thérapeutique

Cette prise en charge dépend du niveau de risque à la prise en charge. Elle s'appuie sur des recommandations internationales faisant la synthèse des études disponibles par un groupe d'expert (Kidney Diseases : Improving Global Outcomes, KDIGO)(38).

Un niveau de risque est considéré comme faible si les anomalies urinaires sont minimales (microhématurie isolée, protéinurie inférieure à 0,5g/24h), qu'il n'y a pas d'HTA et que la fonction rénale est normale ($DFG > 60 \text{ mL/min/1,73m}^2$). Ces patients peuvent récupérer spontanément (environ 15% des cas dans une série chinoise) comme évoluer sur le long terme vers une macroprotéinurie (environ 30%). De simples consignes hygiénodététiques (par exemple : arrêt du tabac, correction d'une obésité) sont suffisants ainsi qu'une surveillance annuelle du fait du risque évolutif.

1.1.4.1. Support thérapeutique commun

La situation la plus typique est la présence d'une protéinurie supérieure à 0,5g/24h ± associée à une HTA et ± une insuffisance rénale chronique (IRC). Ces patients sont à risque d'évolution vers l'insuffisance rénale terminale et doivent faire l'objet d'une prise en charge plus importante. Celle-ci s'appuie en tout premier lieu sur des mesures non spécifiques. Ces mesures sont le contrôle de la pression artérielle avec l'objectif de 130/80 par des moyens non médicamenteux (régime limité en apports sodés à 6g/jour, activité physique, correction d'une obésité, arrêt d'une intoxication éthylique chronique) et médicamenteux. Ces derniers sont principalement le recours à un bloqueur du système rénine-angiotensine (inhibiteur de l'enzyme de conversion, IEC ou antagoniste des récepteurs de type 1 de l'angiotensine II, ARA2) de façon préférentielle, du fait de leur haut niveau de preuve concernant la réduction de la protéinurie et la réduction du risque d'évolution vers l'insuffisance rénale chronique terminale(39-41). Ils font l'objet d'une recommandation KDIGO de niveau élevé (1B) lorsque la protéinurie initiale est supérieure à 1g/24h et d'une suggestion lorsque la protéinurie est située entre 0,5 et 1g/24h (niveau 2D).

1.1.4.2. Corticothérapie

La corticothérapie est un mode de traitement ayant fait l'objet de plusieurs études contrôlées/randomisées et de méta-analyses(42-46). Ces études montrent un bénéfice majeur de la corticothérapie, permettant pour la plupart une réduction de la protéinurie, un ralentissement de la pente de décroissance du DFG et une diminution

du risque de doublement de la créatinine sérique. Cependant, ces études font l'objet d'une controverse marquée par le fait que la plupart d'entre elles n'accompagnaient pas la corticothérapie d'un contrôle tensionnel suffisant, et comprenaient une faible fraction de patients traités par IEC ou ARA2. Une étude chinoise comportait même une période d'éviction de ces traitements 1 mois avant l'inclusion(44). Les quelques études s'appuyant sur un contrôle optimal de la pression artérielle et une proportion élevée de patients traités par bloqueurs du système rénine-angiotensine semblent montrer un bénéfice en terme de réduction de la protéinurie mais sans amélioration de la fonction rénale sur une durée de suivi courte. Une méta-analyse évaluant le bénéfice de la corticothérapie retrouvait une réduction du risque de doublement de la créatinine sérique, mais l'essentiel de l'effet statistique était la résultante de 2 études principales, surreprésentées, au cours desquelles la proportion de patients sous IEC/ARA2 était limitée(47). Enfin les patients présentant un DFG inférieur à 50 mL/min/1,73m² étaient soit exclus soit en nombre limité.

Les recommandations KDIGO ne proposent la corticothérapie qu'à un niveau de suggestion (et non de recommandation) avec un grade limité (2C) pour les seuls patients présentant une protéinurie persistante >1g/j malgré 3-6 mois de traitement anti-hypertenseur et antiprotéinurique s'appuyant sur les IEC/ARA2 si le DFG est supérieur à 50 mL/min/1,73m².

Les schémas thérapeutiques de corticothérapie sont multiples. Le plus utilisé est probablement celui issu de l'étude de Pozzi et al., consistant en 3 périodes successives de 2 mois, chacune initiée par une perfusion intraveineuse quotidienne de 1 gramme de méthylprednisolone pendant 3 jours suivie d'une corticothérapie orale 1 jour sur 2 à 0,5mg/kg/j(42).

1.1.4.3. Traitements immunosuppresseurs

La première option est l'association du cyclophosphamide à la corticothérapie. Une seule étude contrôlée/randomisée a évalué l'intérêt de cette approche à partir de patients présentant une fonction rénale altérée définie par une créatinine sérique initiale entre 130 et 250 µmol/L, avec un DFG estimé (DFGe) déclinant de 15% l'année précédant l'inclusion(48). Le traitement associait une corticothérapie orale à 40 mg/j pendant 2 ans suivie de 10 mg à un traitement par cyclophosphamide par voie orale à 1,5 mg/kg/jour 3 mois suivi d'un traitement par azathioprine à la même dose

durant au moins 2 ans. Le groupe contrôle était un traitement par contrôle tensionnel seul. Cette étude montre une amélioration de la survie rénale à 2 ans et à 5 ans malgré un faible effectif (19 patients dans chaque groupe). Les critiques de cette étude sont principalement l'absence de corticothérapie dans le bras contrôle, le faible effectif, et le contrôle tensionnel insuffisant. Ces limites, ainsi que le caractère unique de cette étude, ne permettait pas d'ériger cette stratégie thérapeutique en recommandation KDIGO.

L'azathioprine n'est pas recommandée par les KDIGO. Seules quelques études contrôlées/randomisées font état de résultats divergents. Les seules études positives concernent des populations pédiatriques et associent un traitement anticoagulant(49). Elles montrent une proportion supérieure de patients en rémission de leur protéinurie avec azathioprine, corticothérapie et traitement anticoagulant comparée à la même stratégie sans azathioprine. Une étude ne comportait pas de bloqueurs du système rénine-angiotensine. Une étude plus récente portant sur une population adulte de 207 patients avec une créatinine sérique inférieure à 2mg/dL et une protéinurie supérieure à 1g/24h, comparant une stratégie « corticothérapie et azathioprine » à une stratégie « corticothérapie seule » ne retrouvait pas d'amélioration en terme de proportion de doublement de la créatinine sérique mais par contre une incidence d'effets secondaires plus importante dans le groupe azathioprine(50).

L'acide mycophénolique n'est pas recommandé non plus. 3 essais thérapeutiques contrôlés/randomisés appuient cette démarche. 2 études, l'une Belge, l'autre Nord-Américaine sont négatives contre placebo avec un traitement par bloqueurs du système rénine-angiotensine systématique dans les 2 groupes(51, 52). Aucune amélioration ni de la protéinurie ni de la fonction rénale n'était mis en évidence après respectivement 2 ans et 1 an de traitement. Une étude chinoise dont la méthodologie était comparable aux deux autres montrait cependant une baisse significative de la protéinurie et une stabilisation du DFG comparé au groupe contrôle(53).

1.1.4.4. Autres traitements

Le traitement par huiles de poissons a été également proposé au cours de la NIGa. Celui-ci s'appuie sur un bénéfice global, associant notamment une amélioration de la pression artérielle et du profil lipidique. Plusieurs essais contrôlés/randomisés ont été menés pour évaluer leur efficacité au cours de la NIGa. Certaines études montrent

une efficacité sur le risque d'évolution vers l'IRCt et le doublement de créatinine sérique dont une caractérisée par un groupe contrôle par huile d'olive(54). Une diminution de la protéinurie était notée au cours d'une autre étude(55). En face de ces études positives, 2 autres études sont demeurées négatives(56, 57), ainsi qu'une méta-analyse(58). Les KDIGO suggèrent toutefois leur usage au regard de leur innocuité et de leurs bénéfices cardio-vasculaires potentiels.

Les anti-agrégants plaquettaires ne sont pas recommandés malgré une méta-analyse concluant en leur faveur(59). Ceci tient au fait que cette étude incluait des essais très hétérogènes en terme de traitements immunosuppresseurs et corticoïdes associés.

Enfin, l'amygdalectomie a pu constituer une option thérapeutique. Aucun essai randomisé n'appuie l'usage de ce traitement et seules des séries rétrospectives sont disponibles pour l'évaluer. Ces séries comprennent souvent une proportion de patients traités par corticoïdes plus élevée parmi ceux traités par amygdalectomie, représentant un biais important(60-62). Ce traitement n'est pas, en l'état, recommandé par les KDIGO.

1.1.4.5. Situations cliniques particulières

Certaines situations plus rares peuvent relever d'un traitement immunosuppresseur. La première situation est une forme rapidement progressive de NIGa caractérisée par une baisse rapide du DFG associée histologiquement à une forme proliférative extracapillaire, définie par l'existence de croissants concernant plus de 50% des glomérules. Ces formes sont associées à une évolution vers l'insuffisance rénale terminale dans 75% des cas à 10 ans(63). Aucun essai randomisé évaluant l'efficacité d'un traitement immunosuppresseur n'est publié à ce jour, mais la sévérité du pronostic rend possible un traitement comparable à celui des vascularites à ANCA, associant corticothérapie et cyclophosphamide(64-66). Cette stratégie fait l'objet d'une recommandation KDIGO.

Une autre situation particulière est celle du syndrome néphrotique s'associant histologiquement à des dépôts d'IgA mésangiaux et l'absence de lésions histologiques par ailleurs. Cette forme est très semblable à la glomérulonéphrite à lésions minimales et doit faire l'objet d'un traitement comparable à celle-ci (corticothérapie orale à fortes doses dégressives en première intention)(67).

1.1.5. Récidive en transplantation rénale

La NIgA est une glomérulonéphrite qui récidive fréquemment sur le transplant rénal(68). Ceci est lié au fait que les complexes immuns circulants à IgA1 polymériques persistent dans le plasma du receveur et peuvent entraîner des dépôts glomérulaires mésangiaux responsables de lésions inflammatoires au sein du greffon. Cette récidive est temps-dépendante et est très variable entre les séries, allant de 9 à 64% à 10 ans(69-74). La récidive se caractérise par l'apparition d'une protéinurie et d'une hématurie microscopique dans la majorité des cas et peut représenter une cause de perte de greffon pour 5 à 10% des patients greffés pour NIgA (69, 75).

Le traitement immunosuppresseur semble influencer le risque de récidive sur le transplant. Une première étude rétrospective montrait que l'incidence de la récidive était de 9% à 10 ans après une induction immunosuppressive par globulines anti-thymocytes, alors qu'elle était de 41% à 10 ans sans induction et de 41% à 5 ans après une induction anti-CD25(75). Une autre étude portant sur le registre Australien et Néo-Zélandais (ANZDATA) a mis en évidence que le maintien d'une corticothérapie à 1 an était associé à une diminution du risque de perte de greffon par récidive de la NIgA de façon indépendante de l'âge, du sexe, des incompatibilités HLA et de l'ancienneté en dialyse avant la transplantation (Hazard Ratio 0,5 ; p=0,009)(76).

1.2. Physiopathologie

1.2.1. Physiologie des IgA et de leur récepteurs

La compréhension de la NIgA a beaucoup progressé ces dernières années avec une physiopathologie en 4 « coups » (77) : (i) une première étape de production d'IgA1 anormales, (ii) une seconde de production d'un élément complexant les IgA1, (iii) entraînant la formation de complexes immuns circulants à IgA1 polymériques responsables d'un dépôt (iv) dans le mésangium et induction de lésions glomérulaires. Au cours de cette revue bibliographique sur la physiopathologie de la maladie, nous décrirons dans un premier temps les acteurs moléculaires et cellulaires impliqués pour dans un second temps exposer les visions physiopathologiques actuellement défendues.

1.2.1.1. Structure et fonction des IgA

Les IgA représentent le sous-type d'immunoglobulines dont la synthèse est la plus importante chez l'homme, avec une production de 66 mg par kilo de poids de corps contre 34 mg par kilo pour IgG et 7,9 pour les IgM. Elles existent sous la forme de deux isotypes, les IgA1 et les IgA2, ces dernières possédant trois allotypes.

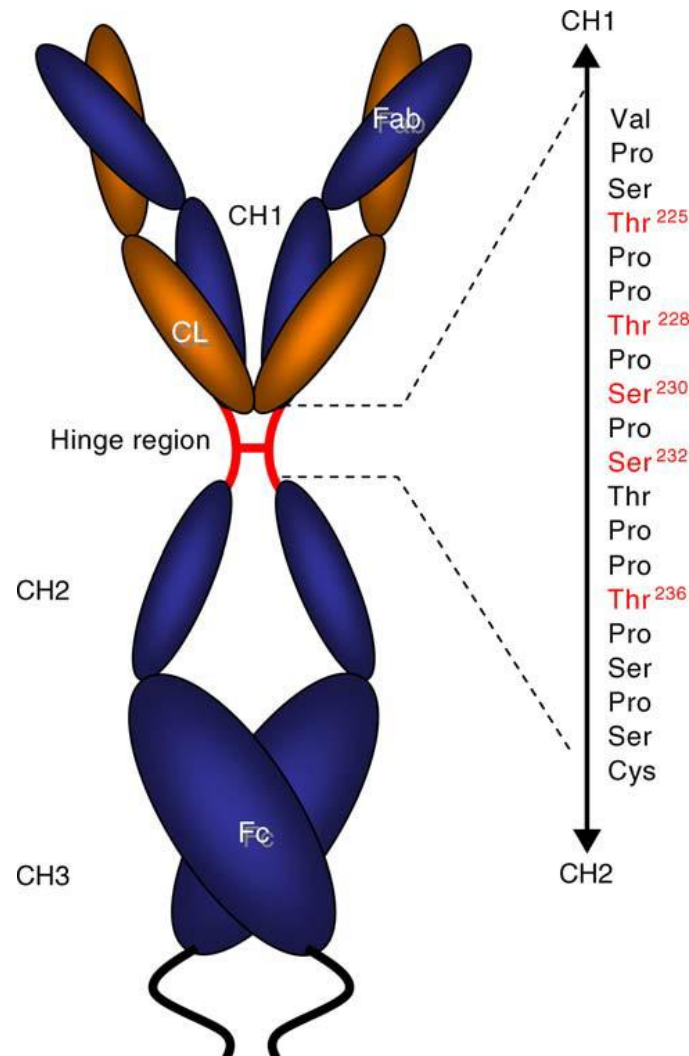


Figure 1. Structure d'une IgA1. Détail de la région charnière.(66)

La grande particularité des IgA1 est la présence d'une région charnière longue, composée de 18 acides aminés et siège de 5 à 6 résidus glucidiques O-glycosylés(78). Des travaux récents suggèrent que la région charnière est en fait plus longue comprenant 20 à 23 acides aminés(79). La O-glycosylation survient sur des résidus Sérine et Thréonine par l'intermédiaire d'enzymes qui transfèrent le premier élément (un résidu GalNac) de la chaîne glucidique : les GalNac transférases (UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases), suivie de

l'action de galactosyltransférases (la glycoprotéine- Nacetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransférase 1, core 1b3-Gal-T) ou T-synthase issue de l'expression du gène C1GALT qui ajoute un galactose(80, 81). Le motif obtenu est appelé antigène T et sert de précurseur à un grand nombre de protéines O-glycosylées à la surface des cellules ou destinées à être sécrétées chez les mammifères.

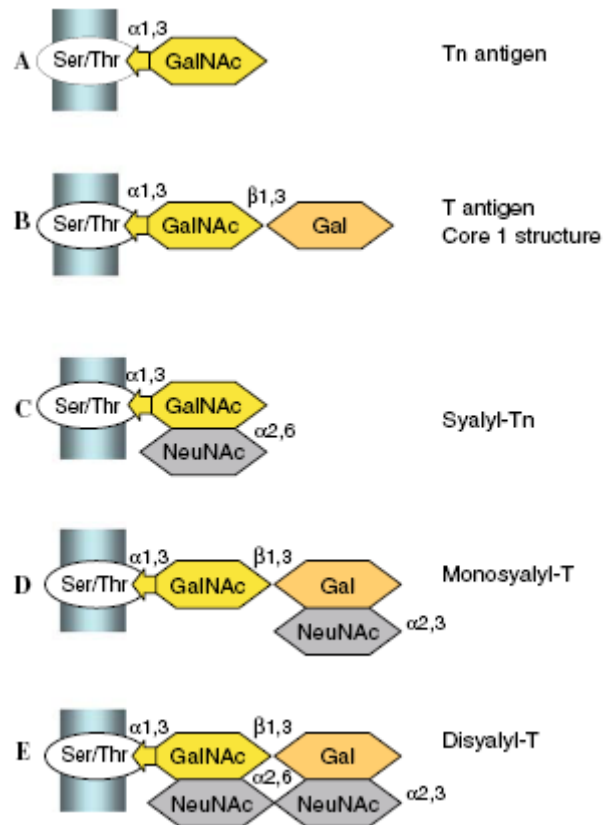


Figure 2. Profils de O-Glycosylation des résidus Ser ou Thr de la région charnière des IgA1.(66)

Cet antigène T est ensuite sujet à plusieurs types de sialylation comme indiqué dans la figure (sialyl-transférases). Le rôle de cette O-glycosylation semble être d'une part la résistance à différentes protéases d'origine bactérienne et d'autre part le maintien de la structure allongée de l'immunoglobuline en rigidifiant la région charnière. Une anomalie de O-glycosylation peut donc altérer les propriétés physico-chimiques de l'IgA1(82).

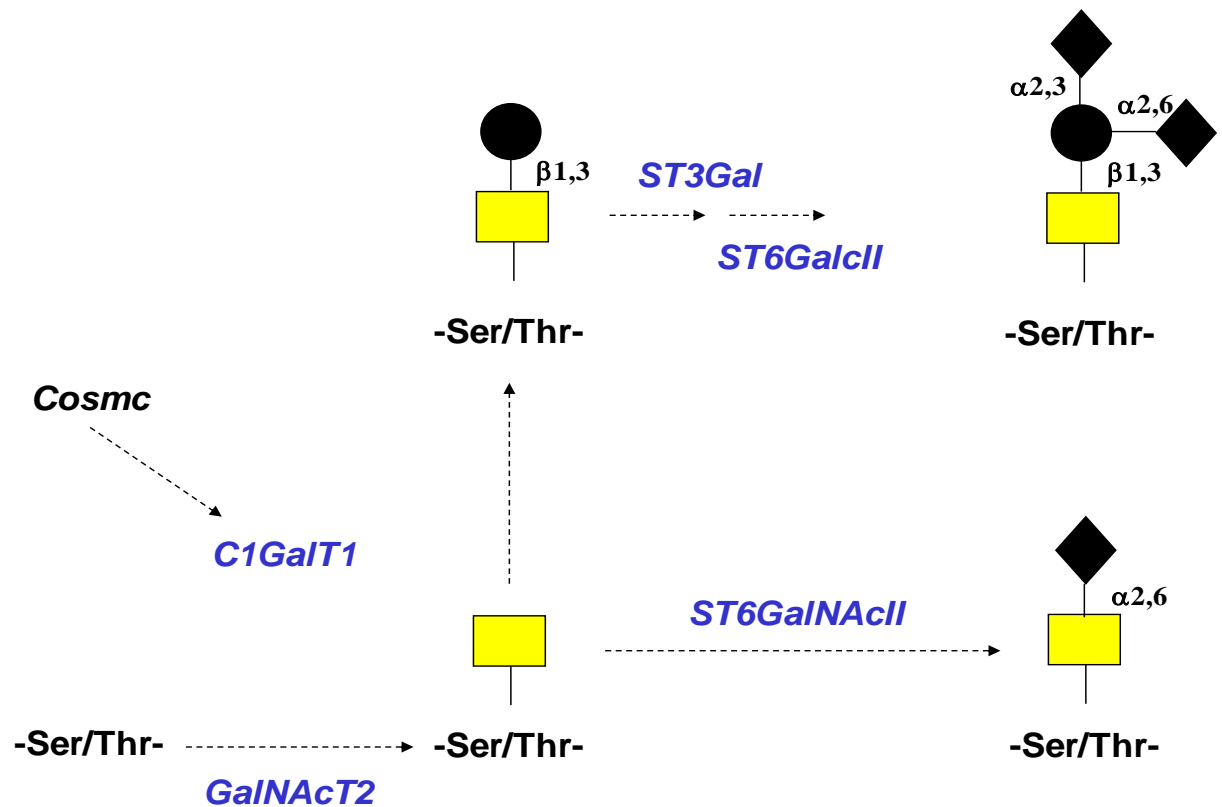


Figure 3. Enzymes impliquées dans l'allongement de la chaîne de O-glycosylation des IgA1

D'autre part, il existe une N-glycosylation au sein du reste de la chaîne lourde α (deux résidus pour la chaîne $\alpha 1$, 4 et 4 ou 5 résidus pour les chaînes $\alpha 2$)(83). Celle-ci comprend des sucres différents (fucose, mannose, N-acétylgalactosamine, galactose), formant des complexes multiantennaires liés aux résidus Asparagine.

Les IgA circulantes sont essentiellement de type IgA1, monomériques et produites par les plasmocytes de la moelle osseuse, alors que les IgA présentes dans les sécrétions sont produites localement, avec une représentation relativement plus importante des IgA2 et sont polymériques(84). Ces dernières sont appelées IgA sécrétoires et sont alors essentiellement dimériques.

L'organisation en dimères est permise par la liaison de deux chaînes lourdes α à leur extrémité C-terminale par une chaîne J(85). l'extrémité C-terminale de la chaîne α des IgA sécrétoires est porteuse d'une séquence supplémentaire de 18 acides aminés comportant une cystéine et permettant la liaison à la chaîne J via des ponts disulfures(86).

D'autre part, les IgA sécrétoires sont caractérisées par la présence d'un composant sécrétoire, un polypeptide d'environ 80 kDa. Ce composant sécrétoire est lui-même un résidu du récepteur aux immunoglobulines polymériques (pIgR). En effet, chez l'homme, les IgA dimériques sont produites par des plasmocytes au sein du système lymphoïde associé aux muqueuses. Ces IgA sont ensuite captées par le pIgR présent sur le pôle basolatéral des cellules épithéliales, et vont subir une endocytose(84). La vésicule d'endocytose est ensuite l'objet d'une circulation intracellulaire (transcytose). L'ensemble IgA-pIgR est enfin exprimé au pôle apical de la cellule épithéliale, où le pIgR est clivé, libérant une IgA dimérique associée au composant sécrétoire.

Le rôle de ces IgA sécrétoires est essentiellement une barrière anti-infectieuse de la muqueuse par plusieurs mécanismes :

- par la liaison et l'inactivation des bactéries sur le versant externe de la muqueuse en inhibant notamment les capacités d'adhésion
- les IgA peuvent capter les bactéries sous l'épithélium et permettre leur clairance par le processus de transcytose.
- de la même manière, les particules virales peuvent être captées lors du passage trans-cellulaire et éliminées par exocytose sur le versant apical

Les deux principaux modes d'action des IgA sont donc le recouvrement et l'inactivation des micro-organismes et la liaison à des récepteurs spécifiques. Les IgA ne peuvent pas activer la voie classique du complément alors qu'elles peuvent l'activer par la voie alterne et la voie des lectines(87).

1.2.1.2. Les récepteurs des IgA

Plusieurs récepteurs aux IgA ont été décrits. Les principaux sont le Fc α RI ou CD89, le pIgR et le récepteur à la transferrine (TfR ou CD71).

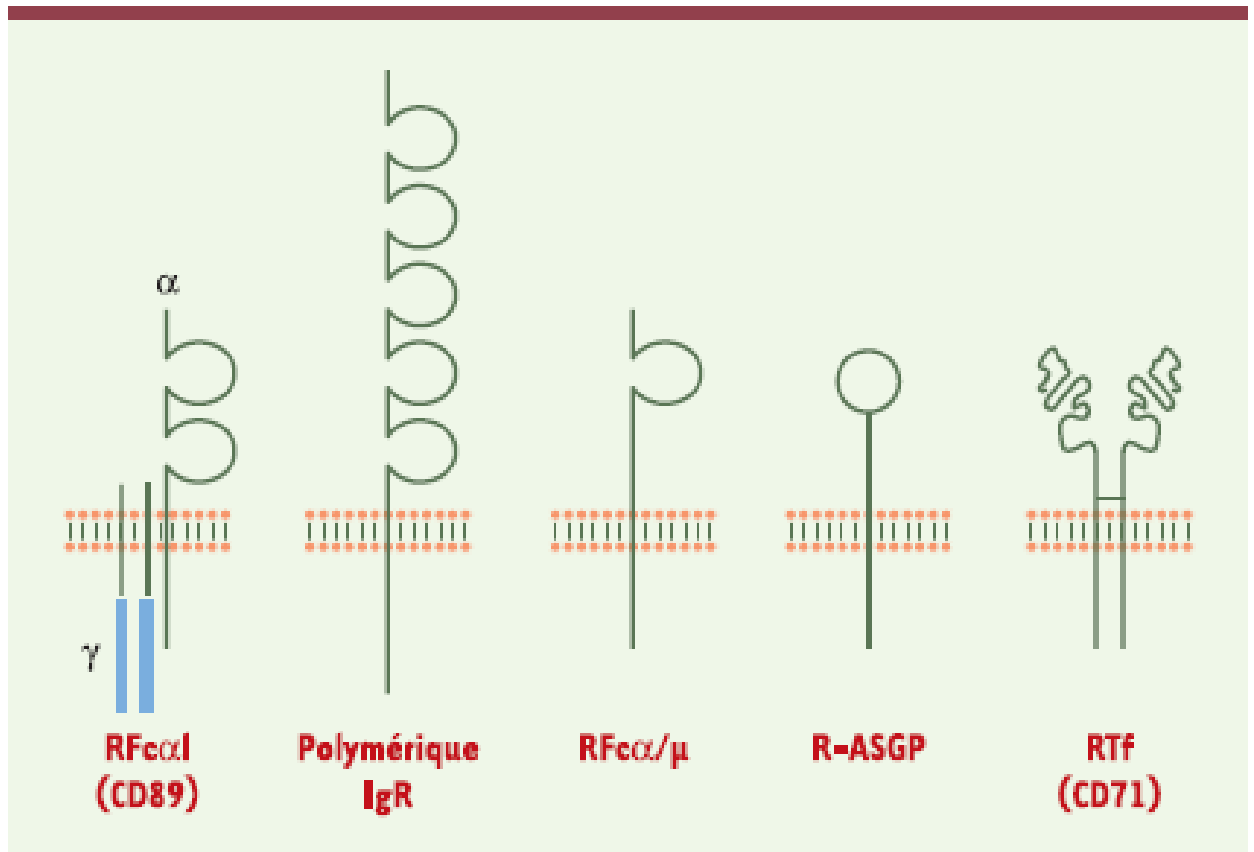


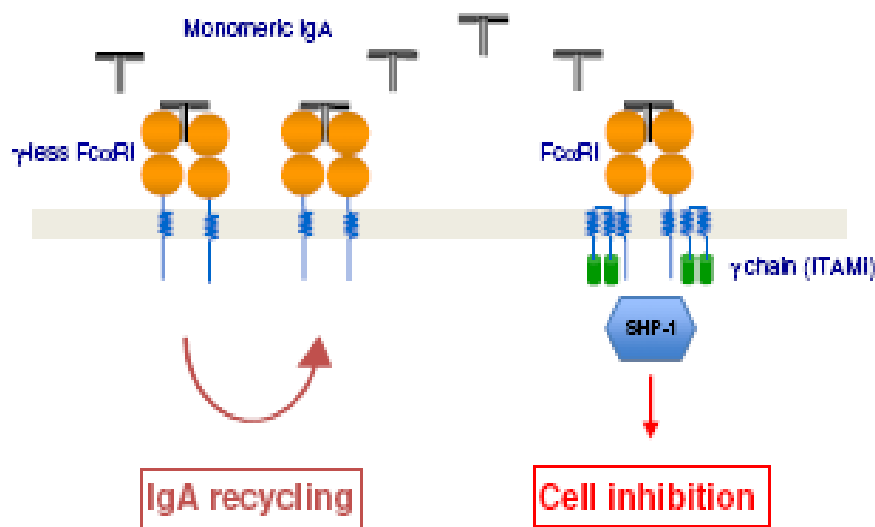
Figure 4. Récepteurs aux IgA, d'après Monteiro et al.

Le Fc α RI (CD89) est exprimé de manière constitutionnelle à la surface des polynucléaires neutrophiles, des éosinophiles, des monocytes, des macrophages, des cellules dendritiques interstitielles et les cellules de Kupffer. Même si sa structure est très semblable aux autres récepteurs de fragments Fc (Fc γ R, Fc ϵ RI), le gène est localisé sur le chromosome 19 alors que ceux des autres récepteurs sont situés sur le chromosome 1. Il est à noter que ce récepteur n'est pas exprimé chez la souris, alors qu'il l'est notamment chez le rat, les chevaux et les primates(88).

Ce récepteur est caractérisé par la présence d'une chaîne α permettant la reconnaissance du ligand, et de deux chaînes γ , communes aux autres récepteurs de fragments Fc, permettant la transduction du signal. La chaîne α comprend deux domaines immunoglobuline-like, une région transmembranaire et une courte portion intracytoplasmique. La chaîne α reconnaît les domaines C α 2 et C α 3 du fragment Fc de l'IgA. La chaîne γ possède un motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). La liaison au fragment Fc des IgA entraîne une dimérisation des chaînes α du récepteur, permettant la phosphorylation des résidus Tyrosine au sein des motifs ITAM, point de départ de la cascade de signalisation intracellulaire. La

liaison ligand-récepteur est responsable d'une relocalisation de plusieurs récepteurs au sein de micro-domaines de la membrane plasmique.

La réponse cellulaire suite à la liaison IgA-CD89 dépendra du type d'IgA impliquée (monomérique ou polymérique/complexées) et de la liaison du récepteur à la chaîne γ . Les IgA monomériques entraînent soit une réponse anti-inflammatoire médiée par la portion ITAMi de la chaîne γ , soit sont internalisées permettant d'accroître leur demi-vie en l'absence de chaîne γ associée. Par contre les IgA polymériques systémiques et surtout les IgA complexées entraînent un regroupement membranaire des molécules de CD89 engendrant dans cette configuration un signal intracellulaire pro-inflammatoire. Cette interaction pourrait également s'accompagner d'un clivage de la portion extracellulaire du récepteur (cf. infra).



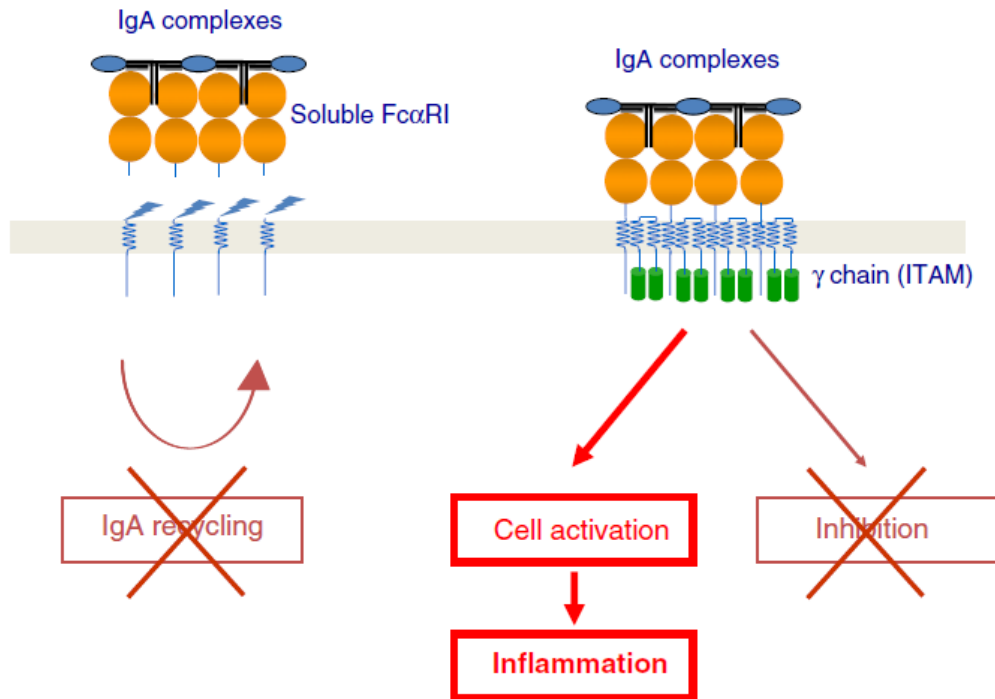


Figure 5. Rôles du CD89 en fonction du caractère monomérique vs. Polymérique des IgA le liant et en fonction de la présence d'une chaîne γ . (88)

Le pIgR est synthétisé par les épithélia muqueux et glandulaires et comprend un segment extracellulaire de 589 acides aminés, un domaine transmembranaire de 23 acides aminés et un segment intracytoplasmique de 103 acides aminés. Ce récepteur est capable de se lier aux IgA et aux IgM polymériques. La liaison aux IgA polymériques se fait à la fois de façon non covalente au domaine C α 3 une autre part de façon covalente par un pont disulfure entre le domaine 5 du pIgR et le domaine C α 2 de l'IgA. Cette zone de liaison est en partie commune au pIgR et au Fc α RI(82).

Comme décrit ci-dessus, le pIgR capte les IgA polymériques sur le pôle basolatéral de la cellule épithéliale et permet leur transfert vers le secteur extra-muqueux par transcytose. Après clivage du pIgR, un fragment de la portion extracellulaire du récepteur reste lié à l'IgA dimérique et constitue le composant sécrétoire.

Le TfR ou CD 71, décrit initialement comme récepteur à la transferrine, est capable de lier les IgA1 polymériques. Il est à noter que ce récepteur est présent sur les cellules mésangiales et son expression est stimulée par les IgA polymériques(89). La reconnaissance des IgA1 par le CD71 est très probablement dépendante de la région charnière et de son niveau de glycosylation (90).

1.2.2. Pathogénie séquentielle

1.2.2.1. Anomalies des IgA au cours de la Néphropathie à IgA primitive

La première anomalie est l'augmentation du taux d'IgA sériques, présente chez environ 40 % des patients(21, 22), soit une proportion supérieure à celle de la population générale. Cette anomalie n'est pas constante et n'est donc pas indispensable à la genèse de la pathologie, mais témoigne d'une probable dérégulation de la production des IgA au cours de la NIgA. D'autre part, la proportion d'IgA sériques polymériques, normalement inférieure à 10 %, est augmentée au cours de cette maladie.

L'anomalie structurelle la plus remarquable concerne la glycosylation des IgA1. Comme décrit ci-dessus, les IgA1 présentent deux types de glycosylation, une N-glycosylation portée par les résidus Asn en position 263 sur le domaine C α 2 et en position 459 sur le domaine C α 3, et une O-glycosylation portée par les résidus Ser et Thr de la région charnière.

Au cours de la NIgA, la O-glycosylation est plus fréquemment anormale à la fois des IgA1 sériques (91, 92) et également de celles éluées des glomérules de patients présentant la maladie(93, 94). Cette anomalie consiste en un déficit de galactosylation des ramifications O-glycosylées. Ceci a pour conséquence une exposition du motif GalNac tel quel (antigène Tn) ou au résidu GalNac directement sialylé.

Le mécanisme de production de ces IgA1 galactose-déficientes (IgA1-dg) n'est pas élucidé et plusieurs hypothèses ont pu être discutées.

La première hypothèse serait une anomalie de l'activité de C1GALT1 des plasmocytes producteurs d'IgA1. En effet, une diminution de l'activité de cette enzyme serait à l'origine d'un défaut de galactosylation des résidus GalNac. Le gène de cette transférase présente plusieurs polymorphismes mononucléotidiques (SNP) dont certains sont associés à une susceptibilité modifiée vis-à-vis de la NIgA. Dans une étude Chinoise portant sur 1164 individus dont 670 patients atteints de la maladie, 5 SNP étaient étudiés mais seul l'un d'entre eux, en position -292, était associé à une protection vis-à-vis de la NIgA(95). Dans une étude italienne plus récente portant sur 494 individus dont 284 patients, l'allèle 1365G était plus fréquent chez les patients atteints de NIgA(96). Cependant, la force d'association entre ces polymorphismes et la NIgA est faible et ne doit être intégrée que dans un modèle de

susceptibilité polygénique à cette maladie. De plus, aucune étude fonctionnelle concernant l'activité de l'enzyme en présence ou non des allèles d'intérêt n'a pu confirmer ces résultats. D'autre part, l'étude du gène de la protéine chaperonne Cosmc dont l'activité est associée à celle de C1GALT1 n'a pas permis d'identifier un polymorphisme d'intérêt (97). La mutation de la protéine Cosmc entraîne une dégalactosylation des protéines exprimées par les éléments figurés du sang (syndrome Tn), mais n'entraîne pas d'anomalie néphrologique(98). Par contre un modèle de souris déficiente en C1GALT1 présente en sus des anomalies hématologiques une protéinurie en fait expliquée par la dégalactosylation de la podocalyxine, protéine exprimée par les podocytes(99). Ceci montre que l'altération seule de la capacité de galactosylation des IgA ne suffit pas à induire la maladie. Plus récemment, il a été montré que la diminution d'expression de C1GALT1 pouvait être sous l'influence d'un micro-ARN, le miR-148b(100). Une autre hypothèse serait une sialylation excessive et précoce des résidus GalNac, empêchant la galactosylation(101). Il a été effectivement montré l'augmentation de l'activité de ST6GalNacII (permettant la sialylation de GalNac) au sein des lymphocytes B chez les patients présentant la maladie(102)ST6GalNacII, une sialyl-transférase, pourrait également avoir un rôle dans la production de formes galactose-déficientes. Son hyperexpression observée au sein les lignées EBV immortalisées de lymphocytes B sécréteurs d'IgA1 issus de patients pourrait entraîner une cinétique de sialylation plus rapide, dépassant les capacités de galactosylation (103).

La deuxième hypothèse est celle d'une dérégulation de la production d'IgA. En effet, la dégalactosylation ne porte pas sur l'IgD présentée par le lymphocyte B avant la commutation isotypique, suggérant que l'anomalie à l'origine de la déficience en galactose n'est pas constitutionnelle. Il pourrait s'agir d'une production excessive d'IgA1, dépassant les capacités de galactosylation. Le taux élevé d'IgA sériques, le grand nombre de leurs cibles antigéniques, qu'elles soient d'origine muqueuse ou systémique et leur faible affinité vis-à-vis de ces antigènes plaident dans ce sens.

D'autre part, une étude a évalué la réponse anticorps IgA1 différentielle après exposition à un antigène systémique (anatoxine tétanique, TT) et un antigène muqueux (*Helicobacter pylori*, HP)(104, 105). L'ensemble des sujets sains et des patients atteints de la NIgA avaient une réponse systémique IgA1-dg (détectés par liaison à la lectine *Vicia Villosa*) plus importante contre l'antigène muqueux par

rapport à l'antigène systémique. Ceci suggère qu'au cours de la NIGa, la réponse aux antigènes d'origine muqueuse est anormale, à l'origine de la production d'IgA1 polymériques vers le secteur systémique de faible affinité et en quantité excessive.

Cependant, il a été montré qu'en isolant et en immortalisant des cellules B du sang périphérique de patients atteints de NIGa, celles-ci sécrétaient des IgA1 essentiellement de type polymérique avec un déficit de galactosylation de la région charnière(102). Ceci suggère que l'origine de ces IgA1 anormales est médullaire, même si il a été montré que 15 % des patients avaient un marquage du composant sécrétoire au sein du mésangium cette fois-ci plus en faveur d'une origine muqueuse(106). L'hypothèse qui prévaut actuellement est celle d'une anomalie de compartimentation des lymphocytes B d'origine muqueuse dont la différenciation en plasmocytes se produit finalement de façon anormale dans le secteur médullaire.

Cette anomalie pourrait survenir sous l'influence d'un excès de certains facteurs de survie des lymphocytes B, BAFF et APRIL. Dans un modèle murin caractérisé par une hyperproduction de BAFF, une néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA survenait spontanément (107). Celle-ci était dépendante de la colonisation bactérienne du tube digestif. L'atteinte rénale était supprimée par un régime stérile et réapparaissait après la reprise d'un régime normal. Dans ce modèle, l'hyperproduction d'IgA dans le secteur systémique présentait des spécificités antigéniques bactériennes des colonies digestives. De plus il a été montré que les taux circulants de BAFF et d'un médiateur semblable, APRIL, étaient plus élevés chez les patients comparés aux volontaires sains. Cette anomalie de compartimentation des lymphocytes B d'origine muqueuse pourrait donc être sous l'influence de ces facteurs.

1.2.2.2. Formation des complexes immuns circulants à IgA1 polymériques

Au cours de la NIGa, on assiste à la formation de complexes immuns circulants comprenant en majeure partie les IgA1-dg polymériques telles qu'elles viennent d'être décrites. Le mécanisme de formation de ces complexes immuns circulants reste débattu et plusieurs mécanismes sont proposés. Nous allons examiner les différentes théories visant à expliquer le mécanisme de formation de ces complexes immuns.

1.2.2.2.1. Auto-agrégation des IgA1 anormales

Il a été montré que les IgA1 au cours de la NlgA avaient une capacité d'auto-agrégation par des tests de liaison en phase solide(108). Cette auto-agrégation pouvait être inhibée par différents éléments compétitifs à savoir les IgA1, un peptide issu de la région charnière des IgA1, des éléments GalNac et galactose alors qu'il n'y avait pas d'inhibition par les IgG, les IgA2 et l'acide sialique. Ceci suggère que cette auto-agrégation se produit au niveau de la région charnière des IgA1 exposant des résidus GalNac ou Galactose compatible avec la glycosylation anormale observée dans cette maladie.

La même équipe a pu mettre en évidence l'apparition d'une capacité d'auto-agrégation après digestion des chaînes O-glycosylés d'IgA1 normales(109). Les enzymes employées étaient une neuraminidase (désialylation), une galactosidase (dégalactosylation) et une N-acétylgalactosaminidase (digestion des résidus GalNac). Il apparaît donc que la sialylation terminale protège de l'auto-agrégation des IgA1. De plus, ces formes galactose-déficientes présentent une affinité supérieure aux éléments de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine, le collagène IV et la laminine pouvant expliquer l'agrégation de ces complexes immuns dans le mesangium glomérulaire.

Plus récemment, Yan et coll. ont montré par une technique d'auto-agrégation à partir d'IgA1 désialylés et dégalactosylés fixés sur une colonne de chromatographie, qu'une plus grande quantité d'IgA1 était éluée à partir du sérum des patients atteints de NlgA par rapport aux sujets sains et qu'une plus grande quantité encore d'IgA1 était éluées à partir du sérum de patients présentant des formes plus sévères (formes proliférantes et sclérosantes)(110). De même, ces formes sévères étaient associées à une exposition plus importante des résidus GalNac, suggérant que l'importance de la dégalactosylation pouvait rendre compte d'une expression plus sévère de la maladie. Au cours de cette étude, la quantité d'IgG éluées était la même entre les groupes par cette méthode.

1.2.2.2.2. Rôle des récepteurs

1.2.2.2.2.1. Formation de complexes solubles

Les récepteurs aux IgA ont été incriminés dans la constitution des complexes immuns circulants et dans le dépôt de ces mêmes complexes dans le mésangium.

La première constatation a été la mise en évidence d'une diminution de l'expression membranaire du CD89 des monocytes et des polynucléaires circulants des patients présentant une NIGa(111). Cette diminution d'expression membranaire est associée à un niveau transcriptionnel du CD89 normal. La deuxième observation est celle de la mise en évidence de CD89 soluble au sein des complexes immuns circulants (précipitation par le PEG) chez les patients NIGa.

Dans la même étude, les auteurs décrivent une souris transgénique pour le CD89 humain. En effet, la souris ne possède naturellement pas de récepteur équivalent au Fc α RI humain. Le développement d'une souris transgénique dont le transgène FCAR est sous le contrôle d'un promoteur spécifique à la lignée monocyttaire reproduit de façon représentative les conditions d'interaction IgA-sCD89 observées chez l'homme. Ces souris développent spontanément une pathologie proche de la NIGa humaine avec des dépôts mésangiaux d'IgA, une infiltration macrophagique et l'apparition d'une protéinurie modérée et d'une hématurie. Dans ce modèle, il est également constaté une diminution de l'expression membranaire du CD89 avec un niveau de transcription normal, et la présence de CD89 soluble au sein de complexes immuns circulants dans le sérum. Seule la partie extracellulaire du CD89 est retrouvée au sein de ces complexes, suggérant un clivage de ce récepteur après l'interaction avec son ligand. De plus, cette NIGa peut être transmise à des souris saines par l'injection du sérum de ces souris transgéniques.

D'autre part, cette équipe a généré une souris SCID transgénique pour le CD89 humain. Cette souris SCID présente un immunodéficit humoral complet portant sur tous les sous-types d'immunoglobulines et notamment sur les IgA. Ces souris ne développent pas spontanément la maladie mais seulement après transfert du sérum des souris transgéniques de souche sauvage ou des IgA de patients atteints de NIGa. Le transfert des IgA de sujets sains n'induit par contre pas la maladie chez ces souris. Ainsi, dans ce modèle murin, l'induction de la maladie nécessite à la fois la présence d'IgA1 polymériques et la présence du CD89. Cependant, dans le modèle de souris transgéniques et de souche sauvage, la seule présence du CD89 induit des dépôts mésangiaux d'IgA, ce qui n'explique pas la physiopathologie chez l'homme, puisque le CD89 y est exprimé de manière constitutionnelle sans entraîner habituellement de lésion. De plus, dans ce modèle, les dépôts sont composés d'IgA2 uniquement, les

seules exprimées par les souris. L'hypothèse formulée par les auteurs est le fait que les IgA chez la souris sont spontanément essentiellement polymériques dans le sérum, ce qui n'est pas le cas chez l'homme.

Donc, d'après ces auteurs, la formation des complexes immuns circulants à IgA1 polymériques serait liée au détachement de la portion extracellulaire du CD89 (sCD89) exprimée par les monocytes et à la formation de complexes IgA1-sCD89 circulants.

1.2.2.2.2. Rôle des récepteurs dans la clairance des IgA

Le récepteur impliqué dans la clairance des IgA sériques et le récepteur aux asialoglycoprotéines (ASGPR).

L'ASGPR est responsable de la clairance hépatique des IgA, mais de façon plus importante sur les IgA2(112). La délétion de la région charnière des IgA1 toutefois augmente leur clairance par l'ASGPR, ce qui n'est pas le cas lors que l'on fait disparaître seulement la O-glycosylation. En fait, il apparaît que cette clairance des IgA est dépendante de la N-glycosylation dont on sait qu'elle est plus importante sur les IgA2 (4 résidus N-glycosylés contre 2 résidus sur les IgA1).

Cependant, il apparaît clairement que les formes dimériques et polymériques font l'objet d'une clairance hépatique médiée par l'ASGPR supérieure à celle des formes monomériques.

Cette voie n'explique pas la diminution de la clairance des IgA observée au cours de la NIgA et d'autres récepteurs pourraient être impliqués dans la reconnaissance de la O-glycosylation.

1.2.2.2.3. Rôle des récepteurs pour la constitution des dépôts mésangiaux

Les dépôts mésangiaux d'IgA sont semblables aux complexes immuns circulants au cours de cette maladie, c'est-à-dire composés essentiellement d'IgA1 polymériques présentant des anomalies de la O-glycosylation. Les récepteurs mésangiaux aux IgA pourraient être responsables du dépôt de ces complexes.

Jusqu'à présent, il n'a pas été retrouvé d'expression du Fc α RI (CD89) sur les cellules mésangiales et ce récepteur n'est donc probablement pas impliqué dans le mécanisme de ces dépôts.

Le principal candidat est le récepteur à la transferrine (CD71). En effet, celui-ci est exprimé sur la membrane des cellules mésangiales, et ne lie que les IgA polymériques(113). De plus, son expression mésangiale est augmentée au cours de la NIgA et corrèle avec la sévérité de la maladie. Cette hyperexpression est retrouvée dans plusieurs néphropathies glomérulaires médiées par les IgA (purpura rhumatoïde, néphropathie lupique).

L'obtention d'un modèle murin présumé plus proche de la situation humaine a été réalisé en développant une souris exprimant l'IgA1 humaine et le CD89 humain. Ces souris présentent un phénotype de NIgA sévère à partir de la 12^{ème} semaine de vie, associant protéinurie, hématurie et élévation de la créatinine sérique. De plus les lésions histologiques comprenaient des dépôts mésangiaux typiques d'IgA et de C3 associés à une prolifération mésangiale et une infiltration macrophagique(114).

Au moyen de ce modèle, il a été possible de démontrer l'interaction entre 3 acteurs potentiels générant les dépôts mésangiaux et la stimulation des cellules mésangiales. Les IgA1 et le sCD89 possèdent chacun une affinité pour le CD71, et a fortiori les complexes IgA1-sCD89. Le dépôt de sCD89 induit l'expression de transglutaminase 2 (Tg2) en plus de médiateurs pro-inflammatoires tels que IL6, TNF α et MIP2. La Tg2 à son tour stabilise en le liant le CD71 et un complexe sCD89-CD71-Tg2 est stabilisé à la surface des cellules, favorisant le dépôt d'IgA1 et stimulant la cellule mésangiale.

Un autre récepteur aux IgA a été décrit, le Fc α / μ R, liant également les IgM avec une affinité supérieure. Cependant, même si la transcription du gène de ce récepteur a été mise en évidence dans les cellules mésangiales, son expression membranaire n'a jamais été mise en évidence, notamment sur ces cellules en culture.

1.2.2.2.3. Anticorps anti-glycanes

Il est connu depuis de nombreuses années que les complexes immuns circulants des patients atteints de NIgA contiennent une certaine quantité d'IgG(115). Tomana et coll. avaient pu mettre en évidence des IgG et des IgA1 anti-GalNac dans le sérum de patients sains et à taux élevés dans le sérum des patients atteints de NIgA. Il s'agit donc d'anticorps naturels probablement produits suite à l'exposition muqueuse à des micro-organismes exprimant GalNac, à la manière des anticorps naturels des groupes

sanguins du système ABO. Au cours de ce travail, la spécificité anti GalNac était établie par la mise en évidence d'une liaison spécifique des IgG sériques contre les IgA1 désialylés et dégalactosylés par voie enzymatique, correspondant à l'exposition des résidus GalNac O-glycosylés. De plus la formation des complexes immuns était inhibée par ces IgA1 modifiées immobilisées et également par GalNac immobilisé. Les travaux de Suzuki ont récemment caractérisé de manière très complète la nature de cette interaction IgG-IgA1 dégalactosylés(116).

Il a d'abord étudié par immunoblot la liaison entre les IgG sériques et les IgA1 dégalactosylés. La quantité d'IgG anti IgA1 du sérum des patients atteints de NIgA était supérieure à celle des sujets sains. La réaction était inhibée par une lectine se liant spécifiquement aux résidus GalNac (HAA : *Helix Aspersa* agglutinin), témoignant de la spécificité de ces anticorps contre ces résidus. Dans le même sens, la regalactosylation des IgA1 inhibait également cette reconnaissance.

Les auteurs ont par la suite développé des clones de lymphocytes B à partir de sang périphérique de patients atteints de NIgA et de sujets sains après immortalisation par l'EBV. Les anticorps produits par les cellules du groupe NIgA étaient capables de reconnaître les IgA1 dégalactosylés et les résidus GalNac de façon plus importante que celles issues des sujets sains. De même, la capacité de formation de complexes immuns était supérieure.

L'amplification et le séquençage des ARNm codant pour les chaînes lourdes et légères des IgG par ces cellules a permis de caractériser une substitution d'acides aminés A/S dans la zone CDR3 de la région variable de la chaîne lourde quasi systématique parmi les clones développés à partir de patients atteints de NIgA.

Les auteurs ont ensuite généré une IgG recombinante (r1123) à partir de la séquence caractérisant les patients NIgA qui est capable de se lier aux IgA dégalactosylés. Enfin, par mutagenèse dirigée, le remplacement de l'acide aminé S par l'acide aminé A faisait disparaître les capacités de liaison aux résidus GalNac.

À partir de ces résultats, un test diagnostique a été développé (Dot-Blot) et dont le principe est une fixation d'IgA1 dégalactosylés, l'application du sérum des patients, et la révélation après lavage de la présence ou non d'anticorps réactifs au sein du serum par un système avidine/peroxydase. Les performances diagnostiques testées sur 60 patients révèlent une aire sous la courbe ROC à 0,96, une spécificité de 95 % et une sensibilité de 88 %.

Ces résultats mettent en lumière l'importance majeure de cette interaction IgG-IgA1-dg qui pourrait dans l'avenir permettre le diagnostic sérologique de la NIGa et devenir un point d'ancrage à de nouvelles perspectives thérapeutiques dans cette maladie.

L'anomalie la plus caractéristique au cours de la NIGa est la constitution de complexes immuns circulants qui vont présenter une capacité de dépôt au sein du mésangium. Cependant, seule une proportion de patients présentant ces dépôts mésangiaux d'IgA va évoluer vers l'insuffisance rénale chronique (autour de 30 à 40 %). Il y a donc une mise en jeu variable de processus inflammatoires au sein du parenchyme rénal.

1.2.2.3. Réponse inflammatoire glomérulaire aux dépôts mésangiaux d'IgA

Plusieurs mécanismes ont été incriminés dans la genèse des lésions glomérulaires induites par la présence de complexes immuns déposés dans le mésangium. Ils font intervenir plusieurs types cellulaires (cellules mésangiales, monocytes et macrophages, lymphocytes T) et plusieurs types moléculaires (complément, cytokines).

1.2.2.3.1. Activation du complément

Les dépôts mésangiaux d'IgA sont très souvent associés à des codépôts de C3 (90% de façon constante entre les séries), mais aussi de Properdine (75-100%) et de facteur H de façon plus variable (30-90%) en faveur d'une activation de la voie alterne du complément(23, 117, 118). D'autre part, il a été mis en évidence au cours d'études datant des années 1980 une augmentation de la présence de produits issus de la dégradation de C3 dans le plasma de patients présentant une NIGa, signant une activation accrue de C3 (en C3a et C3b) par l'existence de C3 convertases au cours de la maladie(119, 120). Le C3b est hautement instable in vivo, soit par liaison aux surfaces activantes (par exemple les parois bactériennes), soit par dégradation rapide par les régulateurs de la voie alterne (facteur I associé à un cofacteur pouvant être le facteur H), générant des produits de dégradation iC3b, C3dg, C3d qui sont eux inactifs et stables, finalement détectables dans le plasma. Ces données anciennes nécessitent toutefois d'être revisitées.

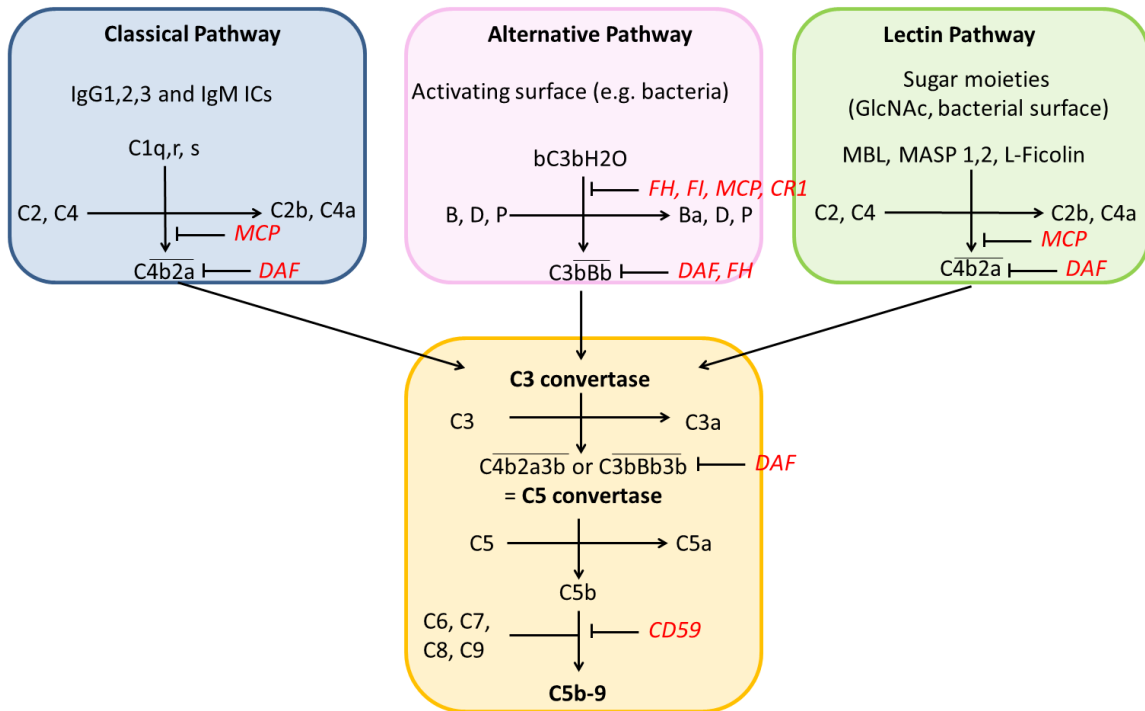


Figure 6. Voies d'activation du complément.

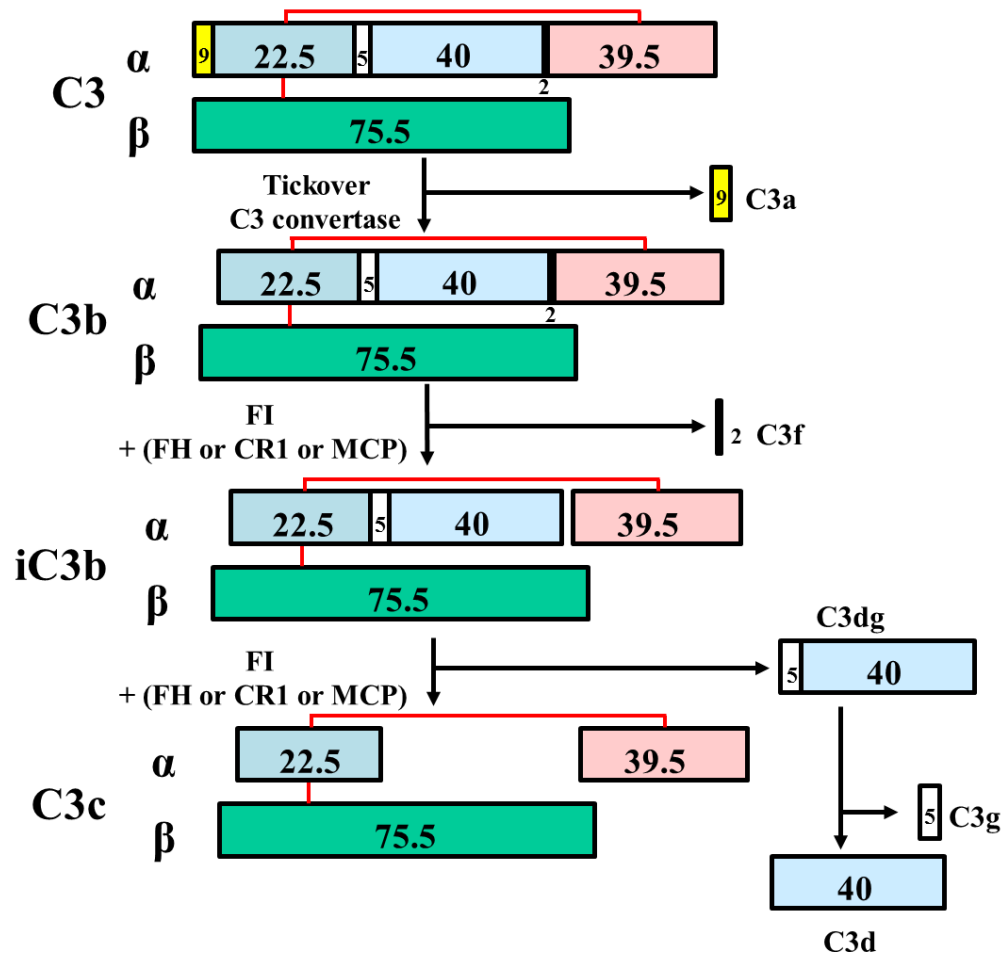


Figure 7. Protéolyse du C3.

Les IgA ont la capacité d'activer la voie alterne du complément *in vitro*. Hiemstra et al. ont pu mettre en évidence l'activation du C3 par le fragment F(ab)₂ immobilisé dans des conditions rendant exclusive l'activation de la voie alterne (MgEGTA)(121). Cette activation était identique par les IgA1 et les IgA2, mais le caractère polymérique des IgA était nécessaire dans cette étude. Le mécanisme moléculaire d'activation de la voie alterne par les IgA n'est pas connu.

La mise en évidence au cours de la GWAS de Gharavi et al. d'une protection vis-à-vis du risque d'occurrence de la NIGA par la délétion des gènes CFHR1/3 réactive l'intérêt pour le rôle de la voie alterne au cours de la maladie (122). Ces gènes sont situés au sein du cluster du gène du facteur H et s'inscrivent dans une succession de 5 gènes de régulation de la voie alterne, sont nommés Complement Factor H Related genes (CFHR) et numérotés de 1 à 5 (123). Ces gènes sont issus de duplications du gène du facteur H et présentent des homologies de séquence marquées avec celui-ci. Le gène du facteur H est structuré en 20 courts domaines (short consensus repeats, SCR) de séquences partiellement conservées. Les gènes CFHR ont une structure semblable plus courte, ne comportant que 4 SCR (CFHR2) à 9 SCR (CFHR4 et 5). CFHR1 circule exclusivement sous forme de dimères (homo ou hétérodimères) et cette dimérisation est médiée par leurs domaines N-terminaux(124). Ces protéines, structurellement proches du facteur H, partagent certaines capacités fonctionnelles de régulation de la voie alterne. Le premier élément commun est la préservation des SCR C-terminaux, responsables de la reconnaissance de C3b et des surfaces cellulaires eucaryotes via la liaison aux glycosaminoglycanes, aux acides sialiques ou aux héparane-sulfates(125). Cette liaison est essentielle à cette fonction de l'immunité innée distinguant les surfaces du soi, où la régulation de la voie alterne est essentielle à la prévention de l'activation du complément, des surfaces pathogènes. Alors que le facteur H présente des capacités de régulation complètes, associant l'accélération de la dissociation de la C3 convertase de la voie alterne (C3bBb) et l'activité cofacteur du facteur I, CFHR1 n'a pas ces capacités (126). En revanche, elle est capable de bloquer la formation de C5b-9 via la liaison de ses SCR1 et 2 à C5 et C5b6 (127). CFHR3 ne peut pas accélérer la dissociation de C3bBb, mais possède une faible activité cofacteur de I. En somme, ces protéines gardent une forte affinité pour C3b et les surfaces cellulaires, en compétition avec H, mais présentent des capacités de régulation très réduites en comparaison au facteur H. Ceci pourrait expliquer que la

protection vis-à-vis de la NIgA conférée par la délétion des gènes soit permise par une activité du facteur H augmentée en l'absence de compétition d'affinité pour le C3b. D'autre part, il a été montré que la délétion de CFHR1/3 s'associait à des concentrations plasmatiques de facteur H plus élevées(128). Cette délétion protège également de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), une autre maladie caractérisée par une activation du complément(129). Cependant, cette délétion a également été associée à certaines formes de syndrome hémolytique et urémique atypique (SHUa), ce qui va apparemment en sens opposé à une augmentation hypothétique de l'activité du facteur en présence de cette délétion. Ces formes de SHUa sont particulières puisqu'elles s'associent à la présence d'anticorps anti-facteur H. Ces anticorps jouent un rôle dans la survenue du SHUa puisqu'ils sont spécifiques de la partie C-terminale du facteur H, responsable de la reconnaissance des surfaces cellulaires(130). Les mutations de cette région du facteur H sont responsables de la survenue de SHUa, soulignant le rôle direct probable de ces anticorps dans la survenue de la maladie. CFHR1/3 comme décrit précédemment, conservent ces SCR C-terminaux et leur absence pourrait avoir un rôle direct dans l'apparition d'anticorps anti-H, suggérant donc un mécanisme totalement distinct, ne remettant pas en cause l'hypothèse mécanistique proposée au cours de la NIgA et de la DMLA. Par contre, cette délétion a été associée à un risque plus élevé de Lupus Erythémateux Disséminé(131).

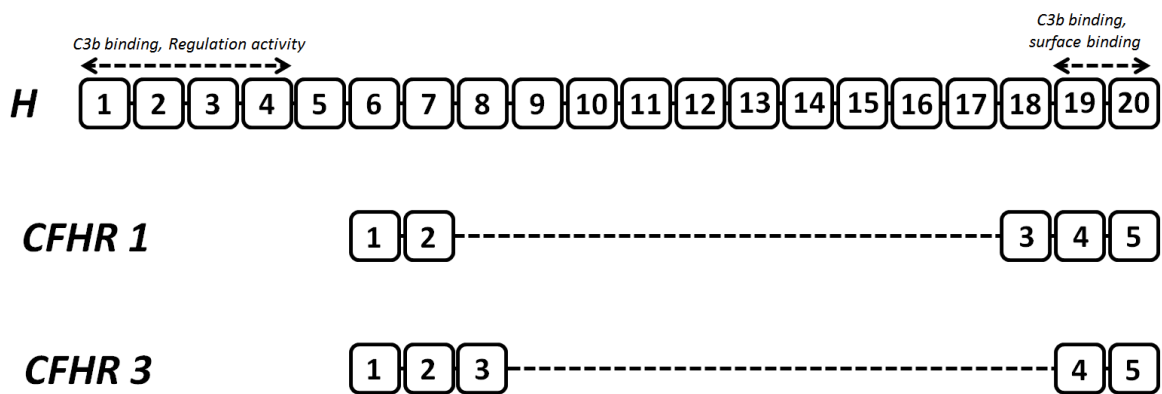


Figure 8. Structure du Facteur H, de CFHR1 et CFHR3, par correspondance des SCR par homologie de séquence.

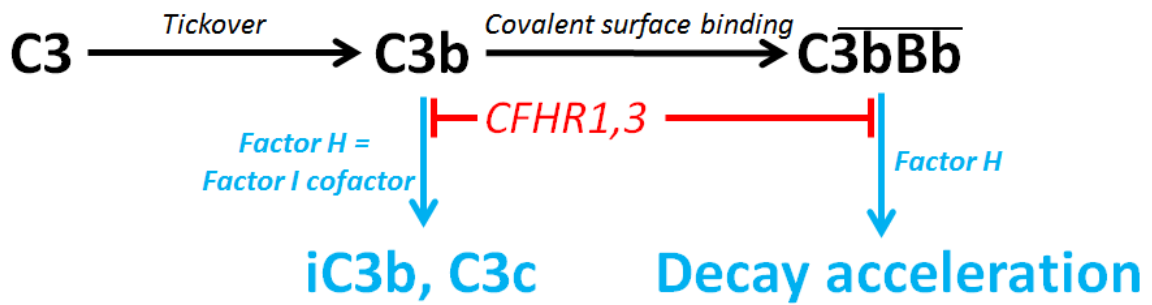


Figure 9. Hypothèse mécanistique sous-tendant le rôle protecteur de la délétion CFH1/3 vis-à-vis de la NIGa.

Une autre voie d'activation possible au cours de la NIGa est la voie des lectines. En effet, il a été montré que les IgA polymériques pouvaient lier la mannose binding lectin (MBL), activant la MBL associated serin protease (MASP). Plusieurs auteurs ont mis en évidence la présence de ces protéines au sein du mésangium dans environ 25 % des biopsies rénales de patients atteints de NIGa(132, 133).

Dans une étude récente, les auteurs ont mis en évidence un sous-groupe de patients présentant des dépôts de MBL, de ficoline, de MASP 1,2,3, de C5b-9, de C3, de C4d qui colocalisaient avec les dépôts d'IgA1(132). Ce sous-groupe de patients présentait une infiltration mésangiale plus importante et une forme clinique significativement plus sévère concernant le niveau d'insuffisance rénale chronique et de protéinurie. Un second élément concerne le dépôt de C4d glomérulaire inconstamment constaté (environ 25% des patients). Celui-ci est connu depuis les années 1980, interprété à l'époque comme un stigmate de l'activation de la voie classique, avant la mise en évidence de la voie des lectines. En réalité, les dépôts de C1q sont soit rares soit inexistants (0-10%) et leur présence n'est constatée que au cours de formes très évoluées de NIGa, où des processus inflammatoires et cicatriciels sont moins spécifiques de la maladie(134). D'autre part, les IgA ne peuvent pas lier le C1q. La mise en jeu de la voie classique est donc hautement improbable au cours de la NIGa. Ces dépôts de C4d témoignent en réalité de l'activation de la voie des lectines, puisque seules les formes associant le comarquage de MBL et MASP existent. Une étude multicentrique Espagnole montre que le dépôt de C4d glomérulaire au cours de la NIGa est prédictif d'une survie rénale plus faible à 20 ans (C4d+ : 28% vs. C4d- :

85%)(135), confortant une étude asiatique préalable(136). L'activation de la voie des lectines pourrait donc représenter un marqueur pronostique dans cette pathologie. Enfin, l'activation du complément au cours de la maladie génère la formation de C5b-9, résultant de la liaison de C5 successivement à C6, C7, C8 et C9. Ces complexes se forment typiquement au sein de la bicouche lipidique des membranes cellulaires, entraînant la formation de pores dont la quantité peut entraîner la lyse cellulaire. Cette conséquence classique est en fait rare et la présence de ces complexes est plus fréquemment impliquée à des doses « sublytiques ». La génération de C5b-9 en quantités sublytiques entraîne un stress cellulaire bien démontré au cours des modèles de glomérulonéphrite extramembraneuse(137). Tout d'abord, la membrane plasmique altérée est rapidement réparée et des vésicules comportant les complexes C5b-9 au sein de leur structure lipidique sont expulsés dans la chambre urinaire et peuvent être détectés dans les urines. Les podocytes soumis à ces complexes augmentent leur expression de protéases (98kDa gélatinase) responsables de l'altération de la structure de la membrane basale glomérulaire, induisent la formation d'espèces réactives de l'oxygène, modifient la structure du cytosquelette, entraînant une désorganisation des diaphragmes de fente (garants de la perméabilité de la barrière de filtration glomérulaire) via CD2AP et la Néphrine, augmente la synthèse d'eicosanoïdes via l'augmentation de l'expression de la cyclo-oxygénase 2, augmente la synthèse de collagène IV et de laminine, participant à l'épaississement de la membrane basale glomérulaire, induit la synthèse de TGF β , impliqué dans les processus de fibrose, augmente la synthèse de PDGF-B et -C, puissants inducteurs de prolifération des cellules mésangiales et enfin entraîne l'apoptose des podocytes dont le capital est limité en l'absence de capacités de prolifération(138). De plus, il apparaît que C5b-9 à doses sublytiques entraîne des altérations des cellules mésangiales. Une équipe a montré dans un modèle de néphrite Thy-1 de rat l'effet stimulant des complexes C5b-9 sur la prolifération, l'apoptose et la synthèse d'IL6 et de TGF β par les cellules mésangiales *in vivo* et en culture(139). Or, la mise en évidence par immunomarquage de C5b-9 glomérulaire est fréquente chez les patients présentant une NIGa et il a été montré que ces complexes sont présents dans les urines et ce, de façon corrélée à l'activité de la maladie (protéinurie, concentration de créatinine sérique), et à la fibrose interstitielle(140).

1.2.2.3.2. Activation des cellules mésangiales

Les études de culture de cellules mésangiales ont pu montrer que ces cellules présentent une capacité de prolifération, de sécrétion cytokinique pro-inflammatoire (IL6, TNF α) en réponse à des agrégats d'IgG et IgA ou à des IgA polymériques(141). D'autres cytokines ont également pu être incriminées (MCP-1, IL8, IP10) sous l'influence de la transcription de NF- κ B(142).

Cette réponse implique des récepteurs aux fragments Fc, puisque le seul fragment Fab n'induit pas d'activation. Seulement, les principaux récepteurs aux IgA (pIgR, Fc α RI, ASGPR) ne sont pas exprimés par les cellules mésangiales. Le récepteur candidat actuellement privilégié est le récepteur à la transferrine (CD71). En effet, si celui-ci est faiblement présent au niveau des cellules mésangiales chez les sujets sains, son expression membranaire est très renforcée au niveau de ces mêmes cellules chez les patients atteints de maladie de Berger. Le CD71 colocalise chez ces patients avec les dépôts d'IgA et n'est exprimé dans les autres glomérulonéphrites que lorsque celles-ci comprennent des dépôts d'IgA. Cependant, l'intensité du marquage du CD71 n'était pas corrélée avec la sévérité biologique et clinique, même si elle s'associait à une prolifération mésangiale plus importante. De plus, une étude montre que le CD71 induit une activation de la voie MAPK/ERK, contrôlant la production de cytokines pro-inflammatoires après stimulation par des complexes de masse moléculaire élevée issus de serum de patients présentant une NIGa(143).

Il a récemment été montré l'existence d'un dialogue cytokinique entre les cellules mésangiales et les podocytes. La culture de podocytes en présence d'IgA n'induit pas de modification phénotypique de ces premières cellules. De plus, les podocytes n'expriment pas de récepteurs aux IgA (en dehors du CD71). Par contre, la co-culture de cellules mésangiales et de podocytes en présence d'IgA entraîne une production de TNF α par ces dernières cellules sous l'influence du TNF α produit par les cellules mésangiales par un système d'auto et de paracrinie(144). Pour renforcer cette boucle d'activation, il apparaît également une surexpression des récepteurs au TNF α par les podocytes. Les cellules épithéliales tubulaires présentent également ce même type de réponse.

1.2.2.3.3. Rôle de la polarisation des lymphocytes T

Les lymphocytes T CD4⁺ présentent une hétérogénéité fonctionnelle, caractérisée par plusieurs profils de sécrétion cytokinique(145). Les lymphocytes Th1 sécrètent majoritairement de l'IFN γ , du TNF α et de l'IL2, soutenant une réponse inflammatoire et permettant une immunité dirigée contre les pathogènes intracellulaires. La sous-population Th2 produit de façon prédominante IL4, IL5, IL13 et favorise la différenciation des lymphocytes B et la production d'anticorps, particulièrement efficace contre les pathogènes extracellulaires et notamment les parasites. L'IL4 empêche la différenciation en Th1 et l'IFN γ bloque celle des Th2, induisant une polarisation dominante des cellules T CD4⁺. Les cellules Th17 expriment l'IL17 et l'IL22 sous l'influence d'un promoteur ROR γ t induisant le recrutement de leucocytes effecteurs tels que les polynucléaires neutrophiles.

En marge de ces phénotypes pro-inflammatoires, une autre population de lymphocytes T CD4⁺ présente des propriétés suppressives, les cellules T régulatrices (Tregs). Ces cellules expriment un facteur transcriptionnel prototypique, FoxP3, permettant d'inhiber l'activation et la prolifération des lymphocytes effecteurs par expression de cytokines suppressives (IL10), en consommant l'IL2 et en exprimant la Galectin-1.

Il a été mis en évidence depuis les années 90, certaines particularités de la polarisation T au cours de la NIgA.

Dans une étude, il a été montré une polarisation Th2 plus prononcée des lymphocytes circulants de patients atteints de NIgA sans insuffisance rénale (expression moindre de IL2, IFN γ et expression plus importante de IL4, IL10 et IL13)(146). Par contre, les formes sévères de la maladie s'associent à une expression plus importante d'IFN γ par les cellules mononucléées du sang périphérique et à une expression parenchymateuse rénale plus importante d'IFN γ , de TNF α et l'IL1 α soit un profil Th1 prédominant(147).

Ceci a été étayé dans un modèle murin spontané de NIgA (souris ddY)(148). Les souris qui développent une forme active de la maladie présentent un profil d'expression cytokinique des cellules T spléniques de type Th1 (IFN γ), alors que la population des souris présentant une maladie quiescente (dépôts d'IgA sans protéinurie) étaient polarisées Th2. D'autre part, le phénotype « maladie active » était transférable à des souris de maladie « quiescente » par transplantation de moëlle osseuse, la situation inverse aboutissant à la diminution des signes d'activité de la maladie. Par contre le transfert adoptif de cellule T CD4⁺ de souris présentant la

maladie à des souris complètement indemnes ne permettait pas d'induire la maladie. Cette étude tend à montrer que chez la souris ddY, la polarisation T n'induisait pas à elle seule la maladie, mais déterminait l'activité inflammatoire glomérulaire en réponse aux dépôts d'IgA.

En plus de ces sous-populations classiques de lymphocytes T, d'autres sous-groupes ont été mis en évidence, parmi lesquels les lymphocytes T régulateurs (Tregs) et les lymphocytes Th17. Les Tregs exercent une activité régulatrice via la sécrétion de cytokines immunosuppressives (IL10, TGF β), et par la lyse de cellules effectrices par la production de granzyme A et perforine entre autres. Le phénotype Tregs est sous la dépendance d'un facteur de transcription, FoxP3(149).

Les cellules Th17 sont à l'inverse des cellules pro-inflammatoires. Elles se différencient sous l'influence de TGF β et d'IL6 (et/ou IL1 β , IL21) et produisent des cytokines pro-inflammatoires dont l'IL17, induisant notamment le recrutement et la stimulation des polynucléaires neutrophiles et les lymphocytes B(150, 151).

Il semble exister une balance Tregs/Th17 dont le déséquilibre peut favoriser les maladies auto-immunes. Le rôle de cette balance a été peu étudiée au cours de la NIgA et représente un mécanisme potentiel de la pathogénie de la maladie.

1.2.2.3.4. Infiltration macrophagique glomérulaire

Plusieurs données montrent que la NIgA s'associe à un infiltrat de cellules mononucléées dans le parenchyme rénal à la fois glomérulaire et tubulo-interstitiel(152). Les monocytes-macrophages sont impliqués dans la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et leur présence est sous la dépendance de facteurs chimiotactiques tels que MCP-1 et MIF. Un polymorphisme mono nucléotidique de MCP-1 (allèle A) est associé à une évolution plus sévère de la néphropathie à IgA dans la population Japonaise, alors que cette association n'a pu être mise en évidence au cours d'une étude Allemande(153, 154).

D'autre part, les monocytes présentent, comme décrit ci-dessus, une expression membranaire du CD89. Celui-ci pourrait être responsable de la reconnaissance des complexes immuns contenant des IgA1 polymériques par les monocytes, en induisant leur activation et la sécrétion de médiateurs pro inflammatoires.

1.2.2. Aspects génétiques de la Néphropathie à IgA

Historiquement, les arguments les plus forts en faveur du rôle de la génétique au cours de la NIgA étaient (i) l'observation de fratries HLA identiques conjointement atteintes (ii) la mise en évidence de quelques familles présentant plusieurs cas, et (iii) de grandes disparités géographiques et ethniques de fréquences de la maladie. Depuis ces observations, la connaissance du déterminisme génétique de cette maladie a progressé de façon majeure, rythmée par les avancées technologiques notamment par les capacités d'analyses multiplexées.

1.2.2.1. Néphropathies à IgA Familiales

Les premières publications décrivant des cas familiaux datent du milieu des années 1970. Deux types d'observations pouvaient être rapportées : des cas de NIgA au sein de fratries présentant des groupes HLA identiques(155, 156) et un cas chez 2 sœurs jumelles(157). Ces observations ont permis de suspecter très précocément le rôle du groupe HLA dans le déterminisme de la maladie.

Ces prémices de l'étude du déterminisme génétique au cours de la NIgA comprenaient également des observations d'antécédents néphrologiques familiaux associés à une proportion de cas issus de séries de NIgA. Ces antécédents se résument la plupart du temps à la présence de symptômes évoquant la NIgA (hématurie macroscopique, protéinurie) sans preuve histologique. Cette proportion variait de 3,8% à 21% (158).

Le deuxième type d'observations était la mise en évidence de familles comportant au moins 2 cas de NIgA prouvée histologiquement dans certaines régions du monde. Ces descriptions ont été faites en France, en Italie dans la région de Brescia(159) et aux Etats-Unis dans le Kentucky (160). Cette dernière description comportait 75 cas de NIgA histologiquement prouvées issues de l'Est ou du centre du Kentucky, parmi ces cas, 14 patients (18%) appartenaient à un arbre généalogique étendu issu d'un ancêtre commun. Cette région était assez isolée génétiquement avec l'existence occasionnelle de consanguinité. De façon comparable, la série italienne décrit 43 cas de glomérulonéphrites comprenant 25 cas prouvés par biopsie (dont 11 NIgA) tous issus de 3 petits villages de la Val Trompia dans la province de Brescia. Ces cas sont issus de 3 familles probablement interreliées. Ces familles ont fait l'objet d'une

consanguinité marquée, avec un isolement géographique net (région montagneuse) et sont très probablement liées entre elles. Ces 2 observations (américaines et italiennes) démontrent le rôle du déterminisme génétique avec une transmission compatible avec un type dominant à pénétrance faible ou polygénique. L'expression clinique de la maladie ainsi que sa progression n'est pas différente de celle des cas sporadiques. Il faut noter que dans ces séries familiales, une proportion significative d'apparentés ont des formes différentes de Glomérulonéphrite (GN) avec notamment des formes mésangioprolifératives sans Ig ou avec des dépôts d'IgM. A ce jour plus de 100 familles ont été décrites avec des contextes ethniques différents (notamment une généalogie étendue d'une famille aborigène d'Australie et une autre issue des indiens Zuni du Nouveau-Mexique).

1.2.2.2. Hérité des anomalies de glycosylation des IgA

Une des caractéristiques les mieux démontrées des patients atteints de NIGa est la quantité plus importante d'IgA1 présentant une région charnière anormalement O-Glycosylée. Ces formes d'IgA1 sont déficientes en Galactose (IgA1-dg) et un test basé sur l'affinité de ces motifs de glycosylation envers la lectine extraite de *Helix Aspersa* permet leur dosage dans le serum. Une première étude (161) a montré une augmentation de concentration de ces formes IgA1-dg dans le serum de 202 sujets asymptomatiques présentant chacun un lien familial direct avec un patient (84 patients au total) présentant une NIGa sporadique prouvée par biopsie. Les taux d'IgA1-dg étaient d'autant plus élevés chez les apparentés asymptomatiques que le taux du patient index était lui-même important. Les mêmes données ont été montrées dans cette étude à partir de cas familiaux américains (2 familles Kentucky et Alabama, 7 patients et 64 apparentés asymptomatiques)(162). Ces données confortent la proximité pathogénique entre NIGa sporadique et NIGa familiale. De la même manière Lin et coll. ont montré dans une population chinoise une augmentation de la proportion d'IgA1-dg dans le serum de sujets apparentés de premier degré à des patients atteints de NIGa (63 patients, 32 apparentés)(163). Les époux(ses) des patients avaient une proportion d'IgA1-dg comparable à une population contrôle, ceci étant en défaveur d'un rôle environnemental. Ces éléments montrent dans 2 contextes ethniques différents le caractère génétiquement déterminé des anomalies de glycosylation des IgA1 au cours de la NIGa.

1.2.2.3. Etudes génétiques moléculaires

Deux grands types d'études moléculaires peuvent être conduites, (i) les études de liaison génétique, réalisées à partir de familles de NIgA et (ii) les études d'association génétiques conduites dans le cadre de NIgA sporadiques.

1.2.2.3.1. Etudes de liaison génétique

La méthodologie de ces études consiste à génotyper des loci très polymorphiques et distribués tout au long du génome humain des membres de familles présentant plusieurs cas de NIgA. La transmission du caractère « NIgA » est établie par le moyen d'un arbre généalogique et une étude statistique est menée pour chaque locus afin de déterminer la liaison génétique de celui-ci à la maladie par l'étude de leur coségrégation (cotransmission) . Cette étude statistique va exprimer le résultat sous la forme d'un LOD score (Logarithm of Odds) propre à chaque locus, dont la valeur supérieure à 3 démontrera la liaison génétique significative entre la maladie et le locus. Une cartographie des loci avec leur LOD score est ensuite établie pour déduire la portion du génome liée à la transmission du caractère NIgA (région de loci présentant un $LOD > 3$). Le grand avantage de cette méthode est l'absence d'hypothèse physiopathologique entre chaque locus et la maladie, permettant une situation d'aveugle au cours de l'analyse. L'étude de Gharavi et al. (164) a mis en évidence à partir de l'analyse de 30 familles italiennes et américaines et au moyen du génotypage de 384 marqueurs polymorphiques (loci), une liaison génétique puissante (LOD maximal 5,7) de la région 6q22-23, appelée par les auteurs IGAN1. Cette analyse a été menée sous l'hypothèse d'une transmission dominante à pénétrance variable et celle d'une hétérogénéité génétique, c'est à dire considérant que seules certaines familles sont liées à cette région du génome (60% dans cette étude). Ce dernier point tend à montrer que cette région ne détermine pas toutes les formes familiales de la maladie. Un second locus à la limite de la significativité était décrit dans la région 3p23-24 (LOD 2,8). Une seconde étude italienne (165) portant sur 22 familles retrouvait une tendance en faveur d'une liaison de IGAN1 à la maladie (LOD score insuffisants à 0,42 et 1,05 mais analyse non paramétrique $p=0,01$). Cette 2^{ème} étude trouve deux autres loci dans les régions 4q26-31 (LOD 1,83, $p=0,0025$) et 17q12-22 (LOD 2,56, $p=0,0045$). La force de liaison dans cette étude était moins

marquées, et les conclusions statistiques étaient portées avec moins d'exigence que la première étude. Une dernière étude de liaison à l'échelle du génome a été menée sur une seule grande famille canadienne (166), retrouvant un autre locus lié à la NIgA, la région 2q36 (LOD 3,47). Cette région recouvre toutefois les gènes COL4A3 et COL4A4 dont les mutations sont responsables de syndrome des membranes basales minces et les formes autosomiques récessives de maladie d'Alport. Compte-tenu du caractère commun de l'hématurie microscopique à ces 3 maladies, il est possible que cette famille particulière ait une forme de NIgA associée aux membranes basales minces. Enfin, il faut noter qu'une étude japonaise (167) portant sur un modèle murin (souris ddY) de susceptibilité spontanée à la NIgA retrouve une liaison de la maladie avec un locus situé sur le chromosome 10, synténique avec la région 6q22-23 humaine (IGAN1).

Ces études tendent à montrer le rôle du locus IGAN1 dans le déterminisme des formes familiales de la maladie. Ce locus est le seul qui soit reproductible dans 2 études avec également un possible rôle dans une forme murine de NIgA familiale spontanée. Cependant, ce locus comprend une centaine de gènes et, à l'heure actuelle, aucun d'entre eux n'a pu être proposé comme participant à la physiopathologie de la maladie.

1.2.2.3.2. Etudes d'association génétique

Ces études portent sur les formes sporadiques de NIgA et peuvent être catégorisées en 2 types, les approches par gènes candidats et les approches à l'échelle du génome (Genome Wide Association Study). Un très grand nombre d'études d'association génétique par l'examen du rôle d'un ou plusieurs gènes candidats ont été menées depuis les années 1990. La méthodologie est typiquement l'étude d'une cohorte de cas de NIgA sporadiques comparée à celle de témoins théoriquement issus de la même zone géographique, avec le même contexte génétique de fond. Ces études comparent la fréquence d'un ou de plusieurs polymorphismes (le plus souvent mononucléotidiques) du gène candidat, choisi pour son rôle physiopathologique supposé, avec l'idée qu'une fréquence significativement différente d'un allèle entre les cohortes de cas et celle des témoins est en faveur d'un rôle causal (au moins partiel) du gène sur la maladie. Mais ces études, dans leur grande majorité, font l'objet de critiques méthodologiques importantes. Les principaux griefs contre ces

études sont le sous-dimensionnement des effectifs, le contexte géographique et ancestral du groupe contrôle différent du groupe de cas (ou du moins non vérifiable), la stratification occulte de la population des cas, l'absence de correction statistiques pour les analyses multiples et le biais de publication. Beaucoup de ces études n'ont pu être reproduites du fait de ces insuffisances méthodologiques d'une part, mais aussi probablement du fait du contexte ethnique différent entre études portant sur le même polymorphisme du même gène. Ces études ont porté sur le polymorphisme des gènes du système rénine-angiotensine, ceux des enzymes de glycosylation, des récepteurs aux immunoglobulines et des cytokines et de leurs récepteurs pour les principaux. Les principaux résultats portant sur le polymorphisme des gènes du système rénine-angiotensine portent sur la délétion du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Une méta-analyse de Yong et coll. (168), porte sur 20 études et rapporte un effet prédisposant de cette délétion sur le risque de NIgA dans la population asiatique, alors qu'elle ne modifie pas le risque dans les populations caucasiennes. Cependant, cette association n'est pas propre à la NIgA et a été décrite dans d'autres glomérulonéphrites et plus globalement au cours de la maladie rénale chronique.

Les polymorphismes des gènes codant les enzymes de glycosylation potentiellement responsables des anomalies de galactosylation des IgA1 concernent essentiellement C1GALT1 et Cosmc. 2 études (95, 96), une chinoise et une européenne, portant sur respectivement 670 et 284 patients atteints de NIgA (494 et 210 témoins) montrent l'association de divers polymorphismes de C1GALT1, une galactosyl-transférase, avec le risque de présenter la maladie. Un polymorphisme au sein du promoteur de ST6GALNAC2, une sialyl-transférase a également été décrit dans une seule étude chinoise de grand effectif(169) comme étant associé à la maladie.

Plusieurs récepteurs aux fragments Fc des IgG (170) ont été associés à la maladie. Les polymorphismes du gène du récepteur commun aux IgA, Fc α RI ou CD89, ont été étudiés de manière extensive et seuls Vuong et coll. (171) ont pu associer un polymorphisme particulier du CD89 avec la quantité de CD89 soluble dans le serum des patients.

Concernant les gènes cytokines, le résultat le plus convaincant concerne le polymorphisme du gène du récepteur à l'IL5 (IL5RA) et du gène TNFRSF6B, un récepteur soluble leurre de LIGHT(172). Cette étude portait sur l'analyse d'un grand nombre de polymorphismes sur 69 gènes candidats et la région IGAN1, à partir de

732 patients atteints de NIgA sporadique issus de 3 centres (Finlande, France, et Canada). Par ailleurs des polymorphismes concernant les gènes CCR5, TGFβ1 et MCP1 ont été associés à la progression de la NIgA.

Ces études peuvent donc permettre malgré les défauts précédemment cités, d'envisager des pistes physiopathologiques, en plus de représenter un biomarqueur potentiel.

1.2.2.4. Les études d'association à l'échelle du génome (Genome Wide Association Study, GWAS)

Celles-ci représentent un bond méthodologique datant de la fin des années 2000, ayant permis une avancée indiscutable dans la compréhension du déterminisme génétique des formes sporadiques de la maladie. Elles permettent d'explorer de nouvelles orientations pathogéniques à partir de données reproductibles et globalement plus sûres. Elles permettent enfin d'expliquer en bonne partie l'épidémiologie mondiale de la maladie.

Ces études sont réalisées à partir du génotypage d'un très grand nombre de polymorphisme mononucléotidiques (>1000) couvrant l'ensemble du génome par le moyen d'analyses multiplexes sur puces à ADN. Cette analyse est réalisée sur un grand nombre de patients et de témoins appariés sur l'origine géographique. La qualité de l'analyse biostatistique est ici essentielle, permettant de corriger les « effets centre », éviter les biais de stratification des populations et corriger les seuils de significativité en regard de l'analyse multiple. Elles permettent d'individualiser des gènes présentant des polymorphismes significativement associés à la maladie sans a priori, même si le grand nombre de cibles polymorphiques ne couvre pas complètement l'ensemble du génome.

La première étude (173) a porté sur une population du Royaume-Uni combinant des cas familiaux et des cas sporadiques (914 patients au total) contre une cohorte de donneurs de sang (4980 contrôles). Cette sélection était critiquable du fait de la combinaison des cas familiaux et des cas sporadiques ainsi que le groupe contrôle issu de donneurs potentiellement originaires de zones géographiques différentes des cas. Cette étude montre une forte association de la région des gènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) en région 6p, avec un grand nombre de polymorphismes associés à la maladie situés dans les gènes HLA-B, HLA-DRB,

HLA-DQA et DQB. Ceci confirme le rôle de certaines mutations limitées des gènes du CMH, sans pouvoir dégager la responsabilité claire de tel ou tel gène dans la prédisposition à la maladie.

Une seconde étude (122) multicentrique mondiale, (première étape exploratoire à partir de la cohorte chinoise, puis une étape de confirmation sur cohortes Européenne et Nord- Américaine) a permis, au moyen d'une méthodologie robuste, de confirmer le rôle de la région 6p21 dans la zone du CMH (comprenant plusieurs signaux) et d'identifier d'autres polymorphismes significatifs. Un deuxième locus, situé dans la région 1q31 au sein du cluster du gène du facteur H du complément, était fortement associé avec le risque de NlgA. Le polymorphisme associé était en déséquilibre de liaison avec la délétion des gènes CFHR1 et CFHR3, suggérant un rôle physiopathologique de la régulation de la voie alterne du complément au cours de la maladie. Enfin, une large région (22q12) comportant les gènes HORMAD2, MTMR3, LIF et OSM présente un polymorphisme significativement associé à la maladie. Cette étude est d'autant plus convaincante que les résultats ont été reproduits dans une seconde étape de validation à partir de nouvelles cohortes distinctes (5 cohortes Européennes, 2 Asiatiques et 1 Afro-Américaine). Un modèle prédictif de risque de NlgA sporadique à partir des génotypes des différents polymorphismes sélectionnés permet de reproduire l'épidémiologie mondiale de la NlgA et notamment les gradients de fréquence Nord-Sud et Est-Ouest(174). Ce modèle retrouve également les pics de fréquence de la région de Brescia en Italie, ce qui est finalement en faveur d'un mécanisme polygénique de ces formes familiales au sein de populations génétiquement isolées.

Enfin, ces études permettent d'estimer la part du déterminisme génétique dans la variabilité d'occurrence de la NlgA. Cette part de variation est de 4 à 5%, ce qui est très significatif tout en restant dans le cadre d'un déterminisme polygénique, dont les traits multiples sont parfois transmis en bloc dans des contextes d'isolats génétiques partiels, faisant apparaître des formes familiales.

2.PARTIE EXPERIMENTALE

2.1. Justification de la recherche et hypothèse de travail

La pathogénie à coups multiples de la NIGa dépend d'un grand nombre de médiateurs inflammatoires qu'ils soient moléculaires ou cellulaires. La génèse des complexes immuns néphritogéniques et l'induction d'une inflammation glomérulaire sont deux étapes critiques que ce travail vise à explorer.

Le rôle du récepteur de type I au fragment Fc des IgA (CD89) reste mystérieux au cours de la NIGa. Il ne semble pas intervenir dans la fixation des IgA au mésangium, celui-ci n'y étant pas exprimé. Deux rôles potentiels sont possibles. Le premier est sa capacité à être clivé par les IgA polymériques, sa fraction soluble étant alors un élément capable de complexer les IgA permettant la constitution de complexes moléculaires de grande taille, favorisant les dépôts glomérulaires. Le second rôle potentiel est le recrutement et l'activation de cellules inflammatoires dans le parenchyme rénal en présence d'IgA polymériques complexées et stabilisées. Les monocytes/macrophages expriment le CD89, et ce récepteur pourrait représenter alors un médiateur entre les dépôts mésangiaux et l'inflammation. Un environnement cytokinique compatible avec une activation de ces cellules prévaut au sein du parenchyme rénal au cours de la NIGa. Or, il a été montré qu'une mutation du gène de ce récepteur (FCAR) dans sa portion cytoplasmique modifiait *in vitro* les capacités d'activation des macrophages et des polynucléaires. Ce polymorphisme a été associé au lupus systémique au cours d'une étude. Au cours de ce travail, nous avons entrepris de rechercher un effet de ce polymorphisme sur le risque de survenue de la NIGa et son impact sur le pronostic de la maladie, afin d'évaluer le rôle pathogénique de l'activation de ce récepteur au cours de la maladie.

La deuxième approche concerne le rôle des lymphocytes T et de ses sous-populations sur l'orientation pro-inflammatoire de la maladie. Un déficit de la régulation immunitaire est constatée dans plusieurs maladies auto-immunes, avec une balance caractérisée par d'une part un excès d'orientation pro-inflammatoire médiée notamment par les lymphocytes Th17 et d'autre part une baisse de la quantité et des capacités fonctionnelles des Tregs. Alors qu'au cours de la NIGa, une réponse inflammatoire locale est responsable des lésions glomérulaires, nous avons réalisé une étude visant à rechercher un déséquilibre de la balance Tregs-Th17 chez des patients en comparaison à des volontaires sains.

Enfin, l'implication de la voie alterne du complément est très probable au cours de la maladie, du fait des dépôts mésangiaux de C3, de properdine, de facteur H associés au

C5b-9. La mise en cause récente au cours d'une GWAS du rôle protecteur de la délétion de CFHR1/3 vis-à-vis du risque de développer la NIGa ajoute un élément fort en faveur du rôle de la voie alterne et de sa régulation. Afin de tester l'hypothèse selon laquelle les complexes immuns au cours de la NIGa activent la voie alterne en phase soluble, nous avons étudié au cours de ce travail les capacités de liaison au C3 de complexes immuns artificiels formés d'IgA1-dg monoclonale associée à une IgG anti-glycane en présence de serum. Les formes moléculaires de C3 étaient précisées par immunoblot et spectrométrie de masse.

2.2. Matériel et méthodes

2.2.1. Exploration du rôle des monocytes/macrophages : étude du polymorphisme du CD89

2.2.1.1. Populations étudiées

L'étude génétique était réalisée à partir de deux cohortes.

Tous les patients présentant une NIGa prouvée par biopsie rénale diagnostiqués entre 1979 et 2009, majeurs au moment du diagnostic, affiliés au régime de sécurité sociale et pour lesquels un échantillon d'ADN exploitable était disponible ont été inclus dans l'analyse. Le critère diagnostique de maladie de Berger était immuno-histologique, correspondant à la présence de dépôt d'IgA dans le mesangium glomérulaire côté 1+ selon une échelle semi quantitative. Seuls les patients ayant fourni leur consentement exprès au moment du prélèvement ou au cours du suivi de la cohorte ont été inclus dans l'étude. Un courrier sera adressé à tous les patients de la cohorte pour les informer de la réalisation de cette étude et pour leur permettre d'exprimer leur refus. D'autre part, seuls les sujets caucasiens et les sujets suivis dans le centre de Saint-Étienne ont été retenus dans l'analyse. Cette première cohorte permettra l'analyse pour l'étude de susceptibilité génétique en comparaison avec les volontaires sains.

Pour l'étude d'association génétique, seule la sous-population des patients inclus de 1979 à 1999 a servi à l'analyse, permettant un recul moyen suffisant.

La cohorte de volontaires sains rassemble un ensemble d'individus matchés en âge et en sexe, ayant signé un consentement éclairé au moment du prélèvement. Les critères d'inclusion étaient l'absence de maladie chronique et l'affiliation au régime de sécurité sociale.

Cette collection biologique a été déclarée au ministère de la santé suite à l'arrêté ministériel de mars 2007 et constitue une cohorte exhaustive de patients consécutifs.

2.2.1.2. Extraction de l'ADN

Cette extraction a été réalisée à partir d'un culot de leucocytes obtenus à partir de sang total après traitement par une solution de lyse des globules rouges et centrifugation. Le culot leucocytaire est ensuite congelé à -20°.

Le culot était ensuite récupéré, homogénéisé dans la solution d'extraction (10 ml). Une digestion enzymatique était ensuite réalisée par l'ajout de 0,1 ml de solution de protéinase K à 10 mg/mL suivie d'une incubation à 37° sous agitation constante pendant une nuit permettant d'obtenir une solution parfaitement homogène.

Une extraction au phénol était ensuite réalisée sous hotte. Le phénol était préparé extemporanément par récupération de la phase supérieure obtenue par l'ajout d'un tampon pH 8 fourni avec la solution mère. 10 ml de phénol étaient ajoutés à l'homogénat cellulaire, le tube était ensuite agité durant 10 minutes, centrifugé 5 min à 3000 tours par minute et la phase aqueuse est récupérée. Celle-ci était traitée successivement par 10 ml de phénol chloroforme (solution 1/1), puis 10 ml de chloroforme-isoamylcool (solution 24/1) à deux reprises avec à chaque étape une agitation suivie d'une centrifugation 5 min à 3000 tours par minute et la récupération de la phase aqueuse. Enfin, une solution de NaCl 5M était ajoutée à la quantité de 40µL/mL de solution.

La précipitation de l'ADN était ensuite également réalisée sous hotte. Elle était permise par l'ajout de deux volumes de solution absolue d'éthanol conservée à -20°C. L'ADN était ensuite récupéré par une pipette pasteur introduite dans le tube jusqu'au fond. Le bout de cette pipette était ensuite plongé dans de l'éthanol à 70° conservé à 4°C. Le surplus d'alcool était retiré par l'application d'un buvard, le bout de la pipette était sectionné et laissé à sécher dans un tube à hémolyse stérile une nuit.

L'ADN était ensuite dissous dans 1 ml de trichloréthylène à pH 8 sous agitation pendant une nuit à 4° et un dosage permettait d'ajuster la concentration à 200µg/mL. Les aliquots étaient ensuite congelés à -20°C.

2.2.1.3. Discrimination allélique par PCR quantitative en temps réel

Les échantillons d'ADN étaient ensuite dilués au 1/10 dans de l'eau distillée. Le volume du milieu réactionnel de la PCR était de 25µL par puits et était composé de :

- 12,5µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix, contenant la Taq polymérase de type hot start Taq polymérase (AmpliTaq Gold ®DNA Polymérase), les

désoxyribonucléotides (dUTP, dATP, dCTP, dGTP), la référence interne passive ROX (permettant de normaliser tous les phénomènes qui ne sont pas dépendants de la réaction PCR comme les erreurs de pipetage), l'AmpErase UNG (système de décontamination), tampon et ions nécessaires à la PCR.

- 0,625 µl de TaqMan® SNP Genotyping assay mix, contenant les primers spécifiques de la PCR et la sonde TaqMan®MGB (reporter en 5' marqué par FAMTM et VICTM pour différencier l'amplification de chaque allèle) (Assay ID : C_25472878_10)
- 6,875 µl d'eau distillée
- 5 µl d'ADN dilué

La réaction de PCR était réalisée sur un automate Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System (ABI PRISM 7500 system) utilisant des plaques de 96 puits. On utilisait un puits par patient et trois puits de contrôles négatifs sans ADN (NTC : non template control) pour vérifier l'absence de contamination de la manipulation. La discrimination allélique ne nécessitait pas la réalisation de duplicata compte tenu de l'absence de résultats quantitatifs.

Les étapes de la PCR suivaient les recommandations du fabricant et comprenaient :

- 2 étapes initiales de deux minutes à 50° (activation AmpErase UNG) et 10 minutes à 95° pour activer la Taq polymérase et désactiver l'AmpErase UNG.
- 40 cycles comprenant chacun une étape de dénaturation de 15 secondes à 92°C et une étape d'annealing /extension d'une seconde à 60°C.

La discrimination allélique se faisait par l'analyse automatique des résultats par l'automate en point final par le « post read run ». L'allèle A était spécifiquement reconnu par la sonde marquée par VIC® et l'allèle G par la sonde marquée par FAM®. Ainsi l'homozygote A : donnait un signal de fluorescence VIC. Ainsi l'homozygote A était caractérisé par un signal de fluorescence VIC, l'homozygote G un signal de fluorescence FAM, et l'hétérozygote G/A donnait les 2 signaux de fluorescence.

2.2.1.4. Analyse statistique

La première analyse était celle de la vérification que la relation entre les trois génotypes AA, AG et GG et la fréquence des allèles suivait bien l'équilibre de Hardy-Weinberg par un test du χ^2 .

L'objectif principal de l'étude était la comparaison de la fréquence de l'allèle Gly²⁴⁸ (allèle G) chez les patients porteurs de maladies de Berger par rapport à des volontaires sains. Cette comparaison était permise par un test du χ^2 . La fréquence de l'allèle décrite pour les sujets caucasiens est de 15 % environ. Pour mettre en évidence une augmentation de fréquence de 70 % chez les patients porteurs de la maladie (soit une fréquence de 26 %) avec un risque alpha de 5 % et un risque bêta de 10 %, il était nécessaire d'inclure un minimum de 278 patients dans chaque groupe. Les résultats sont considérés comme significatifs au seuil de 5 %.

Les objectifs secondaires comprennent :

- l'étude de la corrélation entre la présence de l'allèle Gly248 et la survie rénale chez les patients porteurs de maladie de Berger appartenant à la cohorte et pour lesquels il existait un recul suffisant (cohorte 1979-1999). L'analyse a été réalisée par des méthodes univariées (Kaplan Maier, test du LogRank, modèle de Cox univarié) et des méthodes multivariées (Cox) prenant en compte les différents facteurs de risques connus d'évolution vers l'insuffisance rénale terminale (protéinurie, insuffisance rénale chronique, hypertension artérielle, score histologique de gravité au moment du diagnostic).
- l'étude d'association avec les différents paramètres d'activité au moment du diagnostic : la protéinurie (test t de Student), insuffisance rénale chronique (taux de créatininémie et débit de filtration glomérulaire estimé par la formule MDRD, test t de Student), hypertension artérielle (test du χ^2), score histologique de gravité (test t de Student et χ^2).

2.2.2. Etude du rôle des lymphocytes T : étude de la polarisation lymphocytaire T au cours de la NIgA

2.2.2.1. Patients

Cette étude prospective prévoyait d'inclure un total de 30 patients présentant une NIgA comparée à 15 patients volontaires sains.

Tous les sujets devaient avoir signé les consentements de participation à l'étude et devaient être affilié à un régime de sécurité sociale. De plus les patients devaient être porteurs d'une NIGa authentifiée par biopsie rénale, dont le diagnostic a été établi moins de 5 ans avant l'inclusion, définie par la présence de dépôts mésangiaux diffus d'IgA et présenter un DFG estimé supérieur à 60 mL/min/1,73m². Le groupe « NIGa » comprenait 2 sous-groupes de 15 patients, l'un présentant des IgA augmentées (> 350mg/dL) et l'autre des IgA normales (<350mg/dL). Les patients devaient être appariés en âge (moins de 10 ans de différence) et en sexe entre groupes de 15 sujets. Les volontaires sains ne devaient pas présenter de maladie chronique connue. La prise d'un immunosuppresseur dans les 6 mois précédant l'inclusion, la survenue d'une infection dans les 2 mois précédant, étaient des critères de non inclusion. Un prélèvement sanguin était réalisé le jour de l'inclusion.

2.2.2.2. Extraction des cellules mononucléées du sang périphérique

Les cellules mononucléées étaient récupérées par méthode de centrifugation par gradient de densité dans un milieu de séparation lymphocytaire (Ficoll-Hypaque à 1,077g/mL) après dilution 1:1 dans une solution de Hank's Balanced Salt Solution (HBSS).

Après lavage par centrifugation dans l'HBSS à 2 reprises, les cellules étaient ensuite resuspendues dans du PBS + 0,5% d'albumine de serum bovin (BSA) et numérées sur cellule de Thoma.

2.2.2.3. Analyse en cytométrie de flux de la sous-population CD4⁺CD25⁺CD127^{low}

500000 cellules étaient prélevées pour analyses, resuspendues dans 100µL de PBS 1% BSA contenant des anticorps anti-CD4, anti-CD25, anti-CD45 et anti-CD127 couplés à des fluorochromes différents et analysés par cytométrie en flux (FACS Canto II) sur logiciel FACS DIVA Software Version 2.0.

2.2.2.4. Activation des cellules T

Les lymphocytes T étaient préalablement activés 48h à l'aide d'anticorps mitogéniques anti-CD3 à la concentration finale de 5 µg/mL (eBiosciences, San

Diego, CA, USA) fixés au fond d'une plaque de culture 24 puits et anti-CD28 à la concentration finale de 2µg/mL. Le milieu était du RPMI 1640 (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) supplémenté avec 20% de serum de veau fœtal (SVF) inactivé, et une solution antibiotique et antifongique (péniciline G 1000U/mL, streptomycine 10mg/mL, amphotericine B 25µg/mL), l'ensemble pour 10⁶ CMSP par puits.

2.2.2.5. Extraction de l'ARN

Cette extraction utilise le kit RNEasy Mini Kit de Qiagen (Courtaboeuf, France) d'après les recommandations du fabricant. Cette technique procède de différentes étapes, (i) la lyse des membranes cellulaires par un Tampon RLT (ii) adsorption des ARN par centrifugation sur une colonne de silice (RNEasy Mini spin Column) après homogénéisation dans l'éthanol à 70% et (iii) lavages par tampons RW1 puis RPE (iv) élution dans de l'eau RNase free permettant la conservation à -80°C. Les ARN sont ensuite quantifiés par lecture de la densité optique à 260 nm et leur pureté est vérifiée par un rapport de DO à 260 nm/DO 280 nm et DO à 260 nm/DO 230 nm à respectivement 1,8-2 et 1,9-2.

2.2.2.6. Rétrotranscription des ARN en ADN complémentaires

Le kit High Capacity cDNA Reserve Transcription Kit a permis cette rétrotranscription des échantillons d'ARN issus des cellules des patients et des volontaires sains après respect des recommandations du fabricant. Une transcriptase reverse (1µL) est associée aux dinucléotides triphosphates (dNTP à 100mM) (0,8µL, concentration mère 25x), aux amorces aléatoires (2µL, 10x), et complétée par de l'eau RNase free pour un volume réactionnel de 10µL par échantillon. Un thermocycleur réalise la séquence thermique suivante : 10 minutes à 25°C, 2 heures à 37°C, 5 secondes à 85°C, 10 minutes à 4°C. L'ADN complémentaire (ADNc) est ensuite conservé à -20°C.

2.2.2.7. RT-PCR quantitative en temps réel

L'expression quantitative des gènes Tbet, ROR γ T, TGF β , IL10, FoxP3 et IL17A était analysée par RT-PCR quantitative en temps réel à partir des ADNc des échantillons correspondant à chaque patient.

Le principe est le suivant :

- les mélanges commercialisés spécifiques d'un gène comprennent un couple d'amorces encadrant la séquence d'intérêt et une sonde capable, par sa séquence, de s'hybrider à une portion d'ADN située entre les amorces. Ces sondes d'ADN comportent dans leur structure un émetteur de fluorescence et un extincteur de absorbant la fluorescence de l'émetteur lorsque celui-ci reste à proximité (ce qui est le cas lorsque la sonde est intacte). Après hybridation de la sonde sur sa séquence cible, l'élongation d'un néobrin d'ADN complémentaire par la Taq polymérase va détruire la sonde et libérer l'émetteur de son extincteur, générant un signal de fluorescence. Ce signal sera mesuré de façon quantitative par un détecteur (après excitation à une longueur d'onde spécifique de l'émetteur) à la fin de chaque cycle. A chaque cycle de PCR, les brins des ADN bicaténaires formés sont séparés par l'application d'une température élevée, et les sondes inutilisées peuvent se fixer sur les brins filles au cycle suivant. La détection du signal à la fin du cycle permet au final de tracer une courbe de fluorescence pour chaque puits, traduisant la quantité de sondes consommées depuis le début de la réaction à chaque cycle, équivalant la quantité d'ADN de séquence d'intérêt accumulée.
- Or, à chaque cycle, en présence des réactifs en quantité non limitante (sondes, amorces, nucléotides), la quantité d'ADN double à chaque cycle. Dans une première phase, la quantité de fluorescence est insuffisante pour être détectée, même si l'accumulation d'ADN est déjà exponentielle (2^n , n étant le nombre de cycles) au cours de cette phase et le signal de fluorescence sera celui d'un bruit de fond. Une deuxième phase sera l'augmentation linéaire de la fluorescence, témoignant de l'accumulation exponentielle d'ADN. Lors de cette 2^{ème} phase, la courbe d'augmentation de la fluorescence franchira un seuil dont la valeur est commune à tous les puits. Ce seuil devra être suffisamment élevé pour être dans la portion linéaire d'augmentation de la fluorescence. Le cycle de PCR au cours duquel le seuil est franchi par le signal de fluorescence est noté Ct et constitue la mesure à l'origine de la quantification du gène d'intérêt. Dans une troisième phase, un réactif est complètement consommé, ne permettant pas l'accumulation

supplémentaire d'ADN et le signal de fluorescence stagne (aplatissement terminal de la courbe). L'aspect final de la courbe est une sigmoïde.

- L'utilisation du Ct pour quantifier le gène d'intérêt est la suivante. Un Ct faible représente une nécessité de peu de cycles de PCR pour rendre le signal de fluorescence détectable et traduit donc une quantité d'ADN initiale élevée. A l'inverse un Ct élevé traduit la nécessité d'un grand nombre de cycles pour détecter un signal au seuil défini et correspond à une quantité d'ADN initiale plus faible. Comme la quantité d'ADN est doublée à chaque cycle, la relation entre la quantité d'ADN initiale et la valeur de Ct est :

$$[\text{ADNc gène d'intérêt}] = 2^{-\text{Ct}}$$

Cette valeur absolue n'est pas interprétable en l'état, du fait de la grande variabilité de la quantité globale d'ADN (quantité de cellules notamment, efficacité de l'extraction d'ARN) et doit être normalisée à un gène dont l'expression est constante (gène dit « de ménage »). Le gène utilisé dans notre étude est celui de la GAPDH. Cette normalisation donne une expression relative du gène d'intérêt sur celle du gène de la GAPDH et est permise par la différence de Ct entre les 2 gènes :

$$[\text{ADNc gène d'intérêt}]/[\text{ADNc GAPDH}] = 2^{-\Delta\text{Ct}}$$

Enfin, la comparaison des différentes conditions entre elles (par exemple dans cette étude la comparaison de l'expression relative de chaque gène entre les différents patients) se fait à partir d'un calibrateur commun à partir des différences de ΔCt entre chaque condition et son calibrateur :

$$\begin{aligned} \text{Expression relative (RQ)} &= ([\text{ADNc gène d'intérêt condition}]/[\text{ADNc GAPDH} \\ &\text{condition}]) / ([\text{ADNc gène d'intérêt calibrateur}]/[\text{ADNc GAPDH calibrateur}]) \\ &= 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \end{aligned}$$

Au cours de l'étude, les mélanges spécifiques suivants ont été utilisés (Applied Biosystems) : Tbet (Hs00203436-m1); ROR γ T (Hs01076112-m1); TGF β (Hs0099999918-m1); IL10 (Hs00961622-m1); FoxP3 (Hs00203958-m1); IL17A (Hs00174383-m1).

La réaction de PCR était permise par le mélange d'ADNc (normalisé 10ng), de master mix (12,5 μ L), de mélange sondes/amorces spécifique à chaque gène d'étude (1 μ L), complété par de l'eau pure pour un volume réactionnel finale de 25 μ L

2.2.3. Etude du C3 au sein des complexes immuns IgA1-dg / IgG antiglycane

2.2.3.1. Formation des complexes immuns artificiels

La méthode d'obtention des complexes immuns est basée sur la mise en relation de différents réactifs

Le premier réactif est une IgA1 polymérique monoclonale issue d'un patient présentant un myélome et purifiée par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne de Sephacryl. La fraction polymérique (comprenant des formes di et trimériques) est purifiée lors d'une seconde étape et constitue le réactif employé. Elle est nommée pAle (acronyme du patient source). Cette IgA est parfaitement caractérisée en terme de sites de glycosylation par spectrométrie de masse haute définition et présente une déficience en galactose (IgA1-dg), la rendant réactive vis-à-vis d'Helix Aspersa Agglutinin (HAA), une lectine se liant aux motifs GalNac.

Le second réactif est une IgG recombinante, développée à partir d'un clone de lymphocyte B d'un patient atteint de NIGA. Cette IgG est caractérisée par son affinité élevée vis-à-vis des IgA1-dg, de façon glycane-dépendante. Sa séquence d'acides aminés comprend un motif YCSK au sein la région CDR3, déterminant sa spécificité envers le résidu GalNac. La réactivité de cette IgG, nommée r1123, vis-à-vis d'IgA1-dg est augmentée par un prétraitement des IgA par neuraminidase, permettant la perte des acides sialiques, exposant d'autant mieux les résidus GalNac. Une préexposition des IgA1-dg par HAA, diminue de façon majeure leur liaison à r1123, par compétition d'affinité pour la région charnière. L'affinité de r1123 pour les IgA1-dg est donc bien caractérisée.

des quantités croissantes de serum normal déplété en IgA et en IgG sont utilisées. Le serum est issu d'un patient sain. La déplétion en IgG était permise par passage sur colonnes de protéine G puis la déplétion IgA était réalisée sur colonnes Sepharose-CNBr-anti-IgA. Chaque déplétion était réalisée durant une nuit sous agitation douce. La déplétion était vérifiée par un dosage ELISA IgA et IgG.

les réactifs pAle et r1123 sont mélangés aux doses respectives de 80µg et de 40µg, associés à des doses croissantes de serum déplété (40, 80, 160µL), et complétées par du PBS pour atteindre 500µL. Le mélange était incubé toute une nuit à 4°C sans agitation.

2.2.3.2. Chromatographie

Les complexes sont ensuite obtenus après fractionnement par masse moléculaire au moyen d'une chromatographie d'exclusion stérique sur colonne Superose 6 de 60mm de la manière suivante :

l'échantillon de 500µL était filtré (centrifugation sur Nanosep 0.2µm, Pall)

la colonne Superose 6 de 60mm était rincée par PBS stérile (60 mL) en conditions de basse pression par une pompe péristaltique, après avoir été calibrée par standards moléculaires (Biorad)

l'échantillon filtré était appliqué en surface de colonne après retrait du PBS dans la portion supérieure

après intégration de l'échantillon dans la résine, la pompe est remise en route, permettant la circulation du PBS, véhicule de la chromatographie.

le PBS de sortie de colonne est récupéré dans un collecteur de fraction. Le premier tube est rempli et les tubes suivants reçoivent 5 gouttes (250µL) chacun.

les fractions allant du volume de vidange à la fraction correspondant à la masse moléculaire de 55 kDa sont récoltées, mélangées 2 à 2 puis chaque fraction double est filtrée à nouveau.

2.2.3.1.1. Application des fractions en culture de cellules mésangiales

- une lignée primaire de cellules mesangiales humaines (Cambrex BioScience, Walkersville, MD, USA) est mise en culture au passage 3 sur milieu RPMI 1640 supplémenté par SVF 20%, L-Glutamine et antibiotiques (Pénicilline G/Streptomycine) sur plaques 24 puits à 37°C en atmosphère humide et à 5% CO₂. Le milieu est changé toutes les 48h jusqu'à obtention d'une confluence à 85-95%.
- le milieu de culture est alors changé pour du RPMI 1640 supplémenté par SVF 1% durant 24h
- les fractions doubles filtrées sont alors appliquées dans les puits (200µL de fraction + 200µL de RPMI 1640 1% SVF) en duplicats. Les 100µL restant sont utilisés pour analyse ELISA. Un témoin négatif est utilisé en double sur chaque plaque (fraction remplacée par du PBS stérile) et un témoin positif (fraction remplacée par PBS stérile + PDGF BB (R&D Systems) 4µL). La culture se poursuit dans les mêmes conditions durant 20h

- La ^3H -Thymidine (Perkin Elmer, 1mCi (37MBq), 14.4 Ci/mmol) est ajoutée au milieu de culture dans chaque puits (100 μL) et incubée 4h à 37°C 5% CO_2
- Le surnageant et 2 lavages de puits par PBS sont récupérés et filtrés. Les filtres de chaque condition sont récupérés et placés dans la fiole de scintillation correspondante. La couche cellulaire adhérente est lysée par NaOH 0.3M 200 μL durant 20 minutes. Le lysat est versé dans la fiole de scintillation correspondant à la condition. Une dernière lyse est réalisée par acide acétique 10%, permettant de récupérer les derniers débris cellulaires.
- La lecture est ensuite assurée par un compteur de scintillation. Les données brutes sont moyennées pour chaque condition.

2.2.3.1.2. ELISA de mesure des IgA et des IgG totales par fraction

Les plaques 96 puits (MaxiSorp) sont préalablement coatées à 1 μg / ml de F(ab')₂ Chèvre Anti-IgA(chaine α) Humaine (AffiniPure) pour le dosage des IgA et 1 μg / ml de F(ab')₂ Chèvre Anti-IgG(Fc) Humain (AffiniPure) pour le dosage des IgG, dans 100 μL PBS Azide une nuit. Les puits sont ensuite lavés 5 fois avec du PBS et bloqués avec 200 μL de PBS 5% SVF et Tween 20 à 0.05% durant 2h. Un lavage (5 fois avec PBS) est suivi de la distribution de 100 μL de PBS 1% SVF et Tween dans chaque puits.

Chaque fraction est diluée à 1:200 pour un volume final excédant 400 μL par condition. Les conditions diluées sont distribuées dans chaque puits de départ (100 μL par puits, chaque condition en duplicat) et une dilution de moitié est réalisée à la pipette à chaque étape dans les 5 puits suivants. Un standard de concentration (concentrations finales pour le dosage des IgA 50ng/mL et pour le dosage des IgG 25ng/mL) est dilué de moitié à chaque étape à 9 reprises en double. Les plaques sont recouvertes et incubées une nuit à 4°C.

Le lendemain les plaques sont lavées (5 fois avec PBS + Tween) et l'anticorps secondaire est ajouté (100 μL par puits). Pour le dosage des IgA, un anticorps de Chèvre anti-IgA Humaine (F(ab')₂, Genway Biotech) marqué à la biotine est utilisé (1 :40000) et pour le dosage des IgG, un anticorps de Chèvre anti-IgG Humaine (F(ab')₂, Genway Biotech) marqué à la biotine (1 :20000) est employé. Une incubation de 3h à 37°C en chambre humide est réalisée. Les plaques sont lavées (5 fois avec PBS + Tween) et l'HRPO (Horseradish Peroxidase, Extravidin Peroxidase,

1 :2000) est appliquée 1h à 37°C. Les puits sont de nouveau lavés avec du PBS seul, et la réaction colorimétrique est basée sur l'emploi d'OPD (O- Phenylenediamine, 60mg par plaque), dans un tampon citrate / Na₂HPO₄ à pH 5.0 (12 mL par plaque), et associé à H₂O₂ 30% (1,44µL par plaque), distribué à 100µL par puits. La réaction est arrêtée à 30 minutes par une solution STOP (acide sulfurique 5,6%). La lecture se fait à 490 nm par un spectrophotomètre.

2.2.3.1.3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide et immunoblot anti-C3

L'électrophorèse est réalisée sur minigels (BioRad, 10 puits de 30µL) de polyacrylamide (gradient 4-15%) dans un tampon Tris/Glycine/SDS (BioRad). Les échantillons sont dilués dans un tampon SDS, glycérol, Tris, β-mercaptoéthanol (conditions réductrices) et bleu de bromophénol à 1 :1 et injectés (30µL) dans les puits du gel. Un puits à chaque extrémité est réservé à l'échelle de standards de masse moléculaire (5µL). L'électrophorèse est réalisée à 120V jusqu'à la sortie du standard de 10kDa du gel)

L'immunoblot est ensuite réalisé en condition semi-sèche. La membrane de transfert est en PVDF, le tampon de transfert utilisé est composé de Méthanol/Tris/Glycine. Le gel et la membrane sont disposés en « sandwich » entre 2 couches de papier épais. Le transfert se fait sous 300mA durant 1h25.

Après transfert, la membrane est bloquée 1h dans un tampon de blocage (SuperBlock, Pierce Biotechnology, 5mL), puis l'anticorps primaire est ajouté au tampon (anti-C3 polyclonal, Chèvre anti-C3 Humain, 1 :7000, donné par Dr Mrug, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL) et incubé en agitation douce une nuit. Le tampon est retiré et la membrane est lavée 4 fois 15 min dans le TBS (Tris Buffer Saline). Puis l'anticorps secondaire est appliqué (IgG Ane anti-IgG Chèvre lié à Horseradish Peroxidase dilué 1 :50000 dans le tampon de blocage) à température ambiante 1h. La membrane est de nouveau lavée (4 fois 15 minutes TBS) et la solution ECL est appliquée (Enhanced ChemiLuminescence, Pierce SuperSignal Pico) 10 minutes et le résultat est obtenu par impression d'un film autoradiographique en chambre noire après 1 minute d'exposition).

2.2.3.1.4. Analyse en spectrométrie de masse

Un deuxième gel d'électrophorèse est marqué de manière non spécifique par un marquage des protéines à l'Argent compatible avec l'analyse subséquente en spectrométrie de masse. Les bandes de gel correspondant aux bandes réactives de l'immunoblot anti-C3 sont excisées, et font l'objet d'un traitement par trypsine dans le gel. L'analyse du contenu en fragments tryptiques se fait en spectrométrie de masse par LTQ Orbitrap Velos en MS/MS. Les paramètres m/z des fragments obtenus permettent de déduire le fragment tryptique détecté et de connaître la protéine dont il est issu (par algorithmes MASCOT et SEQUEST).

2.3. Résultats

2.3.1. Exploration du rôle des monocytes/macrophages : étude du polymorphisme du CD89

2.3.1.1. Etude de susceptibilité génétique

Un total de 726 patients et 264 volontaires sains ont finalement pu être inclus dans l'analyse. L'âge moyen des patients était de (âge ; \pm écart type) 46 ± 15 ans au moment du diagnostic avec un sex ratio de 2,7 et les volontaires sains avaient en moyenne 38 ± 11 ans avec un sex ratio de 1,9.

Les fréquences des différents génotypes et allèles sont données dans le Tableau 3. Le génotype homozygote sauvage (AA) est présent chez 69,3 % des patients et 68,9 % des volontaires. Le génotype hétérozygote (AG) représentait respectivement 27 % et 27,3 % alors que le génotype homozygote muté (GG) correspondait à 3,7 % des patients et 3,8 % des volontaires. Les fréquences de ces différents génotypes n'étaient pas différentes entre les deux populations (test χ^2 0,557 ; non significatif). Les fréquences des allèles A et G étaient respectivement de 83 et 17 % de façon comparable entre les deux groupes. Ces fréquences suivent la loi de Hardy-Weinberg, les fréquences attendues étant de 68,9 % pour le génotype AA, de 28,2 % pour le génotype hétérozygote et de 2,89 % pour le génotype GG (test χ^2 0,96 ; non significatif).

Génotypes/ Allèles	Patients (n, %) n=726	Volontaires (n, %) n=264	X ²	p
AA	503 (69,3%)	182 (68,9%)		
AG	196 (27,0%)	72 (27,3%)	0,557	0,76
GG	27 (3,7%)	10 (3,8%)		
A	83%	83%	1,000	0,52
G	17%	17%		

Tableau 3. Fréquence des différents génotypes et allèles parmi les populations de patients présentant la maladie par rapport aux volontaires sains.

2.3.1.2. Etude d'association génétique pronostique

L'ensemble des patients inclus entre 1979 et 1999 correspondaient à un total de 425 individus. Les résultats sont donnés avec l'écart type entre parenthèses. Le recul moyen était de 99 (± 68) mois et les caractéristiques au moment de la biopsie rénale étaient les suivantes : l'âge moyen de 37,6 ($\pm 15,6$) ans, l'indice de masse corporelle de 24,4 ($\pm 4,1$) kg/m², le sex ratio de 2,79, la proportion de patients présentant une protéinurie et une hypertension artérielle était respectivement de 62,7 % et 32 %, le score histologique moyen de 7,4 ($\pm 3,6$) sur une échelle de gravité de 0 à 20, une créatininémie moyenne de 138 (± 141) $\mu\text{mol/L}$ et un débit de filtration glomérulaire estimé par la formule MDRD (Modifying Diet in Renal Diseases) de 74 (± 30) mL/min/1,73m². Un total de 88 patients a évolué vers l'insuffisance rénale chronique terminale soit 20,7 % de la cohorte. Ces caractéristiques sont décrites dans le Tableau 4.

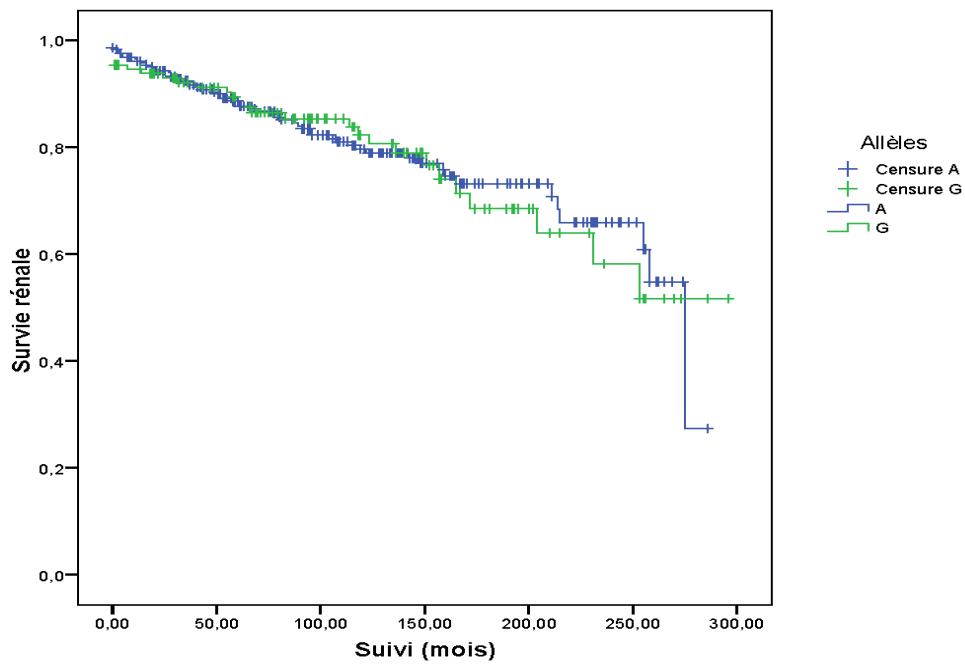
	Population globale n=425	A n=292	G n=133	p
Age (ans)	37,6 (±15,6)	37,3(±16,8)	36,9(±16,0)	0,8
Sexe ratio	2,79	3,11	2,02	0,06
IMC (kg/m ²)	24,4 (±4,1)	24,1 (±4,2)	24,3 (±4,1)	0,6
Score	7,4 (±3,6)	7,3 (±3,4)	7,6 (±3,9)	0,5
Protéinurie (%)	62,7%	62,8%	62,3%	0,9
HTA (%)	32%	34%	29%	0,29
Créatininémie (µmol/L)	138 (±141)	136 (±130)	143(±162)	0,7
MDRD (mL/min/1,73m ²)	74 (±30)	77 (±34)	75 (±31)	0,6
IRCT (n, %)	88 (20,7%)	60 (20,5%)	28 (21,1%)	0,9

Tableau 4. Caractéristiques des patients de la cohorte 1979-1999. IMC : Indice de Masse Corporelle ; HTA : Hypertension Artérielle ; MDRD : formule d'estimation du débit de filtration glomérulaire issue de l'étude Modifying Diet in Renal Diseases ; Score : score histologique de gravité coté de 0 à 20. IRCT : patients ayant évolué vers l'insuffisance rénale terminale au cours du suivi. Test du χ^2 pour les comparaisons de proportion et test t de Student pour les comparaisons de moyennes.

Ces caractéristiques n'étaient pas statistiquement différentes entre les patients homozygotes pour l'allèle A et l'ensemble des patients présentant l'allèle G (hétérozygote ou homozygotes mutés). Seule une différence de sexe ratio était à la limite de la significativité ($p=0,059$), toutefois dans un contexte de comparaisons multiples (Tableau 4). De façon particulière, la proportion de patients ayant évolué vers l'insuffisance rénale chronique terminale n'était pas différente selon l'allèle étudié. De la même manière, en analyse univariable par la méthode de Kaplan Maier, la survie rénale n'était pas différente entre les deux groupes (test du LogRank, $p=0,9$) comme montrée par la Figure 1. Les courbes de survie sont superposables, même pour les patients dont le suivi dépassait 15 ans. Le modèle de Cox univariable montrait un Hazard Ratio à 1,029, non significatif, confirmant l'absence d'effet pronostique sur la survie rénale (Tableau 5). L'intégration dans un modèle multivariable comprenant les principaux facteurs de risque identifiés

aboutit à un résultat comparable, alors que les effets de la protéinurie, de l'insuffisance rénale et d'un score histologique sévère (>8) impactent de façon majeure le risque d'évolution vers l'insuffisance rénale chronique terminale.

a.



b.

Durée suivi (mois)	0	60	120	180	240
Patients exposés (A)	289	190	169	109	49
Patients exposés (G)	132	91	51	21	8

c.

	Survie moyenne (mois)	p (LogRank)
Allèle A	219	0,902
Allèle G	221	

Figure 10. a. Courbe de survie ; b. Table de survie ; c. Survies moyennes, test du LogRank

a.

Variabes	Coefficient β	Hazard Ratio	p
SNP CD89 (G vs A)	0,47	1,029	0,90

b.

Variabes	Coefficient β	Hazard Ratio	p
Age	-0,21	0,98	0,054
Sexe	-0,43	0,65	0,15
IMC	0,041	1,04	0,27
HTA	-0,16	0,85	0,63
Créatininémie	0,006	1,006	<0,001
Protéinurie	2,02	7,57	0,007
Score >8	1,54	4,67	<0,001
SNP CD89 (G vs A)	0,47	1,60	0,118

Tableau 5. Modèles de Cox univariable (a.) et multivariable (b.). IMC : Indice de Masse Corporelle, HTA : Hypertension Artérielle, MDRD : formule d'estimation du débit de filtration glomérulaire issue de l'étude Modifying Diet in Renal Diseases), Score : score histologique de gravité coté de 0 à 20.

2.3.2. Etude du rôle des lymphocytes T : étude de la polarisation lymphocytaire T au cours de la NIgA

2.3.2.1. Patients

Au total, 28 patients présentant un NIgA et 15 volontaires sains (VS) ont été inclus dans l'étude. L'âge médian[étendue interquartile] était de 44,5[32,5-57] ans pour le groupe NIgA et 40,5[27,5-48,5] ans dans le groupe VS (p=0,17). Dans le groupe NIgA le sex ratio était de 3,6, ce qui était comparable au groupe VS (2,75). Le taux d'IgA médian était de 324[231-449] mg/dL dans le groupe NIgA et de 232[194-264] mg/dL dans le groupe VS (p=0,006). La protéinurie au moment de la biopsie était de 0.7g/24h. Le score histologique était faible (5[1-8]) dans le groupe NIgA.

2.3.2.2. Populations cellulaires T

Les lymphocytes totaux n'étaient pas différents entre les groupes (en éléments/mm³) : NIgA : 1899[1590-2177] VS : 2178[1806-2525], p=0,17, de même que la population T CD4+ (NIgA : 922[627-1039] ; VS : 877[764-950], p=0,95) et la population T CD8+ (NIgA : 373[294-513] ; VS : 480[299-504], p=0,49). Les lymphocytes B (NIgA : 196[155-284] ; VS : 266[188-329], p=0,11) et les lymphocytes NK (NIgA : 245[175-336] ; VS : 339[213-480], p=0,13) étaient comparables.

Les populations T CD4+ CD25+ CD127^{low} n'étaient pas différentes, exprimées en % des lymphocytes T CD4+ (NIgA : 7,2[6,1-8,2] ; VS : 6,9[6,0-7,6], p=0,69).

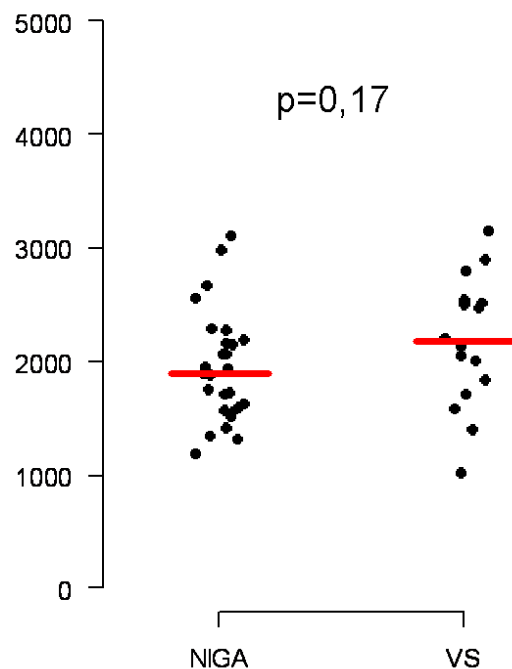


Figure 11. Comparaison des lymphocytes totaux entre groupes NIgA et VS. En éléments/mm³

2.3.2.2. Populations cellulaires T

Les lymphocytes totaux n'étaient pas différents entre les groupes (en éléments/mm³) : NIgA : 1899[1590-2177] VS : 2178[1806-2525], p=0,17, de même que la population T CD4+ (NIgA : 922[627-1039] ; VS : 877[764-950], p=0,95) et la population T CD8+ (NIgA : 373[294-513] ; VS : 480[299-504], p=0,49). Les lymphocytes B (NIgA : 196[155-284] ; VS : 266[188-329], p=0,11) et les lymphocytes NK (NIgA : 245[175-336] ; VS : 339[213-480], p=0,13) étaient comparables.

Les populations T CD4+ CD25+ CD127^{low} n'étaient pas différentes, exprimées en % des lymphocytes T CD4+ (NIgA : 7,2[6,1-8,2] ; VS : 6,9[6,0-7,6], p=0,69).

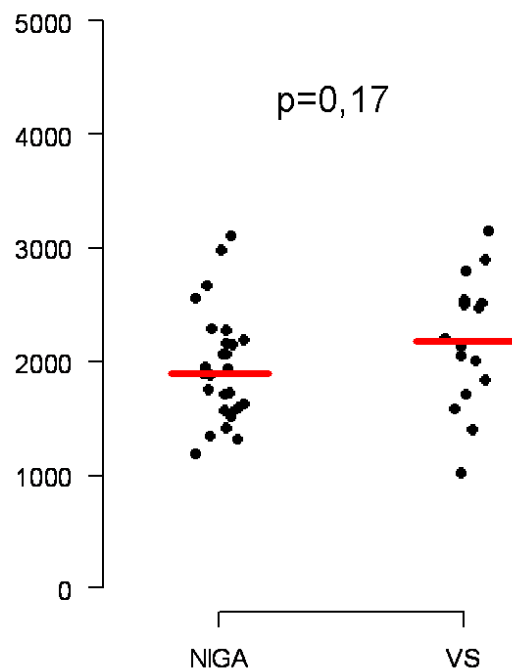


Figure 11. Comparaison des lymphocytes totaux entre groupes NIgA et VS. En éléments/mm³

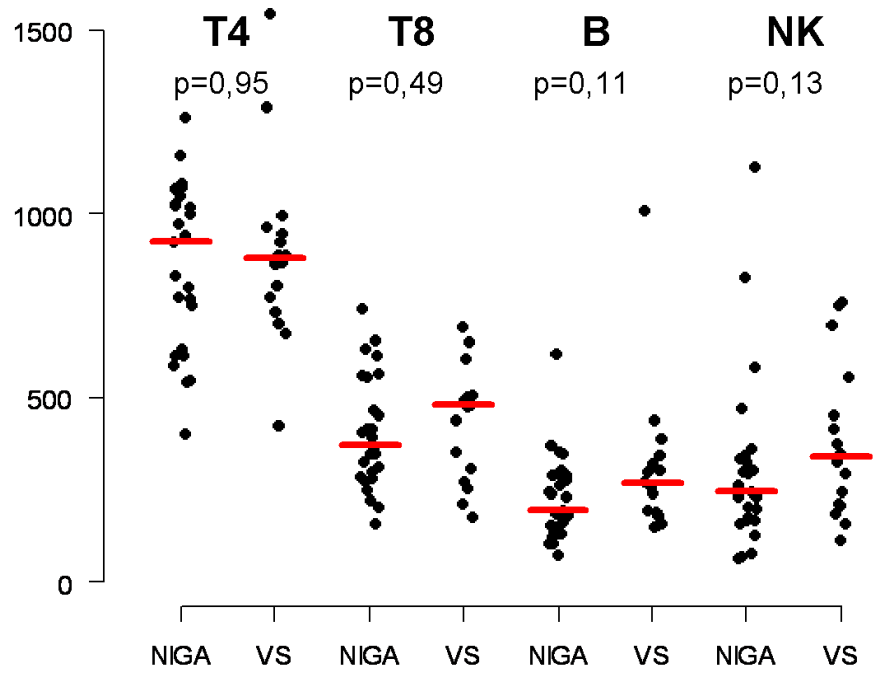


Figure 12. Comparaison des populations lymphocytaires entre groupes NIGa et VS. En éléments/mm³

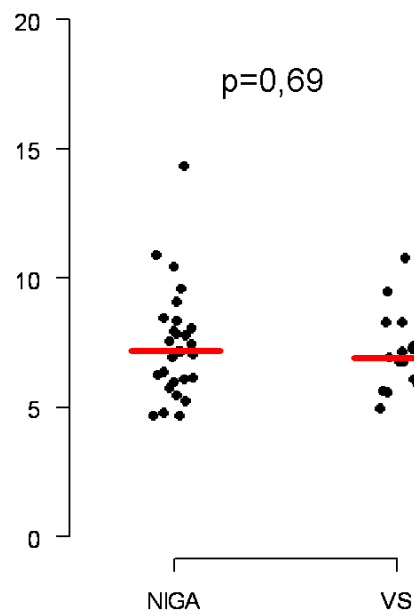


Figure 13. Comparaison des populations T CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low}. En % des lymphocytes T CD4⁺.

2.3.2.3. Profil transcriptionnel des lymphocytes T

2.3.2.3.1. Expression des gènes Th1

L'expression de Tbet était plus faible à au repos et après activation dans le groupe NIGa, en expression relative par rapport à un calibrateur commun (J0 : 3,16[1,6-6,0], J2 : 1,46[0,9-2,0]) par rapport au groupe VS (J0 : 12,3 [2,9-16,1], J2 : 2,55[1,21-4,29], $p=0,01$ et $p=0,09$).

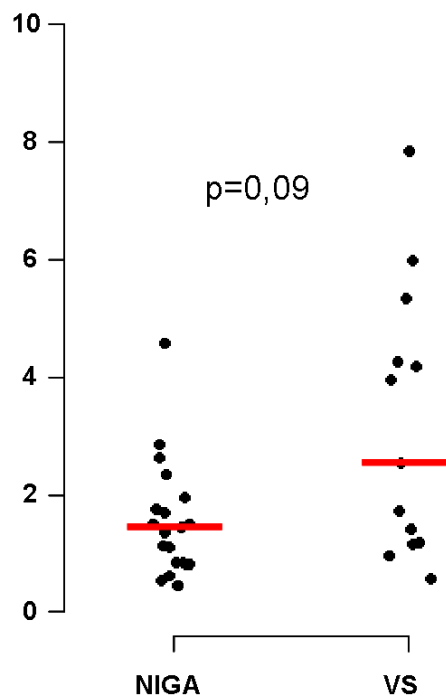


Figure 14. Expression relative de Tbet après activation anti-CD3 et anti-CD28 (J2)

2.3.2.3.2. Expression des gènes Th17

L'expression de ROR γ T était nettement plus faible dans le groupe NIGa au repos. Elle était de 1,5[0,76-4,3] dans le groupe NIGa et 11,1[4,5-46] dans le groupe VS, $p<0,001$. Après activation, la même tendance est notée : dans le groupe NIGa elle était de 2,66[1,4-5,5], et 5,9[3,3-17] dans le groupe VS, $p=0,07$.

L'expression du gène d'IL17A n'était pas détectable au repos dans aucun des groupes, et après activation, elle était de 9,81[2,2-15] et de 27,2[3,1-161], $p=0,3$. Le résultat n'est pas significatif, mais la tendance est la même que pour l'expression de ROR γ T en faveur d'une diminution de l'activité fonctionnelle des cellules Th17.

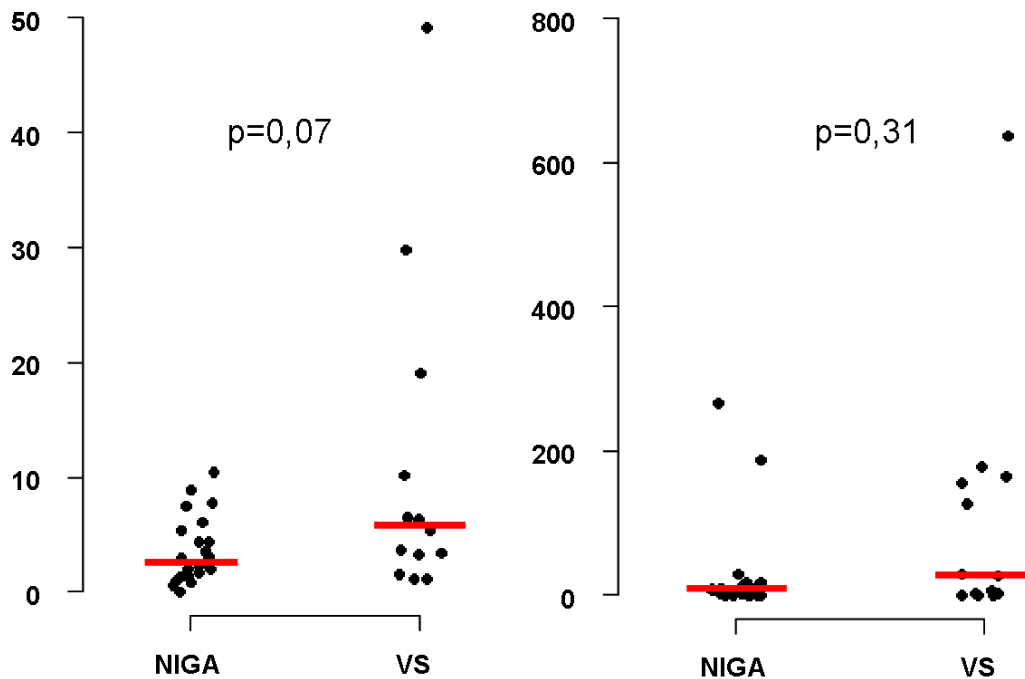


Figure 15. Expression relative de ROR γ T (à gauche) et IL17A (à droite) après stimulation (J2).

2.3.2.3.3. Expression des gènes Tregs

L'expression de FoxP3 était similaire entre le groupe NIgA 1,70[0,51-2,3] et le groupe VS 6,9[6,0-7,6] au repos, $p=0,42$. Après stimulation, elle était de 3,11[1,3-6,1] dans le groupe NIgA et de 4,86[2,0-14], $p=0,14$ dans le groupe VS. Un déficit de régulation Treg n'est donc pas exclu.

L'expression du gène IL10 est identique dans les 2 groupes avant et après activation. Au repos, l'expression relative était de 26,0 [9,0-38] dans le groupe NIgA et de 30,9[5,2-79] dans le groupe VS, $p=0,84$. Après activation elle était de 20,4 [11-34] dans le groupe NIgA et 29,3[14-60] dans le groupe VS, $p=0,14$.

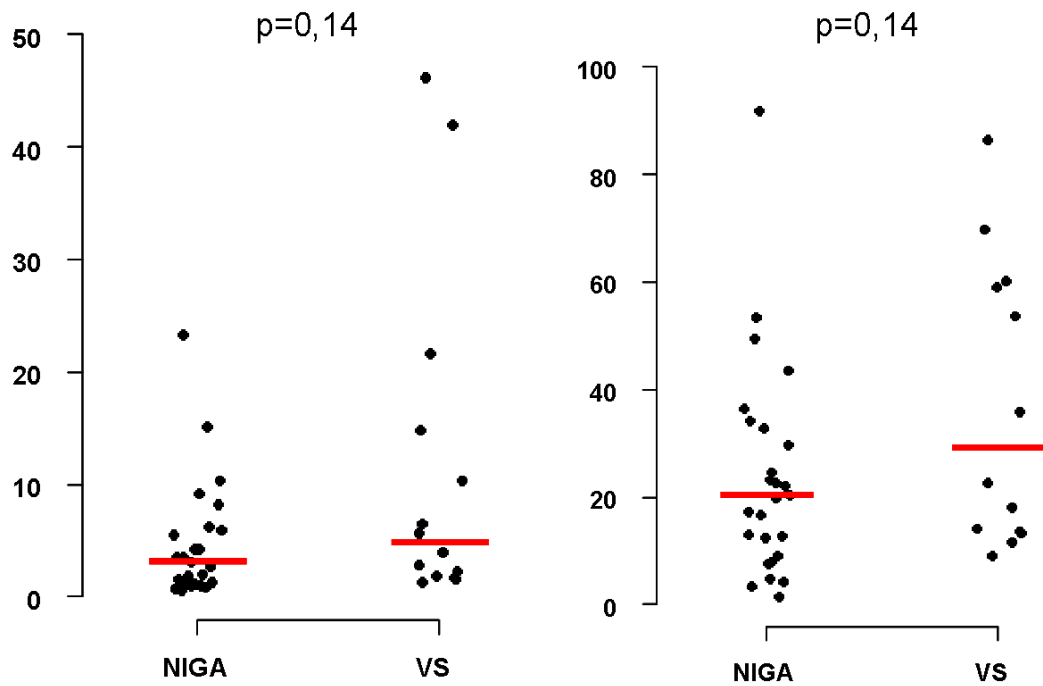


Figure 16. Expression de FoxP3 (à gauche) et IL10 (à droite) après activation.

L'expression de TGF β était comparable entre groupes (NIGa : 8,35[5,7-11,6] et VS : 12,1[0-22], $p=0,6$) au repos et après activation (NIGa : 0,79[0,4-1,5] et VS : 1,8[0,96-2,3], $p=0,11$)

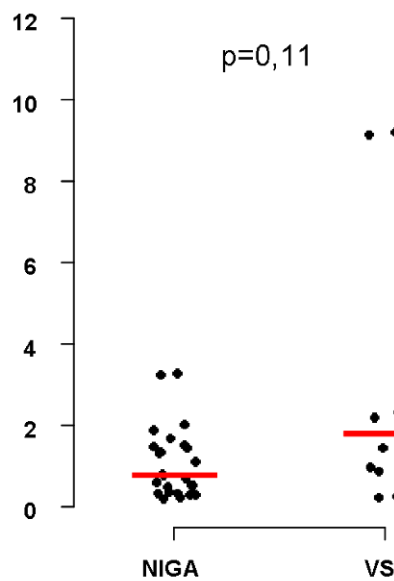


Figure 17. Expression relative du gène TGF β après stimulation

2.3.3. Etude du C3 au sein des complexes immuns IgA1-dg / IgG antiglycane

2.3.3.1. La prolifération mésangiale induite par les complexes immuns est influencée par la présence d'un facteur sérique

Les complexes immuns IgA1-dg/IgG anti-glycane étaient formés par le mélange de pAle, de r1123, de quantités croissantes de serum humain normal déplété en IgA et IgG puis fractionnés sur colonne. Les fractions étaient mélangées 2 à 2 et intégrées au milieu de culture des cellules mésangiales humaines. La stimulation des cellules mesangiales par les fractions de haut poids moléculaire était d'autant plus importante que la quantité ajoutée de serum déplété en IgA et en IgG dans le mélange était importante.. La Figure montre un effet-dose du volume de serum responsable d'un pic de prolifération (marquée ICA, immuns-complexes artificiels) des fractions de très haut poids moléculaire (supérieur à 670 kDa). Un facteur sérique distinct d'une IgA ou d'une IgG est nécessaire pour conférer les capacités de stimulation de la prolifération des cellules mesangiales des complexes immuns IgA1-dg/IgG. L'expérience équivalente avec le seul même serum déplété en IgA et IgG (sans pAle ni r1123) montre l'absence de pic de prolifération au sein des fractions de haut poids moléculaire (témoin négatif)

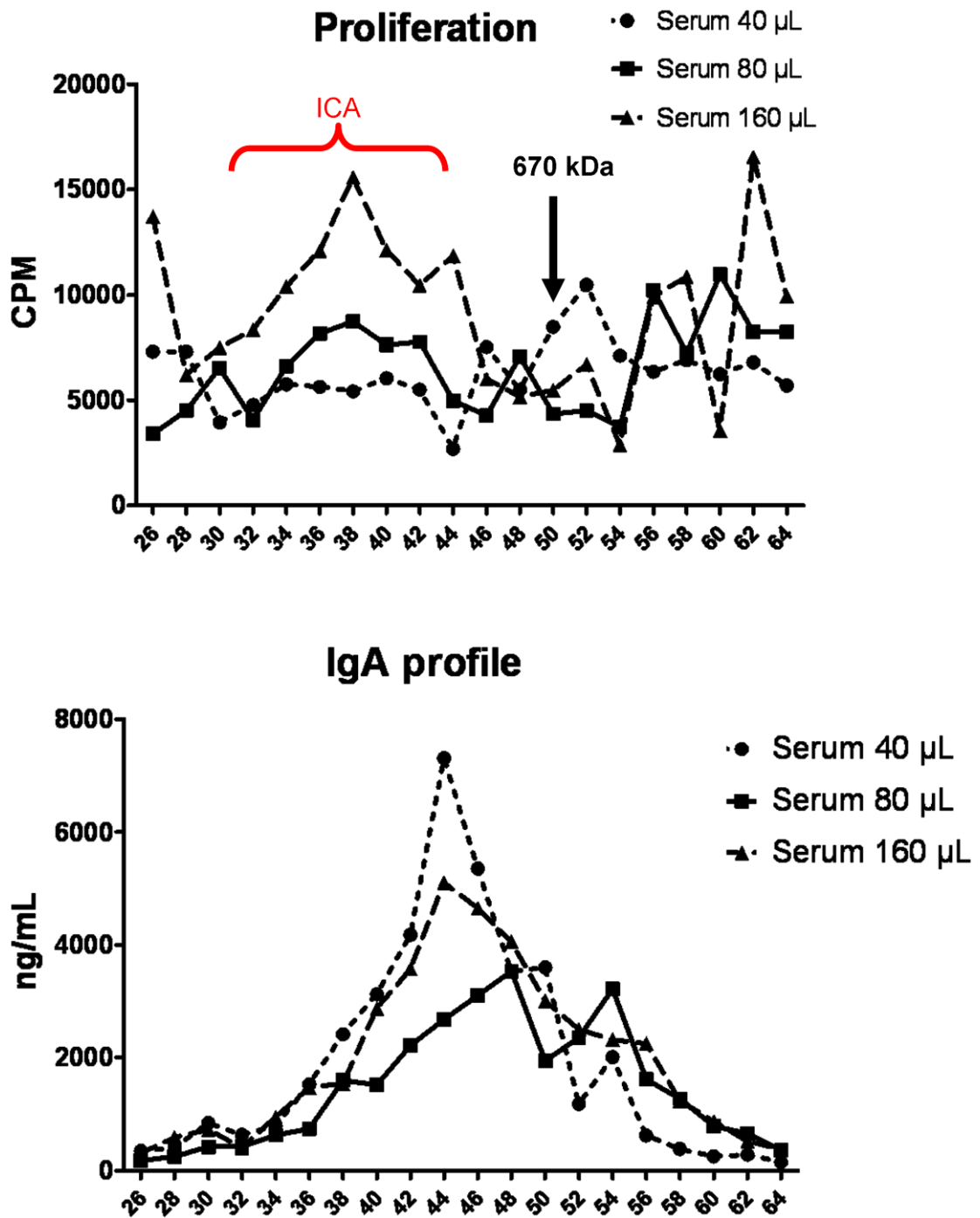


Figure 18. en haut : prolifération des cellules mésangiales en culture induite par les fractions de poids moléculaires décroissants. Les fractions 30 à 42 induisent une prolifération (Immuns Complexes Artificiels). En bas : quantification des IgA totales par fraction

2.3.3.2. Les fractions de haut poids moléculaire contiennent des éléments de C3
 Etude de la composition des fractions de haut poids moléculaire

Les fractions stimulant la prolifération des cellules mesangiales en culture (de 30 à 42, masse moléculaire théorique >670kDa) étaient mélangées et concentrées 4 fois par ultracentrifugation. La condition d'étude (ICA, IgA1-dg/IgG antiglycane en présence de serum déplété en IgA et IgG à 160µL) était comparée à la condition témoin négatif (serum déplété seul, technique de la même manière). L'analyse en immunoblot anti-C3 polyclonal révèle la présence de multiples bandes de C3 de masses moléculaires différentes après électrophorèse en conditions réductrices. Figure. De manière globale, la présence de C3 était plus marquée dans la condition ICA, marquant le fait que la présence de complexes immuns s'accompagnait d'une présence de fragments de C3 de faible masse moléculaire (entre 30 et 120kDa), dont la présence au sein de ces fractions de masse élevée n'était expliquée que par la liaison non covalente aux immunoglobulines ajoutées.

Les principales bandes réactives avaient un poids moléculaire de 30, 40-43, 68, 75, 110 et 120 kDa. Les bandes correspondantes d'un gel identique marqué à l'argent étaient excisées et analysées en spectrométrie de masse après digestion tryptique.

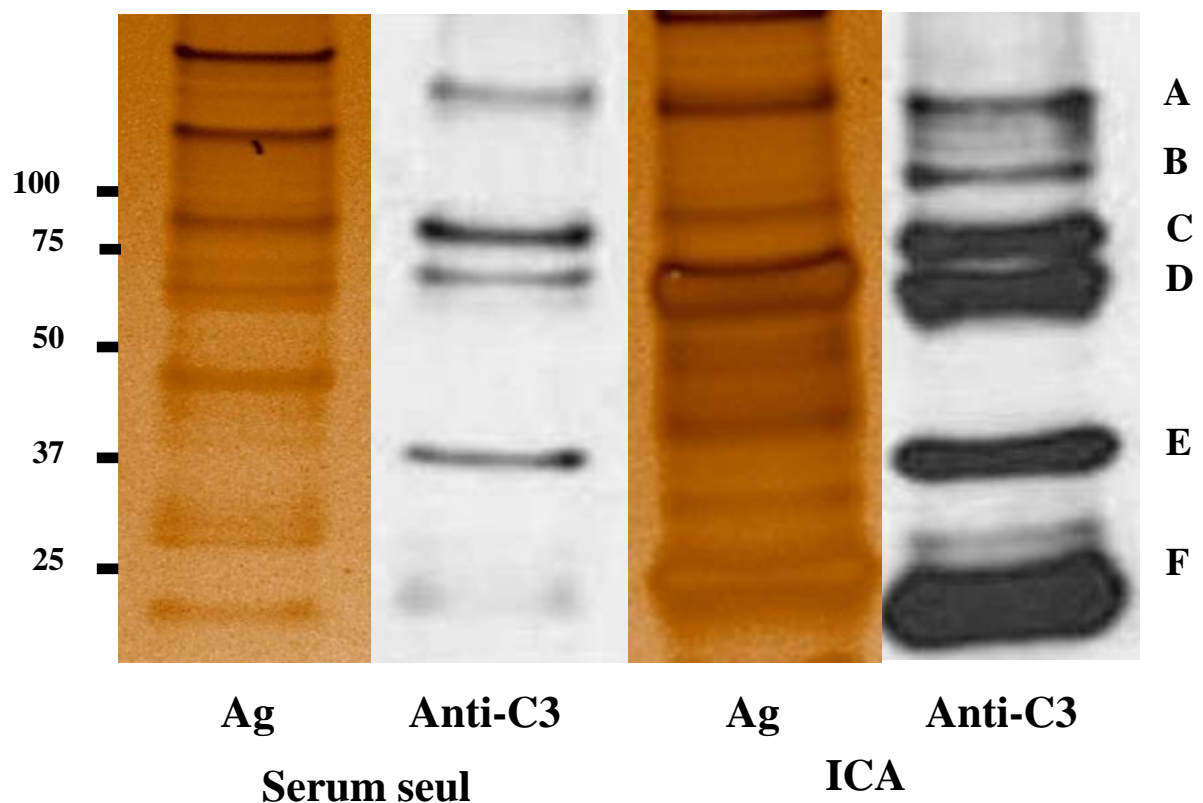


Figure 19. Gel d'électrophorèse marqué à l'argent et immunoblot anti-C3.

Analyse des bandes réactives par spectrométrie de masse MS/MS

L'analyse en spectrométrie de masse confirme la présence de C3 dans chacune de ces bandes avec un niveau de certitude satisfaisant (entre 89 et 100%). Les séquences des fragments tryptiques identifiés permettent de les situer sur la séquence de la protéine de C3, et en prenant en compte la masse moléculaire recouverte par chaque bande, il est possible d'identifier les espèces moléculaires de C3 présentes au sein des complexes immuns de masse élevée. Certains fragments sont des produits issus du clivage du C3b par le facteur I, tels que C3c, iC3b, C3dg et C3d, en faveur d'une activation de C3 directement au sein des complexes immuns IgA1-dg/IgG anti-glycane.

Bandes	MM	chaîne	Produits de C3 déduits	Probabilité (%)	Couverture (%)	ICA	Serum seul
A	120 kDa	α	Complete α chain	100	3.5	Yes	No
B	110 kDa	α	C3b α chain	89	0.54	Yes	No
C	76 kDa	β	C3, C3b, C3c, iC3b β chain	100	15	Yes	Yes
D	68 kDa	α	iC3b	100	8.4	Yes	No
E	40-43 kDa	α	iC3b + iC3c + C3dg	100	21	Yes	No
F	30 kDa	α	C3d	90	0.84	Yes	No

Tableau 6. Identification par spectrométrie de masse des fragments de C3 présents au sein des fractions de très haut poids moléculaire. Le pourcentage de couverture est exprimé sur la base de la séquence entière de C3 (chaînes α et β comprises).

2.3. Discussion générale

Cette thèse explore de multiples mécanismes inflammatoires impliqués dans la genèse et l'entretien de la NIGa. L'exploration du rôle de l'immunité cellulaire a été envisagée sous 2 axes différents : le possible rôle des monocytes macrophages (voire des plaquettes) sous l'influence d'une mutation du récepteur aux IgA (FcαRI ou CD89) et l'exploration de l'implication potentielle des lymphocytes T et de leur rôle d'orientation de la réponse immunitaire. L'immunité humorale est un acteur majeur de la pathogénie de la maladie et cet aspect a été abordé par l'exploration de l'activation du complément par les complexes immuns dans un modèle représentatif *in vitro*.

L'étude du rôle de la mutation 844A->G suit les recommandations émises par l'American Society of Nephrology pour définir des bonnes pratiques pour la réalisation d'études portant sur le rôle des polymorphismes génétiques au cours des maladies rénales(175). Ces recommandations font suite à la définition de critères de qualité méthodologique par le journal Nature Genetics en 1999.

La première condition préalable est celle de l'existence d'un sens physiopathologique à l'étude, c'est-à-dire qu'il existe des arguments pour penser que le gène d'intérêt est impliqué dans les mécanismes de la maladie. Il y a effectivement deux voies potentielles d'implication du CD89 au cours de la maladie de Berger (cf. supra) à savoir un rôle dans la constitution des complexes immuns circulants par le clivage de la portion extracellulaire du récepteur et sa liaison aux IgA polymériques complexées et d'autre part un rôle de médiation pro-inflammatoire médiée par certaines cellules circulantes (monocytes-macrophages, plaquettes) en réponse aux dépôts mésangiaux d'IgA. Ce deuxième mécanisme constitue la base de l'hypothèse de notre étude et est étayé par plusieurs travaux concernant notamment le rôle des monocytes dans la réponse inflammatoire locale au cours de la maladie.

De la même manière, ces recommandations portent sur la nécessité de la description préalable de l'effet du polymorphisme d'intérêt sur la fonction de la protéine. Le travail de Wu et coll.(176) porte sur les différences fonctionnelles du récepteur en fonction de la présence ou non de la mutation 844 A->G. Il met en évidence par une étude de transfection du gène muté dans une lignée cellulaire immortalisée des différences phénotypiques dans le sens d'une exacerbation de la

réponse pro-inflammatoire (mobilisation du calcium intracellulaire, sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, dégranulation) en réponse à une stimulation par les IgA. Ces différences *in vitro* sont confirmés *ex vivo* par l'étude de la réponse inflammatoire de polynucléaires neutrophiles issus de patients homozygotes pour l'allèle A en comparaison avec des patients homozygotes pour l'allèle G. De la même manière, la sécrétion d'Interleukine 6 (IL-6) était exacerbée en réponse à une stimulation par les IgA chez les patients homozygotes mutés. Il n'y a pas d'autres études portant sur ce polymorphisme et notamment pas d'étude fonctionnelle portant sur les monocytes-macrophages ou les plaquettes potentiellement impliquées dans la maladie de Berger. Ces résultats obtenus par Wu et coll. confirmaient le rôle fonctionnel de ce polymorphisme.

Le second critère de qualité méthodologique concerne la taille des groupes étudiés et la puissance de l'étude. L'effectif de notre étude s'appuie sur la cohorte de patients atteints de NIgA caucasiens parmi les plus importantes sur le plan international et sur une collection biologique de même ampleur. Cette taille permet de mettre en évidence en théorie de faibles différences de fréquence allélique avec une puissance suffisante. De plus, il s'agit d'une cohorte exhaustive comprenant des patients consécutifs avec une définition objective de la maladie. La stricte négativité de cette étude permet donc de conclure avec une sécurité suffisante à l'absence d'effet de ce polymorphisme dans notre population. La troisième recommandation concerne les comparaisons multiples et l'ajustement statistique nécessaire dans ce cas. Ce point ne concerne pas cette étude puisqu'un seul polymorphisme a été étudié, limitant le risque de conclure à tort à une différence par inflation du risque α . Enfin, les derniers critères concernent les études pour lesquelles une différence est mise en évidence ce qui n'est pas le cas ici.

Notre étude comporte certaines limites. Au cours de notre travail, seuls les sujets caucasiens ont été retenus pour l'analyse car le contexte génétique déterminé par l'origine ethnique est très important pour l'interprétation. Par exemple, des différences de déterminisme de certains polymorphismes du gène C1GALT1 ont déjà été notées entre populations caucasienne et asiatique (mutation 1365 G->A cliniquement déterminante au cours d'une étude européenne alors qu'elle ne l'est pas au cours d'une étude chinoise)(95, 96). Nos résultats ne peuvent donc pas être extrapolés directement à d'autres populations pour lesquelles l'étude reste nécessaire.

La seconde limite est une hétérogénéité du suivi très marquée liée à un nombre de perdus de vue relativement important expliquée par la faible symptomatologie de la

maladie. Cependant, les analyses effectuées permettent de limiter l'impact de ces différences de suivi en censurant les patients après la date du dernier suivi.

Plusieurs polymorphismes des récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines ont été impliqués dans la susceptibilité envers plusieurs maladies auto-immunes inflammatoires (lupus érythémateux systémique essentiellement, mais aussi myasthénie, syndrome de Guillain-Barré, vascularite à ANCA). Ces polymorphismes sont décrits essentiellement avec les gènes codant pour les Fc γ R : FCGR2A, FCGR2B, FCGR2C, FCG3A, FCGR3B. La majorité de ces mutations sont de type mononucléotidiques (SNP : single nucleotide polymorphism) mais plusieurs d'entre eux concernent des variations du nombre de copies du gène(177). Deux polymorphismes des Fc γ R ont été associés à une évolution plus sévère de la NIGa au cours d'une étude japonaise: FCGR2A 131R et FCGR3A 176V(170). Ce travail comportait cependant certaines limites méthodologiques (faibles effectifs, sévérité de la maladie uniquement affirmée par un score histologique et absence d'ajustement du niveau de significativité compte tenu de comparaisons multiples) et concerne un type de population différent. Elle montre toutefois la possibilité de la médiation inflammatoire locale par certains leucocytes circulants via les récepteurs aux immunoglobulines.

De la même manière, plusieurs polymorphismes concernant des gènes impliqués dans l'inflammation ont montré leur rôle concernant le risque de développer la maladie mais surtout concernant un pronostic plus sévère. Ces principaux gènes sont le récepteur aux chimiokines CC de type 5 (CCR5, sévérité)(178), le Transforming Growth Factor β 1 (TGF β 1, sévérité)(179), MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1, sévérité)(153), IL5RA (chaîne α du récepteur de l'Interleukine 5, susceptibilité), et TNFRSF6B (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily 6b, susceptibilité)(172). Plus récemment, les GWAS ont affirmé le rôle des gènes issus du complexe majeur d'histocompatibilité et l'une d'entre elle a montré l'influence du polymorphisme du gène codant APRIL (TNFSF13), capable *in vivo* d'orienter anormalement les lymphocytes B muqueux vers le secteur systémique, de gènes impliqués dans l'immunité muqueuse (OSM, LIF) et de la délétion de CFHR1/3, impliqués dans la régulation de la voie alterne du complément(180). L'ensemble de ces éléments montre le caractère polygénique du déterminisme de la sévérité de la NIGa, et qu'une partie majeure de ce déterminisme dépend de gènes impliqués dans l'inflammation.

Plusieurs polymorphismes du Fc α RI ont été décrits dans différentes populations. Narita et coll. ont décrit trois polymorphismes mononucléotidiques du promoteur et de la région 5'UTR du gène FCAR sans toutefois pouvoir l'associer ni à un risque plus important de développer la NIgA ni à un pronostic plus sévère(181). Le polymorphisme 324 A->G est associé un risque plus important de développer une maladie inflammatoire, la périodontite agressive et les SNP 311CC et 342 CC sont associés à une évolution plus sévère des patients atteints d'hépatite C(182, 183).

Le polymorphisme du FCAR étudié dans notre étude 844 A->G est le premier à avoir été associé à une différence fonctionnelle du récepteur ce qui rendait nécessaire la réalisation de cette étude. Son résultat négatif n'exclut pas la possibilité qu'un autre polymorphisme de ce gène soit impliqué dans la NIgA ou que ce même polymorphisme ait un rôle au sein d'autres populations. Le rôle du CD89 dans la médiation inflammatoire locale au cours de la NIgA reste donc encore hypothétique et les mécanismes de la réponse locale au dépôt mésangiaux d'IgA restent à l'heure actuelle obscurs.

L'étude d'évaluation du rôle des Tregs et du profil d'expression génique des cellules mononucléées du sang périphérique est globalement négative dans le sens où aucune différence n'a pu être montrée concernant la quantité de cellules Tregs dans le compartiment sanguin et concernant l'expression de gènes prototypiques de sous populations T. Une tendance en faveur d'un déficit de régulation après activation est toutefois notable, puisqu'elle participe d'une expression commune plus faible de gènes exprimés par les Tregs, FoxP3 (facteur transcriptionnel), IL10 et TGF β (cytokines). Il n'est donc pas exclu qu'il existe un déficit fonctionnel du sous-groupe Tregs, alors que leur présence quantitative dans le sang n'était pas différente des volontaires sains.

C'est une étude prospective pour laquelle les analyses ont été réalisées de façon simultanées entre patients et volontaires, rendant la comparaison entre groupes plus fiable.

Cette étude présente des limites. Tout d'abord l'effectif relativement faible est une contrainte consécutive à l'exigence du mode de recrutement prospectif, rendu nécessaire par la nécessité d'une extraction, d'une mise en culture et d'un recueil d'ARN immédiats. D'autre part, les critères d'inclusion ne permettaient de retenir que les patients ne présentant pas d'altération du DFGe, afin de se prémunir contre le risque de différences liées à la seule insuffisance rénale, non spécifique de la NIgA.

Mais cette précaution a généré un groupe de patients présentant une maladie très peu active, rendant moins probable la mise en évidence de différences avec les volontaires. La tendance en faveur d'un déficit de régulation pourrait être plus marquée chez des patients d'expression clinique plus sévère, appelant la réalisation d'une nouvelle étude.

Peu d'études ont évalué le rôle des Tregs au cours de la NIGa. Une seule présentait une méthodologie comparable, à savoir l'évaluation de la fréquence de ce sous-groupe cellulaire dans le sang périphérique et d'autre part le profil d'expression génique de ces sous populations. Elle montre au sein d'un effectif de 63 patients la sous-représentation des populations Tregs associée à une augmentation des populations Th17 par rapport à un groupe de volontaires sains(184). De façon comparable, l'expression génique de FoxP3 était diminuée alors que l'expression de ROR γ T et IL17A était augmentée, en faveur d'une balance proTh17, et donc propice à l'inflammation et à l'autoimmunité. Cette étude incluait des patients plus sévères, comportant des formes très protéinuriques et présentant une altération de la fonction rénale, expliquant une différence plus nette. Une seconde étude dans une population pédiatrique retrouvait également un déficit fonctionnel Tregs, marqué par une diminution d'expression génique de FoxP3 et de TGF β aussi bien au cours du purpura rhumatoïde qu'au cours de la NIGa(185). Enfin, une dernière étude montrait une expression génique plus marquée des Th17 et Th22 (186)

Les arguments en faveur d'un déficit fonctionnel des Tregs est donc probable au cours de la NIGa, potentiellement responsable de la survie de clones auto-réactifs (par exemple des lignées de lymphocytes B produisant les anticorps anti-glycanes) et de l'orientation pro-inflammatoire de la réponse aux dépôts mésangiaux.

La réponse pro-inflammatoire glomérulaire est également sous la dépendance de facteurs humoraux. Les complexes immuns à IgA1 sont les premiers acteurs humoraux à l'origine de cette réponse inflammatoire glomérulaire, même si le mécanisme sous-tendant cette relation reste obscur. Le rôle des récepteurs, notamment du CD89 et du récepteur à la transferrine (CD71) y est possible. Un autre acteur majeur de cette interface complexe immuns/inflammation glomérulaire est l'activation du complément.

Au cours de cette étude in vitro, au moyen d'un modèle de complexes immuns représentatif de ceux impliqués au cours de la NIGa, à savoir une IgA1-dg polymérique et une IgG anti- IgA1-dg (anti-glycane), nous avons montré que (i) un

facteur sérique était nécessaire à l'acquisition du pouvoir stimulant des complexes immuns sur les cellules mésangiales de façon dose-dépendante et (ii) que ces complexes immuns avaient la capacité d'activer et de lier de façon non covalente en phase soluble le C3. Cette activation aboutissait à la présence de produits de dégradation du C3 issus de l'action du facteur I (C3c, iC3b, C3d, C3dg). Cette activation pourrait témoigner de la constitution d'une C3 convertase au sein des complexes, augmentant la taille de ces derniers. Après dépôt glomérulaire, le C3 activé pourrait être responsable de l'activation mésangiale, à l'origine de la prolifération cellulaire et de la transition vers un phénotype sécrétant les éléments de matrice mésangiale. La génération de C3a, une anaphylatoxine issue de l'activation de C3, est un acteur possible de cette médiation(187). La NIGa partage de nombreuses caractéristiques histopathologiques avec la néphropathie à dépôts isolés de C3, au cours de laquelle typiquement le seul dépôt de C3 est présent (les immunoglobulines sont en règle absentes des dépôts) en association à des lésions histologiques comprenant un épaississement et une prolifération mésangiaux(188). De la même manière qu'au cours de la NIGa, le marquage de C5b-9 est fréquent. Le mécanisme de cette néphropathie associe des anomalies de gènes de régulation de la voie alterne du complément avec un caractère familial fréquent (par exemple la mutation de CFHR5) et la présence fréquente d'un facteur néphritique (C3Nef), qui est un auto-anticorps stabilisant la C3 convertase de la voie alterne. Ces mécanismes concernent uniquement l'activation excessive de la voie alterne et qualifie l'activation du C3 comme un médiateur possiblement suffisant de l'induction de l'inflammation glomérulaire, via le C3a et/ou le C5b-9 sublytique. La présence de C3 activé au sein de complexes immuns à IgA1 et un argument en faveur du rôle de la voie alterne dans le déterminisme de la NIGa.

Ce résultat corrobore la mise en évidence récente du rôle protecteur de la délétion de CFHR1/3 vis-à-vis de l'occurrence de NIGa au cours d'une GWAS internationale, dont le mécanisme pourrait être un surcroît d'efficacité du facteur H en l'absence de CFHR1 et CFHR3(122, 189).

Ces travaux mettent donc en perspective différents acteurs de la médiation inflammatoire au cours de la NIGa, comprenant le rôle potentiel des monocytes macrophages et de leur récepteur aux IgA (CD89), le rôle de la polarisation des lymphocytes T, en particulier celui des Tregs et enfin une médiation humorale par l'activation du complément au sein des complexes immuns.

Ces travaux ouvrent la voie à de nouveaux projets. Le rôle des sous-populations lymphocytaires est une voie intéressante, puisqu'elle détermine en amont les processus d'auto-immunité et d'inflammation. L'étude de nouvelles sous populations lymphocytaires T et B, ainsi qu'une évaluation au cours de formes plus sévères de la maladie est une voie possible de prolongement de ce travail. Le rôle du complément au cours de la maladie fait intervenir de nombreux acteurs, que ce soit l'activation en phase soluble du complément, mais aussi l'activation in situ, intraglomérulaire. De ce point de vue, les cellules mésangiales et les podocytes ont la capacité d'influer sur la balance activation/régulation, puisque ces cellules ont la capacité d'exprimer le C3 de manière inductible dans des conditions pro-inflammatoires (en présence de $TNF\alpha$), mais aussi le facteur H, DAF, MCP. L'étude de la réponse cellulaire mésangiale au C3 activé, en présence d'IgA1-dg seule ou sous forme de complexes immuns en modulant l'expression du facteur H par transfection de silenciers est un projet qui permettrait de mieux comprendre la réponse cellulaire au cours de la NIGa. Le rôle des protéines CFHR1 et 3 nécessite d'être étudié de façon plus avancée, en évaluant l'effet de la délétion de leurs gènes sur la sévérité de la maladie (étude en polymorphisme du nombre de copies). Le rôle du C5b-9 nécessite d'être évalué, compte-tenu de l'existence de thérapeutiques anti-C5 efficaces disponibles (eculizumab).

2.4. Conclusion générale

En conclusion, la Néphropathie à IgA primitive est une entité nosologique faisant intervenir de nombreux mécanismes du domaine de l'inflammation, qu'ils soient cellulaires (monocytes/macrophages, lymphocytes T et B) ou humoraux (IgA1-dg, IgG anti-IgA1-dg, activation du complément). Ces mécanismes interviennent en phase soluble (complexes immuns circulants) et en phase solide (dépôts d'immunoglobulines et de complément, déterminant l'inflammation glomérulaire et parenchymateuse rénale).

Le présent travail visait à évaluer le rôle propre de certains de ces acteurs. Le SNP 844 A->G, pourtant responsable d'une modification fonctionnelle du CD89 au sein des monocytes/macrophages et des polynucléaires, ne semble pas impliqué ni dans le déterminisme de la maladie ni dans sa sévérité. Le déficit de régulation immunitaire, suggéré par une tendance d'expression plus faible de gènes prototypiques Tregs

(FoxP3, IL10, TGF β) dans notre étude, malgré un effectif faible et une expression clinique peu sévère peut être impliqué dans la direction pro-inflammatoire et pro-auto-immunité. Cette tendance semble être confirmée dans d'autres études méthodologiquement comparables. Enfin, la médiation humorale fait intervenir les immunoglobulines, au premier rang desquelles les IgA1, possiblement complexées par des IgG, mais aussi le complément par l'activation de la voie alterne et de la voie des lectines. Notre étude a permis de mettre en évidence la présence de formes issues de l'activation de C3 au sein des complexes immuns au moyen d'un modèle in vitro.

Références

1. Bright R. Reports of medical cases. London: Longman, Orme Rees; 1827.
2. Addis T. Determination of the Extent and Nature of the Renal Lesion in Bright's Disease. California state journal of medicine. 1922;20(3):90-3. Epub 1922/03/01.
3. EV W. Handbuch der Krankheiten der Harnapparatus. Leipzig: CW Vogel; 1882.
4. Heptinstall RH, Joeke AM. Focal glomerulonephritis. A study based on renal biopsies. The Quarterly journal of medicine. 1959;28:329-46. Epub 1959/07/01.
5. Bates RC, Jennings RB, Earle DP. Acute nephritis unrelated to group A hemolytic streptococcus infection: report of ten cases. The American journal of medicine. 1957;23(4):510-28. Epub 1957/10/01.
6. Galle P, Berger J. [Intercapillary "fibrinoid" deposits]. Journal d'urologie et de nephrologie. 1962;68:123-7. Epub 1962/01/01.
7. Berger J, Hinglais N. [Intercapillary deposits of IgA-IgG]. Journal d'urologie et de nephrologie. 1968;74(9):694-5. Epub 1968/09/01. Les ddpots intercapillaires d'IgA-IgG.
8. Berger J. IgA glomerular deposits in renal disease. Transplantation proceedings. 1969;1(4):939-44. Epub 1969/12/01.
9. Levy M, Beaufile H, Gubler MC, Habib R. Idiopathic recurrent macroscopic hematuria and mesangial IgA-IgG deposits in children (Berger's disease). Clinical nephrology. 1972;1(2):63-9. Epub 1972/03/01.
10. McEnery PT, McAdams AJ, West CD. Glomerular morphology, natural history and treatment of children with IgA-IgG mesangial nephropathy. Perspectives in nephrology and hypertension. 1973;1 Pt 1:305-20. Epub 1973/01/01.
11. Davies DR, Tighe JR, Jones NF, Brown GW. Recurrent haematuria and mesangial IgA deposition. Journal of clinical pathology. 1973;26(9):672-7. Epub 1973/09/01.
12. Maintz J, Elema JD, Henningsen B, Blaker F, Bunger P. [A special form of chronic glomerulonephritis: IgA-IgG nephropathy]. Dtsch Med Wochenschr. 1972;97(41):1527-33. Epub 1972/10/13. Eine Sonderform der chronischen Glomerulonephritis: IgA-IgG-Nephropathie.
13. Ueda Y, Sakai O, Yamagata M, Kitajima T, Kawamura K. IgA glomerulonephritis in Japan. Contributions to nephrology. 1975;4:37-47. Epub 1975/01/01.
14. McGrogan A, Franssen CF, de Vries CS. The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature. Nephrology, dialysis, transplantation :

official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 2011;26(2):414-30. Epub 2010/11/12.

15. Varis J, Rantala I, Pasternack A, Oksa H, Jantti M, Paunu ES, et al. Immunoglobulin and complement deposition in glomeruli of 756 subjects who had committed suicide or met with a violent death. *Journal of clinical pathology*. 1993;46(7):607-10. Epub 1993/07/01.
16. Suganuma T. [Glomerular IgA deposits in an autopsy study]. *Nihon Jinzo Gakkai shi*. 1994;36(7):813-22. Epub 1994/07/01.
17. Moriyama T, Nitta K, Suzuki K, Honda K, Horita S, Uchida K, et al. Latent IgA deposition from donor kidney is the major risk factor for recurrent IgA nephropathy in renal transplantation. *Clinical transplantation*. 2005;19 Suppl 14:41-8. Epub 2005/06/16.
18. D'Amico G. Natural history of idiopathic IgA nephropathy and factors predictive of disease outcome. *Seminars in nephrology*. 2004;24(3):179-96. Epub 2004/05/25.
19. Alamartine E, Sabatier JC, Guerin C, Berliet JM, Berthoux F. Prognostic factors in mesangial IgA glomerulonephritis: an extensive study with univariate and multivariate analyses. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1991;18(1):12-9. Epub 1991/07/01.
20. Rapport REIN. 2012.
21. Berthoux FC, Mohey H, Afiani A. Natural history of primary IgA nephropathy. *Seminars in nephrology*. 2008;28(1):4-9. Epub 2008/01/29.
22. Moldoveanu Z, Wyatt RJ, Lee JY, Tomana M, Julian BA, Mestecky J, et al. Patients with IgA nephropathy have increased serum galactose-deficient IgA1 levels. *Kidney international*. 2007;71(11):1148-54. Epub 2007/03/08.
23. McCoy RC, Abramowsky CR, Tisher CC. IgA nephropathy. *The American journal of pathology*. 1974;76(1):123-44. Epub 1974/07/01.
24. Haas M. Histology and immunohistology of IgA nephropathy. *Journal of nephrology*. 2005;18(6):676-80. Epub 2005/12/17.
25. El Karoui K, Hill GS, Karras A, Moulonguet L, Caudwell V, Loupy A, et al. Focal segmental glomerulosclerosis plays a major role in the progression of IgA nephropathy. II. Light microscopic and clinical studies. *Kidney international*. 2011;79(6):643-54. Epub 2010/12/24.
26. Hill GS, Karoui KE, Karras A, Mandet C, Duong Van Huyen JP, Nochy D, et al. Focal segmental glomerulosclerosis plays a major role in the progression of IgA nephropathy. I. Immunohistochemical studies. *Kidney international*. 2011;79(6):635-42. Epub 2010/12/17.

27. El Karoui K, Hill GS, Karras A, Jacquot C, Moulonguet L, Kourilsky O, et al. A clinicopathologic study of thrombotic microangiopathy in IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2012;23(1):137-48. Epub 2011/11/05.
28. Haas M. Histologic subclassification of IgA nephropathy: a clinicopathologic study of 244 cases. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1997;29(6):829-42. Epub 1997/06/01.
29. Meadow SR, Glasgow EF, White RH, Moncrieff MW, Cameron JS, Ogg CS. Schonlein-Henoch nephritis. *The Quarterly journal of medicine*. 1972;41(163):241-58. Epub 1972/07/01.
30. Lee SM, Rao VM, Franklin WA, Schiffer MS, Aronson AJ, Spargo BH, et al. IgA nephropathy: morphologic predictors of progressive renal disease. *Human pathology*. 1982;13(4):314-22. Epub 1982/04/01.
31. Alamartine E, Sabatier JC, Berthoux FC. Comparison of pathological lesions on repeated renal biopsies in 73 patients with primary IgA glomerulonephritis: value of quantitative scoring and approach to final prognosis. *Clinical nephrology*. 1990;34(2):45-51. Epub 1990/08/01.
32. Roberts IS, Cook HT, Troyanov S, Alpers CE, Amore A, Barratt J, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility. *Kidney international*. 2009;76(5):546-56. Epub 2009/07/03.
33. Cattran DC, Coppo R, Cook HT, Feehally J, Roberts IS, Troyanov S, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. *Kidney international*. 2009;76(5):534-45. Epub 2009/07/03.
34. Katafuchi R, Ninomiya T, Nagata M, Mitsuiki K, Hirakata H. Validation study of oxford classification of IgA nephropathy: the significance of extracapillary proliferation. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2011;6(12):2806-13. Epub 2011/12/14.
35. Shi SF, Wang SX, Jiang L, Lv JC, Liu LJ, Chen YQ, et al. Pathologic predictors of renal outcome and therapeutic efficacy in IgA nephropathy: validation of the oxford classification. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2011;6(9):2175-84. Epub 2011/08/20.
36. Alamartine E, Sauron C, Laurent B, Sury A, Seffert A, Mariat C. The use of the Oxford classification of IgA nephropathy to predict renal survival. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2011;6(10):2384-8. Epub 2011/09/03.

37. Herzenberg AM, Fogo AB, Reich HN, Troyanov S, Bavbek N, Massat AE, et al. Validation of the Oxford classification of IgA nephropathy. *Kidney international*. 2011;80(3):310-7. Epub 2011/05/06.
38. Nephrology ISo. KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis. *Kidney international*. 2012;2(2):139-274.
39. Coppo R, Peruzzi L, Amore A, Piccoli A, Cochat P, Stone R, et al. IgACE: a placebo-controlled, randomized trial of angiotensin-converting enzyme inhibitors in children and young people with IgA nephropathy and moderate proteinuria. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18(6):1880-8. Epub 2007/05/22.
40. Li PK, Leung CB, Chow KM, Cheng YL, Fung SK, Mak SK, et al. Hong Kong study using valsartan in IgA nephropathy (HKVIN): a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2006;47(5):751-60. Epub 2006/04/25.
41. Praga M, Gutierrez E, Gonzalez E, Morales E, Hernandez E. Treatment of IgA nephropathy with ACE inhibitors: a randomized and controlled trial. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2003;14(6):1578-83. Epub 2003/05/23.
42. Pozzi C, Bolasco PG, Fogazzi GB, Andrulli S, Altieri P, Ponticelli C, et al. Corticosteroids in IgA nephropathy: a randomised controlled trial. *Lancet*. 1999;353(9156):883-7. Epub 1999/03/27.
43. Manno C, Torres DD, Rossini M, Pesce F, Schena FP. Randomized controlled clinical trial of corticosteroids plus ACE-inhibitors with long-term follow-up in proteinuric IgA nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2009;24(12):3694-701. Epub 2009/07/25.
44. Lv J, Zhang H, Chen Y, Li G, Jiang L, Singh AK, et al. Combination therapy of prednisone and ACE inhibitor versus ACE-inhibitor therapy alone in patients with IgA nephropathy: a randomized controlled trial. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2009;53(1):26-32. Epub 2008/10/22.
45. Hogg RJ, Lee J, Nardelli N, Julian BA, Cattran D, Waldo B, et al. Clinical trial to evaluate omega-3 fatty acids and alternate day prednisone in patients with IgA nephropathy: report from the Southwest Pediatric Nephrology Study Group. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2006;1(3):467-74. Epub 2007/08/21.
46. Katafuchi R, Ikeda K, Mizumasa T, Tanaka H, Ando T, Yanase T, et al. Controlled, prospective trial of steroid treatment in IgA nephropathy: a limitation of low-dose

prednisolone therapy. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation. 2003;41(5):972-83. Epub 2003/05/02.

47. Strippoli GF, Maione A, Schena FP, Tognoni G, Craig JC. IgA nephropathy: a disease in search of a large-scale clinical trial to reliably inform practice. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation. 2009;53(1):5-8. Epub 2008/12/23.

48. Ballardie FW, Roberts IS. Controlled prospective trial of prednisolone and cytotoxics in progressive IgA nephropathy. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 2002;13(1):142-8. Epub 2001/12/26.

49. Yoshikawa N, Ito H, Sakai T, Takekoshi Y, Honda M, Awazu M, et al. A controlled trial of combined therapy for newly diagnosed severe childhood IgA nephropathy. The Japanese Pediatric IgA Nephropathy Treatment Study Group. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 1999;10(1):101-9. Epub 1999/01/16.

50. Pozzi C, Andrulli S, Pani A, Scaini P, Del Vecchio L, Fogazzi G, et al. Addition of azathioprine to corticosteroids does not benefit patients with IgA nephropathy. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 2010;21(10):1783-90. Epub 2010/07/17.

51. Maes BD, Oyen R, Claes K, Evenepoel P, Kuypers D, Vanwalleghem J, et al. Mycophenolate mofetil in IgA nephropathy: results of a 3-year prospective placebo-controlled randomized study. Kidney international. 2004;65(5):1842-9. Epub 2004/04/17.

52. Frisch G, Lin J, Rosenstock J, Markowitz G, D'Agati V, Radhakrishnan J, et al. Mycophenolate mofetil (MMF) vs placebo in patients with moderately advanced IgA nephropathy: a double-blind randomized controlled trial. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 2005;20(10):2139-45. Epub 2005/07/21.

53. Tang S, Leung JC, Chan LY, Lui YH, Tang CS, Kan CH, et al. Mycophenolate mofetil alleviates persistent proteinuria in IgA nephropathy. Kidney international. 2005;68(2):802-12. Epub 2005/07/15.

54. Donadio JV, Jr., Grande JP, Bergstralh EJ, Dart RA, Larson TS, Spencer DC. The long-term outcome of patients with IgA nephropathy treated with fish oil in a controlled trial. Mayo Nephrology Collaborative Group. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 1999;10(8):1772-7. Epub 1999/08/14.

55. Ferraro PM, Ferraccioli GF, Gambaro G, Fulignati P, Costanzi S. Combined treatment with renin-angiotensin system blockers and polyunsaturated fatty acids in proteinuric IgA nephropathy: a randomized controlled trial. Nephrology, dialysis, transplantation : official

publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 2009;24(1):156-60. Epub 2008/08/08.

56. Bennett WM, Walker RG, Kincaid-Smith P. Treatment of IgA nephropathy with eicosapentanoic acid (EPA): a two-year prospective trial. *Clinical nephrology*. 1989;31(3):128-31. Epub 1989/03/01.

57. Pettersson EE, Rekola S, Berglund L, Sundqvist KG, Angelin B, Diczfalusy U, et al. Treatment of IgA nephropathy with omega-3-polyunsaturated fatty acids: a prospective, double-blind, randomized study. *Clinical nephrology*. 1994;41(4):183-90. Epub 1994/04/01.

58. Miller ER, 3rd, Juraschek SP, Appel LJ, Madala M, Anderson CA, Bleys J, et al. The effect of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on urine protein excretion and kidney function: meta-analysis of clinical trials. *The American journal of clinical nutrition*. 2009;89(6):1937-45. Epub 2009/05/01.

59. Taji Y, Kuwahara T, Shikata S, Morimoto T. Meta-analysis of antiplatelet therapy for IgA nephropathy. *Clinical and experimental nephrology*. 2006;10(4):268-73. Epub 2006/12/23.

60. Hotta O, Miyazaki M, Furuta T, Tomioka S, Chiba S, Horigome I, et al. Tonsillectomy and steroid pulse therapy significantly impact on clinical remission in patients with IgA nephropathy. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2001;38(4):736-43. Epub 2001/09/29.

61. Xie Y, Nishi S, Ueno M, Imai N, Sakatsume M, Narita I, et al. The efficacy of tonsillectomy on long-term renal survival in patients with IgA nephropathy. *Kidney international*. 2003;63(5):1861-7. Epub 2003/04/05.

62. Komatsu H, Fujimoto S, Hara S, Sato Y, Yamada K, Kitamura K. Effect of tonsillectomy plus steroid pulse therapy on clinical remission of IgA nephropathy: a controlled study. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2008;3(5):1301-7. Epub 2008/05/30.

63. Abe T, Kida H, Yoshimura M, Yokoyama H, Koshino Y, Tomosugi N, et al. Participation of extracapillary lesions (ECL) in progression of IgA nephropathy. *Clinical nephrology*. 1986;25(1):37-41. Epub 1986/01/01.

64. Tumlin JA, Lohavichan V, Hennigar R. Crescentic, proliferative IgA nephropathy: clinical and histological response to methylprednisolone and intravenous cyclophosphamide. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2003;18(7):1321-9. Epub 2003/06/17.

65. Tang Z, Wu Y, Wang QW, Yu YS, Hu WX, Yao XD, et al. Idiopathic IgA nephropathy with diffuse crescent formation. *American journal of nephrology*. 2002;22(5-6):480-6. Epub 2002/10/17.
66. Pankhurst T, Lepenies J, Nightingale P, Howie AJ, Adu D, Harper L. Vasculitic IgA nephropathy: prognosis and outcome. *Nephron Clinical practice*. 2009;112(1):c16-24. Epub 2009/04/04.
67. Kim SM, Moon KC, Oh KH, Joo KW, Kim YS, Ahn C, et al. Clinicopathologic characteristics of IgA nephropathy with steroid-responsive nephrotic syndrome. *Journal of Korean medical science*. 2009;24 Suppl:S44-9. Epub 2009/02/12.
68. Berger J, Yaneva H, Nabarra B, Barbanel C. Recurrence of mesangial deposition of IgA after renal transplantation. *Kidney international*. 1975;7(4):232-41. Epub 1975/04/01.
69. Moroni G, Longhi S, Quaglini S, Gallelli B, Banfi G, Montagnino G, et al. The long-term outcome of renal transplantation of IgA nephropathy and the impact of recurrence on graft survival. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2013;28(5):1305-14. Epub 2012/12/12.
70. Frohnert PP, Donadio JV, Jr., Velosa JA, Holley KE, Sterioff S. The fate of renal transplants in patients with IgA nephropathy. *Clinical transplantation*. 1997;11(2):127-33. Epub 1997/04/01.
71. Bumgardner GL, Amend WC, Ascher NL, Vincenti FG. Single-center long-term results of renal transplantation for IgA nephropathy. *Transplantation*. 1998;65(8):1053-60. Epub 1998/05/16.
72. Kessler M, Hiesse C, Hestin D, Mayeux D, Boubenider K, Charpentier B. Recurrence of immunoglobulin A nephropathy after renal transplantation in the cyclosporine era. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1996;28(1):99-104. Epub 1996/07/01.
73. Kim YS, Moon JI, Jeong HJ, Kim MS, Kim SI, Choi KH, et al. Live donor renal allograft in end-stage renal failure patients from immunoglobulin A nephropathy. *Transplantation*. 2001;71(2):233-8. Epub 2001/02/24.
74. Odum J, Peh CA, Clarkson AR, Bannister KM, Seymour AE, Gillis D, et al. Recurrent mesangial IgA nephritis following renal transplantation. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 1994;9(3):309-12. Epub 1994/01/01.

75. Berthoux F, El Deeb S, Mariat C, Diconne E, Laurent B, Thibaudin L. Antithymocyte globulin (ATG) induction therapy and disease recurrence in renal transplant recipients with primary IgA nephropathy. *Transplantation*. 2008;85(10):1505-7. Epub 2008/05/24.
76. Clayton P, McDonald S, Chadban S. Steroids and recurrent IgA nephropathy after kidney transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2011;11(8):1645-9. Epub 2011/07/30.
77. Suzuki H, Kiryluk K, Novak J, Moldoveanu Z, Herr AB, Renfrow MB, et al. The pathophysiology of IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(10):1795-803. Epub 2011/09/29.
78. Narita I, Gejyo F. Pathogenetic significance of aberrant glycosylation of IgA1 in IgA nephropathy. *Clinical and experimental nephrology*. 2008;12(5):332-8. Epub 2008/04/12.
79. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annual review of immunology*. 2007;25:21-50. Epub 2006/10/13.
80. Ju T, Brewer K, D'Souza A, Cummings RD, Canfield WM. Cloning and expression of human core 1 beta1,3-galactosyltransferase. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(1):178-86. Epub 2001/10/26.
81. Iwasaki H, Zhang Y, Tachibana K, Gotoh M, Kikuchi N, Kwon YD, et al. Initiation of O-glycan synthesis in IgA1 hinge region is determined by a single enzyme, UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(8):5613-21. Epub 2002/11/20.
82. Woof JM, Kerr MA. The function of immunoglobulin A in immunity. *The Journal of pathology*. 2006;208(2):270-82. Epub 2005/12/20.
83. Gomes MM, Wall SB, Takahashi K, Novak J, Renfrow MB, Herr AB. Analysis of IgA1 N-glycosylation and its contribution to Fc α RI binding. *Biochemistry*. 2008;47(43):11285-99. Epub 2008/10/02.
84. Woof JM, Kerr MA. IgA function--variations on a theme. *Immunology*. 2004;113(2):175-7. Epub 2004/09/24.
85. Mestecky J, Zikan J, Butler WT. Immunoglobulin M and secretory immunoglobulin A: presence of a common polypeptide chain different from light chains. *Science*. 1971;171(3976):1163-5. Epub 1971/03/19.
86. Yoo EM, Morrison SL. IgA: an immune glycoprotein. *Clin Immunol*. 2005;116(1):3-10. Epub 2005/06/01.

87. Roos A, Bouwman LH, van Gijlswijk-Janssen DJ, Faber-Krol MC, Stahl GL, Daha MR. Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *J Immunol.* 2001;167(5):2861-8. Epub 2001/08/18.
88. Monteiro RC. Role of IgA and IgA fc receptors in inflammation. *Journal of clinical immunology.* 2010;30(1):1-9. Epub 2009/10/17.
89. Moura IC, Arcos-Fajardo M, Gdoura A, Leroy V, Sadaka C, Mahlaoui N, et al. Engagement of transferrin receptor by polymeric IgA1: evidence for a positive feedback loop involving increased receptor expression and mesangial cell proliferation in IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2005;16(9):2667-76. Epub 2005/07/01.
90. Moura IC, Arcos-Fajardo M, Sadaka C, Leroy V, Benhamou M, Novak J, et al. Glycosylation and size of IgA1 are essential for interaction with mesangial transferrin receptor in IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2004;15(3):622-34. Epub 2004/02/24.
91. Tomana M, Matousovic K, Julian BA, Radl J, Konecny K, Mestecky J. Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG. *Kidney international.* 1997;52(2):509-16. Epub 1997/08/01.
92. Allen AC, Harper SJ, Feehally J. Galactosylation of N- and O-linked carbohydrate moieties of IgA1 and IgG in IgA nephropathy. *Clinical and experimental immunology.* 1995;100(3):470-4. Epub 1995/06/01.
93. Hiki Y, Odani H, Takahashi M, Yasuda Y, Nishimoto A, Iwase H, et al. Mass spectrometry proves under-O-glycosylation of glomerular IgA1 in IgA nephropathy. *Kidney international.* 2001;59(3):1077-85. Epub 2001/03/07.
94. Allen AC, Bailey EM, Brenchley PE, Buck KS, Barratt J, Feehally J. Mesangial IgA1 in IgA nephropathy exhibits aberrant O-glycosylation: observations in three patients. *Kidney international.* 2001;60(3):969-73. Epub 2001/09/05.
95. Li GS, Zhang H, Lv JC, Shen Y, Wang HY. Variants of C1GALT1 gene are associated with the genetic susceptibility to IgA nephropathy. *Kidney international.* 2007;71(5):448-53. Epub 2007/01/18.
96. Pirulli D, Crovella S, Ulivi S, Zadro C, Bertok S, Rendine S, et al. Genetic variant of C1GalT1 contributes to the susceptibility to IgA nephropathy. *Journal of nephrology.* 2009;22(1):152-9. Epub 2009/02/21.
97. Malycha F, Eggermann T, Hristov M, Schena FP, Mertens PR, Zerres K, et al. No evidence for a role of cosmc-chaperone mutations in European IgA nephropathy patients.

- Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 2009;24(1):321-4. Epub 2008/10/09.
98. Berger EG. Tn-syndrome. *Biochimica et biophysica acta*. 1999;1455(2-3):255-68. Epub 1999/11/26.
99. Alexander WS, Viney EM, Zhang JG, Metcalf D, Kauppi M, Hyland CD, et al. Thrombocytopenia and kidney disease in mice with a mutation in the *C1galt1* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(44):16442-7. Epub 2006/10/26.
100. Serino G, Sallustio F, Cox SN, Pesce F, Schena FP. Abnormal miR-148b expression promotes aberrant glycosylation of IgA1 in IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2012;23(5):814-24. Epub 2012/03/01.
101. Smith A, Molyneux K, Feehally J, Barratt J. Is sialylation of IgA the agent provocateur of IgA nephropathy? *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(7):2176-8.
102. Suzuki H, Moldoveanu Z, Hall S, Brown R, Vu HL, Novak L, et al. IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(2):629-39. Epub 2008/01/04.
103. Novak J, Julian BA, Tomana M, Mesteck J. Progress in molecular and genetic studies of IgA nephropathy. *Journal of clinical immunology*. 2001;21(5):310-27. Epub 2001/11/27.
104. Barratt J, Bailey EM, Buck KS, Mailley J, Moayyedi P, Feehally J, et al. Exaggerated systemic antibody response to mucosal *Helicobacter pylori* infection in IgA nephropathy. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1999;33(6):1049-57. Epub 1999/06/03.
105. Smith AC, Molyneux K, Feehally J, Barratt J. O-glycosylation of serum IgA1 antibodies against mucosal and systemic antigens in IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2006;17(12):3520-8. Epub 2006/11/10.
106. Oortwijn BD, Rastaldi MP, Roos A, Mattinzoli D, Daha MR, van Kooten C. Demonstration of secretory IgA in kidneys of patients with IgA nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2007;22(11):3191-5. Epub 2007/06/05.
107. McCarthy DD, Kujawa J, Wilson C, Papandile A, Poreci U, Porfilio EA, et al. Mice overexpressing BAFF develop a commensal flora-dependent, IgA-associated nephropathy. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(10):3991-4002. Epub 2011/09/02.

108. Kokubo T, Hiki Y, Iwase H, Horii A, Tanaka A, Nishikido J, et al. Evidence for involvement of IgA1 hinge glycopeptide in the IgA1-IgA1 interaction in IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 1997;8(6):915-9. Epub 1997/06/01.
109. Kokubo T, Hiki Y, Iwase H, Tanaka A, Toma K, Hotta K, et al. Protective role of IgA1 glycans against IgA1 self-aggregation and adhesion to extracellular matrix proteins. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 1998;9(11):2048-54. Epub 1998/11/10.
110. Yan Y, Xu LX, Zhang JJ, Zhang Y, Zhao MH. Self-aggregated deglycosylated IgA1 with or without IgG were associated with the development of IgA nephropathy. *Clinical and experimental immunology*. 2006;144(1):17-24. Epub 2006/03/18.
111. Launay P, Grossetete B, Arcos-Fajardo M, Gaudin E, Torres SP, Beaudoin L, et al. Fc α receptor (CD89) mediates the development of immunoglobulin A (IgA) nephropathy (Berger's disease). Evidence for pathogenic soluble receptor-IgA complexes in patients and CD89 transgenic mice. *The Journal of experimental medicine*. 2000;191(11):1999-2009. Epub 2000/06/06.
112. Rifai A, Fadden K, Morrison SL, Chintalacheruvu KR. The N-glycans determine the differential blood clearance and hepatic uptake of human immunoglobulin (Ig)A1 and IgA2 isotypes. *The Journal of experimental medicine*. 2000;191(12):2171-82. Epub 2000/06/22.
113. Haddad E, Moura IC, Arcos-Fajardo M, Macher MA, Baudouin V, Alberti C, et al. Enhanced expression of the CD71 mesangial IgA1 receptor in Berger disease and Henoch-Schonlein nephritis: association between CD71 expression and IgA deposits. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2003;14(2):327-37. Epub 2003/01/23.
114. Berthelot L, Papista C, Maciel TT, Biarnes-Pelicot M, Tissandie E, Wang PH, et al. Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(4):793-806. Epub 2012/03/28.
115. Tomana M, Novak J, Julian BA, Matousovic K, Konecny K, Mestecky J. Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(1):73-81. Epub 1999/07/07.
116. Suzuki H, Fan R, Zhang Z, Brown R, Hall S, Julian BA, et al. Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(6):1668-77. Epub 2009/05/30.

117. Evans DJ, Williams DG, Peters DK, Sissons JG, Boulton-Jones JM, Ogg CS, et al. Glomerular deposition of properdin in Henoch-Schonlein syndrome and idiopathic focal nephritis. *British medical journal*. 1973;3(5875):326-8. Epub 1973/08/11.
118. Wyatt RJ. The complement system in IgA nephropathy and Henoch-Schonlein purpura: functional and genetic aspects. *Contributions to nephrology*. 1993;104:82-91. Epub 1993/01/01.
119. Wyatt RJ, Kanayama Y, Julian BA, Negoro N, Sugimoto S, Hudson EC, et al. Complement activation in IgA nephropathy. *Kidney international*. 1987;31(4):1019-23. Epub 1987/04/01.
120. Zwirner J, Burg M, Schulze M, Brunkhorst R, Gotze O, Koch KM, et al. Activated complement C3: a potentially novel predictor of progressive IgA nephropathy. *Kidney international*. 1997;51(4):1257-64. Epub 1997/04/01.
121. Hiemstra PS, Biewenga J, Gorter A, Stuurman ME, Faber A, van Es LA, et al. Activation of complement by human serum IgA, secretory IgA and IgA1 fragments. *Molecular immunology*. 1988;25(6):527-33. Epub 1988/06/01.
122. Gharavi AG, Kiryluk K, Choi M, Li Y, Hou P, Xie J, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nature genetics*. 2011;43(4):321-7. Epub 2011/03/15.
123. Skerka C, Chen Q, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement factor H related proteins (CFHRs). *Molecular immunology*. 2013;56(3):170-80. Epub 2013/07/09.
124. Goicoechea de Jorge E, Caesar JJ, Malik TH, Patel M, Colledge M, Johnson S, et al. Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(12):4685-90. Epub 2013/03/15.
125. Tortajada A, Yebenes H, Abarrategui-Garrido C, Anter J, Garcia-Fernandez JM, Martinez-Barricarte R, et al. C3 glomerulopathy-associated CFHR1 mutation alters FHR oligomerization and complement regulation. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(6):2434-46. Epub 2013/06/04.
126. Fritsche LG, Lauer N, Hartmann A, Stippa S, Keilhauer CN, Oppermann M, et al. An imbalance of human complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular degeneration (AMD). *Human molecular genetics*. 2010;19(23):4694-704. Epub 2010/09/17.

127. Heinen S, Hartmann A, Lauer N, Wiehl U, Dahse HM, Schirmer S, et al. Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood*. 2009;114(12):2439-47. Epub 2009/06/17.
128. Ansari M, McKeigue PM, Skerka C, Hayward C, Rudan I, Vitart V, et al. Genetic influences on plasma CFH and CFHR1 concentrations and their role in susceptibility to age-related macular degeneration. *Human molecular genetics*. 2013;22(23):4857-69. Epub 2013/07/23.
129. Hageman GS, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs KM, Anderson DH, Johnson LV, et al. Extended haplotypes in the complement factor H (CFH) and CFH-related (CFHR) family of genes protect against age-related macular degeneration: characterization, ethnic distribution and evolutionary implications. *Annals of medicine*. 2006;38(8):592-604. Epub 2007/04/19.
130. Jozsi M, Licht C, Strobel S, Zipfel SL, Richter H, Heinen S, et al. Factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome correlate with CFHR1/CFHR3 deficiency. *Blood*. 2008;111(3):1512-4. Epub 2007/11/17.
131. Zhao J, Wu H, Khosravi M, Cui H, Qian X, Kelly JA, et al. Association of genetic variants in complement factor H and factor H-related genes with systemic lupus erythematosus susceptibility. *PLoS genetics*. 2011;7(5):e1002079. Epub 2011/06/04.
132. Roos A, Rastaldi MP, Calvaresi N, Oortwijn BD, Schlagwein N, van Gijlswijk-Janssen DJ, et al. Glomerular activation of the lectin pathway of complement in IgA nephropathy is associated with more severe renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2006;17(6):1724-34. Epub 2006/05/12.
133. Matsuda M, Shikata K, Wada J, Sugimoto H, Shikata Y, Kawasaki T, et al. Deposition of mannan binding protein and mannan binding protein-mediated complement activation in the glomeruli of patients with IgA nephropathy. *Nephron*. 1998;80(4):408-13. Epub 1998/12/02.
134. Lee HJ, Choi SY, Jeong KH, Sung JY, Moon SK, Moon JY, et al. Association of C1q deposition with renal outcomes in IgA nephropathy. *Clinical nephrology*. 2013;80(2):98-104. Epub 2013/04/17.
135. Espinosa M, Ortega R, Sanchez M, Segarra A, Salcedo MT, Gonzalez F, et al. Association of C4d deposition with clinical outcomes in IgA nephropathy. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2014;9(5):897-904. Epub 2014/03/01.
136. Maeng YI, Kim MK, Park JB, Cho CH, Oh HK, Sung WJ, et al. Glomerular and tubular C4d depositions in IgA nephropathy: relations with histopathology and with

albuminuria. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2013;6(5):904-10. Epub 2013/05/03.

137. Cybulsky AV, Takano T, Papillon J, McTavish AJ. Complement-induced phospholipase A2 activation in experimental membranous nephropathy. *Kidney international*. 2000;57(3):1052-62. Epub 2000/03/18.

138. Nangaku M, Shankland SJ, Couser WG. Cellular response to injury in membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005;16(5):1195-204. Epub 2005/04/01.

139. Zhang J, Li Y, Shan K, Wang L, Qiu W, Lu Y, et al. Sublytic C5b-9 induces IL-6 and TGF-beta1 production by glomerular mesangial cells in rat Thy-1 nephritis through p300-mediated C/EBPbeta acetylation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014;28(3):1511-25. Epub 2013/12/18.

140. Onda K, Ohsawa I, Ohi H, Tamano M, Mano S, Wakabayashi M, et al. Excretion of complement proteins and its activation marker C5b-9 in IgA nephropathy in relation to renal function. *BMC nephrology*. 2011;12:64. Epub 2011/11/25.

141. Gomez-Guerrero C, Lopez-Armada MJ, Gonzalez E, Egido J. Soluble IgA and IgG aggregates are catabolized by cultured rat mesangial cells and induce production of TNF-alpha and IL-6, and proliferation. *J Immunol*. 1994;153(11):5247-55. Epub 1994/12/01.

142. Duque N, Gomez-Guerrero C, Egido J. Interaction of IgA with Fc alpha receptors of human mesangial cells activates transcription factor nuclear factor-kappa B and induces expression and synthesis of monocyte chemoattractant protein-1, IL-8, and IFN-inducible protein 10. *J Immunol*. 1997;159(7):3474-82. Epub 1997/10/08.

143. Tamouza H, Chemouny JM, Raskova Kafkova L, Berthelot L, Flamant M, Demion M, et al. The IgA1 immune complex-mediated activation of the MAPK/ERK kinase pathway in mesangial cells is associated with glomerular damage in IgA nephropathy. *Kidney international*. 2012;82(12):1284-96. Epub 2012/09/07.

144. Lai KN, Leung JC, Chan LY, Saleem MA, Mathieson PW, Tam KY, et al. Podocyte injury induced by mesangial-derived cytokines in IgA nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2009;24(1):62-72. Epub 2008/08/08.

145. Tuomela S, Lahesmaa R. Early T helper cell programming of gene expression in human. *Seminars in immunology*. 2013;25(4):282-90. Epub 2013/11/20.

146. Ebihara I, Hirayama K, Yamamoto S, Muro K, Yamagata K, Koyama A. Th2 predominance at the single-cell level in patients with IgA nephropathy. *Nephrology, dialysis,*

transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 2001;16(9):1783-9. Epub 2001/08/28.

147. Yano N, Endoh M, Nomoto Y, Sakai H, Fadden K, Rifai A. Phenotypic characterization of cytokine expression in patients with IgA nephropathy. *Journal of clinical immunology*. 1997;17(5):396-403. Epub 1997/11/05.

148. Suzuki H, Suzuki Y, Aizawa M, Yamanaka T, Kihara M, Pang H, et al. Th1 polarization in murine IgA nephropathy directed by bone marrow-derived cells. *Kidney international*. 2007;72(3):319-27. Epub 2007/05/15.

149. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155(3):1151-64. Epub 1995/08/01.

150. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441(7090):235-8. Epub 2006/05/02.

151. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 2006;441(7090):231-4. Epub 2006/05/02.

152. Kawasaki Y, Suyama K, Go H, Imamura T, Ushijima Y, Sakai N, et al. Accumulation of macrophages expressing myeloid-related protein 8 associated with the progression of sclerotic changes in children with IgA nephropathy. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2009;218(1):49-55. Epub 2009/04/29.

153. Mori H, Kaneko Y, Narita I, Goto S, Saito N, Kondo D, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 A-2518G gene polymorphism and renal survival of Japanese patients with immunoglobulin A nephropathy. *Clinical and experimental nephrology*. 2005;9(4):297-303. Epub 2005/12/20.

154. Steinmetz OM, Panzer U, Harendza S, Mertens PR, Ostendorf T, Floege J, et al. No association of the -2518 MCP-1 A/G promoter polymorphism with incidence and clinical course of IgA nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2004;19(3):596-601. Epub 2004/02/10.

155. Sabatier JC, Ducret F, Colon S, Genin C, Berthoux FC. [Intercapillary glomerulonephritis with IgA deposits in 2 HLA identical brothers]. *Journal d'urologie et de*

nephrologie. 1978;84(9):672-5. Epub 1978/09/01. Glomerulonephrite intercapillaire a depots d'IgA chez deux freres HLA identiques.

156. Tolckoff-Rubin NE, Cosimi AB, Fuller T, Rublin RH, Colvin RB. IGA nephropathy in HLA-identical siblings. *Transplantation*. 1978;26(6):430-3. Epub 1978/12/01.

157. Masuda J, Shiiki H, Fujii Y, Dohi K, Harada A. [Identical twin sisters with IgA nephropathy]. *Nihon Jinzo Gakkai shi*. 1996;38(1):52-6. Epub 1996/01/01.

158. Schena FP. Immunogenetic aspects of primary IgA nephropathy. *Kidney international*. 1995;48(6):1998-2013. Epub 1995/12/01.

159. Scolari F, Amoroso A, Savoldi S, Prati E, Scaini P, Manganoni A, et al. Familial occurrence of primary glomerulonephritis: evidence for a role of genetic factors. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 1992;7(7):587-96. Epub 1992/01/01.

160. Julian BA, Quiggins PA, Thompson JS, Woodford SY, Gleason K, Wyatt RJ. Familial IgA nephropathy. Evidence of an inherited mechanism of disease. *The New England journal of medicine*. 1985;312(4):202-8. Epub 1985/01/24.

161. Gharavi AG, Moldoveanu Z, Wyatt RJ, Barker CV, Woodford SY, Lifton RP, et al. Aberrant IgA1 glycosylation is inherited in familial and sporadic IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2008;19(5):1008-14. Epub 2008/02/15.

162. Kiryluk K, Moldoveanu Z, Sanders JT, Eison TM, Suzuki H, Julian BA, et al. Aberrant glycosylation of IgA1 is inherited in both pediatric IgA nephropathy and Henoch-Schonlein purpura nephritis. *Kidney international*. 2011;80(1):79-87. Epub 2011/02/18.

163. Lin X, Ding J, Zhu L, Shi S, Jiang L, Zhao M, et al. Aberrant galactosylation of IgA1 is involved in the genetic susceptibility of Chinese patients with IgA nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2009;24(11):3372-5. Epub 2009/06/18.

164. Gharavi AG, Yan Y, Scolari F, Schena FP, Frasca GM, Ghiggeri GM, et al. IgA nephropathy, the most common cause of glomerulonephritis, is linked to 6q22-23. *Nature genetics*. 2000;26(3):354-7. Epub 2000/11/04.

165. Bisceglia L, Cerullo G, Forabosco P, Torres DD, Scolari F, Di Perna M, et al. Genetic heterogeneity in Italian families with IgA nephropathy: suggestive linkage for two novel IgA nephropathy loci. *American journal of human genetics*. 2006;79(6):1130-4. Epub 2006/12/23.

166. Paterson AD, Liu XQ, Wang K, Magistroni R, Song X, Kappel J, et al. Genome-wide linkage scan of a large family with IgA nephropathy localizes a novel susceptibility locus to

- chromosome 2q36. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18(8):2408-15. Epub 2007/07/20.
167. Suzuki H, Suzuki Y, Yamanaka T, Hirose S, Nishimura H, Toei J, et al. Genome-wide scan in a novel IgA nephropathy model identifies a susceptibility locus on murine chromosome 10, in a region syntenic to human IGAN1 on chromosome 6q22-23. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005;16(5):1289-99. Epub 2005/03/18.
168. Yong D, Qing WQ, Hua L, Kan JJ, Xi CJ, Jin QQ, et al. Association of angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and IgA nephropathy: a meta-analysis. *American journal of nephrology*. 2006;26(5):511-8. Epub 2006/11/25.
169. Li GS, Zhu L, Zhang H, Lv JC, Ding JX, Zhao MH, et al. Variants of the ST6GALNAC2 promoter influence transcriptional activity and contribute to genetic susceptibility to IgA nephropathy. *Human mutation*. 2007;28(10):950-7. Epub 2007/05/08.
170. Tanaka Y, Suzuki Y, Tsuge T, Kanamaru Y, Horikoshi S, Monteiro RC, et al. FcγRIIa-131R allele and FcγRIIIa-176V/V genotype are risk factors for progression of IgA nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2005;20(11):2439-45. Epub 2005/10/14.
171. Vuong MT, Hahn-Zoric M, Lundberg S, Gunnarsson I, van Kooten C, Wramner L, et al. Association of soluble CD89 levels with disease progression but not susceptibility in IgA nephropathy. *Kidney international*. 2010;78(12):1281-7. Epub 2010/09/03.
172. Liu XQ, Paterson AD, He N, St George-Hyslop P, Rauta V, Gronhagen-Riska C, et al. IL5RA and TNFRSF6B gene variants are associated with sporadic IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2008;19(5):1025-33. Epub 2008/02/08.
173. Feehally J, Farrall M, Boland A, Gale DP, Gut I, Heath S, et al. HLA has strongest association with IgA nephropathy in genome-wide analysis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(10):1791-7. Epub 2010/07/03.
174. Kiryluk K, Li Y, Sanna-Cherchi S, Rohanizadegan M, Suzuki H, Eitner F, et al. Geographic differences in genetic susceptibility to IgA nephropathy: GWAS replication study and geospatial risk analysis. *PLoS genetics*. 2012;8(6):e1002765. Epub 2012/06/28.
175. Mondry A, Loh M, Laurence KB, Low N. DNA polymorphisms and renal disease: a critical appraisal of studies presented at the annual ERA/EDTA and ASN conferences in 2004 and 2005. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2006;21(10):2775-9. Epub 2006/07/06.

176. Wu J, Ji C, Xie F, Langefeld CD, Qian K, Gibson AW, et al. Fc α RI (CD89) alleles determine the proinflammatory potential of serum IgA. *J Immunol*. 2007;178(6):3973-82. Epub 2007/03/07.
177. Bournazos S, Woof JM, Hart SP, Dransfield I. Functional and clinical consequences of Fc receptor polymorphic and copy number variants. *Clinical and experimental immunology*. 2009;157(2):244-54. Epub 2009/07/17.
178. Berthoux FC, Berthoux P, Mariat C, Thibaudin L, Afiani A, Linossier MT. CC-chemokine receptor five gene polymorphism in primary IgA nephropathy: the 32 bp deletion allele is associated with late progression to end-stage renal failure with dialysis. *Kidney international*. 2006;69(3):565-72. Epub 2006/01/06.
179. Lim CS, Kim YS, Chae DW, Ahn C, Han JS, Kim S, et al. Association of C-509T and T869C polymorphisms of transforming growth factor-beta1 gene with susceptibility to and progression of IgA nephropathy. *Clinical nephrology*. 2005;63(2):61-7. Epub 2005/02/26.
180. Kiryluk K, Novak J, Gharavi AG. Pathogenesis of immunoglobulin A nephropathy: recent insight from genetic studies. *Annual review of medicine*. 2013;64:339-56. Epub 2012/10/18.
181. Narita I, Goto S, Saito N, Sakatsume M, Jin S, Omori K, et al. Genetic polymorphisms in the promoter and 5' UTR region of the Fc alpha receptor (CD89) are not associated with a risk of IgA nephropathy. *Journal of human genetics*. 2001;46(12):694-8. Epub 2002/01/05.
182. Kaneko S, Kobayashi T, Yamamoto K, Jansen MD, van de Winkel JG, Yoshie H. A novel polymorphism of Fc α RI (CD89) associated with aggressive periodontitis. *Tissue antigens*. 2004;63(6):572-7. Epub 2004/05/14.
183. Watanabe A, Shimokawa T, Moriyama M, Komine F, Amaki S, Arakawa Y, et al. Genetic variants of the IgA Fc receptor (Fc α R, CD89) promoter in chronic hepatitis C patients. *Immunogenetics*. 2006;58(12):937-46. Epub 2006/10/13.
184. Lin FJ, Jiang GR, Shan JP, Zhu C, Zou J, Wu XR. Imbalance of regulatory T cells to Th17 cells in IgA nephropathy. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2012;72(3):221-9. Epub 2012/01/27.
185. Donadio ME, Loiacono E, Peruzzi L, Amore A, Camilla R, Chiale F, et al. Toll-like receptors, immunoproteasome and regulatory T cells in children with Henoch-Schonlein purpura and primary IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol*. 2014;29(9):1545-51. Epub 2014/04/02.

186. Peng Z, Tian J, Cui X, Xian W, Sun H, Li E, et al. Increased number of Th22 cells and correlation with Th17 cells in peripheral blood of patients with IgA nephropathy. *Human immunology*. 2013;74(12):1586-91. Epub 2013/08/28.
187. Wan JX, Fukuda N, Endo M, Tahira Y, Yao EH, Matsuda H, et al. Complement 3 is involved in changing the phenotype of human glomerular mesangial cells. *Journal of cellular physiology*. 2007;213(2):495-501. Epub 2007/05/24.
188. Medjeral-Thomas NR, O'Shaughnessy MM, O'Regan JA, Traynor C, Flanagan M, Wong L, et al. C3 glomerulopathy: clinicopathologic features and predictors of outcome. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2014;9(1):46-53. Epub 2013/11/02.
189. Zhu L, Zhai YL, Wang FM, Hou P, Lv JC, Xu DM, et al. Variants in Complement Factor H and Complement Factor H-Related Protein Genes, CFHR3 and CFHR1, Affect Complement Activation in IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2014. Epub 2014/09/11.

3.PUBLICATIONS

38. Forabosco P, Neuhausen SL, Greco L *et al.* Meta-analysis of genome-wide linkage studies in celiac disease. *Hum Hered* 2009; 68: 223–230
39. Ng MY, Levinson DF, Faraone SV *et al.* Meta-analysis of 32 genome-wide linkage studies of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2009; 14: 774–785
40. Hermanowski J, Bouzigon E, Forabosco P *et al.* Meta-analysis of genome-wide linkage studies for multiple sclerosis, using an extended GSMA method. *Eur J Hum Genet* 2007; 15: 703–710
41. Zintzaras E, Kitsios G. Identification of chromosomal regions linked to premature myocardial infarction: a meta-analysis of whole-genome searches. *J Hum Genet* 2006; 51: 1015–1021
42. Zintzaras E, Kitsios G, Harrison GA *et al.* Heterogeneity-based genome search meta-analysis for preeclampsia. *Hum Genet* 2006; 120: 360–370
43. Kottgen A. Genome-wide association studies in nephrology research. *Am J Kidney Dis* 2010; 56: 743–758
44. Kottgen A, Pattaro C, Boger CA *et al.* New loci associated with kidney function and chronic kidney disease. *Nat Genet* 2010; 42: 376–384
45. Roeder K, Bacanu SA, Wasserman L *et al.* Using linkage genome scans to improve power of association in genome scans. *Am J Hum Genet* 2006; 78: 243–252
46. Shriner D, Baye TM, Padilla MA *et al.* Commonality of functional annotation: a method for prioritization of candidate genes from genome-wide linkage studies. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: e26
47. Denham S, Koppelman GH, Blakey J *et al.* Meta-analysis of genome-wide linkage studies of asthma and related traits. *Respir Res* 2008; 9: 38
48. Huang J, Li C, Xu H *et al.* Novel non-HLA-susceptible regions determined by meta-analysis of four genomewide scans for ankylosing spondylitis. *J Genet* 2008; 87: 75–81
49. Koivukoski L, Fisher SA, Kanninen T *et al.* Meta-analysis of genome-wide scans for hypertension and blood pressure in Caucasians shows evidence of susceptibility regions on chromosomes 2 and 3. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 2325–2332
50. van Heel DA, Fisher SA, Kirby A *et al.* Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 763–770
51. Bouzigon E, Forabosco P, Koppelman GH *et al.* Meta-analysis of 20 genome-wide linkage studies evidenced new regions linked to asthma and atopy. *Eur J Hum Genet* 2010; 18: 700–706
52. Rybicki BA, Iyengar SK, Harris T *et al.* The distribution of long range admixture linkage disequilibrium in an African-American population. *Hum Hered* 2002; 53: 187–196
53. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: S1–S266
54. Perkins BA, Ficociello LH, Silva KH *et al.* Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2003; 348: 2285–2293
55. Garg JP, Bakris GL. Microalbuminuria: marker of vascular dysfunction, risk factor for cardiovascular disease. *Vasc Med* 2002; 7: 35–43
56. Mogensen CE, Vestbo E, Poulsen PL *et al.* Microalbuminuria and potential confounders. A review and some observations on variability of urinary albumin excretion. *Diabetes Care* 1995; 18: 572–581
57. Forabosco P, Ng MY, Bouzigon E *et al.* Data acquisition for meta-analysis of genome-wide linkage studies using the genome search meta-analysis method. *Hum Hered* 2007; 64: 74–81

Received for publication: 4.1.11; Accepted in revised form: 11.4.11

Nephrol Dial Transplant (2012) 27: 656–660

doi: 10.1093/ndt/gfr246

Advance Access publication 12 July 2011

Single nucleotidic polymorphism 844 A->G of FCAR is not associated with IgA nephropathy in Caucasians

Nicolas Maillard^{1,2,3,4}, Lise Thibaudin⁵, Farida Abadja^{1,2,3}, Ingrid Masson^{1,2,3,4}, Olivier Garraud^{1,2,3}, François Berthoux^{4,5}, Eric Alamartine^{1,2,3,4,5} and Christophe Mariat^{1,2,3,4,5}

¹EA3064, GIMAP, Université Jean Monnet, Saint Etienne France, ²PRES, Université de LYON, Lyon, France, ³Université Jean Monnet, Saint Etienne, France, ⁴Service de Néphrologie, Dialyse, Transplantation Rénale, CHU de Saint Etienne, Saint Etienne, France and ⁵Laboratoire d'Explorations Fonctionnelles Rénales, CHU de Saint-Etienne, Saint Etienne, France

Correspondence and offprint requests to: Nicolas Maillard; E-mail: nicolas.maillard@univ-st-etienne.fr

Abstract

Background. IgA nephropathy is characterized by a high heterogeneity of clinical expression with 10–30% of patients progressing to end-stage renal failure. The gene of the Fc α RI or CD89 presents a single-nucleotide polymorphism responsible for a proinflammatory phenotype of neutrophils *in vitro* and *ex vivo*. The aim of our study was to assess whether this CD89 polymorphism 844 A->G is (i) a marker of disease susceptibility and/or (ii) associated with a more severe prognosis.

Methods. All patients diagnosed with IgA nephropathy and for whom DNA frozen sample was available were included in this European monocentric retrospective analysis and compared to a cohort of healthy volunteers. Allelic discrimination was performed by real-time quantitative polymerase chain reaction (Applied Biosystems™). We first compared the distribution of A and G alleles between patients and volunteers and then studied the relationships between alleles and renal

survival, histological score, proteinuria and renal function at diagnosis.

Results. Seven hundred and twenty-six patients were analyzed for the study of susceptibility and 425 in the association study. The presence of the G allele was not associated with the occurrence of IgA nephropathy (χ^2 test 0.57, ns). Likewise, renal survival and the criteria for disease activity at time of diagnosis were not affected by the presence of the G allele.

Conclusions. No significant association between 844 A->G CD89 polymorphism and the expression of the IgA nephropathy in Caucasians exists. This result does, however, not preclude the implication of other CD89 polymorphisms neither the possibility for a role of CD89 in the pathogenesis of IgA nephropathy.

Introduction

IgA nephropathy is the most frequent primary glomerulonephritis with a worldwide distribution. Its incidence is considered to be ~30 new cases per million per year in Caucasians [1]. Seven–40% of patients will progress to end-stage renal failure (ESRF) requiring dialysis and/or kidney transplantation with a high rate of recurrence on renal graft (50% after 10 years). The typical clinical expression is the presence of hematuria (either microscopic or macroscopic during mucosal infection) associated with some level of hypertension, proteinuria and impaired renal function that altogether represent classical risk factors for evolution toward ESRF. Renal biopsy is mandatory for the diagnosis showing the presence of mesangial dominant IgA deposits [2] and also useful to refining prognostic evaluation [3].

Pathogeny of the disease can be separated into three main stages [4]: (i) abnormal response to mucosal antigens and production of aberrantly glycosylated polymeric IgA1, (ii) formation and glomerular deposition of IgA1 immune complexes and (iii) glomerular injury (inflammation and fibrosis). The aberrant glycosylation of the IgA1 is necessary but not sufficient to trigger the disease [5]. A ‘second hit’ is required to form circulating IgA immune complexes with currently two possible pathways being privileged: (i) the cleavage of Fc α RI (CD89) from cell membrane leading to a soluble form of the receptor that aggregates the circulating abnormal IgA1 [6] and (ii) an autoimmune-like mechanism through which auto-IgG and/or IgA1 specific for the Tn antigen interact with the degalactosylated IgA1 [7].

Fc α RI or CD89 is the main Fc receptor for IgA, specific for its heavy chain and expressed by myeloid-derived cells, mainly polynuclear cells, monocytes/macrophages and platelets [8]. Fully functional CD89 requires the association of the α -chain with a γ -chain [9]. While the monovalent engagement of CD89 leads to an intracellular negative signal, clustering of this receptor by, for instance polymeric IgA immune complexes triggers a proinflammatory stimulating signal via the phosphorylation of ITAM of the γ -chain.

Several studies have shown that glomerular inflammation in IgA nephropathy is in part mediated by mesangium infiltrating macrophages [10] through the local production of several specific cytokines [e.g. macrophage chemoattractant protein 1 (MCP-1), Macrophage Migration Inhib-

itory Factor] [11]. These cells express Fc α RI and thus could be at the interface between IgA deposits and local inflammation. Indeed, Kanamaru *et al.* [12] well described the link between Fc α RI signaling and glomerular inflammation (macrophage infiltration, proteinuria) in a human Fc α RI transgenic mouse model. By rendering the Fc α RI unable to signal, while they still observed mesangial IgA deposits, they noticed a dramatic decrease in local inflammation.

Wu *et al.* [13] described several single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the gene coding for the CD89, FCAR. The nonsynonymous SNP 844 A->G, also called rs16986050, changes codon 248 from AGC (Ser248) to GCC (Gly248). It concerns the cytoplasmic domain of CD89 and appeared to be responsible for *in vitro* significant differences in inflammatory response of transfected immortalized cell lines (murine macrophage cell lines P388D1 and rat basophilic leukemia mast cell lines RBL-2H3) in term of degranulation and intracellular Ca⁺⁺ mobilization. The mutated allele Gly248 rendered the inflammatory response of these cells independent of the presence of the γ -chain suggesting that this polymorphism modifies the cytoplasmic interaction with this γ -chain. The authors found also that the Gly248 allele was enriched in a systemic lupus erythematosus population.

Herein, we tested the hypothesis that the proinflammatory allele Gly248 of the FCAR is associated to IgA nephropathy. We studied in a large cohort of Caucasian patients whether this allele was responsible for (i) a higher susceptibility of patients to develop IgA nephropathy and (ii) a higher risk to progress toward ESRF.

Material and methods

Populations

All Caucasian adult patients who presented a biopsy-proven IgA nephropathy, defined by the presence of IgA mesangial deposits of at least 1+ (semiquantitative scale), diagnosed between 1979 and 2009 in Saint Etienne, France, with useable DNA sample and informed consent were first considered (SUSCEPTIBILITY study cohort). The severity of histological lesions was assessed by a semiquantitative score (from 0 to 20 points) that is independently predictive of a worse clinical evolution [14]. In order to permit a minimal follow-up of 10 years, only patients from the 1979–99 period were analyzed to study the association of the allele with the progressing forms of the disease (ASSOCIATION study cohort). The control cohort comprised age- and sex-matched healthy adult volunteers having signed an informed consent.

These biological collections have been declared to the French health Ministry and represent an exhaustive cohort of consecutive patients. The study was realized with approval from the local ethical committee and was promoted by CHU de Saint Etienne.

DNA extraction

DNA was extracted from peripheral blood leucocytes with a standard phenol–chloroform method. Leucocytes were isolated by treatment with red blood cell lysis solution, before an overnight enzymatic digestion (proteinase K). Treatments by phenol, phenol–chloroform (1/1) and chloroform–isoamylalcohol (24/1) twice were successively applied with centrifugation (3000 tours/min, 5 min) and recovering of the aqueous phase after each step. DNA was then precipitated with pure ethanol then dried and finally dissolved in 1 mL trichloroethylene solution (pH 8) overnight. Aliquots DNA concentrations were adjusted to target 200 μ g/mL before storing at –20°C.

Allelic discrimination

The allelic discrimination was performed by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR). The mix was composed of 12.5 μ L Taqman

universal master mix (containing Taq polymerase, deoxyribonucleotides, internal passive reference ROX, AmpErase UNG, buffer and ions), 0.625 μ L Taqman SNP Genotyping assay mix (containing rs16986050 specific primers and Taqman MGB probe; assay ID C_25472878_10), 5 μ L of patient DNA and 6.875 μ L distilled water. PCR was performed on Applied Biosystems 7500 (ABI PRISM 7500) with 96 well PCR plates. Three negative template controls were performed on each plate. PCR steps were realized according to the manufacturer guidelines: two initial cycles (2 min 50°C–10 min 95°C) followed by 40 cycles (15 s 92°C–1 s 60°C) with an automatic post read run giving patient genotyping.

Statistic analyses

A first analysis was to verify that the genotypes distributions (AA, AG and GG) followed the Hardy–Weinberg equilibrium with a χ^2 test. Frequencies of the G allele between IgA nephropathy patients and healthy volunteers were compared using the χ^2 test. With a α risk of 5% and a statistical power of 90%, a minimal number of 278 individuals in each group was necessary to gather, as the frequency of the G allele was reported to be 0.14 in Caucasian healthy population. Results were considered to be significant at a 5% threshold.

For the association study, univariate (log-rank test, univariate Cox) and multivariate Cox analyses were performed. For multivariate analysis, categorical variables were considered (gender, proteinuria >0.3 g/day, history of hypertension, impaired renal failure at time of diagnosis defined by an modifying diet in renal diseases equation (MDRD) 4-variable assessed glomerular filtration rate (GFR) of <60 mL/min/1.73m² and global optical score of >8) as well as continuous variables [age, serum creatinine, body mass index (BMI)]. Comparisons of proteinuria level, serum creatinine level and MDRD estimated GFR were performed between patients with AA genotype and those with AG or GG genotype (Student's *t*-test), as hypertension and global optical score were compared using χ^2 test.

Results

SUSCEPTIBILITY Study

Seven hundred and twenty-six patients and 264 healthy volunteers were finally included in the analysis. The mean age of the patients was (\pm SD) 46 \pm 15 years at time of diagnosis with a male/female sex ratio of 2.7, comparable to the control cohort (respectively, 38 \pm 11 years and 1.9).

Genotypes and alleles frequencies are displayed in Table 1. The frequencies in patients of wild (AA), mutated heterozygote (AG) and mutated homozygote (GG) genotypes were 69.3, 27 and 3.7%, respectively. These frequencies were comparable to those observed in the volunteers' cohort (68.9, 27.3 and 3.8%, respectively, ns). The frequencies of allele A and G were, respectively, 83 and 17%, equally distributed in both groups. These distributions respected the Hardy–Weinberg equilibrium.

ASSOCIATION study

A total of 425 patients were included in the 1979–99 cohort with a mean follow-up of 99 \pm 68 months with the following characteristics at the time of biopsy: mean age of 37.6 (\pm 15.6), BMI of 24.4 (\pm 4.1) kg/m², a sex ratio of 2.79. Sixty-three percent of patients had a proteinuria of >0.3 g/24 h and 32% had hypertension at the time of diagnosis. Mean serum creatinine was 138 \pm 141 μ mol/L with an MDRD estimated GFR of 74 (\pm 30) mL/min/1.73m² and the mean global optical score (GOS) was 7.4 (\pm 3.6) on a 0–20 points scale. Eighty-eight patients progressed to ESRF during follow-up. The distribution of these characteristics according to the A and G alleles is displayed in Table 2.

Table 1. Genotypes and alleles frequencies among patients and healthy volunteers

Genotypes/alleles	Patients (n, %), n = 726	Controls (n, %), n = 264	χ^2	P
AA	503 (69.3)	182 (68.9)	0.557	0.76
AG	196 (27.0)	72 (27.3)		
GG	27 (3.7)	10 (3.8)		
A	83	83	1.000	0.52
G	17	17		

Table 2. Comparative characteristics of the 1979–99 cohort patients according to their alleles^a

	Whole population	A	G	P
	n = 425	n = 292	n = 133	
Age (years old) mean (\pm SD)	37.6 (\pm 15.6)	37.3 (\pm 16.8)	36.9 (\pm 16.0)	0.8
Sex ratio	2.79	3.11	2.02	0.059
BMI (kg/m ²) mean (\pm SD)	24.4 (\pm 4.1)	24.1 (\pm 4.2)	24.3 (\pm 4.1)	0.6
GOS mean (\pm SD)	7.4 (\pm 3.6)	7.3 (\pm 3.4)	7.6 (\pm 3.9)	0.5
Proteinuria (%)	62.7	62.8	62.3	0.9
Hypertension (%)	32	34	29	0.29
Serum creatinine (μ mol/L) mean (\pm SD)	138 (\pm 141)	136 (\pm 130)	143 (\pm 162)	0.7
MDRD (mL/min/1.73m ²) mean (\pm SD)	74 (\pm 30)	77 (\pm 34)	75 (\pm 31)	0.6
ESRF (n, %)	88 (20.7)	60 (20.5)	28 (21.1)	0.9

^aMDRD, modifying diet in renal diseases equation.

Table 3. Univariate and multivariate Cox regression analyses

	β	Hazard ratio	P
Univariate Cox regression analysis			
SNP CD89 (G versus A)	0.47	1.029	0.90
Multivariate Cox regression analysis			
Age	–0.21	0.98	0.054
Sex	–0.43	0.65	0.15
BMI	0.041	1.04	0.27
Hypertension	–0.16	0.85	0.63
Serum creatinine	0.006	1.006	<0.001
Proteinuria >0.3 g/day	2.02	7.57	0.007
GOS >8	1.54	4.67	<0.001
SNP CD89 (G versus A)	0.47	1.60	0.118

Renal survival was identical in both allelic groups as shown in Figure 1. Univariate and multivariate Cox analysis did not show any increased allele-related risk to progress to ESRF (hazard ratio 1.029, ns). In contrast, proteinuria, renal function impairment and high GOS (>8) were confirmed to be independent risk factors (Table 3).

Discussion

Our results strongly suggest that the FCAR polymorphism 844 A->G is not associated with a higher susceptibility to IgA nephropathy neither with a worse disease prognosis.

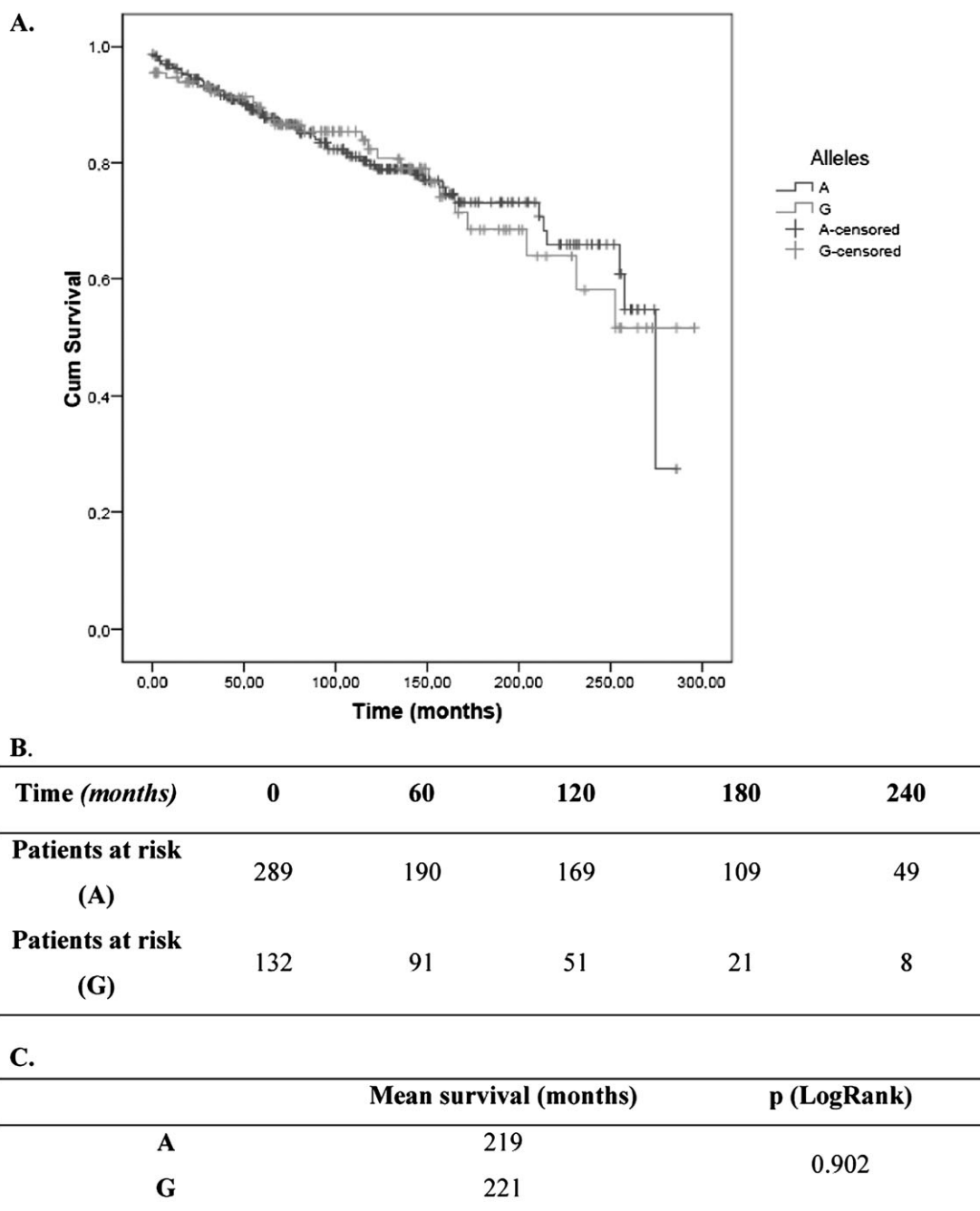


Fig. 1. (A) Kaplan–Meier analysis of renal survival according to the alleles A or G. (B) Survival table. (C) Log-rank test.

This polymorphism of FCAR is a particularly attractive genetic candidate as a susceptibility factor for IgA nephropathy. Wu *et al.* [13] demonstrated that the mutated allele 844G is a functional polymorphism susceptible to exacerbate the proinflammatory phenotype of CD89-bearing cells. Monocytes/macrophages that constitutively express CD89 can infiltrate the glomerulus during IgA nephropathy [3, 15]. This process is recognized as an independent prognostic factor which is now taken into account in the Oxford Classification (endocapillary hypercellularity) [3]. In this regard, we reasoned that the 844G allele might be overexpressed in patients with IgA nephropathy or at least in patients with the more severe forms of the disease.

We believe that our negative results are robust and allow us to ruling out any significant association between the 844G allele and IgA nephropathy in Caucasians. Indeed, the American Society of Nephrology issued guidelines for polymorphisms study applied to nephrology with a special focus on (i) the biological sense of the study (ii) the adequate sample size (iii) the P adjustment for multiple comparisons [16]. Our study largely met these criteria since (i) a pathogenic hypothesis was initially formulated, (ii) our cohort was adequately sized for testing our hypothesis and even to reject it with sufficient

confidence (iii) no adjustment of P was necessary as we tested only one SNP.

Several SNPs concerning inflammatory genes have been previously found to impact either the susceptibility to IgA nephropathy or the risk to progress toward ESRF. The main genes that have been pinpointed so far are CC chemokine receptor of type 5 (CCR5, severity) [17], transforming growth factor β 1 (TGF β 1, severity) [18], MCP-1 (severity) [19], α -chain of the receptor of interleukin 5 (IL5RA, susceptibility) and TNFRSF6B (tumor necrosis factor receptor superfamily 6b, susceptibility) [20]. SNPs concerning Fc receptor genes have also been implied. In a Japanese cohort of patient with IgA nephropathy, SNPs of genes coding for the FcR γ (FCGR2A 131R et FCGR3A 176V) were found to be overexpressed [21]. To our knowledge, this finding was not confirmed in other population.

Interestingly, as part of a study looking at the implication of soluble CD89 in the progression of IgA nephropathy, Vuong *et al.* [22] recently tested a possible association of the 844G allele in IgA nephropathy. Our results obtained in a larger cohort of patients are identical to theirs regarding the frequency of the G allele and the absence of association with disease susceptibility and prognosis.

Other FCAR SNPs have been tested, essentially concerning the intron or promoter region of the gene. Narita *et al.* [23] failed to find any relationship between three SNPs of the 5'UTR with IgA nephropathy. Vuong *et al.* studied four additional SNPs and found a relationship between an FCAR intronic SNP, rs11084377, and the level of soluble CD89, that seems to be, in this study, protective from nephropathy progression.

Conclusion

Our study provides strong evidence that the SNP 844 A->G of FCAR is not associated with IgA nephropathy in Caucasians. This result does, however, not preclude the implication of other FCAR polymorphisms neither the possibility for a role of CD89 in the pathogenesis of IgA nephropathy.

Conflict of interest statement. None declared.

References

1. Berthoux FC, Mohey H, Afiani A. Natural history of primary IgA nephropathy. *Semin Nephrol* 2008; 28: 4–9
2. Berger J, Hinglais N. [Intercapillary deposits of IgA-IgG]. *J Urol Nephrol (Paris)* 1968; 74: 694–695
3. Roberts IS, Cook HT, Troyanov S *et al.* The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility. *Kidney Int* 2009; 76: 546–556
4. Narita I, Gejyo F. Pathogenetic significance of aberrant glycosylation of IgA1 in IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 2008; 12: 332–338
5. Lin X, Ding J, Zhu L *et al.* Aberrant galactosylation of IgA1 is involved in the genetic susceptibility of Chinese patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 3372–3375

6. Launay P, Grossetete B, Arcos-Fajardo M *et al.* Fcalpha receptor (CD89) mediates the development of immunoglobulin A (IgA) nephropathy (Berger's disease). Evidence for pathogenic soluble receptor-IgA complexes in patients and CD89 transgenic mice. *J Exp Med* 2000; 191: 1999–2009
7. Suzuki H, Fan R, Zhang Z *et al.* Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *J Clin Invest* 2009; 119: 1668–1677
8. Qian K, Xie F, Gibson AW *et al.* Functional expression of IgA receptor FcalphaRI on human platelets. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 1492–1500
9. Blank U, Launay P, Benhamou M *et al.* Inhibitory ITAMs as novel regulators of immunity. *Immunol Rev* 2009; 232: 59–71
10. Kawasaki Y, Suyama K, Go H *et al.* Accumulation of macrophages expressing myeloid-related protein 8 associated with the progression of sclerotic changes in children with IgA nephropathy. *Tohoku J Exp Med* 2009; 218: 49–55
11. Grandaliano G, Gesualdo L, Ranieri E *et al.* Monocyte chemotactic peptide-1 expression in acute and chronic human nephritides: a pathogenetic role in interstitial monocytes recruitment. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 906–913
12. Kanamaru Y, Arcos-Fajardo M, Moura IC *et al.* Fc alpha receptor I activation induces leukocyte recruitment and promotes aggravation of glomerulonephritis through the FcR gamma adaptor. *Eur J Immunol* 2007; 37: 1116–1128
13. Wu J, Ji C, Xie F *et al.* FcalphaRI (CD89) alleles determine the proinflammatory potential of serum IgA. *J Immunol* 2007; 178: 3973–3982
14. Alamartine E, Sabatier JC, Guerin C *et al.* Prognostic factors in mesangial IgA glomerulonephritis: an extensive study with univariate and multivariate analyses. *Am J Kidney Dis* 1991; 18: 12–19
15. Ferrario F, Rastaldi MP, Napodano P. Morphological features in IgA nephropathy. *Ann Med Interne (Paris)* 1999; 150: 108–116
16. Mondry A, Loh M, Laurence KB *et al.* DNA polymorphisms and renal disease: a critical appraisal of studies presented at the annual ERA/EDTA and ASN conferences in 2004 and 2005. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 2775–2779
17. Berthoux FC, Berthoux P, Mariat C *et al.* CC-chemokine receptor five gene polymorphism in primary IgA nephropathy: the 32 bp deletion allele is associated with late progression to end-stage renal failure with dialysis. *Kidney Int* 2006; 69: 565–572
18. Lim CS, Kim YS, Chae DW *et al.* Association of C-509T and T869C polymorphisms of transforming growth factor-beta1 gene with susceptibility to and progression of IgA nephropathy. *Clin Nephrol* 2005; 63: 61–67
19. Mori H, Kaneko Y, Narita I *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 A-2518G gene polymorphism and renal survival of Japanese patients with immunoglobulin A nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 2005; 9: 297–303
20. Liu XQ, Paterson AD, He N *et al.* IL5RA and TNFRSF6B gene variants are associated with sporadic IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1025–1033
21. Tanaka Y, Suzuki Y, Tsuge T *et al.* FcgammaRIIa-131R allele and FcgammaRIIIa-176V/V genotype are risk factors for progression of IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 2439–2445
22. Vuong MT, Hahn-Zoric M, Lundberg S *et al.* Association of soluble CD89 levels with disease progression but not susceptibility in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2010; 78: 1281–1287
23. Narita I, Goto S, Saito N *et al.* Genetic polymorphisms in the promoter and 5' UTR region of the Fc alpha receptor (CD89) are not associated with a risk of IgA nephropathy. *J Hum Genet* 2001; 46: 694–698

Received for publication: 19.2.11; Accepted in revised form: 7.4.11

Conclusions: Interleukin-6 and interleukin-4 accentuated galactose deficiency of IgA1 via coordinated modulation of key glycosyltransferases. These data provide a mechanism to explain increased immune-complex formation and disease exacerbation during mucosal infections in patients with IgAN.

Funding: NIDDK Support

FR-PO542

Pathogenic Role of IgA1-Containing Immune Complexes in IgA Nephropathy Hitoshi Suzuki¹ Yusuke Suzuki,¹ Kenji Satake,¹ Bruce A. Julian,² Jan Novak,² Yasuhiko Tomino.¹ ¹*Nephrology, Juntendo Univ Faculty of Medicine, Tokyo, Japan;* ²*Medicine and Microbiology, Univ of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL.*

Background: IgA nephropathy (IgAN) is an autoimmune glomerulonephritis wherein immune complexes (IC) composed of galactose-deficient IgA1 (Gd-IgA1; autoantigen) and anti-glycan IgG autoantibodies deposit in the glomeruli. Serum levels of Gd-IgA1 as well as anti-glycan IgG autoantibodies, responsible for the formation of ICs with Gd-IgA1, are elevated in patients with IgAN. However, the pathogenic roles of Gd-IgA1-containing IC and mechanisms of immune deposits in the mesangium are still obscure.

Methods: Polymeric Gd-IgA1 myeloma protein and recombinant anti-glycan IgG were used to form IC (Gd-IgA1-IgG IC) *in vitro* to inject *in vivo* into nude mice. After various time intervals, mice were sacrificed; blood and urine were collected to determine serum IgA1 and IgG, urinary protein and creatinine and hematuria. Also, to assess the potential capacity of these IC to activate endothelial cells, human renal glomerular endothelial cells (HRGEC) were co-cultured with Gd-IgA1 alone or Gd-IgA1-IgG IC for 72 h. Then, transcript levels of TNF- α , TGF- β , IL-6, ICAM1 and E-selectin in HRGEC were measured by RealTime PCR.

Results: Gd-IgA1 and anti-glycan IgG formed IC that deposited with murine C3 in the mesangium and in small amounts in the subendothelial area of the glomerular capillaries, and induced hematuria and proteinuria. In control mice injected with only Gd-IgA1 or Gd-IgA1 with IgG from a healthy control, IgA1 deposited only transiently and did not cause tissue injury. After stimulation with Gd-IgA1-IgG IC in HRGEC, transcript levels of TNF- α , ICAM-1 and E-selectin were upregulated ($P < 0.01$).

Conclusions: Our studies confirmed the role of Gd-IgA1-IgG-containing IC in the pathogenesis of IgAN and induction of proteinuria and hematuria. Furthermore, the Gd-IgA1-IgG IC may bind to glomerular endothelial cells and induce release of pathogenic cytokines and chemokines.

FR-PO543

IgA Antibodies to Glomerular Endothelial Cells in Patients with Lupus Nephritis: Correlations with Renal Injury Kazuo Takahashi, Ayako Kondo, Daisuke Hirano, Shin'ichi Akiyama, Hiroki Hayashi, Shigehisa Koide, Midori Hasegawa, Yoshiyuki Hiki, Shunji Yoshida, Keiji Miura, Yukio Yuzawa. *Fujita Health Univ, Toyoake, Aichi, Japan.*

Background: Although anti-endothelial cell antibodies (AECA) against human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) have been detected in systemic lupus erythematosus (SLE), their pathological role remains unclear. Because antigens expressed on the endothelial cell (EC) surface are pivotal for autoimmune reactions, methods that detect antibodies only to EC surface molecules are required. Thus, we developed a solubilized cell surface protein capture enzyme-linked immunosorbent assay (CSP-ELISA) that is able to detect antibodies against membrane proteins. We also aimed to elucidate the clinical importance of AECA for tissue-specific EC.

Methods: Sera from 52 patients with biopsy-proven lupus nephritis (LN), 25 with SLE without renal involvement (non-LN SLE), 10 disease controls (DC) and 81 healthy controls (HC) were tested for IgG- and IgA-AECA to human glomerular EC (HGEC) by CSP-ELISA.

Results: Titers of IgG- and IgA-AECA to HGEC were significantly higher in LN and non-LN SLE patients than in the combined DC and HC ($P < 0.001$) groups. The level of IgG-AECA did not correlate with active lesions, but the level of IgA-AECA to HGEC did correlate with histological evidence of active lesions in LN patients ($P < 0.001$). Immunocytochemical analysis showed AECA recognized membrane proteins on HGEC. The significant correlation of titer of AECA to both HGEC and HUVEC ($R = 0.95$ for IgG-, 0.93 for IgA-AECA, respectively) indicated AECA in LN patients recognize membrane proteins expressed on HGEC and HUVEC. To identify specific antigens against AECA, biotinylated CSPs were incubated with sera from LN patients with high titers of IgG-AECA, immunoprecipitated with immobilized protein G followed by immobilized avidin, and blotted with NeutrAvidin. A 150-kDa protein band that shifted to a 55-kDa protein band under reducing conditions was detected in patients with LN, but not in HC.

Conclusions: IgA-AECA was observed to be associated with pathological activity in LN. These EC membrane components recognized by AECA may be linked with the pathogenesis of LN.

Funding: Private Foundation Support, Government Support - Non-U.S.

FR-PO544

Enzymatic Sialylation of IgA1 Hinge-Region: Pathogenic Role of Sialic Acid in IgA Nephropathy (IgAN) Kazuo Takahashi^{1,2} Milan Raska,^{1,2} Milada Stuchlova-Horynova,^{1,2} Alena Kasperova,^{1,2} Stacy D. Hall,¹ Yoshiyuki Hiki,² Yukio Yuzawa,² Zina Moldoveanu,¹ Bruce A. Julian,¹ Matthew B. Renfrow,¹ Jan Novak.¹ ¹*Univ of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL;* ²*Fujita Health Univ, Toyoake, Japan;* ³*Palacky Univ in Olomouc, Olomouc, Czech Republic.*

Background: Patients with IgAN have high serum levels of galactose (Gal)-deficient IgA1; some hinge-region (HR) *O*-glycans consist of terminal *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) with or without *N*-acetylneuraminic acid (NeuAc, sialic acid). Sialylation of GalNAc blocks subsequent galactosylation. IgA1-producing cells from IgAN patients have increased activity of α 2,6 sialyltransferase (ST6GalNAc) that sialylates GalNAc. Thus, premature sialylation of GalNAc may be favor production of Gal-deficient IgA1.

Methods: We established protocols for enzymatic α 2,6-sialylation or α 2,3-sialylation (ST3Gal1; adds NeuAc to galactose) of IgA1 *O*-glycans of an asialo-IgA1 myeloma protein (Ale) that mimics the Gal-deficient IgA1 in IgAN patients. The products were assessed by high-resolution mass spectrometry and ELISA with the GalNAc-specific lectin from *Helix aspersa* (HAA).

Results: Changes in SDS-PAGE mobility of the IgA1 heavy chain indicated that both enzymes were active. Enzymatic sialylation of the myeloma protein generated sialylated IgA1 that mimics the circulating nephritogenic IgA1 in IgAN patients, characterized by α 2,6-sialylated GalNAc, or the IgA1 typical for healthy controls, characterized by an α 2,3-sialylated Gal attached to GalNAc. Lectin ELISA was used to assess binding to the IgA1 before and after the enzymatic reactions. α 2,6- or α 2,3-sialylation of IgA1 markedly decreased reactivity with the HAA lectin. Neuraminidase treatment (removes sialic acid) completely restored the level of lectin reactivity. Thus, lectin binding to GalNAc decreased after sialylation of a neighboring glycan in the cluster of *O*-glycans of the IgA1 hinge region.

Conclusions: Neuraminidase should be used to treat serum IgA1 before a lectin assay to assess the content of hinge-region Gal-deficient GalNAc. Our *in vitro* enzymatic sialylation model will be useful to study the biological roles of NeuAc in the IgA1 HR in the pathogenesis of IgAN.

Funding: NIDDK Support, Other NIH Support - NIGMS, Government Support - Non-U.S.

FR-PO545

Proteomic Analysis of Engineered IgA1-IgG Immune Complexes Reveals Association with Activated Complement C3 Nicolas Maillard, Leann Boerma, Stacy D. Hall, Zhi Qiang Huang, Michal Mrug, Zina Moldoveanu, Bruce A. Julian, Matthew B. Renfrow, Jan Novak. *Univ of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL.*

Background: In IgA nephropathy (IgAN), C3 colocalizes with IgA in mesangial deposits. Deletion of CFHR1,3 genes has been recently described to protect from the occurrence of IgAN, highlighting the contribution of complement alternative pathway (AP). Using an *in vitro* model of polymeric galactose-deficient (Gd) IgA1 with recombinant antiglycan IgG derived from an IgAN patient in immune complexes (ICs) formed in the presence of serum, we identified and characterized by proteomic analyses complement C3 products associated with the complexes.

Methods: ICs were formed overnight at 4°C, using purified Gd-polymeric IgA1 (pAle) myeloma protein, recombinant antiglycan IgG (r1123), and IgA- and IgG-depleted serum of a healthy control. High-molecular-mass fractions (HMMS; >700 kDa) were isolated by size-exclusion chromatography. The fractions that stimulated proliferation of cultured human mesangial cells were pooled, concentrated, and fractionated by SDS-PAGE for proteomic analysis. After silver staining, protein bands were excised, digested by trypsin, and analysed by high-resolution tandem mass spectrometry (LTQ OrbitrapVelos; MS/MS). Identification of proteins was allowed by use of MASCOT and SEQUEST algorithms.

Results: Proteomic analysis revealed that C3 α and β chain elements were present in the active ICs and only low amount of β chain was in the corresponding fractions in negative control (serum only). Amino-acid sequence obtained by MS/MS combined with information on the molecular mass of corresponding bands from SDS-PAGE identified iC3b, C3c, and C3dg (confirmed by anti-C3 immunoblotting). The presence of these low-molecular-mass products in HMMS can only be explained by their binding to ICs. These results thus provide evidence that biologically active IgA1-ICs activate complement C3 and associate with C3 degradation fragments. iC3b, C3c, and C3dg are the products of the action of factor I and H, suggesting a critical role of regulators in the activation of complement AP in IgAN.

Conclusions: Soluble engineered IgA1 - IgG ICs can bind C3 elements *in vitro*.
Funding: NIDDK Support, Private Foundation Support

FR-PO546

Prevention of Formation of IgA1-Containing Immune Complexes in IgA1 Nephropathy Alena Kasperova^{1,2} Hiroyuki Ueda,¹ Milada Stuchlova-Horynova,^{1,2} Tyler J. Stewart,² Matthew B. Renfrow,² Bruce A. Julian,² Jan Novak,² Jiri F. Mestecky,² Milan Raska,^{1,2} ¹*Immunology, Faculty of Medicine, Palacky Univ, Olomouc, Czech Republic;* ²*Univ of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL.*

Background: IgA nephropathy (IgAN), the most common primary glomerulonephritis in the world, is characterized by mesangial deposits enriched for galactose-deficient IgA1 (Gd-IgA1). These immunodeposits likely originate from circulating immune complexes

Exceptional Case

Immune profile of IgA-dominant diffuse proliferative glomerulonephritis

Eric Wallace¹, Nicolas Maillard², Hiroyuki Ueda², Stacy Hall², Huma Fatima³, Jan Novak² and Bruce A. Julian^{1,2}

¹Division of Nephrology, Department of Medicine, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA, ²Department of Microbiology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA and ³Department of Pathology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA

Correspondence and offprint requests to: Eric Wallace; E-mail: ericwallace@uab.edu

Abstract

The diagnosis of IgA-dominant post-infectious glomerulonephritis (PIGN) may be challenging, as it must be differentiated from that of active IgA nephropathy. Predominant clinicopathologic features of IgA-dominant PIGN substantially overlap with those of active IgA nephropathy. Here, we present a case of a 67-year-old woman with rapidly rising serum creatinine, proteinuria and severe hypertension. The kidney biopsy findings included some features of IgA-dominant PIGN while others were more consistent with classical IgA nephropathy. We describe this patient's immune profile at the time of acute kidney injury and review the literature regarding differentiation of the two entities.

Keywords: IgA; IgA dominant post-infectious glomerulonephritis; IgA nephropathy

Introduction

IgA-dominant post-infectious glomerulonephritis (PIGN), first described in 2003, is a variant of classical PIGN. Its pathological characteristics mimic those of classical PIGN, including endocapillary hypercellularity on light microscopy, mesangial and subepithelial staining for IgG and C3 on immunofluorescence microscopy, and hump-like subepithelial immune deposits on electron microscopy. Other features differ from those of classical PIGN in that presentation is typically in older adults, the dominant or co-dominant immunoglobulin on immunofluorescence is IgA rather than IgG, and the association is with staphylococcal rather than streptococcal infections [1]. Differentiating IgA-dominant PIGN from IgA nephropathy (IgAN) can be challenging. This distinction is further complicated by the fact that IgAN is known to worsen after mucosal infections.

We present an elderly woman who developed acute kidney injury associated with a *Clostridium difficile* infection. The findings of her kidney biopsy had features of both IgA-dominant PIGN and classical IgAN. We also report the immunologic profile at the time of her acute illness.

Clinical history and initial laboratory data

A 67-year-old woman with no history of kidney disease was diagnosed with adenocarcinoma of the gallbladder; an attempt to fully remove the tumor was unsuccessful

and she was referred for further management. Baseline serum creatinine was 88.4 $\mu\text{mol/L}$ (1.0 mg/dL). She subsequently underwent a cystic-duct-stump wedge resection of the gallbladder. Her postoperative course was complicated by right-upper-quadrant pain, nausea, vomiting and fever. The serum creatinine rose to 168 $\mu\text{mol/L}$ (1.9 mg/dL). Urinalysis dipstick showed no protein or blood, and only trace leukocyte esterase. She was started on intravenous piperacillin/tazobactam for a suspected abscess at the surgical site. After volume repletion, the serum creatinine improved to 115 $\mu\text{mol/L}$ (1.3 mg/dL) 15 days after surgery and she was discharged from the hospital. Three days later, the patient became severely hypertensive with worsening edema in her legs and had diarrhea. On readmission to the hospital, her blood pressure was 201/94 mm Hg and oral temperature, 37.5°C (99.5°F). Physical examination was unremarkable except for a healed right-upper-quadrant incision and 2+ pitting pretibial edema. Laboratory studies included serum creatinine 168 $\mu\text{mol/L}$ (1.9 mg/dL), blood urea nitrogen 4.3 mmol/L (12 mg/dL) and serum albumin 27 g/L (2.7 g/dL). Urinalysis revealed 2+ protein and 3+ blood by dipstick, with >25 red blood cells and 11–25 white blood cells per high-power field. The 24-hour protein excretion was 2.4 g. Serum C3, C4 and CH50 levels were normal. Anti-nuclear antibody and serum cryoglobulins were negative. *C. difficile* cytotoxin on admission was negative; a second test during persistent severe diarrhea was positive. The serum creatinine continued to worsen, and six days after admission a percutaneous kidney biopsy was performed.

Kidney biopsy

The biopsy specimen for light microscopy contained 15 glomeruli, of which three were globally sclerosed and one had a segmental sclerotic lesion. The remaining glomeruli showed moderate to marked expansion of the mesangial matrix, mesangial and segmental endocapillary hypercellularity, and intracapillary neutrophils. There was no focal necrotic lesion. The glomerular basement membranes (GBMs) appeared prominent due to occasional double contours, large subendothelial deposits (Figure 1A) and intracapillary pseudothrombi (Figure 1A). There was a patchy interstitial inflammation without tubulitis. The arterioles showed mild hyaline deposition; the arteries were unremarkable.

Immunofluorescence microscopy showed three glomeruli, all with diffuse mesangial and segmental capillary-loop staining for IgA (4+, scale 0–4), C3 (4+), IgG (2+), IgM (trace), kappa light chains (3+) and lambda light chains (4+) (Figure 1B). Staining for C1q and albumin was absent. On electron microscopy, GBMs were extremely thickened due to segmental cellular interposition and massive subendothelial immune-complex deposits without substructure. One large subepithelial hump-like deposit was identified (Figure 1C). The mesangial areas were markedly expanded due to increased matrix and numerous large electron-dense deposits. The glomerular foot processes were completely effaced (Figure 1C).

Diagnosis

The diagnosis was diffuse proliferative glomerulonephritis with membranoproliferative features and dominant IgA deposits. The history of recent infection in conjunction with a light microscopy pattern of diffuse endocapillary hypercellularity with neutrophil infiltration in addition to mesangial and subendothelial deposits raised the possibility of an IgA-dominant PIGN.

Clinical follow-up

Due to the severity of the *C. difficile* colitis and the diagnosis of possible PIGN, no immunosuppressive therapy was instituted. Her kidney failure worsened and she eventually required hemodialysis. One year later, she remained on hemodialysis.

Discussion

This case demonstrates the difficulties in differentiating IgAN from IgA-dominant PIGN, especially when taking into account persistent or resolving PIGN [2]. Pathologic features that have been associated with a diagnosis of IgA-dominant PIGN, as opposed to IgAN, include a clinical history of recent *Staphylococcus aureus* infection, hypocomplementemia, predominant intracapillary neutrophilic infiltrate and large subepithelial humps [3]. Our patient was elderly and had no previous diagnosis of IgAN but did have a history of microscopic hematuria. She lacked clinical features typically associated with IgA-dominant PIGN such as hypocomplementemia and a preceding staphylococcal infection, and did not have

diabetes mellitus. On biopsy, she had subepithelial humps, IgA dominance with equally strong C3 staining on immunofluorescence microscopy, as well as neutrophilic infiltrate, and endocapillary hypercellularity, findings that favor a diagnosis of IgA-dominant PIGN. However, many of these features can be seen with active IgAN as well. Subepithelial humps, specifically, favor the diagnosis of IgA-dominant PIGN, but can also be present in active IgAN [4]. The number of subepithelial or intramembranous deposits per glomerulus may be a differentiating factor, as 13/13 cases with IgA-dominant PIGN in one series had more than five subepithelial or intramembranous deposits per glomerulus, with 10/13 having >10 per glomerulus [2]. Our patient had only one large subepithelial deposit in one of three glomeruli available for electron microscopy, suggesting a diagnosis of IgAN. Hypocomplementemia cannot be used as the distinguishing feature either. Nasr et al. found that only 72% of elderly patients with biopsy-proven PIGN (IgA-dominant and classical) had low serum levels of C3 or C4 [1]. Finally, stronger mesangial staining for lambda light chains than kappa light chains may point to IgAN [2]. Overall, clinical distinction between the two entities can be difficult.

The microbe classically associated with IgA-dominant PIGN is coagulase-positive staphylococcus [1, 3, 5]. Balb/c mice when immunized with *S. aureus* have been shown to develop mesangial deposits of IgA, IgG and C3 [6]. The *S. aureus* cell-envelope antigen has been identified as a possible causative antigen and, in one study, was present in 75% of cases with IgA-dominant PIGN and 68% of patients with IgAN [7]. However, these findings do not explain the association of IgA-dominant PIGN with coagulase-negative staphylococcus and Gram-negative organisms such as *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* [1, 3]. Mucosal infections are known to coincide with active IgAN. *C. difficile* as the inciting organism for glomerular IgA deposition has also been reported twice [8, 9]. Thus, neither the lack nor the presence of *S. aureus* in the clinical history fully eliminates or supports the diagnosis of IgA-dominant PIGN versus IgAN.

We performed immune profiling at the time of acute kidney injury. Central to the development of IgAN is the aberrant glycosylation of a portion of the circulating IgA1, characterized by galactose deficiency of the hinge-region O-linked glycans. This structural feature is more important than levels of total IgA1, as shown by patients with IgA1 myeloma who only rarely develop glomerular deposits of IgA [10]. The O-glycosylation nature of IgA1 has not been described previously in IgA-dominant PIGN. In our patient, ELISA demonstrated markedly elevated serum levels of total IgA. Western blot after SDS-PAGE separation of serum IgA under non-reducing conditions showed a normal polymer-to-monomer ratio. Serum level of galactose-deficient IgA1 was markedly elevated, to that normally found in patients with IgAN.

In IgAN, the circulating galactose-deficient IgA1 serves as the autoantigen target of circulating anti-glycan-specific IgG and/or IgA1, leading to formation of IgG-IgA1 immune complexes that deposit in the mesangium [11, 12]. To gauge the nephritogenicity of our patient's circulating IgA1, serum (native or IgA- or IgG-depleted) was fractionated by size-exclusion chromatography, fractions added to cultures of human primary mesangial cells, and cellular proliferation assessed by thymidine incorporation. Our patient had circulating IgG- and IgA1-containing immune complexes. Large complexes (>800 kDa) consisting of IgG3 and IgA1 stimulated proliferation of the mesangial

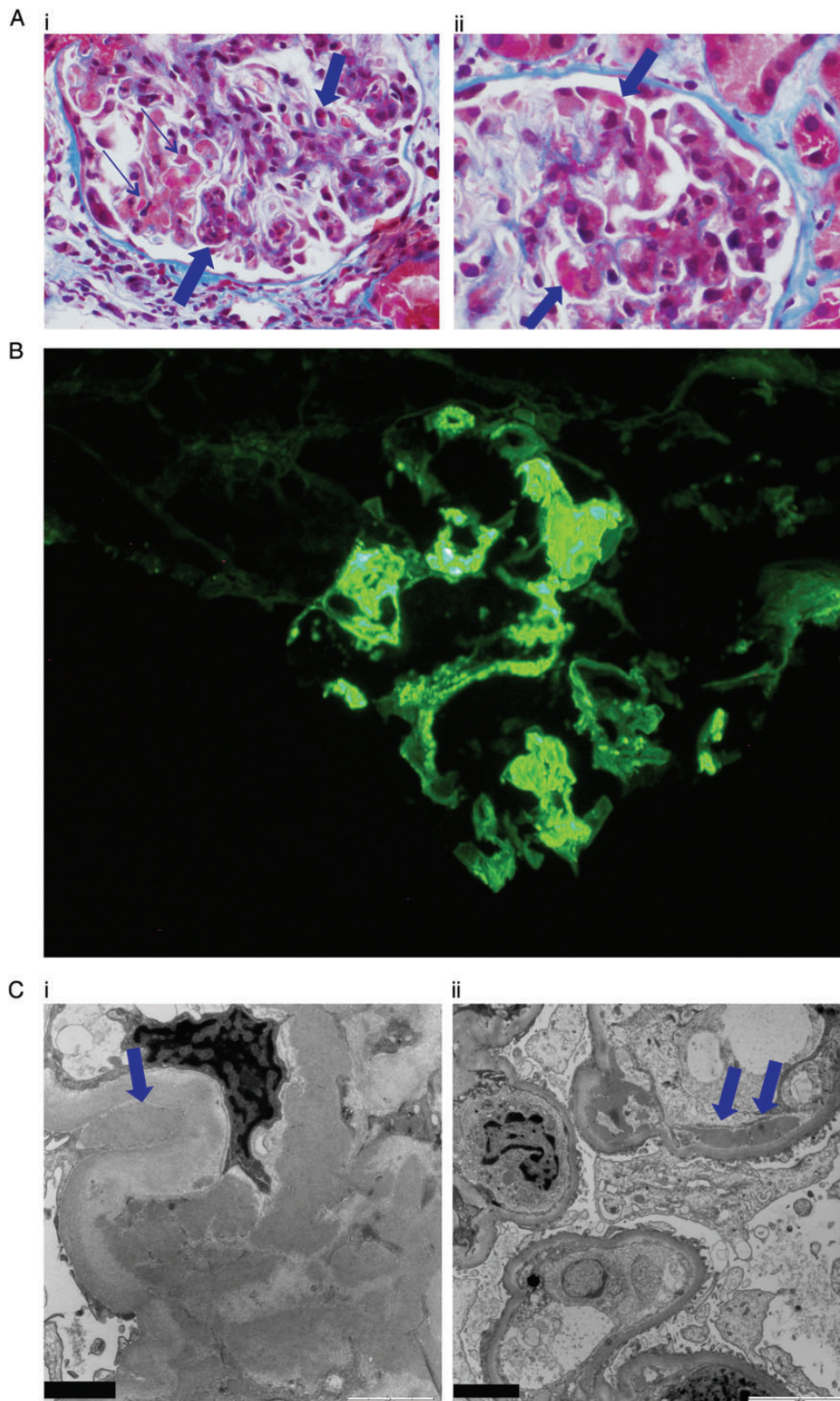


Fig. 1. Pathology features in the renal biopsy. (A) (i) Light microscopy: This glomerulus shows mild-to-moderate expansion of the mesangial matrix with mesangial hypercellularity and segmental endocapillary hypercellularity with intracapillary neutrophils (thick arrows). There are several intracapillary pseudothrombi (thin arrows). Trichrome $\times 600$. (A) (ii) This glomerulus shows prominent glomerular basement membranes with large subendothelial eosinophilic deposits and granular mesangial deposits (arrows). Trichrome $\times 600$. (B) Immunofluorescence microscopy. Very strong (4+) staining for IgA is shown in the mesangium and capillary loops. C3 also showed 4+ staining in the capillary loops (not illustrated). (C) (i) Electron microscopy. Numerous large electron-dense immune-complex deposits are present in the mesangium. One large hump-like subepithelial deposit (arrow) in the notch area is shown. The foot processes are completely effaced. (C) (ii) Subendothelial deposits (arrows).

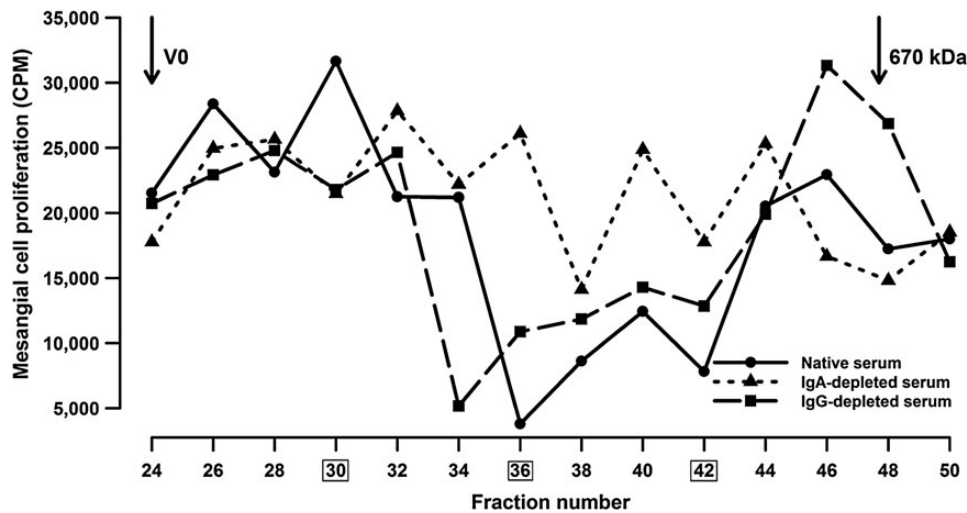


Fig. 2. Circulating IgA1-containing complexes were isolated from serum (native or IgA- or IgG-depleted) by size-exclusion chromatography on a calibrated Superose 6 column, fractions added to cultures of primary human mesangial cells, and cellular proliferation assessed by thymidine incorporation. High-molecular-mass fractions of serum induced proliferation of the mesangial cells. Fractions 26 and 30 stimulated cellular proliferation in an IgA- and IgG-dependent manner, whereas fractions 36–42 were inhibitory in an IgA-dependent manner. Fractions 30, 36 and 42 (boxed) were analyzed for total IgG and IgG subclasses (see Table 1).

Table 1. Analysis of IgG subclasses in stimulatory (30) and inhibitory (36, 42) fractions of serum

Fractions	30	36	42
Total IgG	+	+	+++
IgG1	–	+	+++
IgG2	–	–	+
IgG3	+	+	+++
IgG4	–	–	+

Results of western blot analyses are expressed as negative (–), positive (+) or strongly positive (+++).

cells whereas smaller complexes (700–800 kDa) did not (Figure 2), as has been described in patients with IgAN [13]. Depletion of IgA or IgG from serum removed stimulatory activity from the large-molecular-mass fractions, suggesting that IgA–IgG complexes were responsible for the stimulatory activity. Depletion of IgA, but not IgG, removed the inhibitory activity from fractions 36–42, indicating that the small-molecular-mass inhibitory complexes contained IgA (Figure 2). IgG3 was the only IgG subclass identified in the stimulatory complexes (Table 1). These results indicate that the pathogenesis of the kidney injury was similar to that of active IgAN.

In conclusion, the clinical and pathologic distinction of IgA-dominant PIGN and active IgAN can be very difficult. We have shown that in this patient the mechanisms of disease for the glomerular deposition of IgA associated with colitis induced by *C. difficile* were similar to those of patients with IgAN. Based on these molecular diagnoses and pathologic review, a diagnosis of active IgAN is favored; however, significant clinicopathological overlap clearly exists between these two entities. Further studies are needed to investigate the IgA1 profiles in patients with more classical IgA-dominant PIGN to confirm similarities or differences with the pathogenesis with IgAN. If such differences exist, they could be exploited to provide a molecular means to differentiate these two entities.

Concise methods

Immune complexes were isolated by fractionation of serum samples by size-exclusion chromatography and their biological activities were tested with cultured primary human mesangial cells [13]. ELISA and immunoblotting, including detection with subclass-specific antibodies after non-reducing SDS–PAGE, were performed, as described [14].

Conflict of interest statement. None declared.

Acknowledgements. This work was supported in part by grants from the National Institutes of Health DK078244, DK082753 and GM098539, and by a gift from the IGA Nephropathy Foundation of America.

References

- Nasr SH, Fidler ME, Valeri AM et al. Postinfectious glomerulonephritis in the elderly. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 187–195
- Haas M, Racusen LC, Bagnasco SM. IgA-dominant postinfectious glomerulonephritis: a report of 13 cases with common ultrastructural features. *Hum Pathol* 2008; 39: 1309–1316
- Nasr SH, D'Agati VD. IgA-dominant postinfectious glomerulonephritis: a new twist on an old disease. *Nephron Clin Pract* 2011; 119: c18–c26
- Yoshikawa N, Ito H, Nakahara C et al. Glomerular electron-dense deposits in childhood IgA nephropathy. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1985; 406: 33–43
- Nasr SH, Markowitz GS, Whelan JD et al. IgA-dominant acute poststaphylococcal glomerulonephritis complicating diabetic nephropathy. *Hum Pathol* 2003; 34: 1235–1241
- Sharmin S, Shimizu Y, Hagiwara M et al. *Staphylococcus aureus* antigens induce IgA-type glomerulonephritis in Balb/c mice. *J Nephrol* 2004; 17: 504–511
- Koyama A, Sharmin S, Sakurai H et al. *Staphylococcus aureus* cell envelope antigen is a new candidate for the induction of IgA nephropathy. *Kidney Int* 2004; 66: 121–132

8. Arrich J, Sodeck GH, Sengolge G *et al.* *Clostridium difficile* causing acute renal failure: case presentation and review. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1245–1247
9. Gaughan WJ, Hassan MH, McCue PA *et al.* Association of IgA nephropathy with *Clostridium difficile* colitis. *Am J Kidney Dis* 1999; 34: E1–E4
10. Zickerman AM, Allen AC, Talwar V *et al.* IgA myeloma presenting as Henoch-Schönlein purpura with nephritis. *Am J Kidney Dis* 2000; 36: 1–5
11. Tomana M, Novak J, Julian BA *et al.* Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *J Clin Invest* 1999; 104: 73–81
12. Suzuki H, Fan R, Zhang Z *et al.* Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *J Clin Invest* 2009; 119: 1668–1677
13. Novak J, Tomana M, Matousovic K *et al.* IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy differentially affect proliferation of mesangial cells. *Kidney Int* 2005; 67: 504–513
14. Suzuki H, Moldoveanu Z, Hall S *et al.* IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. *J Clin Invest* 2008; 118: 629–639

Received for publication: 2.4.14; Accepted in revised form: 6.8.14

JASN

Brief Review: Current understanding of the role of complement in IgA nephropathy

Journal:	<i>Journal of the American Society of Nephrology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Invited Feature
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Maillard, Nicolas; University of Alabama at Birmingham,, Microbiology Wyatt, Robert; University of Tennessee, Pediatrics Julian, Bruce; University of Alabama at Birmingham,, Microbiology Kirylyuk, Krzysztof; Columbia University, Medicine Gharavi, Ali; ColumbiaUniversity , Medicine FREMEAUX-BACCHI, VERONIQUE; UMRS 1138, Team "Complement and diseases", Cordeliers Research Center, Novak, Jan; University of Alabama at Birmingham, Microbiology
Keywords:	complement, IgA nephropathy, immune complexes

SCHOLARONE™
Manuscripts

view

Current understanding of the role of complement in IgA nephropathy

Nicolas Maillard,^{1,4} Robert J. Wyatt,² Bruce A. Julian,¹ Krzysztof Kiryluk,³ Ali Gharavi,³
Veronique Fremeaux-Bacchi⁵, Jan Novak¹

¹ University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA;

² University of Tennessee Health Science Center, Memphis, TN, USA;

³ Columbia University, New York, NY, USA

⁴ Université Jean Monnet, Saint Etienne, PRES Université de Lyon, France

⁵ UMRS 1138, Team "Complement and diseases", Cordeliers Research Center, Paris, France

Running Title: Complement in IgA Nephropathy

Word count for abstract: 186; Word count text: 2984

Corresponding author:

Dr. Jan Novak

University of Alabama at Birmingham

Department of Microbiology

845 19th Street South, BBRB 761A (Box 1)

Birmingham, AL 35294

Tel.: (205) 934-4480

Fax: (205) 934-3894

E-mail: jannovak@uab.edu

Abstract

Complement activation has a role in the pathogenesis of IgA nephropathy, an autoimmune disease mediated by pathogenic immune complexes consisting of galactose-deficient IgA1 bound by anti-glycan antibodies. Of the three complement-activation pathways, the alternative and lectin pathways are involved in IgA nephropathy. IgA can activate both pathways *in vitro* and their components are present in the mesangial immunodeposits, including properdin and factor H (alternative pathway) and MBL, MASP-1, MASP-2, and C4d (lectin pathway). Genome-wide association studies identified deletion of complement factor H-related genes 1 and 3 as protective against the disease. As the corresponding gene products are factor H-like regulators of the alternative pathway, we hypothesize that their absence could lead to a more potent complement inhibition by factor H. Complement activation can take place directly on IgA-containing immune complexes and/or after deposition in the mesangium. Based on the role of complement in the disease pathogenesis, complement factors and their fragments can serve as biomarkers in serum, urine, or renal tissue. A better understanding of the role of complement in IgA nephropathy may provide potential targets and rationale for development of complement-targeting therapy of the disease.

1
2
3 IgA nephropathy (IgAN), initially described by Jean Berger in 1968,¹ is the most frequent
4
5 primary glomerulopathy worldwide, leading to end-stage renal disease in up to 40% of the
6
7 patients within 20 years after the diagnostic biopsy.² The diagnosis is based on finding IgA as the
8
9 dominant or co-dominant immunoglobulin in the glomerular immunodeposits. The IgA is
10
11 exclusively of the IgA1 subclass.^{3,4} Complement component C3 is usually present in the same
12
13 distribution as IgA and the immunodeposits may contain also IgG, IgM, or both.⁵
14
15

16
17 Recent studies have confirmed an autoimmune nature of IgAN. The pathophysiology of
18
19 the disease is considered to be a “four-hit” mechanism.^{6,7} The first hit is characterized by
20
21 increased levels of circulatory polymeric IgA1 with aberrant *O*-glycosylation of the hinge region.
22
23 These molecules lack galactose on some *O*-glycans (galactose-deficient IgA1, Gd-IgA1), thus
24
25 exposing *N*-acetylgalactosamine (GalNAc). The second hit is the presence of circulating Gd-
26
27 IgA1-binding proteins that are considered to be mainly glycan-specific IgG or IgA1
28
29 autoantibodies targeting terminal GalNAc in the hinge region of Gd-IgA1.⁸ Other proteins can
30
31 bind Gd-IgA1, such as the soluble form of Fc α receptor (sCD89), and thus form complexed Gd-
32
33 IgA1, although it is not clear whether such complexes would activate complement.⁹ The third hit
34
35 is the formation of Gd-IgA1-containing circulating immune complexes, some of which may
36
37 deposit in the glomeruli and incite injury (hit four), potentially leading to chronic kidney damage.
38
39
40
41
42

43
44 Complement activation can generally occur through three different pathways (Figure
45
46 1).^{10,11} The first one, the classical pathway, is activated by IgG-containing (IgG1, 2, and 3, but
47
48 not IgG4) or IgM-containing immune complexes, through binding by C1q. C1qrs is then
49
50 assembled and cleaves complement components C2 and C4 to form C4b2a enzyme complex, a
51
52 C3 convertase.
53
54

55
56 The alternative pathway is initiated constantly by spontaneous hydrolysis of C3
57
58 (“tickover”), leading to the formation of C3(H₂O)Bb which cleaves C3 into C3a and C3b.¹²
59
60

1
2
3 Amplification of this pathway is based on the covalent binding of C3b to activating surfaces (*e.g.*,
4 bacterial surface), followed by cleavage of factor B (FB). In the presence of factor D (FD) and
5 properdin, this process leads to formation of alternative-pathway C3 convertase (C3bBb).¹³
6 Properdin promotes association between C3b and FB, thus stabilizing the alternative pathway C3
7 convertase (C3bBb).¹⁴ FH and factor I (FI) tightly negatively regulate the alternative pathway in
8 solution and on self-cellular membranes whereas decay accelerating factor (DAF; CD55),
9 membrane cofactor protein (MCP; CD46), and CD59 regulate the alternative pathway only on
10 self-cellular membranes.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

22 The activation of the lectin pathway is based on recognition of microbial cell-surface
23 carbohydrates by mannan-binding lectin (MBL) or ficolin. This process leads to cleavage of C2
24 and C4 to form the classical-pathway C3 convertase C4bC2a.
25
26
27
28

29 Activation of each of the three complement pathways produces a C3 convertase that
30 accounts for the cleavage of C3 into C3a (an anaphylatoxin) and C3b; the addition of C3b then
31 turns C3 convertases into C5 convertases. This last product ultimately leads to formation of the
32 terminal complete complement complex consisting of C5b, C6, C7, C8, and C9 (C5b-9) that
33 inserts into the lipid bilayer of cellular membranes. For nucleated cells, the amount of C5b-9 is
34 rarely sufficient to induce the lysis of the cells, but these “sublytic” quantities are nevertheless
35 deleterious. Sublytic C5b-9 on podocytes can increase release of various proteases, oxidants,
36 cytokines, and components of extracellular matrix that disrupt the function of the glomerular
37 basement membrane and induce apoptosis and glomerular scarring.^{15,16} Mesangial cells are also
38 affected by C5b-9, as shown by fibronectin synthesis, production of TGF β and IL-6, or cellular
39 apoptosis in a rat model of mesangioproliferative nephritis.^{17,18}
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

55 The role of complement in the pathogenesis of IgAN has been suspected since discovery
56 of the disease, as the components of complement activation have been commonly detected in the
57
58
59
60

1
2
3 renal biopsy specimens.^{19,20} Here, we will review the current understanding of the mechanisms of
4
5 complement activation in IgAN and its role in development of the disease.
6
7

8 9 **Complement pathways in IgAN**

10 11 **Alternative pathway**

12
13 C3 mesangial co-deposition is a hallmark of IgAN, being present in more than 90% of
14
15 cases.^{19,21,22} Properdin is co-deposited with IgA and C3 in 75-100% of patients and with FH in
16
17 30-90% of cases.²³⁻²⁵ Complement activation through the alternative pathway leads to
18
19 accumulation of FI- and FH-induced C3 proteolytic fragments (*e.g.*, iC3b and C3d; Figure 2.).
20
21 Several centers have described increased plasma levels of these fragments in patients with
22
23 IgAN,²⁶⁻²⁹ that were associated with severity of the histologic lesions in one study³⁰ and
24
25 progression of the disease in another study.²⁹ Circulating levels of C3 breakdown products are
26
27 also increased in 70% of pediatric patients with IgAN.³¹
28
29
30
31
32

33
34 IgA has been demonstrated to activate the alternative pathway *in vitro*.³² The Fab
35
36 fragment of immobilized human IgA can activate C3, in alternative pathway-specific
37
38 conditions.³³ Notably, the hinge region of IgA1 was not critical in this process, but the polymeric
39
40 form of IgA was necessary. Another study has reported that while IgA1 and its Fab fragments
41
42 reduced complement activation through the classical pathway mediated by IgG antibodies,³⁴
43
44 surface-bound IgA1 activated the alternative pathway.³⁵ The mechanism of IgA-mediated
45
46 alternative pathway activation remains poorly understood, but is thought that it requires
47
48 stabilization of the C3 convertase.³⁶
49
50
51
52
53

54 55 **Lectin pathway**

56
57
58
59
60

1
2
3 Recent data revealed the ability of polymeric IgA to activate the lectin pathway.³³ Polymeric IgA
4 can bind MBL *in vitro* in a Ca²⁺-dependent manner, probably through the N-linked glycans as
5
6
7
8 IgA1 and IgA2 share this property. MBL is co-deposited with IgA in 17-25% of IgAN
9
10 biopsies;³⁷⁻³⁹ one study showed correlation of MBL co-deposits with the severity of the disease.⁴⁰
11
12 Mesangial deposition of C4 (especially C4d) and C4-binding protein is not rare in IgAN and was
13
14 initially considered to be a consequence of classical pathway activation.^{21,23} However, these C4
15
16 deposits are probably due to activation through the lectin pathway, as they are associated with co-
17
18 deposition of MBL-associated serine proteases (MASP-1 and MASP-2) and L-ficolin.^{37,40}
19
20
21
22
23

24 **Classical pathway**

25
26 Evidence of classical pathway activation, such as C1q deposits, is usually lacking in kidney-
27
28 biopsy specimens of IgAN patients.^{22,41} Components of this pathway can be rarely observed in
29
30 the glomeruli (less than 10% of biopsy specimens) and their deposition is limited to patients with
31
32 poor clinical outcomes.⁴² In this setting, activation of classical pathway may not be specific for
33
34 the disease but rather occurs in highly damaged kidneys. C4 (and C4d) and C4-binding protein,
35
36 present in the mesangial area in ~30% of patients' biopsies and initially thought to be markers of
37
38 classical pathway activation, are more likely products of activation of the lectin pathway.⁴⁰
39
40
41
42
43
44

45 **Terminal complement complex**

46
47 Mesangial co-deposits of terminal complement complex, also called membrane attack complex,
48
49 are commonly observed in IgAN,^{24,43} based on detection of C9 neoantigen corresponding to the
50
51 C5b-9 complex. Urinary excretion of sC5b-9 is elevated in IgAN patients.⁴⁴ The blockade of C5
52
53 could, in this respect, represent a promising therapy for some patients. The first case of a child
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 with severe IgAN who benefitted from treatment with a monoclonal anti-C5 antibody,
4
5 eculizumab, was recently published.⁴⁵
6
7
8
9

10 **Inherited partial deficiencies of alternative pathway proteins**

11
12 Inherited partial deficiencies of several complement component or regulatory proteins have been
13
14 found in some patients with IgAN. Three deficiencies are related to regulators of the alternative
15
16 pathway: properdin, FH, and FI.⁴⁶⁻⁴⁸ These findings may suggest that lower than normal serum
17
18 levels of alternative pathway proteins can sometimes be related to development or clinical
19
20 expression of IgAN. However, a recent series of IgAN patients failed to find any mutation of the
21
22 *FH* gene.⁴⁹ Also, another study showed the absence of mutation of *CFH*, *CFI*, and *MCP* genes in
23
24 IgAN patients presenting with severe thrombotic microangiopathy.⁵⁰
25
26
27
28
29
30

31 ***CFHR1/3* gene deletion: a role of *CFHR1/3* proteins in regulation of complement activation**

32
33 Large international genome-wide association studies (GWAS) have identified several genomic
34
35 regions associated with the risk of IgAN.⁵¹⁻⁵⁴ Apart from the loci in the HLA region, these studies
36
37 also associated the disease with SNP rs6677604 (Chr. 1q32), which represents a proxy for the
38
39 deletion of complement factor H-related genes 1 and 3 (*CFHR1/3*). This genetic variant protects
40
41 against development of IgAN.⁵¹ A further analysis of this protective effect reveals that this
42
43 deletion correlates with higher plasma FH level and lower plasma C3a level, as well as less
44
45 mesangial C3 deposition.⁵⁵ The allelic frequency of the deletion exhibits marked differences
46
47 across worldwide populations. The deletion has the highest frequency in individuals of African
48
49 ancestry (*e.g.*, 55% in DNA samples from Nigeria) and the lowest frequency in samples from
50
51 South America and East Asia (0-5%). The allelic frequency of the *CFHR1/CFHR3* gene deletion
52
53 in the United Kingdom and other European populations ranges from 18 to 24%.^{56,57}
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

CFHR genes are located downstream of the gene encoding FH and consist of five genes (*CFHR1* to *CFHR5*). The *CFHR* proteins share a high sequence homology with FH, with a short consensus repeat (SCR) repetition frame.⁵⁸ The number of SCRs varies from five for *CFHR1* and four for *CFHR2* to nine for *CFHR4* and *CFHR5*. *CFHR* proteins are smaller than FH that contains 20 SCRs. *CFHR* proteins 1, 2, and 5, but not *CFHR3* and *CFHR4*, contain N-terminal dimerization domains that allow homo- and hetero-dimers to form (*e.g.*, *CFHR1* molecule can bind *CFHR1*, *CFHR2* or *CFHR5*).⁵⁹ *CFHR1* circulates exclusively as dimers (homo- and hetero-dimers), formed due to the interactions of the two N-terminal domains.⁵⁹ The C-terminal SCRs sequences are highly conserved in *CFHR* proteins (36 to 100%) and correspond to the SCRs 19 and 20 of FH that account for the recognition of C3b and cell surfaces (Figure 3). FH presents C3b binding sites at each end of the molecule. The N-terminal C3b-binding site mediates the accelerated decay of the alternative-pathway C3 convertase (C3bBb) and the cofactor activity for the FI-dependent proteolytic inactivation of C3b. The C-terminal region binds C3b and polyanions normally present on the cell surfaces (*e.g.*, heparan sulfates and glycosaminoglycans). This region is essential for the complement regulatory activity of FH on surfaces and to discriminate between self and pathogens. Most pathogens lack these polyanions on their surfaces. Each of the five *CFHR* binds to C3b and to C3d and discriminates between cell and non-cell surfaces.^{59,60}

46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

CFHR1 lacks cofactor activity for FI for the cleavage of C3b and lacks decay activity for the dissociation of the C3 convertase C3bBb.⁶¹ In contrast, *CFHR3* shows low cofactor activity for FI.⁶² However, *CFHR3* and *CFHR1* compete with FH for binding to C3b.⁶³ Only *CFHR1* may have the ability to block C5b-9 formation, a function mediated through the binding of the SCR1-SCR2 domains of *CFHR1* to C5 and C5b6 (Figure 4).⁶⁴

1
2
3 Deletion of *CFHR1/3* protects against development of not only IgAN but also age-related
4 macular degeneration.⁶⁵⁻⁶⁷ The hypothetical mechanism of this protection is based on (i)
5 competition between FH and CFHR1 that increases the functional activity of FH on surfaces in
6 the absence of CFHR1; and (ii) higher FH concentrations associated with the deletion conferring
7 an increased protection.⁶⁷ Interestingly, homozygosity for the deletion has been associated with a
8 particular form of atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS) wherein anti-FH antibodies
9 frequently occur. In this disease, absence of CFHR1 and CFHR3 in the circulation is thought to
10 favor the emergence of FH-specific antibodies that target mostly the region of C3- and surface-
11 recognition.⁶⁸⁻⁷¹ These sites are also known to be the hotspot of aHUS associated-FH
12 mutations.^{72,73} Lastly, whereas the *CFHR1/3* deletion protects against IgAN, it is also associated
13 with an increased risk of development of systemic lupus erythematosus.⁷⁴ The molecular basis for
14 this intriguing association is presently not understood.

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32 The genome-wide significant effect of *CFHR3,1* gene deletion on the reduced risk of
33 IgAN qualifies activators and regulators of the alternative pathway as major players in the
34 pathogenesis of the disease. However, the role of CFHR in regulation and activation of the
35 alternative pathway in IgAN remains to be elucidated.

43 **Where complement is activated: from soluble circulating immune complexes to glomeruli**

44
45
46 Theoretically, complement can be activated directly on immune complexes in a soluble phase, in
47 the mesangial deposits, or at both locations. In patients with IgAN, the setting(s) where
48 complement activation takes place remains to be determined.

49
50
51
52
53 The activation of classical pathway on IgG- or IgM-containing circulating immune
54 complexes is a common feature in several autoimmune disorders (*e.g.*, systemic lupus
55 erythematosus) and can lead to discordant results: tissue co-deposition of immune complexes

1
2
3 with attached complement with local inflammation or clearance of the complexes from the
4
5 circulation.¹⁰ In IgAN, it is unclear whether IgA1-containing circulating immune complexes have
6
7 complement elements.⁷⁵⁻⁷⁸ Nevertheless, elevated serum concentrations of C3-derived products in
8
9 IgAN patients suggest a soluble-phase activation of the alternative pathway.²⁸ Proteomic analyses
10
11 of patients' circulating immune complexes and complexes formed *in vitro* from Gd-IgA1 and
12
13 anti-glycan IgG revealed the presence of C3.⁷⁹ In this study, cleavage products (iC3b, C3c, C3dg,
14
15 and C3d) were detected in high-molecular-mass fractions, suggesting that the activation and
16
17 regulation of the alternative pathway occurred directly on the immune complexes. This finding
18
19 could mean that these complexes have an activating surface and carry C3bBb convertase.
20
21
22
23

24
25 Complement alternative and lectin pathways can also be activated *in situ* in renal
26
27 immunodeposits. Notably, C3 glomerulonephritis displays mesangial proliferation associated
28
29 with C3 glomerular deposits in the absence of immunoglobulins in most cases. The pathogenesis
30
31 is likely driven by either an inherited defect in the regulation of the alternative pathway (*e.g.*,
32
33 internal duplication of the *CFHR5* gene) or an acquired excess of alternative pathway activation
34
35 (presence of a C3 nephritic factor). The data from studies of this disease indicate that (i)
36
37 glomerular C3 deposition is favored by a defect in the regulation of alternative pathway, possibly
38
39 triggered by immune complexes and (ii) C3 alone can induce glomerular lesions similar to those
40
41 in IgAN.⁸⁰⁻⁸³ Mesangial cells have been shown to be a player in local complement-driven
42
43 glomerular inflammation. Mesangial cells produce FH⁸⁴ and, in an inflammatory environment
44
45 (IL1, TNF α), they produce C3.^{85,86} C3a and C5a can induce cultured human mesangial cells to
46
47 produce DAF, a potent membrane-bound regulator of the alternative pathway.⁸⁷ The expression
48
49 of DAF and C3 mRNA by mesangial cells in IgAN was confirmed by *in situ* hybridization as
50
51 relatively specific for the disease.⁸⁸ Gd-IgA1 has been recently shown to be a potent inducer of
52
53 mesangial C3 expression and secretion.⁸⁶ C3a, the anaphylatoxin produced by cleavage of C3,
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 induces a secretory phenotype of cultured mesangial cells, characterized by an increase in
4 expression of genes encoding components of the extracellular matrix (collagen IV, osteopontin,
5 and matrix Gla protein). This transition may explain the *in vivo* expansion of the mesangial
6 matrix commonly observed in renal biopsies of patients with IgAN.⁸⁵ The effect has been shown
7 to be dependent on C3a receptor (C3aR), although another study, using *in situ* hybridization,
8 failed to find C3aR expression on normal human mesangial cells.⁸⁹
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

20 **Complement as a biomarker**

21
22 Plasma C3 levels have been proposed to be a prognostic biomarker of IgAN. In several studies in
23 Asia, a high serum IgA/C3 ratio was associated with disease progression.^{90,91} Another study
24 showed that decreased serum C3 level (<90 mg/dl) predicted a worse outcome.⁹² Plasma levels of
25 FH are inconsistent: not altered in one study,⁴⁹ but increased in another study.⁹³ In the latter
26 report, serum levels of FI, FB, and properdin were also increased in a cohort of 50 IgAN patients
27 vs. 50 healthy controls.⁹³
28
29
30
31
32
33
34
35

36 Urinary complement excretion has also been suggested as a biomarker of the activity of
37 IgAN. Urinary excretion of FH and sC5b-9 correlated positively with proteinuria, serum
38 creatinine increase, interstitial fibrosis, and the percentage of global glomerular sclerosis,
39 whereas urinary properdin was associated only with proteinuria. The urinary excretion of these
40 biomarkers was higher in the patients with IgAN than in healthy controls.⁴⁴ Another study
41 described increased excretion of FH in patients with more severe histological lesions.⁹⁴ These
42 analyses, however, have not included disease controls with proteinuria to assess a non-specific
43 excretion due to a damaged glomerular filtration barrier.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

55 Biopsy-based complement immunostaining is another potential prognostic biomarker.
56 This evaluation was excluded from the Oxford classification system.^{95,96} It is notable that C3 was
57
58
59
60

1
2
3 absent in an autopsy series designed to estimate IgAN prevalence,⁹⁷ meaning that C3 is usually
4
5 absent in asymptomatic mesangial deposition of IgA. In a recent study of Iranian patients,
6
7 mesangial C3 was associated with an increased serum creatinine level, a higher frequency of
8
9 crescent formation, and more endocapillary hypercellularity, mesangial cellularity and segmental
10
11 sclerosis.⁹⁸ Interestingly, in a study of Korean patients, a low plasma concentration of C3
12
13 correlated with the intensity of mesangial C3 deposition, and each finding predicted a higher risk
14
15 of progression to ESRD.⁹² The predominance of C3c deposition versus that of C3d was
16
17 associated with a more severe clinical expression, manifested as a more rapid decline in eGFR.⁹⁹
18
19 The glomerular activation of the lectin pathway has been also demonstrated as a biomarker for
20
21 disease severity. Mesangial staining for MBL has been associated with worse renal clearance
22
23 function and greater proteinuria.⁶⁴ C4d mesangial deposition is a potential biomarker of growing
24
25 interest. The assessment is widespread in renal pathology laboratories and can be easily
26
27 performed routinely. In a study of Spanish patients,¹⁰⁰ the 20-year renal survival was strikingly
28
29 worse when C4d was detected in the mesangium (C4d⁺, 28% vs. C4d⁻, 85%). This differential
30
31 effect was independent of eGFR and proteinuria at time of biopsy. A study in Asia showed a
32
33 similar effect.¹⁰¹

43 **Conclusion**

44
45 Activation of complement plays a key role in the pathogenesis and clinical expression of IgAN
46
47 (Figure 5). This process is mediated through the alternative and lectin pathways and likely occurs
48
49 systemically on IgA-containing circulating immune complexes as well as locally in glomeruli. As
50
51 with aHUS and C3 nephropathy, abnormalities of alternative pathway regulatory genes are
52
53 emerging as a key element to partly drive the development of disease. Activation of C3, assessed
54
55 in plasma by its decreased levels and increased levels of its breakdown fragments and in biopsy
56
57
58
59
60

1
2
3 specimens by its glomerular deposition, represents a biomarker of activity. Mesangial deposition
4
5 of C4d needs further evaluation to determine its efficacy as a clinically useful tool. Approaches
6
7 that target complement activation (such as the recently available anti-C5 and anti-C5aR
8
9 antibodies) may represent a promising option for treatment of some patients with IgAN.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Acknowledgements

This study was supported in part by the NIH grants DK078244, GM098539, DK090207, and DK082753, and by a gift from the IGA Nephropathy Foundation of America.

For Peer Review

References

1. Berger J, Hinglais N: [Intercapillary deposits of IgA-IgG]. *J Urol Nephrol (Paris)* 74: 694-695, 1968
2. Berthoux FC, Mohey H, Afiani A: Natural history of primary IgA nephropathy. *Semin Nephrol* 28: 4-9, 2008
3. Conley ME, Cooper MD, Michael AF: Selective deposition of immunoglobulin A1 in immunoglobulin A nephropathy, anaphylactoid purpura nephritis, and systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 66: 1432-1436, 1980
4. Russell MW, Mestecky J, Julian BA, Galla JH: IgA-associated renal diseases: antibodies to environmental antigens in sera and deposition of immunoglobulins and antigens in glomeruli. *J Clin Immunol* 6: 74-86, 1986
5. Jennette JC: The immunohistology of IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 12: 348-352, 1988
6. Wyatt RJ, Julian BA: IgA nephropathy. *N Engl J Med* 368: 2402-2414, 2013
7. Suzuki H, Kiryluk K, Novak J, Moldoveanu Z, Herr AB, Renfrow MB, Wyatt RJ, Scolari F, Mestecky J, Gharavi AG, Julian BA: The pathophysiology of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 22: 1795-1803, 2011
8. Suzuki H, Fan R, Zhang Z, Brown R, Hall S, Julian BA, Chatham WW, Suzuki Y, Wyatt RJ, Moldoveanu Z, Lee JY, Robinson J, Tomana M, Tomino Y, Mestecky J, Novak J: Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *J Clin Invest* 119: 1668-1677, 2009
9. Launay P, Grossetete B, Arcos-Fajardo M, Gaudin E, Torres SP, Beaudoin L, Patey-Mariaud de Serre N, Lehuen A, Monteiro RC: Fc α receptor (CD89) mediates the development of immunoglobulin A (IgA) nephropathy (Berger's disease). Evidence for pathogenic soluble receptor-IgA complexes in patients and CD89 transgenic mice. *J Exp Med* 191: 1999-2009, 2000
10. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD: Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 11: 785-797, 2010
11. Kemper C, Pangburn MK, Fishelson Z: Complement Nomenclature 2014. *Mol Immunol* 61: 56-58, 2014

12. Sahu A, Lambris JD: Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol Rev* 180: 35-48, 2001
13. Roumenina LT, Loirat C, Dragon-Durey MA, Halbwachs-Mecarelli L, Sautes-Fridman C, Fremeaux-Bacchi V: Alternative complement pathway assessment in patients with atypical HUS. *J Immunol Methods* 365: 8-26, 2011
14. Kemper C, Atkinson JP, Hourcade DE: Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annu Rev Immunol* 28: 131-155, 2010
15. Cybulsky AV, Takano T, Papillon J, McTavish AJ: Complement-induced phospholipase A2 activation in experimental membranous nephropathy. *Kidney Int* 57: 1052-1062, 2000
16. Nangaku M, Shankland SJ, Couser WG: Cellular response to injury in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 16: 1195-1204, 2005
17. Qiu W, Zhou J, Zhu G, Zhao D, He F, Zhang J, Lu Y, Yu T, Liu L, Wang Y: Sublytic C5b-9 triggers glomerular mesangial cell apoptosis via XAF1 gene activation mediated by p300-dependent IRF-1 acetylation. *Cell Death Dis* 5: e1176, 2014
18. Zhang J, Li Y, Shan K, Wang L, Qiu W, Lu Y, Zhao D, Zhu G, He F, Wang Y: Sublytic C5b-9 induces IL-6 and TGF-beta1 production by glomerular mesangial cells in rat Thy-1 nephritis through p300-mediated C/EBPbeta acetylation. *FASEB J* 28: 1511-1525, 2014
19. Evans DJ, Williams DG, Peters DK, Sissons JG, Boulton-Jones JM, Ogg CS, Cameron JS, Hoffbrand BI: Glomerular deposition of properdin in Henoch-Schonlein syndrome and idiopathic focal nephritis. *Br Med J* 3: 326-328, 1973
20. Floege J, Moura IC, Daha MR: New insights into the pathogenesis of IgA nephropathy. *Semin Immunopathol* 36: 431-442, 2014
21. Wyatt RJ: The complement system in IgA nephropathy and Henoch-Schonlein purpura: functional and genetic aspects. *Contrib Nephrol* 104: 82-91, 1993
22. McCoy RC, Abramowsky CR, Tisher CC: IgA nephropathy. *Am J Pathol* 76: 123-144, 1974
23. Miyazaki R, Kuroda M, Akiyama T, Otani I, Tofuku Y, Takeda R: Glomerular deposition and serum levels of complement control proteins in patients with IgA nephropathy. *Clin Nephrol* 21: 335-340, 1984
24. Rauterberg EW, Lieberknecht HM, Wingen AM, Ritz E: Complement membrane attack (MAC) in idiopathic IgA-glomerulonephritis. *Kidney Int* 31: 820-829, 1987

- 1
2
3 25. Tomino Y, Sakai H, Nomoto Y, Endoh M, Arimori S, Fujita T: Deposition of C4-binding
4 protein and beta 1H globulin in kidneys of patients with IgA nephropathy. *Tokai J Exp*
5 *Clin Med* 6: 217-222, 1981
6
7
- 8 26. Lagrue G, Branellec A, Intrator L, Moisy M, Sobel A: [Measurements of serum C3d in
9 primitive chronic glomerular nephropathies (author's transl)]. *Nouv Presse Med* 8: 1153-
10 1156, 1979
11
12
- 13 27. Solling J: Circulating immune complexes and complement breakdown product C3d in
14 glomerulonephritis and kidney transplantation. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C*
15 92: 213-220, 1984
16
17
- 18 28. Wyatt RJ, Kanayama Y, Julian BA, Negoro N, Sugimoto S, Hudson EC, Curd JG:
19 Complement activation in IgA nephropathy. *Kidney Int* 31: 1019-1023, 1987
20
21
- 22 29. Zwirner J, Burg M, Schulze M, Brunkhorst R, Gotze O, Koch KM, Floege J: Activated
23 complement C3: a potentially novel predictor of progressive IgA nephropathy. *Kidney Int*
24 51: 1257-1264, 1997
25
26
- 27 30. Wyatt RJ, Julian BA: Activation of complement in IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 12:
28 437-442, 1988
29
30
- 31 31. Tanaka C, Suhara Y, Kikkawa Y: [Circulating immune complexes and complement
32 breakdown products in childhood IgA nephropathy]. *Nihon Jinzo Gakkai Shi* 33: 709-717,
33 1991
34
35
- 36 32. Hiemstra PS, Gorter A, Stuurman ME, Van Es LA, Daha MR: Activation of the alternative
37 pathway of complement by human serum IgA. *Eur J Immunol* 17: 321-326, 1987
38
39
- 40 33. Roos A, Bouwman LH, van Gijlswijk-Janssen DJ, Faber-Krol MC, Stahl GL, Daha MR:
41 Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *J*
42 *Immunol* 167: 2861-2868, 2001
43
44
- 45 34. Russell MW, Reinholdt J, Kilian M: Anti-inflammatory activity of human IgA antibodies and
46 their Fab alpha fragments: inhibition of IgG-mediated complement activation. *Eur J*
47 *Immunol* 19: 2243-2249, 1989
48
49
- 50 35. Russell MW, Mansa B: Complement-fixing properties of human IgA antibodies. Alternative
51 pathway complement activation by plastic-bound, but not specific antigen-bound, IgA.
52 *Scand J Immunol* 30: 175-183, 1989
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
36. Daha NA, Banda NK, Roos A, Beurskens FJ, Bakker JM, Daha MR, Trouw LA: Complement activation by (auto-) antibodies. *Mol Immunol* 48: 1656-1665, 2011
 37. Endo M, Ohi H, Ohsawa I, Fujita T, Matsushita M: Glomerular deposition of mannose-binding lectin (MBL) indicates a novel mechanism of complement activation in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 13: 1984-1990, 1998
 38. Hisano S, Matsushita M, Fujita T, Endo Y, Takebayashi S: Mesangial IgA2 deposits and lectin pathway-mediated complement activation in IgA glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 38: 1082-1088, 2001
 39. Matsuda M, Shikata K, Wada J, Sugimoto H, Shikata Y, Kawasaki T, Makino H: Deposition of mannan binding protein and mannan binding protein-mediated complement activation in the glomeruli of patients with IgA nephropathy. *Nephron* 80: 408-413, 1998
 40. Roos A, Rastaldi MP, Calvaresi N, Oortwijn BD, Schlagwein N, van Gijlswijk-Janssen DJ, Stahl GL, Matsushita M, Fujita T, van Kooten C, Daha MR: Glomerular activation of the lectin pathway of complement in IgA nephropathy is associated with more severe renal disease. *J Am Soc Nephrol* 17: 1724-1734, 2006
 41. D'Amico G, Imbasciati E, Barbiano Di Belgioioso G, Bertoli S, Fogazzi G, Ferrario F, Fellin G, Ragni A, Colasanti G, Minetti L, et al.: Idiopathic IgA mesangial nephropathy. Clinical and histological study of 374 patients. *Medicine (Baltimore)* 64: 49-60, 1985
 42. Lee HJ, Choi SY, Jeong KH, Sung JY, Moon SK, Moon JY, Lee SH, Lee TW, Ihm CG: Association of C1q deposition with renal outcomes in IgA nephropathy. *Clin Nephrol* 80: 98-104, 2013
 43. Miyamoto H, Yoshioka K, Takemura T, Akano N, Maki S: Immunohistochemical study of the membrane attack complex of complement in IgA nephropathy. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 413: 77-86, 1988
 44. Onda K, Ohsawa I, Ohi H, Tamano M, Mano S, Wakabayashi M, Toki A, Horikoshi S, Fujita T, Tomino Y: Excretion of complement proteins and its activation marker C5b-9 in IgA nephropathy in relation to renal function. *BMC Nephrol* 12: 64, 2011
 45. Rosenblad T, Rebetz J, Johansson M, Bekassy Z, Sartz L, Karpman D: Eculizumab treatment for rescue of renal function in IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol*, 2014
 46. Wyatt RJ, Julian BA, Galla JH: Properdin deficiency with IgA nephropathy. *N Engl J Med* 305: 1097, 1981

- 1
2
3 47. Wyatt RJ, Julian BA, Weinstein A, Rothfield NF, McLean RH: Partial H (beta 1H) deficiency
4 and glomerulonephritis in two families. *J Clin Immunol* 2: 110-117, 1982
5
6
7 48. Wyatt RJ, Schneider PD, Alpers CE, Hudson EC, Julian BA: C4B deficiency in two siblings
8 with IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 15: 66-71, 1990
9
10 49. Edey M, Strain L, Ward R, Ahmed S, Thomas T, Goodship TH: Is complement factor H a
11 susceptibility factor for IgA nephropathy? *Mol Immunol* 46: 1405-1408, 2009
12
13 50. El Karoui K, Hill GS, Karras A, Jacquot C, Moulonguet L, Kourilsky O, Fremeaux-Bacchi V,
14 Delahousse M, Duong Van Huyen JP, Loupy A, Bruneval P, Nochy D: A
15 clinicopathologic study of thrombotic microangiopathy in IgA nephropathy. *J Am Soc*
16 *Nephrol* 23: 137-148, 2012
17
18 51. Gharavi AG, Kiryluk K, Choi M, Li Y, Hou P, Xie J, Sanna-Cherchi S, Men CJ, Julian BA,
19 Wyatt RJ, Novak J, He JC, Wang H, Lv J, Zhu L, Wang W, Wang Z, Yasuno K, Gunel
20 M, Mane S, Umlauf S, Tikhonova I, Beerman I, Savoldi S, Magistroni R, Ghiggeri GM,
21 Bodria M, Lugani F, Ravani P, Ponticelli C, Allegri L, Boscutti G, Frasca G, Amore A,
22 Peruzzi L, Coppo R, Izzi C, Viola BF, Prati E, Salvadori M, Mignani R, Gesualdo L,
23 Bertinetto F, Mesiano P, Amoroso A, Scolari F, Chen N, Zhang H, Lifton RP: Genome-
24 wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nat Genet* 43:
25 321-327, 2011
26
27 52. Kiryluk K, Novak J: The genetics and immunobiology of IgA nephropathy. *J Clin Invest* 124:
28 2325-2332, 2014
29
30 53. Kiryluk K, Li Y, Sanna-Cherchi S, Rohanizadegan M, Suzuki H, Eitner F, Snyder HJ, Choi
31 M, Hou P, Scolari F, Izzi C, Gigante M, Gesualdo L, Savoldi S, Amoroso A, Cusi D,
32 Zamboli P, Julian BA, Novak J, Wyatt RJ, Mucha K, Perola M, Kristiansson K, Viktorin
33 A, Magnusson PK, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Stefansson K, Boland A, Metzger
34 M, Thibaudin L, Wanner C, Jager KJ, Goto S, Maixnerova D, Karnib HH, Nagy J, Panzer
35 U, Xie J, Chen N, Tesar V, Narita I, Berthoux F, Floege J, Stengel B, Zhang H, Lifton
36 RP, Gharavi AG: Geographic differences in genetic susceptibility to IgA nephropathy:
37 GWAS replication study and geospatial risk analysis. *PLoS Genet* 8: e1002765, 2012
38
39 54. Kiryluk K, Li Y, Scolari F, Sanna-Cherchi S, Choi M, Verbitsky M, Fasel D, Lata S, Prakash
40 S, Shapiro S, Fischman C, Snyder HJ, Appel G, Izzi C, Viola BF, Dalleria N, Del Vecchio
41 L, Barlassina C, Salvi E, Amoroso A, Bertinetto F, Savoldi S, Rocchietti M, Amore A,
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Peruzzi L, Coppo R, Salvadori M, Ravani P, Magistroni R, Ghiggeri GM, Caridi GL,
4 Bodria M, Lugani F, Allegri L, Delsante M, Maiorana M, Magnano A, Frasca G, Boscutti
5 G, Ponticelli C, Mignani R, Marcantoni C, Santoro D, Pani A, Feriozzi S, Galliani M,
6 Gigante M, Gesualdo L, Zamboli P, Maixnerová D, Tesar V, Eitner F, Rauen T, Floege J,
7 Nagy J, Mucha K, Pączek L, Zaniew M, Mizerska-Wasiak M, Roszkowska-Blaim M,
8 Pawlaczyk K, Gale D, Thibaudin L, Berthoux F, Canaud G, Boland A, Metzger M,
9 Panzer U, Suzuki H, Goto S, Narita I, Caliskan Y, Xie J, Hou P, Chen N, Zhang H, Wyatt
10 RJ, Novak J, Julian BA, Feehally J, Stengel B, Cusi D, Lifton RP, Gharavi AG: Novel
11 GWAS loci for IgA nephropathy implicate immunity against intestinal pathogens. *Nat*
12 *Genet*: In Press, 2014
13
14
15
16
17
18
19
20
21 55. Zhu L, Zhai YL, Wang FM, Hou P, Lv JC, Xu DM, Shi SF, Liu LJ, Yu F, Zhao MH, Novak
22 J, Gharavi AG, Zhang H: Variants in Complement Factor H and Complement Factor H-
23 Related Protein Genes, CFHR3 and CFHR1, Affect Complement Activation in IgA
24 Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2014
25
26
27
28 56. Holmes LV, Strain L, Staniforth SJ, Moore I, Marchbank K, Kavanagh D, Goodship JA,
29 Cordell HJ, Goodship TH: Determining the population frequency of the CFHR3/CFHR1
30 deletion at 1q32. *PLoS One* 8: e60352, 2013
31
32
33 57. Fremeaux-Bacchi V, Fakhouri F, Garnier A, Bienaime F, Dragon-Durey MA, Ngo S, Moulin
34 B, Servais A, Provot F, Rostaing L, Burtey S, Niaudet P, Deschenes G, Lebranchu Y,
35 Zuber J, Loirat C: Genetics and outcome of atypical hemolytic uremic syndrome: a
36 nationwide French series comparing children and adults. *Clin J Am Soc Nephrol* 8: 554-
37 562, 2013
38
39
40
41
42 58. Skerka C, Chen Q, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT: Complement factor H related
43 proteins (CFHRs). *Mol Immunol* 56: 170-180, 2013
44
45
46 59. Goicoechea de Jorge E, Caesar JJ, Malik TH, Patel M, Colledge M, Johnson S, Hakobyan S,
47 Morgan BP, Harris CL, Pickering MC, Lea SM: Dimerization of complement factor H-
48 related proteins modulates complement activation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:
49 4685-4690, 2013
50
51
52
53 60. Tortajada A, Yebenes H, Abarategui-Garrido C, Anter J, Garcia-Fernandez JM, Martinez-
54 Barricarte R, Alba-Dominguez M, Malik TH, Bedoya R, Cabrera Perez R, Lopez
55 Trascasa M, Pickering MC, Harris CL, Sanchez-Corral P, Llorca O, Rodriguez de
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Cordoba S: C3 glomerulopathy-associated CFHR1 mutation alters FHR oligomerization
4 and complement regulation. *J Clin Invest* 123: 2434-2446, 2013
5
6
7 61. Timmann C, Leippe M, Horstmann RD: Two major serum components antigenically related
8 to complement factor H are different glycosylation forms of a single protein with no
9 factor H-like complement regulatory functions. *J Immunol* 146: 1265-1270, 1991
10
11 62. Hellwage J, Jokiranta TS, Koistinen V, Vaarala O, Meri S, Zipfel PF: Functional properties of
12 complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of
13 C3b and differential regulation by heparin. *FEBS Lett* 462: 345-352, 1999
14
15
16 63. Fritsche LG, Lauer N, Hartmann A, Stippa S, Keilhauer CN, Oppermann M, Pandey MK,
17 Kohl J, Zipfel PF, Weber BH, Skerka C: An imbalance of human complement regulatory
18 proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular
19 degeneration (AMD). *Hum Mol Genet* 19: 4694-4704, 2010
20
21
22 64. Heinen S, Hartmann A, Lauer N, Wiehl U, Dahse HM, Schirmer S, Gropp K, Enghardt T,
23 Wallich R, Halbich S, Mihlan M, Schlotzer-Schrehardt U, Zipfel PF, Skerka C: Factor H-
24 related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal
25 complex formation. *Blood* 114: 2439-2447, 2009
26
27
28 65. Hageman GS, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs KM, Anderson DH, Johnson LV, Radeke MJ,
29 Kavanagh D, Richards A, Atkinson J, Meri S, Bergeron J, Zernant J, Merriam J, Gold B,
30 Allikmets R, Dean M: Extended haplotypes in the complement factor H (CFH) and CFH-
31 related (CFHR) family of genes protect against age-related macular degeneration:
32 characterization, ethnic distribution and evolutionary implications. *Ann Med* 38: 592-604,
33 2006
34
35
36 66. Kubista KE, Tosakulwong N, Wu Y, Ryu E, Roeder JL, Hecker LA, Baratz KH, Brown WL,
37 Edwards AO: Copy number variation in the complement factor H-related genes and age-
38 related macular degeneration. *Mol Vis* 17: 2080-2092, 2011
39
40
41
42 67. Ansari M, McKeigue PM, Skerka C, Hayward C, Rudan I, Vitart V, Polasek O, Armbrecht
43 AM, Yates JR, Vataavuk Z, Bencic G, Kolcic I, Oostra BA, Van Duijn CM, Campbell S,
44 Stanton CM, Huffman J, Shu X, Khan JC, Shahid H, Harding SP, Bishop PN, Deary IJ,
45 Moore AT, Dhillon B, Rudan P, Zipfel PF, Sim RB, Hastie ND, Campbell H, Wright AF:
46 Genetic influences on plasma CFH and CFHR1 concentrations and their role in
47 susceptibility to age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* 22: 4857-4869, 2013
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
68. Moore I, Strain L, Pappworth I, Kavanagh D, Barlow PN, Herbert AP, Schmidt CQ, Staniforth SJ, Holmes LV, Ward R, Morgan L, Goodship TH, Marchbank KJ: Association of factor H autoantibodies with deletions of CFHR1, CFHR3, CFHR4, and with mutations in CFH, CFI, CD46, and C3 in patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* 115: 379-387, 2010
69. Jozsi M, Licht C, Strobel S, Zipfel SL, Richter H, Heinen S, Zipfel PF, Skerka C: Factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome correlate with CFHR1/CFHR3 deficiency. *Blood* 111: 1512-1514, 2008
70. Jozsi M, Strobel S, Dahse HM, Liu WS, Hoyer PF, Oppermann M, Skerka C, Zipfel PF: Anti factor H autoantibodies block C-terminal recognition function of factor H in hemolytic uremic syndrome. *Blood* 110: 1516-1518, 2007
71. Dragon-Durey MA, Loirat C, Cloarec S, Macher MA, Blouin J, Nivet H, Weiss L, Fridman WH, Fremeaux-Bacchi V: Anti-Factor H autoantibodies associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 16: 555-563, 2005
72. Richards A, Buddles MR, Donne RL, Kaplan BS, Kirk E, Venning MC, Tielemans CL, Goodship JA, Goodship TH: Factor H mutations in hemolytic uremic syndrome cluster in exons 18-20, a domain important for host cell recognition. *Am J Hum Genet* 68: 485-490, 2001
73. Perez-Caballero D, Gonzalez-Rubio C, Gallardo ME, Vera M, Lopez-Trascasa M, Rodriguez de Cordoba S, Sanchez-Corral P: Clustering of missense mutations in the C-terminal region of factor H in atypical hemolytic uremic syndrome. *Am J Hum Genet* 68: 478-484, 2001
74. Zhao J, Wu H, Khosravi M, Cui H, Qian X, Kelly JA, Kaufman KM, Langefeld CD, Williams AH, Comeau ME, Ziegler JT, Marion MC, Adler A, Glenn SB, Alarcon-Riquelme ME, Pons-Estel BA, Harley JB, Bae SC, Bang SY, Cho SK, Jacob CO, Vyse TJ, Niewold TB, Gaffney PM, Moser KL, Kimberly RP, Edberg JC, Brown EE, Alarcon GS, Petri MA, Ramsey-Goldman R, Vila LM, Reveille JD, James JA, Gilkeson GS, Kamen DL, Freedman BI, Anaya JM, Merrill JT, Criswell LA, Scofield RH, Stevens AM, Guthridge JM, Chang DM, Song YW, Park JA, Lee EY, Boackle SA, Grossman JM, Hahn BH, Goodship TH, Cantor RM, Yu CY, Shen N, Tsao BP: Association of genetic

- 1
2
3 variants in complement factor H and factor H-related genes with systemic lupus
4 erythematosus susceptibility. *PLoS Genet* 7: e1002079, 2011
- 5
6
7 75. Czerkinsky C, Koopman WJ, Jackson S, Collins JE, Crago SS, Schrohenloher RE, Julian BA,
8 Galla JH, Mestecky J: Circulating immune complexes and immunoglobulin A rheumatoid
9 factor in patients with mesangial immunoglobulin A nephropathies. *J Clin Invest* 77:
10 1931-1938, 1986
- 11
12
13 76. Van Es LA, Van den Wall Bake AW, Valentijn RM, Daha MR: Composition of IgA-
14 containing circulating immune complexes in IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 12: 397-
15 401, 1988
- 16
17
18 77. Yanagihara T, Brown R, Hall S, Moldoveanu Z, Goepfert A, Tomana M, Julian BA,
19 Mestecky J, Novak J: In vitro generated immune complexes containing galactose-
20 deficient IgA1 stimulate proliferation of mesangial cells. *Results Immunol* 2: 166-172,
21 2012
- 22
23
24 78. Suzuki Y, Matsuzaki K, Suzuki H, Okazaki K, Yanagawa H, Ieiri N, Sato M, Sato T, Taguma
25 Y, Matsuoka J, Horikoshi S, Novak J, Hotta O, Tomino Y: Serum levels of galactose-
26 deficient immunoglobulin (Ig) A1 and related immune complex are associated with
27 disease activity of IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol*, 2014
- 28
29
30 79. Maillard N, Boerma L, Hall SD, Huang ZQ, Mrug M, Moldoveanu Z, Julian BA, Renfrow
31 MB, Novak J: Proteomic analysis of engineered IgA1-IgG immune complexes reveals
32 association with activated complement C3 [Abstract]. *J Am Soc Nephrol* 24: 490A, 2013
- 33
34
35 80. Pickering MC, D'Agati VD, Nester CM, Smith RJ, Haas M, Appel GB, Alpers CE, Bajema
36 IM, Bedrosian C, Braun M, Doyle M, Fakhouri F, Fervenza FC, Fogo AB, Fremeaux-
37 Bacchi V, Gale DP, Goicoechea de Jorge E, Griffin G, Harris CL, Holers VM, Johnson S,
38 Lavin PJ, Medjeral-Thomas N, Paul Morgan B, Nast CC, Noel LH, Peters DK, Rodriguez
39 de Cordoba S, Servais A, Sethi S, Song WC, Tamburini P, Thurman JM, Zavros M, Cook
40 HT: C3 glomerulopathy: consensus report. *Kidney Int* 84: 1079-1089, 2013
- 41
42
43 81. Servais A, Noel LH, Fremeaux-Bacchi V, Lesavre P: C3 glomerulopathy. *Contrib Nephrol*
44 181: 185-193, 2013
- 45
46
47 82. Servais A, Fremeaux-Bacchi V, Lequintrec M, Salomon R, Blouin J, Knebelmann B,
48 Grunfeld JP, Lesavre P, Noel LH, Fakhouri F: Primary glomerulonephritis with isolated
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 C3 deposits: a new entity which shares common genetic risk factors with haemolytic
4 uraemic syndrome. *J Med Genet* 44: 193-199, 2007
5
6
7 83. Barbour TD, Pickering MC, Cook HT: Recent insights into C3 glomerulopathy. *Nephrol Dial*
8 *Transplant* 28: 1685-1693, 2013
9
10 84. van den Dobbelen ME, Verhasselt V, Kaashoek JG, Timmerman JJ, Schroeijers WE,
11 Verweij CL, van der Woude FJ, van Es LA, Daha MR: Regulation of C3 and factor H
12 synthesis of human glomerular mesangial cells by IL-1 and interferon-gamma. *Clin Exp*
13 *Immunol* 95: 173-180, 1994
14
15
16 85. Wan JX, Fukuda N, Endo M, Tahira Y, Yao EH, Matsuda H, Ueno T, Matsumoto K:
17 Complement 3 is involved in changing the phenotype of human glomerular mesangial
18 cells. *J Cell Physiol* 213: 495-501, 2007
19
20
21 86. Schmitt R, Stahl AL, Olin AI, Kristoffersson AC, Rebetz J, Novak J, Lindahl G, Karpman D:
22 The Combined Role of Galactose-Deficient IgA1 and Streptococcal IgA-Binding M
23 Protein in Inducing IL-6 and C3 Secretion from Human Mesangial Cells: Implications for
24 IgA Nephropathy. *J Immunol* 193: 317-326, 2014
25
26
27 87. Cosio FG, Shibata T, Rovin BH, Birmingham DJ: Effects of complement activation products
28 on the synthesis of decay accelerating factor and membrane cofactor protein by human
29 mesangial cells. *Kidney Int* 46: 986-992, 1994
30
31
32 88. Abe K, Miyazaki M, Koji T, Furusu A, Ozono Y, Harada T, Sakai H, Nakane PK, Kohno S:
33 Expression of decay accelerating factor mRNA and complement C3 mRNA in human
34 diseased kidney. *Kidney Int* 54: 120-130, 1998
35
36
37 89. Braun MC, Reins RY, Li TB, Hollmann TJ, Dutta R, Rick WA, Teng BB, Ke B: Renal
38 expression of the C3a receptor and functional responses of primary human proximal
39 tubular epithelial cells. *J Immunol* 173: 4190-4196, 2004
40
41
42 90. Komatsu H, Fujimoto S, Hara S, Sato Y, Yamada K, Eto T: Relationship between serum
43 IgA/C3 ratio and progression of IgA nephropathy. *Intern Med* 43: 1023-1028, 2004
44
45
46 91. Zhang J, Wang C, Tang Y, Peng H, Ye ZC, Li CC, Lou TQ: Serum immunoglobulin A/C3
47 ratio predicts progression of immunoglobulin A nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 18:
48 125-131, 2013
49
50
51 92. Kim SJ, Koo HM, Lim BJ, Oh HJ, Yoo DE, Shin DH, Lee MJ, Doh FM, Park JT, Yoo TH,
52 Kang SW, Choi KH, Jeong HJ, Han SH: Decreased circulating C3 levels and mesangial
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 C3 deposition predict renal outcome in patients with IgA nephropathy. *PLoS One* 7:
4 e40495, 2012
5
6
7 93. Onda K, Ohi H, Tamano M, Ohsawa I, Wakabayashi M, Horikoshi S, Fujita T, Tomino Y:
8 Hypercomplementemia in adult patients with IgA nephropathy. *J Clin Lab Anal* 21: 77-
9 84, 2007
10
11
12 94. Zhang JJ, Jiang L, Liu G, Wang SX, Zou WZ, Zhang H, Zhao MH: Levels of urinary
13 complement factor H in patients with IgA nephropathy are closely associated with disease
14 activity. *Scand J Immunol* 69: 457-464, 2009
15
16
17 95. Cattran DC, Coppo R, Cook HT, Feehally J, Roberts IS, Troyanov S, Alpers CE, Amore A,
18 Barratt J, Berthoux F, Bonsib S, Bruijn JA, D'Agati V, D'Amico G, Emancipator S,
19 Emma F, Ferrario F, Fervenza FC, Florquin S, Fogo A, Geddes CC, Groene HJ, Haas M,
20 Herzenberg AM, Hill PA, Hogg RJ, Hsu SI, Jennette JC, Joh K, Julian BA, Kawamura T,
21 Lai FM, Leung CB, Li LS, Li PK, Liu ZH, Mackinnon B, Mezzano S, Schena FP,
22 Tomino Y, Walker PD, Wang H, Weening JJ, Yoshikawa N, Zhang H: The Oxford
23 classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and
24 classification. *Kidney Int* 76: 534-545, 2009
25
26
27 96. Roberts IS, Cook HT, Troyanov S, Alpers CE, Amore A, Barratt J, Berthoux F, Bonsib S,
28 Bruijn JA, Cattran DC, Coppo R, D'Agati V, D'Amico G, Emancipator S, Emma F,
29 Feehally J, Ferrario F, Fervenza FC, Florquin S, Fogo A, Geddes CC, Groene HJ, Haas
30 M, Herzenberg AM, Hill PA, Hogg RJ, Hsu SI, Jennette JC, Joh K, Julian BA, Kawamura
31 T, Lai FM, Li LS, Li PK, Liu ZH, Mackinnon B, Mezzano S, Schena FP, Tomino Y,
32 Walker PD, Wang H, Weening JJ, Yoshikawa N, Zhang H: The Oxford classification of
33 IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility. *Kidney Int* 76:
34 546-556, 2009
35
36
37 97. Varis J, Rantala I, Pasternack A, Oksa H, Jantti M, Paunu ES, Pirhonen R: Immunoglobulin
38 and complement deposition in glomeruli of 756 subjects who had committed suicide or
39 met with a violent death. *J Clin Pathol* 46: 607-610, 1993
40
41
42 98. Nasri H, Sajjadieh S, Mardani S, Momeni A, Merikhi A, Madihi Y, Ghiessari A, Emami
43 Naieni A: Correlation of immunostaining findings with demographic data and variables of
44 Oxford classification in IgA nephropathy. *J Nephropathol* 2: 190-195, 2013
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 99. Nakagawa H, Suzuki S, Haneda M, Gejyo F, Kikkawa R: Significance of glomerular
4 deposition of C3c and C3d in IgA nephropathy. *Am J Nephrol* 20: 122-128, 2000
5
6
7 100. Espinosa M, Ortega R, Sanchez M, Segarra A, Salcedo MT, Gonzalez F, Camacho R,
8 Valdivia MA, Cabrera R, Lopez K, Pinedo F, Gutierrez E, Valera A, Leon M, Cobo MA,
9 Rodriguez R, Ballarin J, Arce Y, Garcia B, Munoz MD, Praga M: Association of C4d
10 deposition with clinical outcomes in IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 9: 897-904,
11 2014
12
13
14
15 101. Maeng YI, Kim MK, Park JB, Cho CH, Oh HK, Sung WJ, Park KK: Glomerular and tubular
16 C4d depositions in IgA nephropathy: relations with histopathology and with albuminuria.
17 *Int J Clin Exp Pathol* 6: 904-910, 2013
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure legends

Figure 1. Three pathways of complement activation. The classical pathway is triggered by IgG- and/or IgM-containing immune complexes. The alternative pathway is constantly initiated by spontaneous hydrolysis of C3 [C3b(H₂O)], and efficiently powered by the covalent attachment of C3b on an activating surface. The lectin pathway requires a particular sugar-moiety pattern (*N*-acetylglucosamine, GlcNAc) to be recognized and bound by MBL, leading to a classical pathway-like activation cascade. Each pathway leads to formation of a C3 convertase. The addition of C3b to the C3 convertase creates a C5 convertase that, in turn, triggers the assembly of the membrane attack complex (C5b-9), also known as the terminal complement complex. Regulatory factors are in red. P: properdin, FD: factor D, FB: factor B, FH: factor H, FI: factor I, DAF: decay-accelerating factor, MCP: membrane cofactor protein, CR1: complement receptor 1, MAC: membrane attack complex, MBL: mannan-binding lectin, and MASP: MBL serine peptidase.

Figure 2. C3 proteolytic cascade. The hydrolysis of C3 leads to the release of active products: C3a, a potent anaphylatoxin, and C3b that contains a highly reactive thioester bond that can covalently bind activating surfaces, such as a bacterial wall. This attachment of C3b initiates a powerful amplification system from the formation of the C3 convertase to the subsequent proteolysis of new molecules of C3, allowing more C3b to bind to the surface. This amplification is controlled by regulator molecules, such as FI and FH, that degrade C3b into products that cannot contribute to the formation of the C5 convertase. Detection of these inactive breakdown products, iC3b, C3c, C3dg, and C3d, is considered evidence of activation of C3. The numbers, in kDa, represent the molecular masses of the corresponding polypeptides.

1
2
3
4
5
6 Figure 3. Comparison of the structures of factor H, CFHR1, and CFHR3. The structure of FH
7 contains 20 short consensus repeats (SCRs). SCRs 1-4 possess the regulation activity (FI cofactor
8 activity, decay acceleration of the C3 convertase) as well as a weak C3b-binding capacity. SCRs
9 19-20 contain the most powerful C3b-binding zone that is critical for binding to cell surfaces.
10 This latter area is the “hotspot” of atypical hemolytic uremic syndrome-associated mutations,
11 likely explained by the loss of ability of an abnormal FH to bind to endothelial cells. CFHR1 and
12 CFHR3 resemble FH by the presence of structurally similar SCRs. These molecules possess the
13 corresponding C3b/cell-surface-binding zone (SCRs 4 and 5 corresponding to the SCRs 19 and
14 20 of FH) but lack the regulatory portion (having no region equivalent to SCRs 1-4). In contrast
15 to FH and CFHR3, CFHR1 contains a unique pair of highly conserved SCRs 1-2 that (also shared
16 with CFHR2 and CFHR5). These domains enable formation of homo- and hetero-dimers
17 involving CFHR1, CFHR2, and CFHR5.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

35 Figure 4. Proposed mechanism to explain the protective effect of *CFHR1,3* deletion on the
36 development of IgAN. CFHR1 and CFHR3 proteins can bind to C3b, in competition with FH.
37 The regulatory activities of CFHR1 and CFHR3 are less efficient than that of FH. *CFHR1,3*
38 deletion thus allows FH to bind C3b effectively and thereby strongly inhibits the initiation and
39 amplification of the alternative pathway cascade.
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 Figure 5. Integrative view of the role of complement activation in the four-hit model of the
50 pathogenesis of IgAN. C3 can be activated directly by IgA1-containing immune complexes and
51 increase the pathogenic potential of these complexes. The lectin and alternative pathways can
52 each contribute to the glomerular damage induced by immune complexes in the mesangium.
53
54
55
56
57
58
59
60

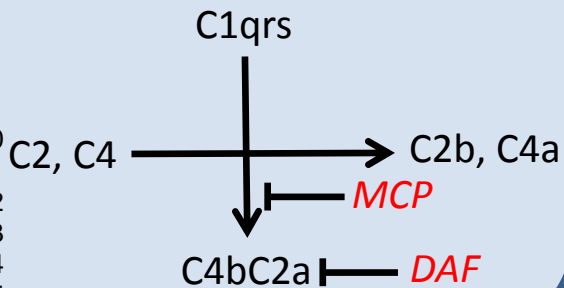
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Mesangial cells can play an active role, considering their ability to be stimulated by C3a as well as their production of C3 in response to an inflammatory stimulus.

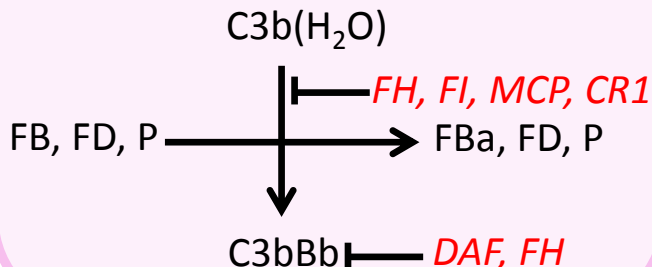
For Peer Review

Classical Pathway

IgG1, 2, 3 and IgM
immune complexes



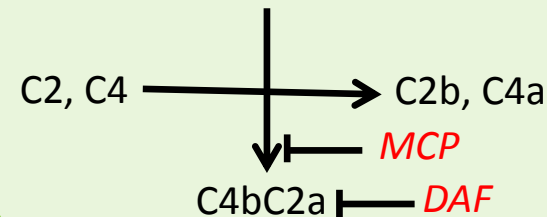
Activating surface (e.g., bacteria)



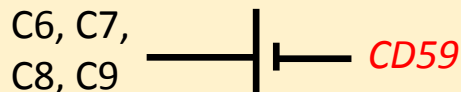
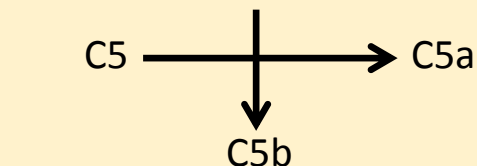
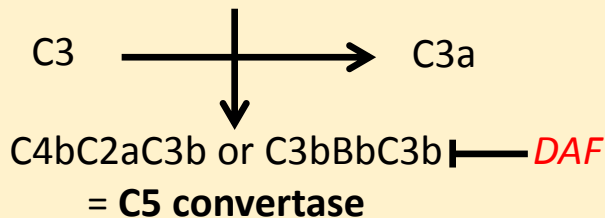
Lectin Pathway

Sugar moieties
(GlcNAc, bacterial surface)

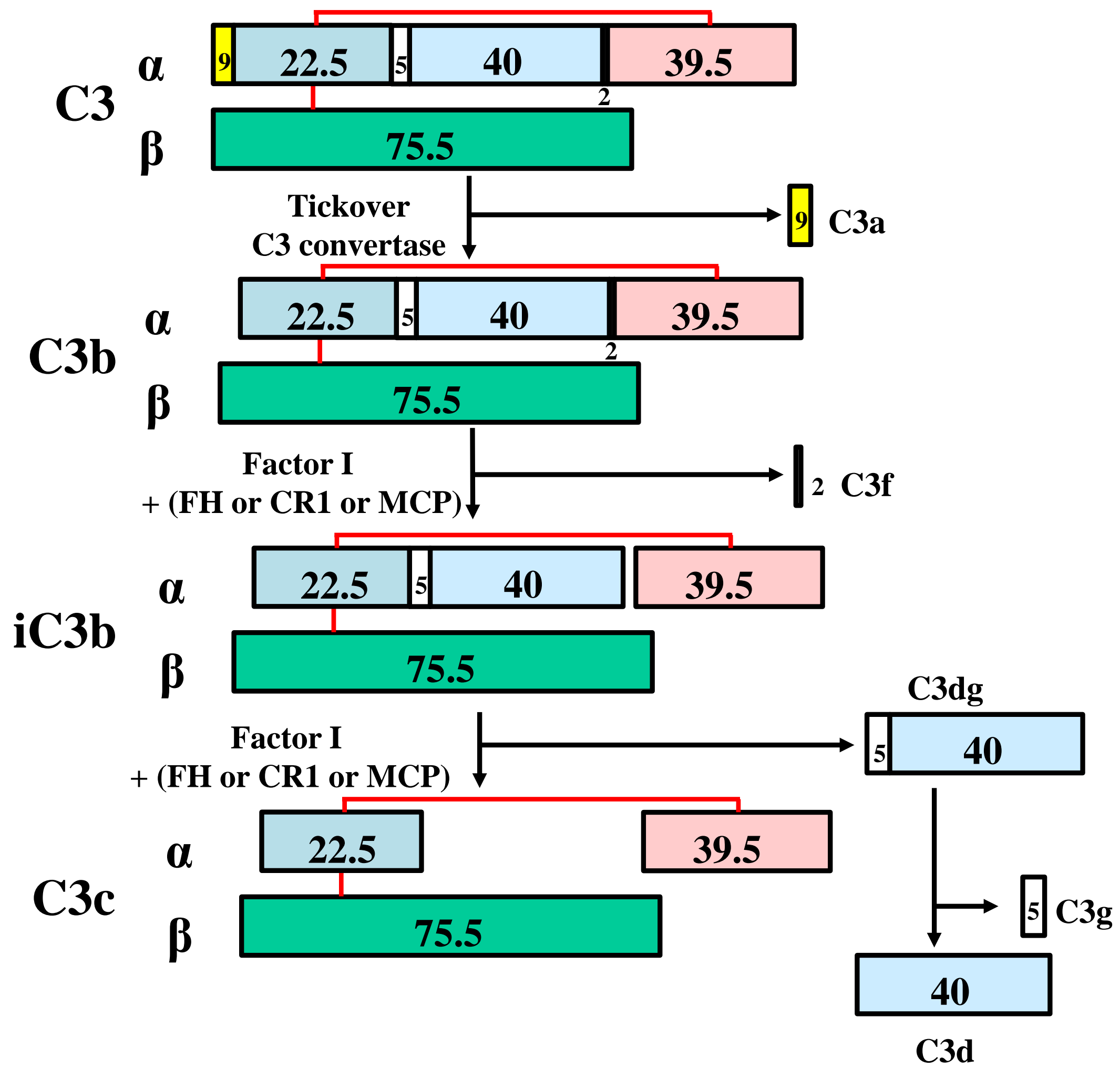
MBL, MASP-1, MASP-2, Ficolin 2



C3 convertase



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



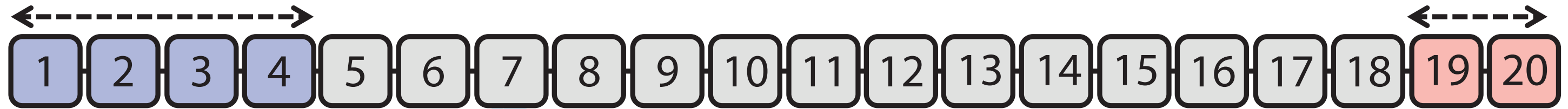
N-terminal

C-terminal

C3b binding
regulatory region

C3b and surface
binding region

FH



CFHR1 dimerization
domains

CFHR 1



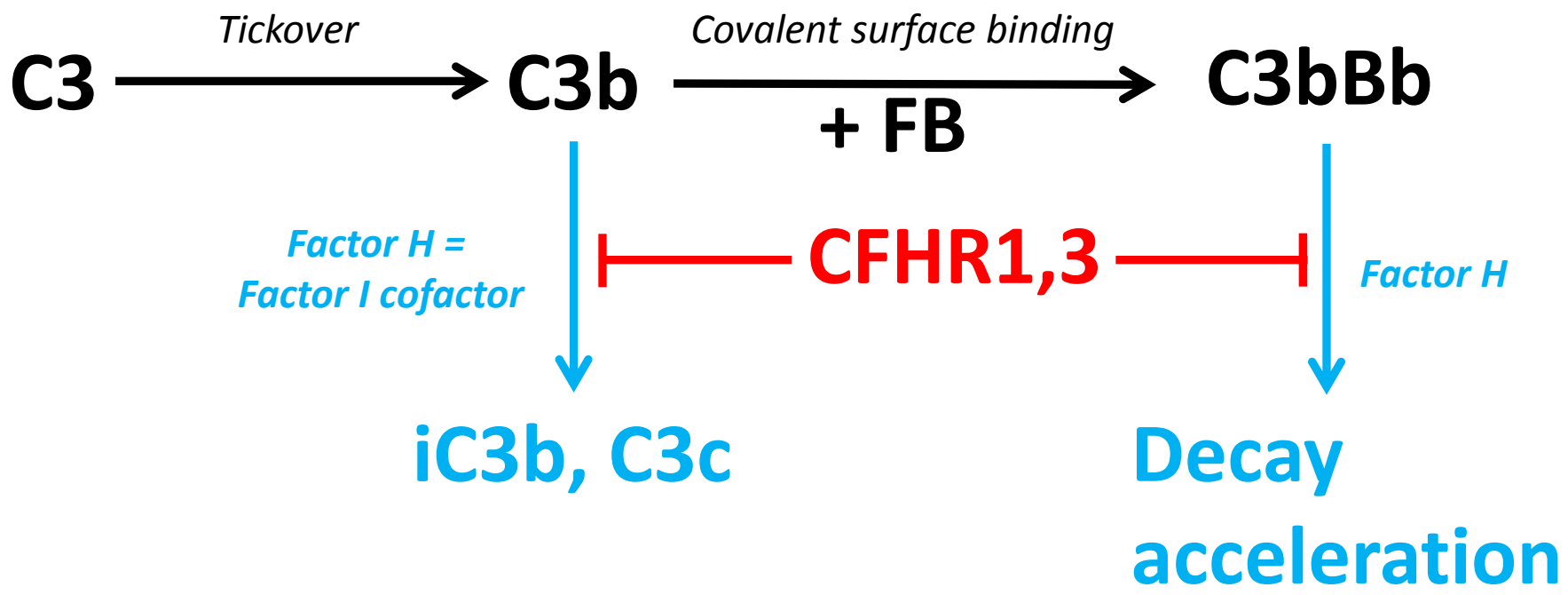
CFHR 3



For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43



Hit 1

Increased circulating galactose-deficient IgA1

Hit 2

Production of unique anti-glycan antibodies

Activation of C3 participates in the formation of pathogenic immune complexes

Hit 3

Formation of pathogenic IgA1-containing circulating immune complexes

Hit 4

Mesangial deposition and mesangial cells activation leading to glomerular injury

Mesangial cells have an active role in complement activation

Lectin and alternative pathways are activated and contribute to tissue injury

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

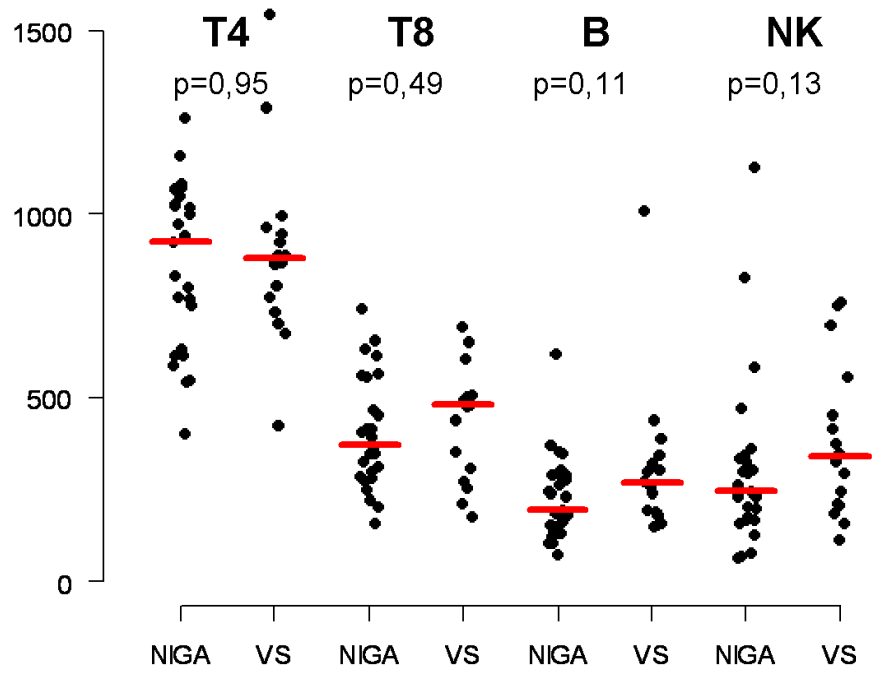


Figure 12. Comparaison des populations lymphocytaires entre groupes NIGa et VS. En éléments/mm³

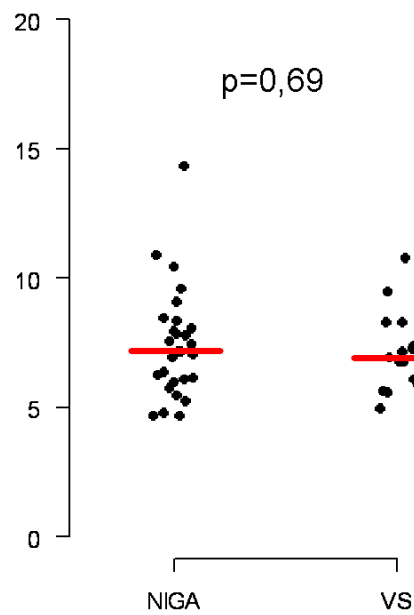


Figure 13. Comparaison des populations T CD4+ CD25+ CD127^{low}. En % des lymphocytes T CD4+.

2.3.2.3. Profil transcriptionnel des lymphocytes T

2.3.2.3.1. Expression des gènes Th1

L'expression de Tbet était plus faible à au repos et après activation dans le groupe NIGa, en expression relative par rapport à un calibrateur commun (J0 : 3,16[1,6-6,0] , J2 : 1,46[0,9-2,0]) par rapport au groupe VS (J0 : 12,3 [2,9-16,1], J2 : 2,55[1,21-4,29], $p=0,01$ et $p=0,09$).

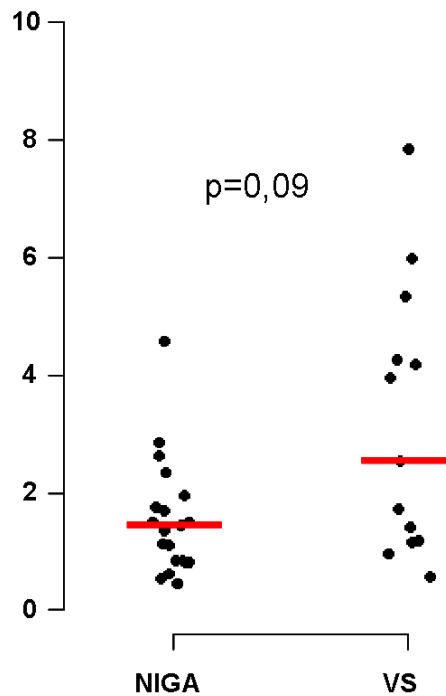


Figure 14. Expression relative de Tbet après activation anti-CD3 et anti-CD28 (J2)

2.3.2.3.2. Expression des gènes Th17

L'expression de ROR γ T était nettement plus faible dans le groupe NIGa au repos. Elle était de 1,5[0,76-4,3] dans le groupe NIGa et 11,1[4,5-46] dans le groupe VS, $p<0,001$. Après activation, la même tendance est notée : dans le groupe NIGa elle était de 2,66[1,4-5,5], et 5,9[3,3-17] dans le groupe VS, $p=0,07$.

L'expression du gène d'IL17A n'était pas détectable au repos dans aucun des groupes, et après activation, elle était de 9,81[2,2-15] et de 27,2[3,1-161], $p=0,3$. Le résultat n'est pas significatif, mais la tendance est la même que pour l'expression de ROR γ T en faveur d'une diminution de l'activité fonctionnelle des cellules Th17.

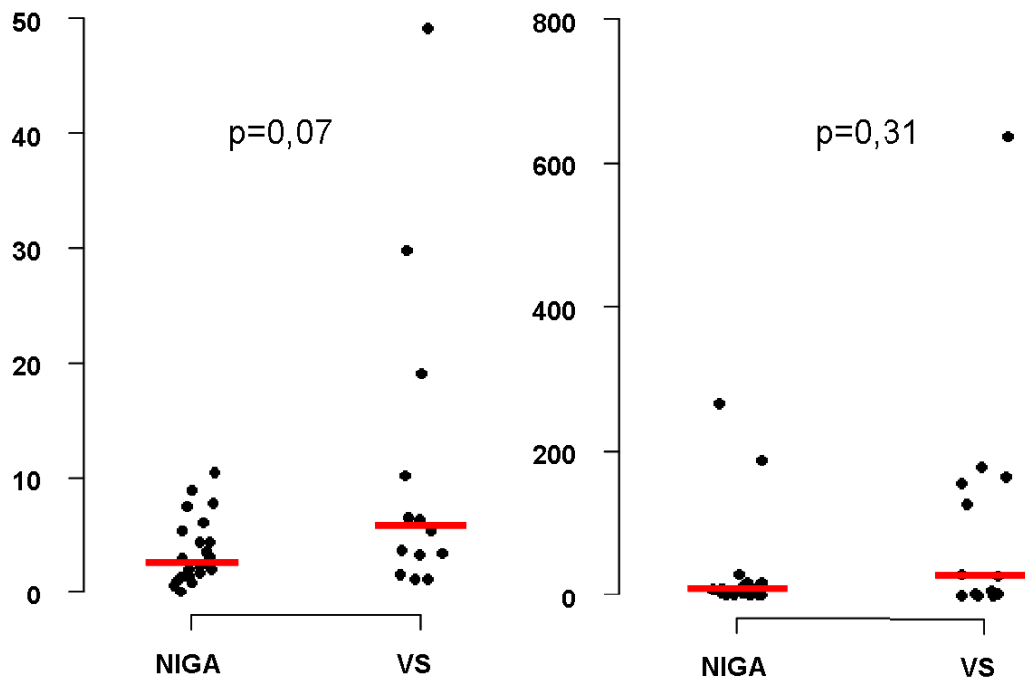


Figure 15. Expression relative de ROR γ T (à gauche) et IL17A (à droite) après stimulation (J2).

2.3.2.3.3. Expression des gènes Tregs

L'expression de FoxP3 était similaire entre le groupe NIgA 1,70[0,51-2,3] et le groupe VS 6,9[6,0-7,6] au repos, $p=0,42$. Après stimulation, elle était de 3,11[1,3-6,1] dans le groupe NIgA et de 4,86[2,0-14], $p=0,14$ dans le groupe VS. Un déficit de régulation Treg n'est donc pas exclu.

L'expression du gène IL10 est identique dans les 2 groupes avant et après activation. Au repos, l'expression relative était de 26,0 [9,0-38] dans le groupe NIgA et de 30,9[5,2-79] dans le groupe VS, $p=0,84$. Après activation elle était de 20,4 [11-34] dans le groupe NIgA et 29,3[14-60] dans le groupe VS, $p=0,14$.

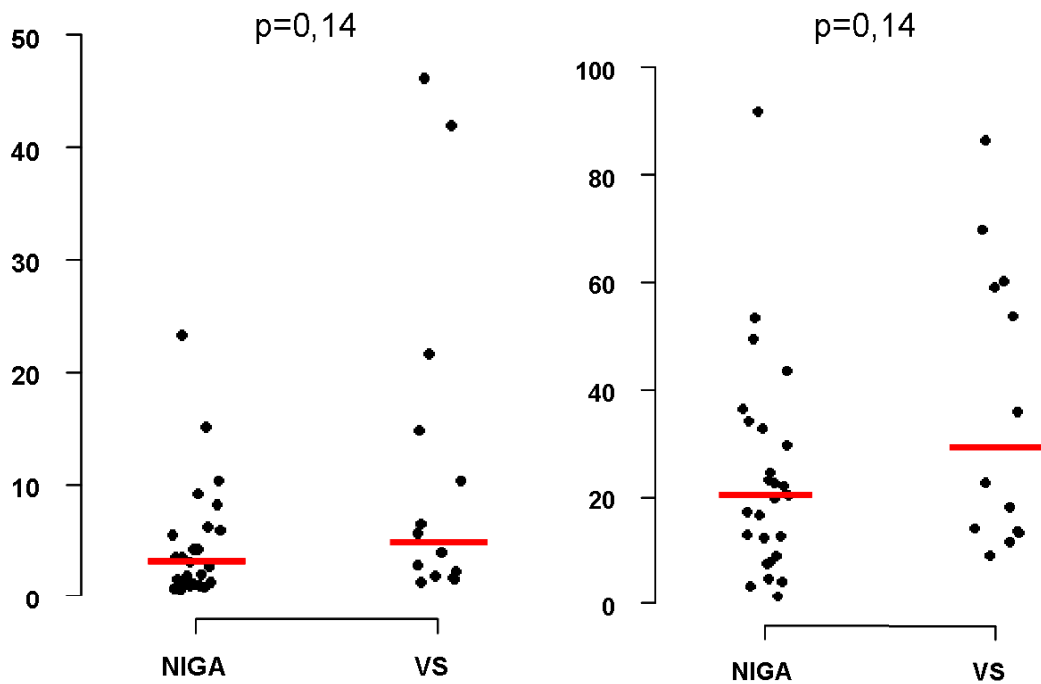


Figure 16. Expression de FoxP3 (à gauche) et IL10 (à droite) après activation.

L'expression de TGFβ était comparable entre groupes (NIGA : 8,35[5,7-11,6] et VS : 12,1[0-22], $p=0,6$) au repos et après activation (NIGA : 0,79[0,4-1,5] et VS : 1,8[0,96-2,3], $p=0,11$)

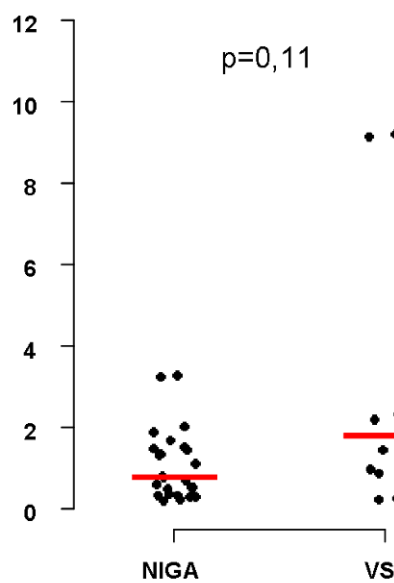


Figure 17. Expression relative du gène TGFβ après stimulation

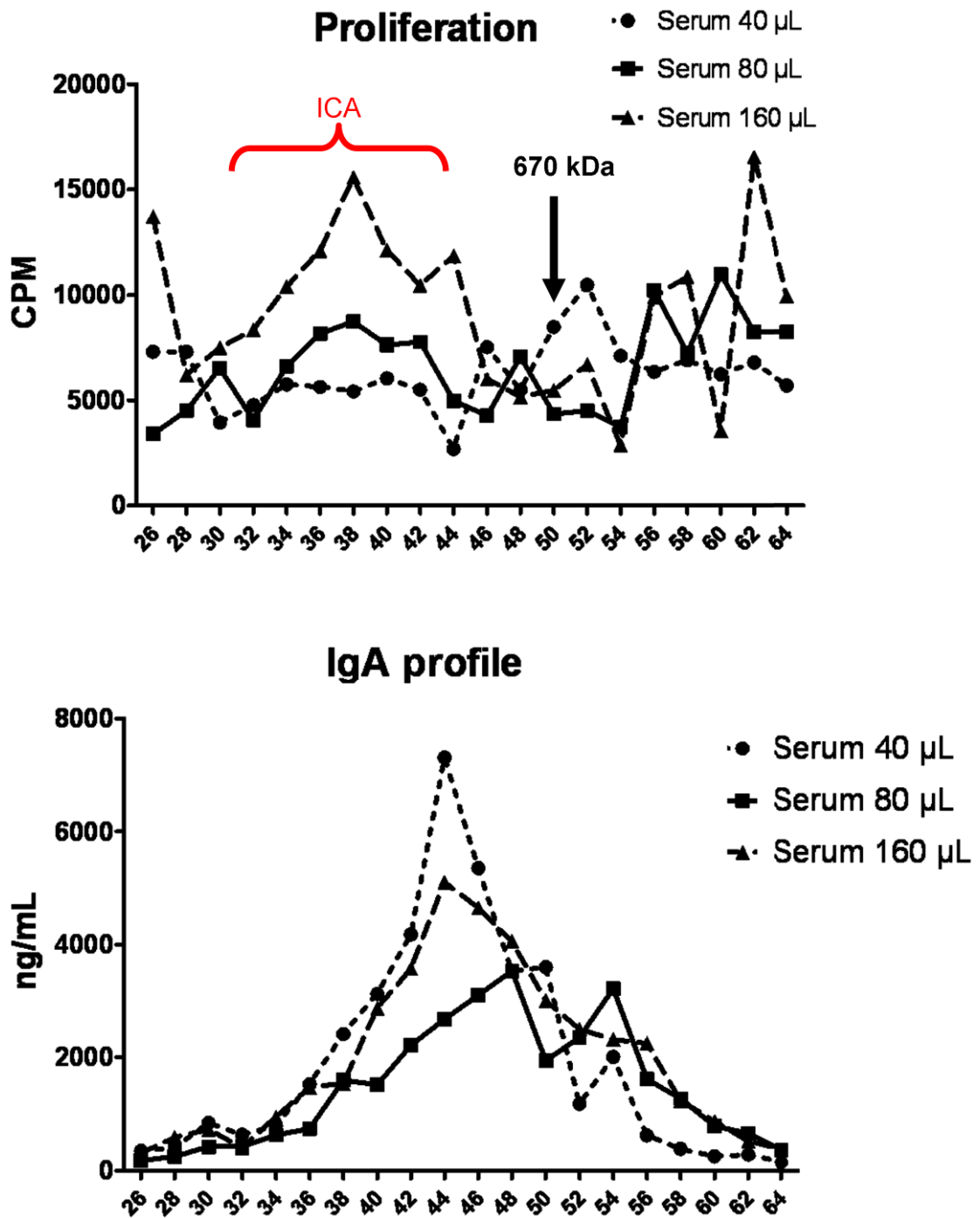
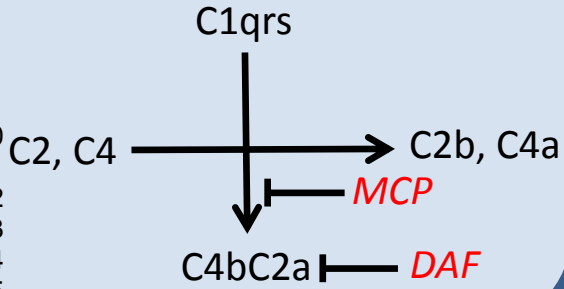


Figure 18. en haut : prolifération des cellules mésangiales en culture induite par les fractions de poids moléculaires décroissants. Les fractions 30 à 42 induisent une prolifération (Immuns Complexes Artificiels). En bas : quantification des IgA totales par fraction

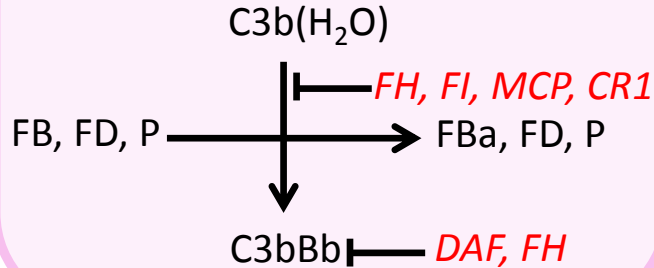
2.3.3.2. Les fractions de haut poids moléculaire contiennent des éléments de C3
 Etude de la composition des fractions de haut poids moléculaire

Classical Pathway

IgG1, 2, 3 and IgM
immune complexes

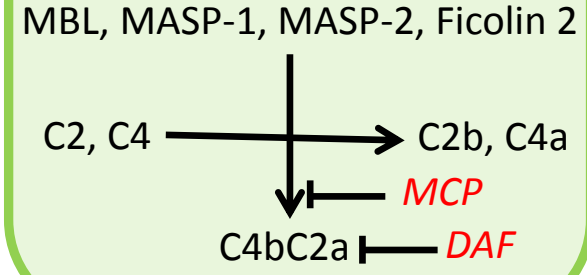


Activating surface (e.g., bacteria)

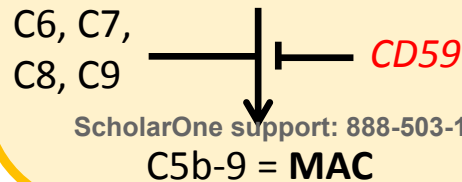
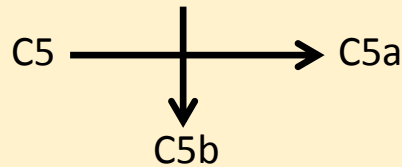
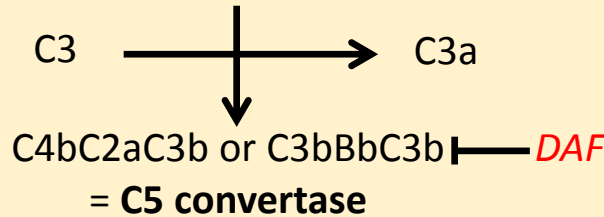


Lectin Pathway

Sugar moieties
(GlcNAc, bacterial surface)



C3 convertase



Hit 1

Increased circulating galactose-deficient IgA1

Hit 2

Production of unique anti-glycan antibodies

Activation of C3 participates in the formation of pathogenic immune complexes

Hit 3

Formation of pathogenic IgA1-containing circulating immune complexes

Hit 4

Mesangial deposition and mesangial cells activation leading to glomerular injury

Mesangial cells have an active role in complement activation

Lectin and alternative pathways are activated and contribute to tissue injury

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43