



HAL
open science

Facteurs prédictifs de récurrence et de sévérité du syndrome hémolytique et urémique atypique et de la glomérulonéphrite à C3 après transplantation rénale

Moglie Le Quintrec Donnette-Le Quintrec

► To cite this version:

Moglie Le Quintrec Donnette-Le Quintrec. Facteurs prédictifs de récurrence et de sévérité du syndrome hémolytique et urémique atypique et de la glomérulonéphrite à C3 après transplantation rénale. Immunologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05T098 . tel-01196002

HAL Id: tel-01196002

<https://theses.hal.science/tel-01196002>

Submitted on 8 Sep 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.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PARIS DIDEROT**

Spécialité

Immunologie

Ecole doctorale

Biochimie, Biothérapies, Biologie Moléculaire et Infectiologie-B3MI

Présentée par

Moglie Donnette-Le Quintrec

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT

Sujet de la thèse :

**Facteurs prédictifs de récurrence et de sévérité du
Syndrome Hémolytique et Urémique atypique et de
la Glomérulonéphrite à C3 après transplantation rénale**

Soutenue le 27 Novembre 2013

Devant le jury composé de :

M. le Professeur Antonino Nicoletti	Président du Jury
M. le Professeur Fadi Fakhouri	Rapporteur
M. le Professeur Yvon Lebranchu	Rapporteur
M. le Professeur Eric Rondeau	Examineur
M. le Professeur Georges Mourad	Examineur
M ^{me} . le Docteur Magali Colombat	Examineur
M ^{me} . le Docteur Véronique Frémeaux Bacchi	Directrice de thèse

Remerciements

Je remercie l'ensemble des personnes qui m'ont apporté leur aide et leur soutien dans la réalisation de ce travail.

A Hervé Fridman et Catherine Fridman

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein du Centre de Recherche des Cordeliers et de l'équipe 13

A ma directrice de thèse, le Docteur Véronique Frémeaux-Bacchi,

Je te remercie très chaleureusement pour ton aide indéfectible.

Ta confiance, ton soutien et tes conseils m'ont été durant toutes ces années d'un apport essentiel pour la réalisation de ces travaux de recherche et mon évolution personnelle.

Au Professeur Antonio Nicoletti,

Je vous remercie de l'honneur que vous m'avez fait d'avoir accepté la présidence de la thèse.

A mes rapporteurs, Le Professeur Yvon Lebranchu et le Professeur Fadi Fakhouri,

Je vous remercie d'avoir accepté la charge d'être rapporteurs de cette thèse et d'avoir jugé ce travail. Vos commentaires et analyses ont permis d'améliorer le manuscrit.

Au Professeur Eric Rondeau, au Docteur Magali Colombat,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être examinateurs, d'avoir pris du temps pour lire, juger et critiquer ce travail.

Au Professeur Georges Mourad,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail, et vous remercie sincèrement pour votre confiance et votre soutien dans le projet futur.

A toute l'équipe du complément,

Je vous remercie pour votre aide, votre soutien durant toutes ces années. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec vous dans une ambiance chaleureuse, détendue et studieuse.

Lubka, un grand merci pour ton aide précieuse, ta générosité, ton enthousiasme dans la transmission de tes connaissances. Ta passion pour le complément est contagieuse. **Marie-Agnès**, je te remercie pour ton écoute et ton soutien constant depuis de nombreuses années, **Tania**, toujours présente pour des conseils divers et variés. **Lise** un grand merci pour tes conseils, **Chiara**, merci pour ton aide précieuse dans la réalisation de ces projets. **Stéphanie, Nelly, Pauline, Jacques**, merci de m'avoir guidé patiemment à mes débuts.

A Romain et Jérémie, un très grand merci de m'avoir initié à l'immunohistochimie.

A Marion Rabant, c'est avec grand plaisir que j'ai travaillé avec toi, merci pour ta disponibilité.

A l'équipe de néphrologie de l'hôpital Foch, merci pour votre soutien et votre aide. Un merci tout particulier à **Michel Delahousse** qui a largement contribué à la réussite de ces travaux.

A mes parents, ma famille et belle-famille, un grand merci pour votre soutien et votre amour

A mes enfants, Mahault et Ambroise, qui m'apportent beaucoup de bonheur et de joie. Avec tout mon amour.

A François-Xavier, je te remercie profondément de m'avoir soutenue et accompagnée dans ce projet. Avec tout mon amour

Sommaire

REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE	4
RÉSUMÉ	7
INTRODUCTION	11
CHAPITRE 1 : LE SYSTEME DU COMPLEMENT	12
1 ACTIVATION	12
1.1 LA VOIE CLASSIQUE ET LA VOIE DES LECTINES	12
1.2 LA VOIE ALTERNE	14
1.3 LA VOIE EFFECTRICE TERMINALE COMMUNE	15
2 LES FONCTIONS PRINCIPALES	18
2.1 LE ROLE PRO-INFLAMMATOIRE	18
2.2 LA LYSE CELLULAIRE	19
2.3 L'OPSONISATION	19
2.4 L'IMMUNITE SPECIFIQUE	20
3 REGULATION	22
3.1 REGULATION DE LA VOIE CLASSIQUE	22
3.2 REGULATION DE LA VOIE ALTERNE	23
3.2.1 LE FACTEUR H	23
3.2.2 LE FACTEUR I	27
3.3 REGULATEURS MEMBRANAIRES COMMUNS DE LA VOIE ALTERNE ET CLASSIQUE : MCP, DAF ET CR1	27
3.4 REGULATION DE LA VOIE EFFECTRICE FINALE	29
CHAPITRE 2 : PATHOLOGIES ASSOCIEES A UNE DEREGULATION DE LA VOIE ALTERNE DU COMPLEMENTLE SYSTEME DU COMPLEMENT	31
1 LE SYNDROME HEMOLYTIQUE ET UREMIQUE ATYPIQUE	31
1.1 DE LA LESION HISTOLOGIQUE AU SHU ATYPIQUE	31
1.2 DIFFERENTES ENTITES ASSOCIEES A LA MAT	32
1.2.1 LE PURPURA THROMBOTIQUE THROMBOPENIQUE (PTT)	32
1.2.2 LE SHU	33
1.3 CLINIQUE	35
1.4 DEREGULATION DE LA VOIE ALTERNE DU COMPLEMENT	36
1.5 LES DIFFERENTES MUTATIONS IMPLIQUEES	37
1.5.1 MUTATIONS DE FH	38
1.5.2 MUTATIONS DU FI	39
1.5.3 MUTATIONS DE MCP	40
1.5.4 MUTATIONS DE C3 ET DU FB	40
1.5.5 THROMBOMODULINE ET DGKE	41
1.6 LE SHU ATYPIQUE : UNE MALADIE POLYGENIQUE COMPLEXE	42

1.7	PRONOSTIC	45
1.8	TRAITEMENT	46
2	GLOMERULONEPHRITES A DEPOTS DE C3	48
2.1	EVOLUTION DE LA CLASSIFICATION BASEE SUR LA PHYSIOPATHOLOGIE	48
2.2	LES GLOMERULONEPHRITES ASSOCIEES AUX ANOMALIES DE LA VOIE ALTERNE DU COMPLEMENT	49
2.3	DES MODELES ANIMAUX A L'HOMME	50
2.4	ANOMALIES ACQUISES ET GENETIQUES CHEZ L'HOMME	52
2.4.1	CLINIQUE	52
2.4.2	HISTOLOGIE	54
2.4.3	LES ANOMALIES DU COMPLEMENT	55
2.5	CORRELATION ENTRE LE PHENOTYPE ET LE GENOTYPE	62
2.6	LES TRAITEMENTS	62
CHAPITRE 3 : RECIDIVES EN POST-TRANSPLANTATION		64
1	RECIDIVE DE SHU ATYPIQUE	64
2	LES RECIDIVES DE GNMP	67
OBJECTIFS DU TRAVAIL		71
RESULTATS		72
1	SHU ATYPIQUE - COMPLEMENT DEPENDANT : ETUDE EN POST-TRANSPLANTATION RENALE	72
1.1	CONTEXTE-OBJECTIF DE L'ETUDE	72
1.2	COHORTE	73
1.3	SURVIE DES GREFFONS ET RECIDIVES	75
1.4	ANOMALIES DE LA VOIE ALTERNE DU COMPLEMENT	78
1.4.1	LES DOSAGES DES PROTEINES PLASMATIQUES DU COMPLEMENT	78
1.4.2	ANOMALIES GENETIQUES : MUTATIONS DES PROTEINES DE REGULATIONS, DES COMPOSANTS DE LA C3 CONVERTASE ET POLYMORPHISME DU CFH	79
1.5	CORRELATION ENTRE LES ANOMALIES GENETIQUES ET LA SURVENUE D'UNE RECIDIVE	95
1.6	TESTS FONCTIONNELS DU FACTEUR H	98
1.6.1	PROTECTION DES CELLULES : TEST DE LYSE DES GLOBULES ROUGES DE MOUTONS	98
1.6.2	ETUDE DE LA DISSOCIATION DE LA C3 CONVERTASE	102
1.6.3	ETUDE DE L'ACTIVITE COFACTEUR DU FACTEUR I	103
1.7	FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX	108
1.8	DISCUSSION	108
1.8.1	ANOMALIES DU COMPLEMENT ASSOCIEES A LA RECIDIVE DE SHU ATYPIQUE	109
1.8.2	FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX : TRIGGERS POTENTIELS	115
1	SHU ATYPIQUE NON LIE A UNE ANOMALIE D'UNE PROTEINE DU COMPLEMENT	119
1.1	LA THROMBOMODULINE	119
1.2	SHU ATYPIQUE ASSOCIE A DES MUTATIONS DE DGKE	123
2	FACTEURS PREDICTIFS DE RECIDIVE DES GNC3 EN POST-TR	128
2.1	CONTEXTE	128
2.2	OBJECTIF DE L'ETUDE	129
2.3	MATERIELS ET METHODES	129
2.3.1	PATIENTS	129
2.3.2	ANALYSE DU COMPLEMENT	130

2.3.3	ANALYSE HISTOLOGIQUE	131
2.3.4	LES CRITERES D'ANALYSE	139
2.3.5	LES DONNEES	139
2.3.6	ANALYSE STATISTIQUE	140
2.4	RESULTATS PRELIMINAIRES DE CETTE ETUDE	140
2.4.1	LES CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION	140
2.4.2	LE COMPLEMENT	141
2.4.3	SURVIE DES GREFFONS	144
2.4.4	FACTEURS ASSOCIES A LA SURVENUE D'UNE RECIDIVE	145
2.4.5	RESULTATS HISTOLOGIQUES	152
3.5	DISCUSSION	154
DISCUSSION-PERSPECTIVES		156
1	SHU ATYPIQUE EN POST-TRANSPLANTATION	156
2	C3G ET GNMP DE TYPE I EN POST-TRANSPLANTATION	160
3	LIENS ENTRE LES G3N/GNMP DE TYPE I ET LE SHU ATYPIQUE	162
BIBLIOGRAPHIE		164
ANNEXES		185

Résumé

Le syndrome hémolytique et urémique atypique (SHU) et les glomérulonéphrites à dépôts de C3 sont des pathologies rares. Le SHU atypique est une pathologie aigüe sévère, responsable de microangiopathie thrombotique rénale glomérulaire et artériolaire. La glomérulonéphrite à dépôts de C3 (GNC3) est une pathologie chronique responsable d'une protéinurie et d'une insuffisance rénale chronique qui évolue sur plusieurs années. Ces pathologies sont secondaires soit à un défaut de régulation soit à une hyperactivation de la voie alterne du complément. Dans ces deux pathologies, le risque de récurrence après transplantation rénale est élevé et responsable d'une perte de greffon. L'objectif de ma thèse a été de rechercher des marqueurs prédictifs de récurrence et de sévérité conditionnant le pronostic de la transplantation rénale pour ces deux pathologies complément-dépendantes. Une approche à la fois clinique, biologique et génétique a permis de déterminer pour le SHU atypique : les facteurs de risque génétique de récurrence, de déterminer pour la première fois que la présence de l'haplotype homozygote du Facteur H (gtgt) est associée à risque de récurrence et de préciser les conséquences fonctionnelles des mutations. Ce travail a contribué à établir les recommandations du traitement chez les patients transplantés pour un SHU atypique.

Les facteurs de risque de récurrences des glomérulonéphrites à C3 ont été recherchés à partir d'une large cohorte de patients que j'ai créée. Ce travail a permis de mettre en évidence une corrélation entre l'hyperactivation de la voie alterne du complément (élévation du C5b9 soluble, C3 plasmatique bas), la présence de dépôts (C3, C5b9) dans le rein en post transplantation et la sévérité de la récurrence. La consommation de C3 en phase fluide, la présence d'un sC5b9 élevé et la présence de C5b9 in situ sont associées à une récurrence sévère.

Enfin, j'ai participé à la première description de mutations de DGKE dans le SHU atypique. J'ai mis au point la technique d'immunohistochimie permettant de détecter et localiser DGKE dans les cellules endothéliales et podocytaires rénales. Ce travail a permis de montrer que le DGKE est présent dans l'endothélium rénal, élément essentiel du mécanisme physiopathologique du SHU atypique. Le DGKE est apporté par le rein transplanté et permet de corriger le risque de récurrence après transplantation chez les patients déficitaires.

Abréviations

ADAMTS13: A Desintegrin And Metalloprotease with ThromboSpondin type 1 repeats

CAM : Complexe d'Attaque Membranaire

C3aR : Récepteur au C3a

C5aR : Récepteur au C5a

C3bi (ou iC3b): fragment C3b inactivé

C5L2 : Complement 5a-Like Receptor ; Récepteur apparenté au C5a

CD19 : Cluster de Différenciation

CFHR : Complement Factor-H Related Proteins; protéines du complément apparentées au Facteur H

C3Nef : C3 nephritic factor ou facteur néphritique.

C4BP: C4 binding protein

DAF : Decay-Accelerating Factor, Facteur accélérateur de Dissociation

DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age

DDD: dense deposits disease.

EGTA: Ethylene Glycol Tetraacetic Acid; Acide Ethylèneglycol Tétracétique

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FB : Facteur B

FD : Facteur D

FH : Facteur H

FI : Facteur I

Fc : Fragment cristallisable

FcR : Fc-gamma Receptor, Récepteur aux fragments Fc des immunoglobulines

GAG : Glycosaminoglycanes

GNMP : Glomérulonéphrite Membrano-Proliférative

GPI: Glycosylphosphatidylinositol

GNC3 : glomérulonéphrite à dépôts de C3

ICAM-1 : Intra-Cellular Adhesion Molecule 1 ; molécule d'adhésion intracellulaire

IL: Interleukine

IFN- γ : Interferon-Gamma

Ig : Immunoglobuline

LB : Lymphocyte B

LED : Lupus Erythémateux Disséminé

LT : Lymphocyte T

LPS : Lipopolysaccharide

MCP : Membran-Cofactor Protein, Protéine membranaire cofacteur

MASP : Mannan-Associated Serine Protease; protéase associées aux MBL

MAT : Microangiopathie Thrombotique

MBL : Mannose Binding Lectin

MLPA : Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification ; amplification multiplex de sondes dépendant d'une ligation

MAC (ou C5b9) : membrane attack complexe

sMAC (ou sC5b9) : soluble membrane attack complexe

PTT : purpura thrombotique thrombocytopénique

RCA: Regulator of Complement Activation

SAPL : syndrome des antiphospholipides

SCR : Short Consensus Repeat; courtes unités répétitives

SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique

STEC : Shiga Toxin-producing E.Coli; E.Coli productrice de shiga toxine

TAFI : Thrombin-Activable Fibrinolysis Inhibitor; inhibiteur de fibrinolyse activé par la thrombine

TCR : T-cell Receptor, récepteur au lymphocyte T

THBM : thrombomoduline

TGF-β: Transforming Growth Factor beta; facteur de croissance transformant bêta

TNF-alpha: Tumor Necrosis Factor-Alpha; facteur de nécrose tumorale alpha

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1 ; molécule d'adhésion cellulaire vasculaire

VEGF : vascular endothelial growth factor

vWF: von Willebrand Factor; facteur Von Willebrand

Introduction

Le système du complément a été découvert à la fin du XIX^{ème} siècle. Son rôle, avant les 20 dernières années était cantonné à ses propriétés bactéricides, il s'agit de la première barrière de défense contre les microbes, via l'opsonisation, le recrutement des cellules inflammatoires et la destruction directe de l'agent infectieux par lyse osmotique. Ses fonctions se sont largement étendues puisqu'il joue un rôle dans la clearance des cellules apoptotiques et complexes immuns, il module la réponse immunitaire spécifique et inflammatoire. L'ensemble des fonctions est essentiel mais nécessite d'être très finement régulé^{1 2}. Toute dérégulation ou anomalie d'une protéine du complément associée le plus souvent à un trigger déclenchant peut être à l'origine de pathologies variées de l'inflammation, de la coagulation ou de l'immunité. J'ai focalisé mon travail sur deux pathologies rénales, le syndrome hémolytique et urémique atypique et la glomérulonéphrite à C3, deux pathologies associées à une dérégulation de la voie alterne du complément, dans un contexte de transplantation rénale. Le but de cette introduction est de présenter le système du complément, les pathologies rénales, le SHU atypique et la GNC3 associés à des anomalies de la voie alterne du complément, et les particularités de ces pathologies dans le contexte de transplantation rénale.

Chapitre 1 : Le système du complément

Le système du complément se caractérise par un système de cascade et est soumis à un système de régulation qui se fait à plusieurs niveaux. Les trois voies d'activation sont la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines¹⁻³. Ces voies d'activation entraînent des cascades de protéolyses successives de protéines plasmatiques. Elles aboutissent à la formation de complexes enzymatiques appelés C3 convertases qui vont cliver la protéine centrale du système du Complément, le C3, en C3b. Le C3b peut alors initier les différentes voies effectrices du complément qui vont permettre les trois principales fonctions du système du Complément : la destruction directe de l'agent infectieux par lyse osmotique ; l'élimination des complexes immuns circulants, des cellules apoptotiques et débris cellulaires ; ainsi que la modulation de la réponse immunitaire spécifique.

1 Activation

1.1 La voie classique et la voie des lectines

La voie classique et la voie des lectines activent le complément et aboutissent à la même cascade protéolytique conduisant à la synthèse de la « C3 convertase classique ». Cependant les mécanismes d'initiation des deux voies sont différents.

L'activation de la voie classique, première voie décrite, est initiée par la fixation de la protéine C1q à l'un de ses ligands. Ceux-ci sont majoritairement les anticorps IgG1, IgG3 et IgM fixés aux surfaces microbiennes ou à des complexes immuns. Cependant, le C1q peut reconnaître directement d'autres molécules comme « Pathogen-associated molecular patterns » (les *PAMs*, motifs moléculaires associés aux pathogènes), de l'ADN, certains

polysaccharides, certains virus, la thrombine, les fragments lipopolysaccharidiques des bactéries ou certaines protéines inflammatoires telles que la protéine C-réactive sur les cellules apoptotiques^{4 5 6}. Le C1q possède une structure complexe comprenant six têtes globulaires connectées à une région centrale de structure proche de celle du collagène, l'ensemble évoquant un bouquet de tulipe. Un site de fixation est présent sur chaque tête globulaire et l'engagement d'au moins deux têtes suffit pour induire un changement conformationnel de C1q. Celui-ci circule dans le plasma associé à deux hétérodimères composés des sérines estérases C1r et C1s, formant le complexe C1, Ca⁺⁺ dépendant (C1q(C1r-C1s)²). La fixation de C1q à l'un de ces ligands entraîne l'auto-activation de C1r, qui clive et active ainsi C1s.

La voie des lectines présente des similitudes avec la voie classique. La protéine de reconnaissance est une protéine MBL (Mannose Binding lectin) ou une ficoline qui initie cette voie par leur liaison à des carbohydrates de micro-organismes et qui ont une structure proche du C1q. Elles s'associent à des sérines estérases, dénommées MASP1, 2 et 3 qui présentent de grandes homologues avec le C1s et C1r⁷.

Ces deux voies, lorsqu'elles sont activées, clivent le composant plasmatique C4 en libérant l'anaphylatoxine C4a en phase fluide, et en générant un fragment majeur C4b qui se fixe de façon covalente à la surface cible de l'activation, par son domaine thioester libéré lors du clivage⁸. Le C4b fixé à la surface activatrice devient capable de lier le fragment C2 formant un complexe C4bC2Mg⁺⁺ dépendant. Le C2, une fois fixé, peut être clivé à son tour par C1s ou MASP2 en libérant un fragment C2b en phase fluide et dévoilant un site enzymatique sérine estérase sur le fragment C2a qui reste associé à C4b. Ces cascades de protéolyse aboutissent à la formation du complexe C4b2a. Ainsi se trouve formé sur la

surface activatrice, le complexe C4b2a, appelé C3 convertase classique dont le rôle est de cliver le C3 en deux fragments distincts le C3a et le C3b.

Le complexe C1 est spécifiquement régulé par une protéine, le C1-inhibiteur qui empêche son auto-activation.

1.2 La voie alterne

A la différence de la voie classique et de la voie des lectines, la voie alterne du complément n'est pas initiée par une liaison spécifique-protéine mais est activée en permanence par l'hydrolyse spontanée du C3, formant du C3(H₂O), processus appelé le « tick-over »⁹. Cette voie d'activation est constamment active et permet à l'organisme une réactivité immédiate contre les agents pathogènes. Le clivage continu, à bas bruit de C3 par une C3 convertase constitutivement activée en phase fluide génère en permanence de petites quantités de C3b¹⁰. Le premier dépôt covalent de C3b se fait de façon aléatoire¹¹. Si le C3b ne rencontre pas de pathogène constituant pour lui une surface activatrice (i.e. capable de fixer le C3b permettant ainsi le recrutement du FB), il est rapidement inactivé par un système complexe de régulation dans la circulation sanguine, ou à la surface des membranes cellulaires, en produits de dégradations inactifs le iC3b, le C3c, ou C3d. En revanche, s'il rencontre une surface activatrice, ou si le système de régulation est défaillant, le C3 se fixe à une surface activatrice, ce qui lui permet de recruter le facteur B (FB). La fixation de B sur le C3b induit un changement de conformation de B qui expose alors un site de clivage pour une sérine protéase circulante, le facteur D, en présence de Mg⁺⁺. Deux fragments sont alors générés : Ba qui est libéré en phase fluide et Bb, qui, associé de manière non covalente avec le fragment C3b forme la C3 convertase alterne : C3bBb. Cette enzyme clive le C3 en deux fragments : le C3a, une anaphylatoxine de petit poids moléculaire, libérée en phase soluble et le C3b qui participe à une boucle amplificatrice. Il forme une nouvelle C3 convertase, le

clivage de C3 en deux fragments : le C3a (9kD), une anaphylatoxine libérée en phase soluble et le C3b (186kD) qui exprime transitoirement un site labile permettant sa fixation covalente par une liaison thioester au pathogène et permettant la formation de nouvelle C3 convertase alterne C3bBb, et molécule de C3b ¹². La demi-vie de la C3 convertase est courte (d'environ 90 secondes), mais peut être augmentée de 5 à 10 fois lorsqu'elle se lie à la Properdine (Facteur P). Elle clive alors plus de molécules C3 en C3b et forme de nouvelles convertases.

Cette capacité d'auto-amplification de la voie alterne est très importante pour la reconnaissance et l'élimination des pathogènes en l'absence d'anticorps spécifique ¹³.

L'activation des voies classiques et des voies des lectines permet le recrutement de la voie alterne. Les molécules de C3b générées par la voie classique et la voie des lectines peuvent interagir avec le facteur B, et aboutir à la formation des C3 convertases alternes. Ce mécanisme est important car il augmente considérablement le nombre de molécules de C3b générées qui permettront dans un second temps la formation de C5a et C5b9. Seule la voie alterne a la capacité de s'auto-amplifier et contribue pour 80% à la formation des molécules de C5 et C5b9 après une activation initiale par la voie classique ¹¹. Cette voie joue donc un rôle majeur en physiologie et physiopathologie. Les anaphylatoxines C3a et C5a, générées après le clivage de C3 et C5 respectivement sont des molécules pro-inflammatoires ^{14 15}.

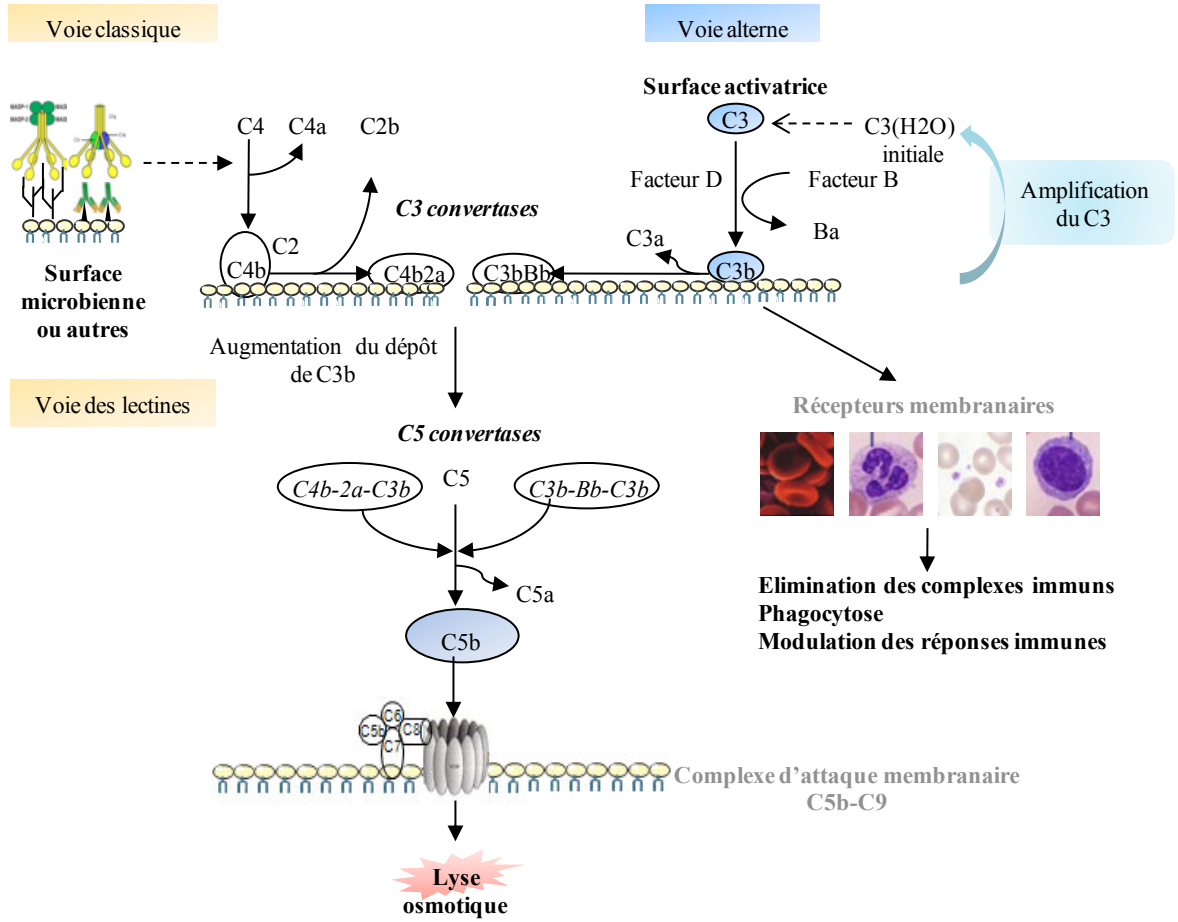
1.3 La voie effectrice terminale commune

Le C3 est le point de convergence des trois voies d'activation du complément et le clivage se fait de façon identique par les C3 convertases alternes (C3Bb) ou classiques (C4b2a). La

fixation des molécules de C3b supplémentaires aux convertases classiques (C4b2a(C3b))_n ou alternes (C3bBb(C3b))_n leur confère une activité C5 convertase ¹³.

En effet, la protéine C5 peut alors se lier aux complexes (C4b2a)C3b ou (C3bBb)C3b et être soumise à leur activité enzymatique. La protéolyse de C5 (par les sous-unités C2a ou Bb des complexes) coupe la chaîne α du C5 dans sa partie N Terminale pour libérer en phase fluide un petit peptide, le C5a, qui a une activité anaphylatoxique, et produire la molécule C5b. C5b peut s'associer aux protéines de la voie finale commune présentes dans le plasma : les composants C6, C7. Ce complexe fixera C8 qui commencera un ancrage dans la membrane plasmique. Le complexe (dit « sublytique ») C5b8 s'associe alors à 6 à 12 molécules de C9 qui en se polymérisant vont créer un véritable pore transmembranaire. Ainsi le complexe d'attaque membranaire (appelé mC5b9) permet une lyse osmotique de la cible (microorganisme, cellule transformée) (figure 1).

Figure 1 : Le système du complément



2 Les fonctions principales

2.1 Le rôle pro-inflammatoire

Les anaphylatoxines C3a et C5a, fragments actifs issus du clivage des chaînes α de C3, et C5 sont des petits polypeptides. Ils interagissent via leurs récepteurs C3aR et les C5aR (au nombre de 2 : CD88 et C5L2), qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés à la protéine G ¹⁶. Ces récepteurs sont présents à la surface des cellules myéloïdes (polynucléaires neutrophiles ¹⁷, mono/macrophages, cellules dendritiques ¹⁸ ainsi que sur les lymphocytes T et B ¹⁹). Leurs liaisons à leurs récepteurs entraînent l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la chemoattraction des cellules inflammatoires (polynucléaires neutrophiles, les monocytes et macrophages) ²⁰ ainsi que l'activation des lymphocytes T et B sur le lieu d'activation du complément. Le C3a et le C5a sont également responsables de l'activation des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales activées augmentent l'expression des molécules d'adhésion d'ICAM-1, VCAM-1 et E-selectine, ainsi que de la P-selectine et vWF et plaquettaires ^{21 22 23}. Elles induisent également la dégranulation des neutrophiles, éosinophiles, basophiles et mastocytes et la sécrétion de cytokines comme le TNF α , IL-1 et IL-6 ^{24 21}.

Le complexe d'attaque membranaire y compris le complexe sublytique C5b7 et C5b8 induit la production d'une grande variété de cytokines et de médiateurs pro-inflammatoires. Il permet une migration des polynucléaires neutrophiles²⁵.

2.2 La lyse cellulaire

Le complexe d'attaque membranaire forme des pores transmembranaires à la surface des cellules cibles. Ces pores, en laissant passer des molécules d'eau et des petits ions à travers la membrane plasmique, sont responsables de la lyse cellulaire. L'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire induite par les CAM peut également à des concentrations lytiques induire une dysfonction des mitochondries et est susceptible d'induire la mort cellulaire²⁶.

2.3 L'opsonisation

Certaines protéines du complément interviennent dans le processus de clearance des agents pathogènes, complexes immuns et antigènes, corps apoptotiques par l'opsonisation. Les fragments du complément qui ont des propriétés d'opsonisation sont le C3b et C4b et leurs produits de dégradation, le iC3b, C3dg et C3d. Les MBL, Ficolines et C1q sont capables de jouer ce rôle. Ces opsonines liées à la substance à éliminer sont reconnues par des récepteurs spécifiques portés par les cellules phagocytaires. Les différents récepteurs impliqués dans la clearance des cellules opsonisées sont :

- Le CR1 (CD35) : protéine membranaire présente sur les érythrocytes, les cellules phagocytaires, les lymphocytes B, les cellules dendritiques folliculaires et les podocytes. Ce récepteur intervient également dans la régulation de C3b²⁷⁻²⁹.
- Le CR3 (CD11b/CD18) et le CR4 (CD11c/CD18) : récepteurs appartenant à la famille des intégrines leucocytaires dont l'expression membranaire est restreinte aux polynucléaires neutrophiles, aux monocytes (surtout CR3) et macrophages (surtout CR4), aux cellules NK et dendritiques (CR4). Ces deux récepteurs lient C3bi, mais

aussi le fibrinogène et le LPS. Ils participent à la phagocytose des micro-organismes³⁰.

- Le CR1g : récepteur de la super famille des Immunoglobulines. Il est capable de lier C3b et C3bi et n'est exprimé qu'à la surface de certains macrophages dont les cellules de Kupffer du foie. Il a donc un rôle important dans la phagocytose et l'élimination des particules opsonisées de la circulation sanguine.

2.4 L'immunité spécifique

Depuis maintenant trois décennies, il a été montré qu'une réduction du C3 circulant était responsable d'une défaillance de la réponse anticorps, ce qui suggérait le lien entre le complément et l'immunité adaptative³¹. Le récepteur CD21 (CR1) présent sur les lymphocytes B se lie au C3b, C4b et produits de dégradations de C3 (iC3b, C3dg et C3d)³². Ce récepteur forme une molécule complexe engageant les protéines CD19, CD81 présentes à la surface du lymphocyte B.

La liaison du C3d-antigène par les lymphocytes B

- participe à la sélection positive du soi et non soi à des stades précoces de la vie
- participe à l'élimination des lymphocytes B autoréactifs
- permet une activation des follicules B matures naïves par l'engagement antigène couplé à son récepteur en présence de lymphocytes T helper³³.
- permet l'activation et la différenciation des lymphocytes B dans les follicules spléniques organisés par les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques folliculaires expriment également les récepteurs des produits dégradés du complément qui rétentionnent les antigènes, favorisant ainsi la formation d'un centre germinatif de B

ayant une haute affinité pour cette sélection d'antigènes et la formation de lymphocytes B de longue durée de vie.

Le complément participe également à la régulation des lymphocytes T par de multiples mécanismes : l'opsonisation des antigènes étrangers couplés au C3bi via les cellules dendritiques, la modulation des cytokines, la genèse des lymphocytes T qui stimulera la production des lymphocytes T activés.

Le MCP est une molécule de costimulation du lymphocyte T ³⁴. Le crosslinking de MCP (par le C3b notamment) en présence du récepteur T à la surface de cellules CD4+ naïves induit la genèse de cellules régulatrices sécrétant de l'IL10 et exprimant le granzyme B³⁵. A l'inverse des autres types de cellules T régulatrices, la fonction de celles induites par MCP est indépendante de l'expression de FoxP3, molécule hautement spécifique de la fonction des cellules T régulatrices « classiques ».

CD55 est également un régulateur négatif de la réponse T CD4+ comme l'illustrent les souris invalidées pour DAF qui présentent une hyperactivation cellulaire T. Ce rôle semble être dépendant des récepteurs cellulaires de surface présents sur la plupart des cellules de l'immunité et permet une modulation de la réponse immunitaire spécifique.

Plusieurs études ont montré que les produits de clivage C5a et C3a ont la capacité d'activer un réseau complexe de voies de signalisation des différents récepteurs permettant d'augmenter ou de diminuer l'immunité cellulaire CD4+ et/ou CD8+.

Le C5a et le C3a ont également des effets sur la réponse B notamment dans la circulation et la distribution des lymphocytes B naïfs et mémoires.

3 Régulation

Le complément est un système peu spécifique qui requiert donc une régulation pour éviter l'agression des cellules hôtes. S'il y a un excès d'activation et de production des différents composants du complément, un réseau de protéines régulatrices solubles et membranaires intervient pour inhiber l'activation (les activités enzymatiques ne sont dévoilées qu'après l'activation d'un précurseur ou l'action d'un cofacteur) et réduire la demi-vie des composants actifs (C4b, C3b, C5b, C3 et C5 convertases). Plusieurs régulateurs ont la capacité d'interagir avec la protéine centrale C3b. Ils présentent une structure protéique similaire organisée en modules de séquences répétitives d'environ 60 acides aminés en tandem : les SCR (Short Consensus Repeat). Ces SCR ont la particularité de présenter 4 résidus cystéines conservés qui forment des ponts disulfure entre les cystéines I et III et les cystéines II et IV et sont indispensables pour la structure secondaire de la protéine.

3.1 Régulation de la voie classique

La voie classique est régulée par 2 protéines circulantes spécifiques, le C1-Inhibiteur et la C4 Binding protein (C4BP).

– Le C1-inhibiteur

Le C1 inhibiteur est une protéine présente dans le plasma sous forme active appartenant à la famille des serpins. Cette famille de protéines inactive son substrat en formant un complexe stable avec lui. Ainsi, le C1 INH empêche l'auto-activation du complexe C1 et le dissocie de

l'activateur en se combinant à C1r et à C1s pour former un complexe C1r-C1s-(C1 INH)₂ laissant le C1q fixé seul sur l'activateur. C1q ainsi dévoilé peut interagir avec un récepteur spécifique présent sur les cellules phagocytaires comme la calréticuline ou le gC1qR, favorisant la phagocytose de l'activateur.

– La C4 binding protein (C4bp)

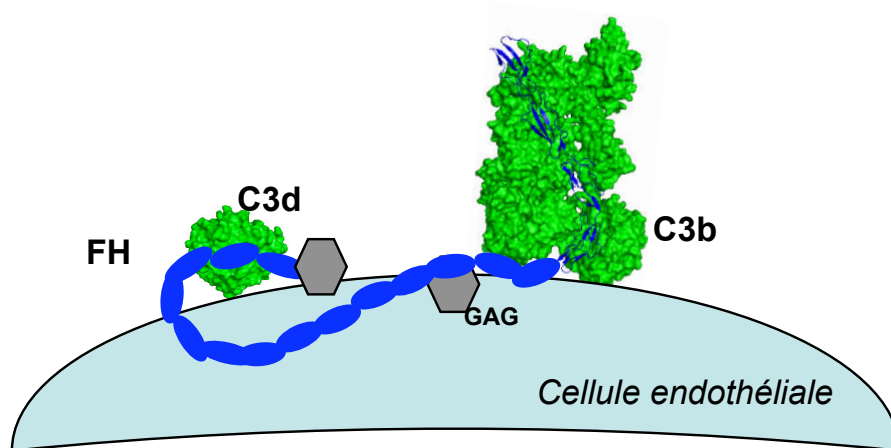
La C4 binding protein (C4bp) en se liant au C4b permet la fixation d'une sérine estérase plasmatique, Facteur I qui dégrade C4b en C4d.

3.2 Régulation de la voie alterne

3.2.1 Le Facteur H

La régulation de la voie alterne est principalement assurée par une protéine soluble de 150 kDa, le Facteur H. Cette protéine est codée à partir du gène CFH, composé de 23 exons, se trouvant sur le chromosome 1, au sein du locus RCA (Regulator of complement activation)³⁶. La concentration plasmatique du FH est de 500mg/l^{37,38}. Il est synthétisé majoritairement par le foie mais peut également être synthétisé et sécrété par d'autres types de cellules, plaquettes, cellules épithéliales rétiniennes ou cellules mésangiales glomérulaires, la synthèse étant induite par l'interferon γ . Il forme une chaîne de 150 kDa, composée de 20 modules similaires appelés SCR (short consensus repeat)³⁹. Les SCR s'organisent en une boucle hypervariable. Les variabilités des propriétés structurelles de la boucle confèrent à chaque SCR des spécificités qui permettent la fixation à ses différents ligands^{40,41}. Ses deux principaux ligands sont le C3b et les GAG⁴²⁻⁴⁴.

Figure 2 : Interaction du FH avec le C3b.



Le FH est capable de se lier simultanément au C3b en phase fluide par sa région N-terminale et au C3d fixé aux surfaces par sa région C-terminale (SCR 19-20).
GAG : Glycosaminoglycans (donnée par Lubka Rouménina)

Une des particularités du FH est de permettre une régulation en phase fluide et à la surface des cellules hôtes. La régulation en phase fluide est réalisée par la partie N terminale (SCR1-4). Le facteur H contrôle l'initiation de la C3 convertase alterne en se mettant en compétition avec le facteur B pour la fixation de C3b afin de prévenir la formation de la C3 convertase en phase fluide mais aussi à la surface des cellules hôtes. Le facteur H accélère également la dissociation de la C3 convertase alterne en déplaçant le fragment Bb de la C3 convertase active. C'est aussi un cofacteur du FI, puisque le complexe C3b-FH est reconnu par le facteur I, inactivant le C3b par clivage protéolytique en un fragment inactif ne pouvant plus initier une nouvelle C3 convertase⁴⁵⁻⁴⁷. La partie C terminale, c'est à dire les SCR19-20 du FH a une affinité différente selon la cellule sur laquelle le C3b est déposé^{48, 49,50}. Il joue un rôle central pour discriminer les surfaces du soi sur lesquelles une C3 convertase peut être formée. Il reconnaît les surfaces non-activatrices c'est à dire riche en polyanions comme l'acide sialique, l'héparan sulfate ou d'autres glycosaminoglycans. C3b fixé sur de telles surfaces présente une affinité 100 fois supérieure pour le facteur H que

pour le facteur B ^{48,51}. Le SCR 19-20 est le principal site de liaison aux GAG membranaires, il partage cette fonction avec les SCR6-8 (**Figure 3**).

Il existe des protéines apparentées au FH, le CFHL-1 (complement facteur H like protein) issue d'un épissage alternatif de l'ARNm du FH et les CFHR (Complement Factor H Related)⁵². Le CFHL-1 se compose des SCR1-7, dont seuls les 4 acides aminés C terminaux sont spécifiques. Il s'agit d'une protéine circulante, qui partage avec le FH ses fonctions de régulation du complément en phase fluide via ses SCR1-4 (cofacteur du FI et dissociation des C3 convertases) ⁵³. Il possède également un site de liaison à l'héparine localisé sur son SCR7. Les CFHR sont situés à proximité du gène du CFH et sont des protéines ayant une grande homologie avec le FH dont les fonctions de régulation propres sont en cours de détermination et celles connues ont été décrites récemment ⁵⁴. Etant donné la grande homologie de séquences des CFHR avec le CFH et entre eux, il existe des recombinaisons non homologues qui aboutissent à des réarrangements, des délétions, des duplications, ou encore des mutations. Le CFHR1 est une petite protéine de 37 à 43 kDa, composée de 5 domaines SCR. Sa concentration plasmatique est estimée autour de 70 à 100 µg/ml.

Le CFHR1, possède un site d'oligomérisation permettant la formation de dimères CFHR1/CFHR1, CFHR1/CFHR2, et CFHR1/CFHR5⁵⁵ ⁵⁶. Les SCR 3-5 ou domaines C-terminal du CFHR1 ont une forte homologie avec les SCR 18-20 du FH ⁵⁴ ; ils interagissent avec les mêmes ligands que celui-ci à savoir, le C3b, le C3d et les GAGs. Ces domaines permettent ainsi au CFHR1, d'entrer en compétition avec le FH en diminuant la fixation de FH à la surface des cellules empêchant ainsi au FH de jouer son rôle de cofacteur. Il ne possède pas d'activité cofacteur du facteur I permettant la dégradation du C3b en iC3b ^{55,57}. Le CFHR1 se lie au C3b de la C5 convertase et inhibe l'action de la C5 convertase qui clive le C5 en C5a et C5b. Il inhibe donc la formation du CAM ⁵⁸. Il existe deux isoformes chez

les personnes présentant le CFHR1 : le CFHR1* A et le CFHR1* B ⁵². Ces différences se portent uniquement sur trois acides aminés au niveau du troisième domaine SCR du CFHR1. La forme homozygote du CFHR1 *B, relativement rare dans une population générale, se retrouve augmentée significativement dans le SHU atypique. L'association entre CFHR1*B et la survenue d'un SHU atypique a été démontrée dans la cohorte espagnole ⁵² mais aussi dans la cohorte française⁹¹.

La délétion du CFHR1 est retrouvée chez 2 à 20 % dans une population générale ⁶⁰. Cette variabilité repose sur l'ethnie des populations. En effet, en Afrique, le taux de délétion du CFHR1 est plus élevé qu'en Europe ou en Asie. Cette délétion peut être associée à la formation d'Ac anti-FH, dans le cas du SHUa ⁶¹. Mais elle peut jouer un rôle protecteur dans la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA) ⁶².

La protéine plasmatique CFHR2 inhibe l'activité de la C3 convertase et l'amplification de la voie alterne du complément⁶³.

Le CFHR5 est une protéine glycosylée de 62 kDa. Il a la capacité de se lier à l'héparine par ses SCR5-7 (forte homologie avec les SCR12-14 du facteur H), à la CRP ainsi qu'au C3b permettant une activité de cofacteur du FI. Il clive le C3b en iC3b. Il entre en compétition avec le FH pour sa liaison à la C3 convertase et permet la dissociation de la C3 convertase⁵⁵.

Le rôle du CFHR3 et du CFHR4 n'est pas bien connu. Ils ont la capacité de se lier au C3b et C3d ⁶⁴.

3.2.2 Le Facteur I

Le facteur I appartient à la famille des sérines protéases et participe à la régulation des voies alternes et des voies classiques du complément en clivant respectivement C3b et C4b. Le gène du Facteur I est situé sur le chromosome 4 et se compose de 13 exons dont l'expression aboutit à une glycoprotéine de 88 kDa, hétérodimère constitué d'une chaîne lourde (58kDa) et d'une chaîne légère (30kDa) unies par un pont disulfure⁶⁵. La fonction du FI est portée par la chaîne légère (domaine sérine kinase protéine kinase). La chaîne lourde est composée de plusieurs domaines : un domaine récepteur de SCR (ou domaine CD5) qui permet la liaison du FI à ses cofacteurs, un domaine FIMAC (Facteur I et complexe d'attaque membranaire) et deux autres domaines dont les fonctions restent inconnues. Le facteur I, comme le facteur D, circule sous forme de pro-enzymes. Ces deux enzymes ne s'activent qu'en présence de leur substrat, lorsque celui-ci est complexé. Le facteur I n'exerce son activité protéolytique qu'en présence d'un cofacteur pour permettre l'inactivation du C3b en C3bi^{66,67}. Il a comme cofacteur le MCP (CD46) et CR1 (CD35) qui sont des protéines membranaires⁴⁵. Ceux-ci sont des régulateurs pour la voie classique et alterne. Le facteur H est un cofacteur du facteur I et est spécifique de la voie alterne et le C4BP est spécifique de la voie classique. Néanmoins le C4BP peut également servir de cofacteur du FI pour la dégradation du C3b mais de façon beaucoup moins efficace⁶⁸

3.3 Régulateurs membranaires communs de la voie alterne et classique : MCP, DAF et CR1

La protéine MCP (CD46) est présente sur la plupart des membranes cellulaires, excepté sur les membranes érythrocytaires. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires de 51 à 68 kDa composées de quatre SCRs et d'une région O-glycosylée. Le gène de MCP comporte

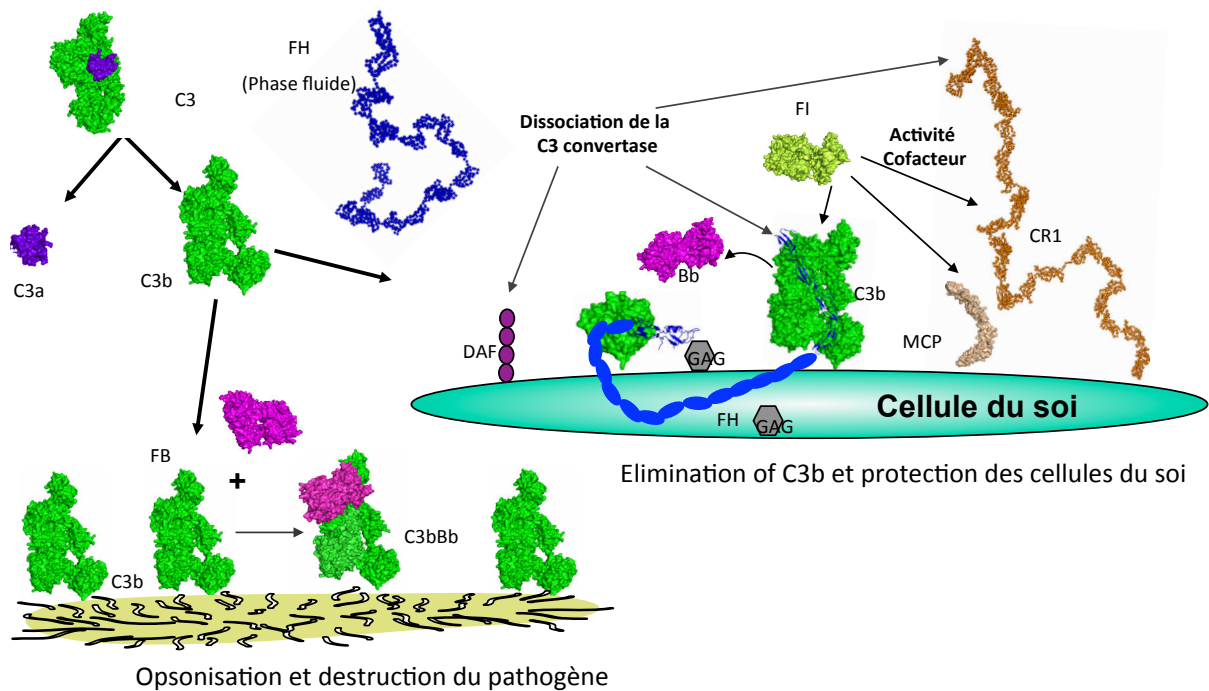
14 exons. Le MCP est exprimé sous forme de 4 isoformes qui résultent de l'épissage alternatif du transcrit du gène MCP. Tous les isoformes partagent 4 domaines communs CCP. Les sites de liaison du MCP au C3b et de ses fragments et son activité cofacteur du FI sont localisés principalement dans le SCR 4 appartenant aux quatre SCR du domaine extracellulaire⁶⁹. La protéine MCP sert de cofacteur au Facteur I pour le clivage du C4b en fragment C4d qui reste attaché aux membranes⁷⁰ et, dans le clivage du C3b⁷¹ en C3bi. La protéine MCP possède une affinité pour le C4b supérieure à celle pour le C3b, faisant d'elle un régulateur particulièrement efficace de la voie classique⁷¹. La protéine MCP ne possède pas d'activité de dissociation des C3 convertases. En plus de son rôle dans la régulation du complément, le MCP est aussi une molécule de costimulation du lymphocyte T³⁴. Le crosslinking de MCP (par le C3b notamment) en présence du récepteur T à la surface de cellules CD4+ naïves induit la genèse de cellules régulatrices sécrétant de l'IL10 et exprimant le granzyme B³⁵.

La protéine membranaire DAF (Decay Accelerating Factor ou CD55) est une glycoprotéine de membrane liée par un ancrage glycosylphosphatidyl inositol (GPI) régulant négativement les C3 et C5 convertases, classique ou alterne, en accélérant leur dissociation.

Le CR1 est une glycoprotéine transmembranaire (CD35 ou C3/C4b récepteur) composé d'une chaîne unique de 30 SCR. Il est exprimé sur la majorité des cellules circulantes et plus particulièrement les érythrocytes. 90% du pool total de CR1 est sur les GR. Le CR1 est également présent sur les podocytes glomérulaires et les cellules folliculaires dendritiques. Il n'est pas exprimé par les cellules endothéliales. C'est un cofacteur du FI pour le clivage du C3b et C4b. Il accélère la dissociation des convertases C3 et C5 classique et alterne. C'est le seul cofacteur pour le FI pour le clivage iC3b, générant du C3dg. C'est un ligand du

récepteur CR2 présent à la surface des lymphocytes B. Le CR1 sert également de récepteur pour les opsonines C3b et C4d qui peuvent donc complexer les C3b associés aux Immunoglobulines et avoir un rôle dans la clearance des complexes immuns.

Figure 3 : Les régulateurs de la voie alterne du complément.



Le FH et DAF possèdent tous deux une activité de dissociation des C3 convertases. Le FH agit comme compétiteur du FB pour la liaison au C3b et agit comme co-facteur du FI, comme le CR1 et la MCP (deux récepteurs membranaires) pour la dégradation du C3b en C3bi.⁷²

3.4 Régulation de la voie effectrice finale

Le complexe d'attaque membranaire est sous le contrôle d'une part de deux protéines plasmatiques, la protéine S et la Clusterine^{73,74}, qui inhibent la formation du CAM et d'autre part, d'une protéine membranaire à ancre GPI, CD59, qui empêche la formation respectivement de C5b-7 et C5b-8 aux membranes et la polymérisation de C9.

La rupture entre l'activation et la régulation est à l'origine de nombreuses pathologies responsables d'une activation continue du complément, de l'inflammation, d'une accumulation de débris qui perpétuent des lésions tissulaires.

Je focaliserai l'analyse sur deux pathologies associées à une dérégulation de la voie alterne du complément : le Syndrome hémolytique et urémique atypique et les Glomérulopathies à C3.

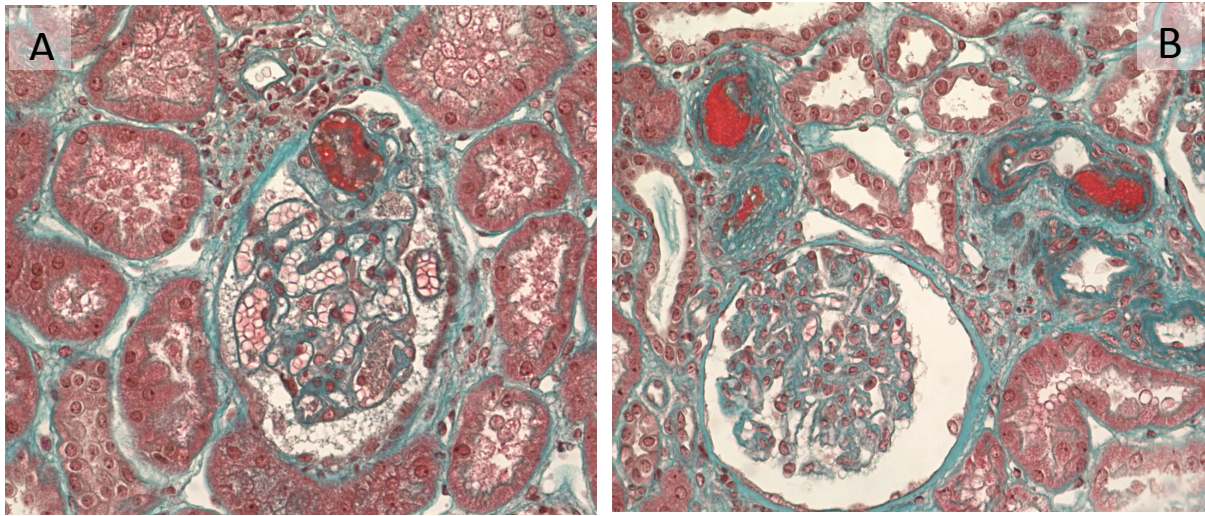
Chapitre 2 : Pathologies associées à une dérégulation de la voie alterne du complément **Le système du complément**

1 Le syndrome hémolytique et urémique atypique

1.1 De la lésion histologique au SHU atypique

La microangiopathie thrombotique (MAT) est une définition histologique qui correspond à une occlusion des petits vaisseaux, artérioles et glomérules. Les lésions aiguës sont de sévérité variable, de modérées (élargissement de l'espace sous endothelial associé à une congestion et une turgescence des cellules endothéliales) à sévères, définie par la nécrose fibrinoïde de la média, les thromboses des lumières des vaisseaux. Les lésions glomérulaires peuvent s'associer des thrombus intra glomérulaires, un aspect en double contours contenant de la fibrine, des plaquettes et hématies fragmentées, de la mésangiolyse allant jusqu'à la nécrose corticale. L'immunofluorescence est négative.

Figure 4: Lésions de microangiopathie thrombotique aiguë



A : Mésangiolyse et thrombose du glomérule

B : Présence de thrombi dans les artériolaires

Les lésions de MAT, à la phase aiguë, sont la plupart du temps associées à une thrombopénie (plaquettes $< 150 \times 10^9/l$), une anémie hémolytique mécanique (hémoglobine $< 10g/dl$), des LDH supérieurs à la normale, une haptoglobine indetectable et la présence de schizocytes. Il s'y associe une défaillance d'organe secondaire à l'ischémie induite par l'occlusion des vaisseaux. Ces anomalies ne sont pas spécifiques d'une pathologie, le contexte clinique et la physiopathologie aide au diagnostic.

1.2 Différentes entités associées à la MAT

1.2.1 Le Purpura thrombotique thrombopénique (PTT)

Il est responsable principalement de manifestations neurologiques allant de la stupeur, aux crises convulsives et au coma. Il est secondaire à un déficit congénital ou acquis en

ADAMTS 13, protéase qui coupe le facteur von Willebrand (vWF). En cas de déficit ou d'inactivité de l'ADAMTS 13 par un anticorps anti-ADAMTS 13, des microagrégats plaquettaires sont retrouvés dans les microvaisseaux sous forme de thrombi⁷⁵.

1.2.2 Le SHU

Il est responsable d'insuffisance rénale, à des étiologies beaucoup plus hétérogènes que le PTT. Deux grandes entités sont bien décrites, le SHU typique et atypique.

- **Le SHU typique**

Les infections à *Escherichia coli* producteurs de Shiga-like toxine (STEC) chez l'enfant entraînent une symptomatologie variable allant de la gastroentérite au syndrome hémolytique et urémique (SHU) et constituent un problème de santé publique. Ces SHU, dits typiques ou post-diarrhée (D+) ou encore à STEC, représentent 95 % de l'ensemble des SHU de l'enfant^{76 77-80 81}. Le SHU typique survient sous forme de petites épidémies saisonnières. Les principaux réservoirs sont les ruminants ; la transmission à l'homme est généralement oro-fécale via l'ingestion de produits carnés, produits laitiers non pasteurisés ou fruits et légumes contaminés. En France, 80 à 100 cas de SHU à STEC surviennent chaque année chez des enfants. Le taux de décès à la phase aiguë est de 2 %. Le pronostic est rénal. Avec un recul moyen de 4 ans, le taux d'insuffisance rénale (IR) terminale est de 10 à 15 %, le taux de séquelles (IR chronique, hypertension artérielle ou protéinurie) de 30 %.

Les lésions de MAT sont dues aux altérations des endothéliums vasculaires, principalement rénaux, directement engendrées par les Shiga-toxines.

La plus fréquente des infections est celle à *Escherichia Coli* producteur de Shiga-toxines (Stx) de sérotype OH157:H7. Divers mécanismes induits par les Shiga-like toxines ont été démontrés, ils sont à l'origine de lésions des endothéliums vasculaires (induction d'apoptose, sécrétion de cytokines ou sur-expression des récepteurs Gb3). La toxicité des vérotoxines St1 et St2 sur les cellules endothéliales est directe. Le récepteur, glycosphingolipide globotriaosylcéramide (Gb3), de ces vérotoxines est présent à la surface cellulaire endothéliale. La fixation de la toxine au Gb3 permet son internalisation, elle entraîne des modifications de l'ARN, stoppe la synthèse protéique induisant l'apoptose de la cellule endothéliale qui acquiert ainsi des propriétés procoagulantes. La MAT est la conséquence ultime de cette cascade d'activation de la cellule endothéliale et des plaquettes. La prédominance de l'atteinte rénale au cours de l'infection par *E Coli* O157H7 serait due à l'expression plus importante de Gb3 à la surface des cellules endothéliales rénales en comparaison avec d'autres organes.

En 2011, il y a eu une épidémie de SHU en Allemagne dit « SHU typique », à *Escherichia coli* de sérotype O104 : H4⁸². Le réservoir était très probablement des germes de soja. Cette épidémie a surpris par le nombre de patients atteints et la sévérité de la maladie. Plus de 20% des patients ayant eu une gastro entérite virale ont fait secondairement un SHU. Le SHU a touché principalement des adultes et principalement les femmes. Plus de 50% d'entre eux ont été dialysés. Les atteintes neurologiques étaient retrouvées chez environ 30% des patients⁸³.

- **Le SHU atypique primitif**

Il ne survient pas dans un contexte d'infection à germes sécrétant de vérotoxines et touche d'une façon égale les enfants et les adultes. Son incidence est beaucoup plus rare. Il y a 2 à 3

cas pour 10 millions par an. Il survient de façon sporadique ou familial. Il est associé à des anomalies de régulation du complément. Le SHU atypique sera détaillé dans le paragraphe suivant ⁸⁴.

- **Le SHU atypique secondaire**

Il est par définition atypique car non dû à une shiga-toxine. Il peut être secondaire à une prise médicamenteuse (anti-VEGF, gemcitabine, anticalcineurines), une infection (pneumocoque, VIH, CMV), une maladie de système (syndrome des antiphospholipides, lupus, sclérodémie), ou encore à une transplantation d'organe ou de moelle osseuse ^{85 86 87 88 89 90}.

Le SHU atypique primitif constitue le modèle de dysfonction aiguë de la cellule endothéliale complément-dépendant et est associé à des anomalies de régulation de la voie alterne du complément.

1.3 Clinique

Le SHU atypique est une pathologie rare qui survient quelque soit l'âge, de quelques mois de vie à plus de 80 ans ⁹¹. Les deux pics de fréquence sont l'enfant avant deux ans et l'adulte entre 20 et 40 ans ⁹¹. Chez l'enfant, le sexe ratio est de 1 contrairement aux adultes où le sexe ratio est de 3 femmes pour un homme ⁹¹. La maladie peut survenir de façon sporadique ou familiale. Les formes familiales, représentant moins de 20% des cas de SHU atypiques, sont définies lorsqu'au moins deux membres d'une même famille sont atteints de SHU

atypique. Les modes de transmission sont principalement autosomiques récessifs, plus rarement autosomiques dominants. La diarrhée peut précéder le SHU atypique dans 20% à 30% selon les séries et ne constitue pas un facteur discriminant entre le SHU atypique et typique du à une shiga-toxine. L'atteinte rénale n'est pas toujours isolée. Les patients peuvent avoir des manifestations extra-rénales, principalement neurologiques (convulsions, coma) ⁹² et cardiaques allant de l'insuffisance cardiaque à l'infarctus myocardique ^{93,94}. Les atteintes extra-rénales sont présentes dans 5 à 10% des patients atteints de SHU atypiques ⁹². Contrairement au SHU typique, le SHU atypique a une évolution le plus souvent défavorable, il peut évoluer par poussée, il est responsable dans plus de 50% des cas d'une insuffisance rénale terminale.

1.4 Dérégulation de la voie alterne du complément

Le lien entre la dérégulation du complément et le SHU a été faite en 1973 ⁹⁵. Cameron et al rapportaient pour la première fois une diminution du C3 plasmatique chez cinq patients, trois enfants et deux adultes présentant un SHU sévère ⁹⁵. L'existence de formes familiales de SHU atypique associées à des stigmates persistants d'activation de la voie alterne fut rapportée en 1981 ⁹⁶. Quelques mois plus tard, un déficit constitutionnel en FH fut pour la première fois mis en évidence chez un patient atteint de SHU ⁹⁷. De nombreux travaux, ont permis, ces dix dernières années, d'impliquer 3 protéines de régulation de la voie alterne du complément, le FH, le MCP et le FI, ainsi que 2 protéines de la C3 convertase, le C3 et le FB, dans la pathogénie du SHU atypique ^{84 98 99 100 59 101 102 103}. Les mutations connues des CFH, CFI, et MCP sont répertoriées dans une base de données interactive (www.FH-HUS.org), librement accessible qui s'enrichit au fil du temps. Ces mutations sont des facteurs de susceptibilité majeurs de SHU atypique ⁸⁴.

Ces anomalies génétiques sont responsables d'une dysrégulation de la voie alterne du complément et peuvent être dues :

i) à une perte de la régulation de la voie alterne du complément suite à la présence soit de mutations inactivatrices des gènes codant pour ces trois facteurs (CFH, CFI et MCP) soit d'anticorps inhibiteurs (anti-FH),

ii) à un gain de fonction des éléments constituant de la C3 convertase, le Facteur B (CFB) et le C3 (secondaires à la présence de mutations activatrices).

Ces mutations ont en commun une rupture de l'équilibre entre la formation et la dissociation de la C3 convertase alterne, une augmentation de la production de C3b, de C5b9 responsable des lésions endothéliales, de l'activation plaquettaire et la formation des lésions de microangiopathie thrombotique¹⁰⁴.

Plus récemment d'autres mutations de protéines n'appartenant pas au système du complément ont été décrites comme associées au SHU atypique : la thrombomoduline (THBD)¹⁰⁵, une protéine de coagulation et le diacylglycerol kinase ϵ (DGKE), une kinase catalysant la phosphorylation de substrats diacylglycerol en acide phosphatidique, pour laquelle aucun lien avec le complément n'a été décrit¹⁰⁶.

1.5 Les différentes mutations impliquées

Plusieurs études rétrospectives permettent d'approcher la fréquence des mutations des gènes régulant la voie alterne du complément chez les patients atteints de SHUa. Une mutation dans les gènes CFH, CFI, MCP, C3 et CFB est trouvée respectivement chez 20 à 30%, 4 à 20%, 6 à 15%, 5 à 10% et 2% des patients atteints de SHU atypique^{92 91 107}.

Enfin, 5 à 10% des patients atteints de SHUa ont des auto-anticorps anti-FH ¹⁰⁸ et 5% une mutation de la thrombomoduline (THBD)¹⁰⁵. Dans l'état actuel des connaissances, une anomalie de régulation de la voie alterne est identifiée chez 60 à 70 %.

1.5.1 Mutations de FH

Les mutations du CFH sont les plus fréquentes et représentent la moitié des mutations retrouvées, ce qui souligne le rôle essentiel de cette protéine dans la régulation du complément. Plus de 70 mutations du CFH ont été identifiées et répertoriées dans la base de données (<http://www.fh-hus.org/>). On peut les diviser en deux groupes : les mutations de type I liées à un déficit quantitatif et les mutations de type II liées à une anomalie fonctionnelle. Ces mutations peuvent être homozygote de type I et responsables d'un déficit complet en FH. Cette forme est très rare et a été identifiée dans environ 15 cas ¹⁰⁹. Le plus souvent les mutations sont hétérozygotes, et peuvent être associées à un déficit quantitatif (le facteur H plasmatique est à 50% de la normale) rapporté chez 20% des patients ¹¹⁰ ou responsables d'une anomalie de fonction, déficit qualitatif, sans diminution de leur concentration plasmatique. Le hot spot de ces mutations, responsables d'une anomalie de fonction, et représentant 60% des mutations du CFH est situé dans la partie C terminale, site de liaison du facteur H au C3b et aux GAG. Certaines anomalies génétiques résultent d'un réarrangement entre la partie terminale du gène du Facteur H et des gènes du CFHR aboutissant à la formation d'un gène hybride CFH/CFHR1¹¹¹, ou CFH/CFHR3¹¹² ou encore d'un hybride reverse CFHR1-CFH.

Le défaut de liaison du facteur H au C3b/C3d ainsi qu'à la cellule endothéliale a été montré *in vitro* ¹¹³⁻¹¹⁶.

Un test basé sur la capacité du FH à se lier aux érythrocytes de moutons et à s'opposer à leur hémolyse, décrit par Sanchez Corral ¹¹⁷ permet rapidement de dépister les conséquences fonctionnelles des mutations situées dans la partie C terminale.

Les résultats des modèles animaux confirment les données retrouvées chez l'homme. Les souris transgéniques ayant la perte du domaine C terminal (FH Δ 16-20) d'un allèle du CFH développent un SHU identique à celui observé chez l'homme ¹¹⁸. Les souris ayant un allèle du CFH dépourvu de la partie C terminale (FH Δ 16-20) et une délétion du gène de C5 ont des dépôts de C3 mais ne développent pas de SHU ¹¹⁹. Ce modèle montre bien l'importance de la partie C terminale de CFH et de la présence du C5 permettant la formation du CAM dans la pathogénèse du SHU atypique.

Les patients ayant une mutation du CFH ont un pronostic le plus souvent défavorable puisque plus de 40% des patients après la première poussée de SHU évoluent vers l'insuffisance rénale, et 60% dans l'année qui suit la première poussée ⁹¹.

La recherche des conséquences fonctionnelles des mutations n'est pas démontrée pour l'ensemble des mutations rapportées chez les patients atteints de SHU atypique. A partir de modélisation structurale, les conséquences fonctionnelles de certaines mutations peuvent être suggérées¹²⁰.

1.5.2 Mutations du FI

Les mutations de CFI sont identifiées chez 5-10% des patients. Les mutations du CFI sont au nombre d'environ 30 et sont quasiment exclusivement hétérozygotes. Elles sont responsables d'une diminution des taux circulants du FI ou d'un défaut enzymatique du domaine de la sérine protéase entraînant une diminution de l'inactivation du C3b en iC3b en phase fluide ou à la surface des cellules^{121,122}. Le C3 plasmatique est diminué chez approximativement 40% des patients et 50% des patients ont un FI diminué. 30% des

patients ayant une mutation de CFI ont une autre atteinte génétique combinée, mutation d'un autre facteur, polymorphisme de CFH, délétion CFHR1^{123 122}. Le pronostic est sévère, 50% des patients évoluent vers l'insuffisance rénale terminale après la première année⁹¹

1.5.3 Mutations de MCP

Les mutations de MCP, protéine transmembranaire sont selon les cohortes, retrouvées entre 5 et 10%. Elles ont été rapportées pour la première fois en 2003¹²⁴. La plupart des mutations sont hétérozygotes. Elles sont, pour la plupart, associées à une diminution d'expression de la protéine à la surface des granulocytes. Parfois l'expression de la protéine est normale mais la protéine dysfonctionne. Les mutations de MCP sont responsables d'une diminution de la liaison au C3b et d'une diminution de l'activité cofacteur^{125 126}. Les cas de SHU atypiques associés à des mutations de MCP sont en général le plus souvent à début pédiatrique, et marqués par des rechutes fréquentes. Les enfants atteints d'un SHU atypique associé à une mutation de MCP ont un meilleur pronostic comparés aux enfants ayant un SHU atypique associé aux autres anomalies génétiques. En revanche, le pronostic n'est pas différent chez l'adulte, quelque soit la mutation. Les mutations sont parfois combinées et le pronostic est variable selon le nombres de mutations associées¹²³.

1.5.4 Mutations de C3 et du FB

Elles jouent un rôle central dans la formation de la C3 convertase. Les mutations du CFB sont très rares, représentent moins de 2% des mutations de la cohorte. Les mutations sont dites « gain de fonction » et sont responsables d'une formation accrue de C3b et d'une augmentation de la demi-vie de la C3 convertase, conduisant à une augmentation de la de formation de C5b9 à la surface des cellules endothéliales¹²⁷. Très peu de cas ont été décrits mais l'évolution était défavorable pour tous les patients. Les mutations de C3 sont présentes

entre 4 et 8% selon les cohortes^{91,92}. Plusieurs conséquences fonctionnelles ont été décrites selon les mutations. Certaines mutations sont associées à une diminution de liaison avec le MCP et le FH. On peut parler de mutations gain de fonction puisque la régulation inefficace permet à l'opposé la formation d'une C3 convertase plus active⁹⁹. Deux mutations de C3, le R161W et V1636A, récemment décrites, sont responsables de la formation d'une « super C3 convertase » avec un allongement de la demi-vie de la C3 convertase^{128,129}. Il s'agit donc d'un second mécanisme entraînant un gain de fonction. Le pronostic des patients ayant une mutation de C3 est variable. Dans la cohorte française, 60% des patients évoluent vers l'IRCT après un an.

1.5.5 Thrombomoduline et DGKE

Deux autres mutations ont été décrites plus récemment : la mutation de la thrombomoduline et les mutations de DGKE. La Thrombomoduline est une protéine membranaire des cellules endothéliales, elle joue le rôle de régulateur négatif du complément. Elle accélère la dégradation de C3b par le Facteur I, en présence du facteur H et de *C4 binding protein* (C4BP). Les mutations associées au SHU atypique sont responsables de la diminution de l'activité cofacteur du FH, d'une diminution de la dégradation de C3b en C3bi. Cinq pourcent des patients atteints de SHU atypique dans la cohorte Italienne ont une mutation de la Thrombomoduline. Le DGKE (diacylglycerol kinase ϵ) est une kinase catalysant la phosphorylation de substrats diacylglycerol en acide phosphatidique¹⁰⁶, pour laquelle aucun lien avec le complément n'a été établi ; il est toutefois responsable d'un phénotype de SHU atypique¹⁰⁶. La mutation de DGKE a été retrouvée chez 13 patients ayant un SHU atypique (deux membres dans deux familles distinctes et 9 cas sporadiques). Tous les patients avaient un C3 plasmatique normal. Les mutations de DGKE ont également été décrites chez des patients ayant une GNMP¹³⁰.

1.5.6 Anticorps anti-FH

Les anticorps anti-FH ont été décrits comme étant associés au SHU atypique en 2005¹⁰⁸. La fréquence est évaluée à 10% des SHU atypiques dans les cohortes caucasiennes^{131 132 52}. Cette forme de SHU affecte principalement les enfants âgés en moyenne de 7 ans. Dans ce SHU auto-immun, la maladie est définie par la présence de IgG (principalement des IgG1 et IgG3) dirigés contre le Facteur FH. Ils peuvent être dirigés contre le domaine C terminal du FH^{131,134} mais sont aussi capables de lier de multiples épitopes localisés dans la partie N terminale et le domaine central. Les anticorps peuvent également former des complexes avec le facteur H qui neutralisent l'action du FH. Ils induisent un défaut de protection de la cellule endothéliale en réduisant la liaison du facteur H à l'un de ses ligands^{131,134}. Dans ce SHU atypique auto-immun, une délétion homozygote du CFHR1 est retrouvée dans 90% des cas^{132,135}. Le mécanisme par lequel la présence de la délétion CFHR1 favoriserait le développement d'auto-immunisation n'est pas démontré.

1.6 Le SHU atypique : une maladie polygénique complexe

La pénétrance de la maladie est incomplète. Les formes familiales représentent moins de 10% des cas de SHU. L'existence de porteurs sains issus des mêmes familles amène à considérer d'autres facteurs de prédisposition de la maladie. Ceci conduit à s'interroger dans un premier temps sur la responsabilité de variants génétiques. La plupart des nucléotides du génome humain sont invariables mais environ 1 sur 300 présente un polymorphisme ayant 2 variants habituels. Ces deux variants ou single nucleotide polymorphism (SNP) se retrouvent dans la population humaine avec une fréquence qui par définition est supérieur à 1%. Ces variations sont secondaires à des mutations ancestrales du génome humain qui se sont répandues dans la population humaine. L'étude des SNP a permis de démontrer que la

transmission de l'information génétique se fait fréquemment par la transmission de blocs de séquences ne subissant aucun événement de recombinaison génétique. Ces blocs de séquences définissent des haplotypes. Pour le scientifique, une mutation est un changement par rapport à la séquence de référence qui n'est pas connue dans les banques de données et un polymorphisme (ou un variant) est une variation de la séquence d'un gène dans la population. Pour le médecin, une mutation est une variation rare impliquée dans la maladie et un polymorphisme une variation fréquente qui n'est pas impliquée dans la maladie. En pratique clinique il est important de relier un gène à une maladie. Ce qui est simple dans le cas des maladies récessives mais plus complexes dans les maladies polygéniques. Les polymorphismes fréquents ne sont pas toujours sans conséquences biologiques (variants de susceptibilité) et certains variants rares ne sont pas toujours délétères.

Les études génétiques à partir des cohortes de patients et de témoins ont permis de déterminer la présence de variants de prédisposition dans le SHU atypique.

La fréquence de certains SNP localisés au niveau du Facteur H, de MCP et de CFHR1 est différente chez les patients par rapport à la population contrôle. Le variant CFHR1*B est augmenté dans la cohorte des patients présentant un SHU atypique par rapport à une population contrôle de référence à la fois dans la cohorte française et espagnole^{52,91}. Deux haplotypes sont décrits comme facteurs de susceptibilité génétique : l'haplotype CFH *gtgt* défini par quatre SNP 1, 7, 11 et 16 et l'haplotype MCP *ggaac* défini par 5 SNP localisés dans l'intron et le promoteur du gène. Ces deux haplotypes sont décrits comme facteurs de risque de SHU atypique ^{136 118}.

Les variants rares sont présents chez moins de 1% de la population et sont répertoriés dans les banques de données « 1000 génomes ». A ce jour dans le SHU, deux variants rares localisés sur le gène du Facteur H pour l'un (R1210C) ¹³⁷ et sur le gène de C4BP¹³⁸ pour le second, ont été impliqués dans la maladie. Mais l'identification de variants rares causales

requiert des cohortes de patients de grande taille afin de disposer d'une puissance statistique suffisante^{137,138}. Une publication récente a identifié quatre variants rares localisés sur les gènes de CFH, C3, CFI et C9, associés à la dégénérescence maculaire liée à l'âge¹³⁹⁻¹⁴¹.

La présence de deux mutations chez un même patient est aussi un facteur qui permet d'expliquer la différence de pénétrance de la maladie dans une famille. Récemment, l'étude européenne reprenant l'ensemble des patients ayant une mutation combinée, soit 3,4% de la population atteinte de SHU atypique (27/795) a confirmé et affiné ces données. Les patients ayant une mutation de MCP ou de CFI ont le plus souvent une autre anomalie génétique associée contrairement aux patients ayant une mutation de CFH, C3, CFB (25% versus 8%)¹²³.

La présence d'une mutation ou d'un polymorphisme additionnel entraîne une augmentation de la pénétrance de la maladie chez un individu.

Par ailleurs, il est constaté que le début de la maladie peut survenir à des âges très variables et ceci quelle que soit la mutation. Les facteurs génétiques sont considérés comme des facteurs majeurs de prédisposition de la maladie mais ils n'expliquent pas que certains apparentés resteront toujours asymptomatiques.

L'environnement crée donc les conditions souvent nécessaires au développement de la pathologie. Un facteur prédisposant est retrouvé dans plus de 30% des cas⁹². Les triggers potentiels sont les infections, la grossesse, la transplantation rénale, le greffe de moelle osseuse, les médicaments. L'ensemble de ces triggers peut potentiellement activer les cellules endothéliales.

Le SHU atypique est le plus souvent secondaire à une mutation d'un gène de la voie alterne du complément, une autre anomalie génétique et un trigger entraînant un défaut de protection et une activation des cellules endothéliales. Le mécanisme par lequel une lyse de la cellule endothéliale est responsable de la formation de thrombi, le lien entre le complément, l'activation des cellules endothéliales et la coagulation commence à être mieux établi. Récemment, il a été montré dans une cohorte de SHU atypique que 80% des patients ayant un SHU atypique associé à une mutation d'un gène du complément avait au moins un SNP dans l'ADAMTS 13 et 38% avaient de multiples variants dans le gène de ADAMTS 13. Plus de 50% des patients ayant un SHU atypique ont une diminution de l'activité ADAMTS 13 ¹⁴².

D'autre part, l'hème, issu de l'hémolyse des GR forme une boucle d'amplification de l'hémolyse et accroît la consommation du complément ⁹⁴. « In vitro », les cellules endothéliales exposées à l'hème activent la voie alterne du complément entraînant l'augmentation de C3b, de C5b9 à la surface des cellules et la libération des anaphylatoxines (C3a, C5a). Ces acteurs sont impliqués dans la formation de microthrombi et participent au phénotype de la maladie⁹⁴. Le vWF est également sécrété en plus grande quantité lors de l'activation des cellules endothéliales, il augmente l'activation cofacteur du facteur FH et diminue l'inflammation locale¹⁴³.

1.7 Pronostic

Le SHU atypique est une pathologie sévère. Le pronostic vital peut-être engagé, principalement chez les nourrissons¹⁴⁴ ou lorsqu'il y a des atteintes extra-rénales, neurologiques ou encore cardiaques. Chez l'enfant, 40% des patients évoluent vers

l'insuffisance rénale terminale, 5 ans après la première poussée de SHU atypique. Chez l'adulte, le pronostic est encore plus sévère puisque la moitié des patients seront en insuffisance rénale terminale après le premier épisode de SHU et deux tiers seront en insuffisance rénale terminale à 5 ans de suivi⁹¹. Les récurrences en post-transplantation rénale sont fréquentes et conditionnent le pronostic de la greffe¹⁴⁵.

1.8 Traitement

Le traitement reposant sur les échanges plasmatiques intensifs (60ml/kg/j) était jusqu'à la fin des années 2000 le traitement de référence¹⁴⁶. Ce traitement, même s'il permet dans certains cas d'obtenir la rémission de la pathologie après une première poussée de SHU atypique ou une récurrence en post-transplantation dans, reste d'une efficacité insuffisante¹⁴⁷. Lorsque la plasmathérapie ne permet pas d'améliorer les paramètres hématologiques et la fonction rénale, on parle de plasma-résistance et lorsque l'arrêt ou l'espacement du traitement entraîne une rechute, on parle de plasma-dépendance. Dans une étude récemment publiée sur la cohorte française, 20% des enfants et 50% des adultes sont en insuffisance rénale terminale, un mois après le premier épisode⁹¹ et ceci, malgré la plasmathérapie. En post-transplantation rénale, les risques d'échecs liés à la récurrence sont très importants et encore très récemment, les équipes de transplantation rénale étaient très réticentes à greffer ces patients⁹².

Le traitement efficace mais non dénué de risque, du SHU atypique associé à une mutation du CFH est la greffe combinée rein-foie. Après trois échecs ^{148 149,150} responsables du décès des patients par non fonction hépatique ou complications infectieuses, les succès ont été obtenus lorsque la double transplantation rein-foie a été encadrée d'échanges plasmatiques^{151 146 152}.

L'identification de la dérégulation du complément comme le facteur de risque principal de SHU atypique et la disponibilité de l'Eculizumab, premier inhibiteur du complément ciblant le C5, a changé l'évolution de la maladie et les perspectives de la transplantation rénale. L'Eculizumab est un anticorps hybride monoclonal, humanisé IgG2/IgG4 dirigé contre le composant C5¹⁵³. En se liant au C5, il bloque le clivage du C5 en C5a et C5b9 et par conséquent, il inhibe la formation du complexe C5b9 et bloque les fonctions inflammatoires, pro-thrombotiques ainsi que les fonctions lytiques du complément. Depuis 2009, le nombre de patients traités pour un SHU atypique par Eculizumab et les données disponibles croient¹⁵⁴. Les résultats sont excellents puisque, ce traitement donné lors d'une plasma-dépendance ou plasma-résistance a permis l'amélioration des signes d'hémolyse et de la fonction rénale chez les patients ayant un SHU atypique sur le rein natif ou une récurrence sur le greffon^{155 156 157}. Récemment les données retrospectives^{155 156} ont été confirmées par deux études prospectives ouvertes, réalisées par le laboratoire pharmaceutique Alexion, en Europe et aux USA. Les patients inclus dans la première étude (n=17) ont une récurrence de SHU atypique et une plasmarésistance définie par une non réponse à au moins quatre échanges plasmatiques et les patients inclus dans la deuxième étude (n=20) ont une plasma-dépendance¹⁵⁸. L'évaluation de l'efficacité du traitement a été mesurée par l'amélioration des paramètres hématologiques et la correction de la thrombopénie pour la première étude et l'absence de dialyse ou de plasmathérapie pour la deuxième étude. L'obtention de la normalisation des paramètres biologiques est obtenue dans 87% et 80% dans les études une et deux respectivement. L'amélioration de la fonction rénale est obtenue dans les deux études et est corrélée à la rapidité de mise en place du traitement¹⁵⁸. L'eculizumab est à présent le traitement de référence du SHU atypique¹⁵⁴. L'administration est intraveineuse et la demi-vie est de 11-12 jours. La tolérance est excellente^{159 158}. Cette drogue a été conçue

en minimisant immunogénécité (Ac humanisé) et les fonctions du fragment Fc (les IgG4 ne permettent pas l'activation du complément et interagissent faiblement avec les récepteurs Fc). En revanche, un certain nombre de précautions sont à respecter lors de l'utilisation de l'éculizumab. Le fait d'inhiber le C5 engendre un déficit fonctionnel en C5 et les patients ayant un déficit génétique en C5 ont une susceptibilité accrue aux infections à germes encapsulés comme *le Neisseria* responsable de méningites. Les précautions à prendre sont donc la vaccination et une antibioprofylaxie quotidienne par amoxicilline à prendre pendant la durée du traitement. Le monitoring du traitement se fait actuellement par le dosage du CH50 (qui doit être indosable) et dans un proche avenir par le dosage de l'éculizumab libre résiduel¹⁵⁴.

2 Glomérulonéphrites à dépôts de C3

2.1 Evolution de la classification basée sur la physiopathologie

Les Glomérulonéphrites membrano-prolifératives représentent un groupe hétérogène de pathologies rénales touchant le glomérule. Elles sont définies sur des critères histologiques communs associant prolifération mésangiale, hypertrophie mésangiale, épaissement de la paroi capillaire avec des aspects en « double contour » liés à l'interposition de la matrice mésangiale entre les 2 feuillets de la membrane basale glomérulaire. Des dépôts d' Ig et/ou de C3 sont retrouvés. Il s'agit d'un aspect histologique peu spécifique puisqu'il peut être rencontré dans diverses situations allant du lupus érythémateux disséminé aux dépôts monoclonaux organisés, en passant par l'infection par le virus de l'hépatite C, la cryoglobulinémie ¹⁶⁰. Lorsqu'aucune étiologie secondaire n'est retrouvée, on parle de GNMP idiopathique. Elles représentent entre 0,3% à 4% des patients en insuffisance rénale

terminale¹⁶¹. La fréquence, les différentes présentations cliniques, et le pronostic étaient jusqu'alors établis en fonction d'une classification histologique basée sur la localisation et la nature des dépôts. Les GNMP de type I et III ont des dépôts sous endothéliaux et/ou épithéliaux associés à des dépôts d'Ig et/ou de C3. Les GNMP de type II (DDD ou *Dense deposit disease*) sont caractérisées par la présence de dépôts denses dans la membrane basale glomérulaire. Ces derniers peuvent également être retrouvés dans les membranes tubulaires, associés à des dépôts isolés de C3 ^{162 163 164}. Certains patients ayant une GNMP de type I et III présentent également des dépôts isolés de C3 sans Immunoglobuline ¹⁶⁵.

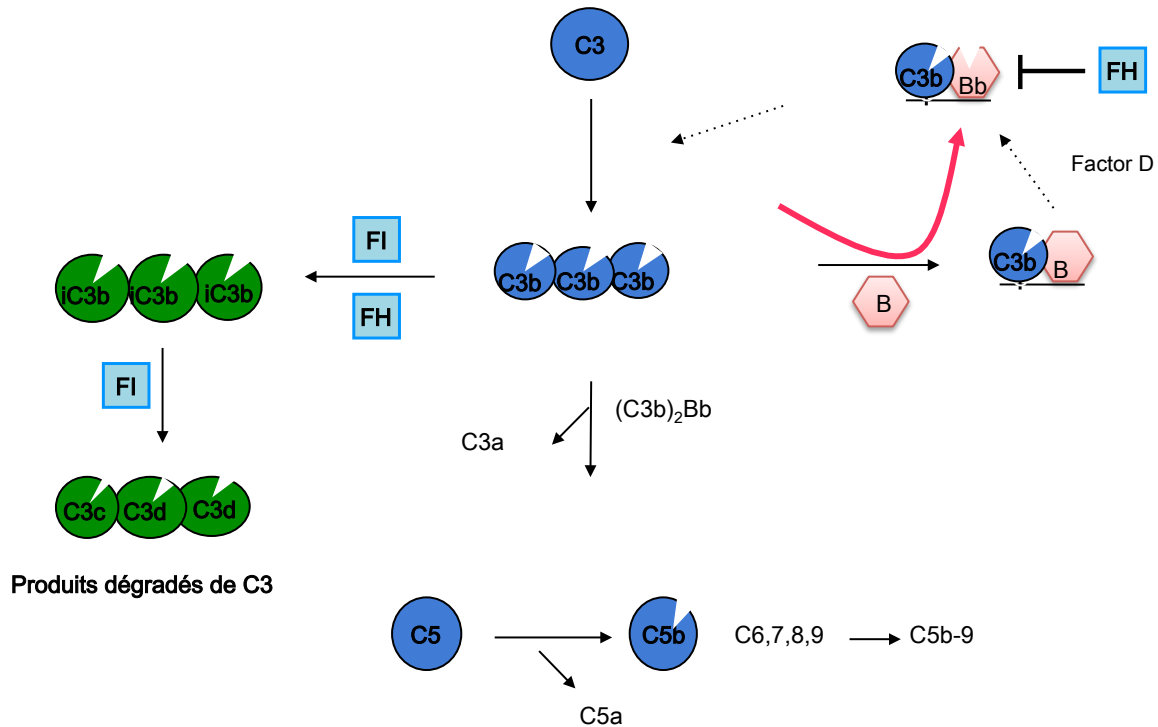
Au regard d'une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques, une nouvelle classification a été proposée scindant les GNMP en deux groupes : les GNMP associées à des dépôts d'immunoglobulines et de C3, et les GNC3 associées à des dépôts de C3 sans immunoglobuline. Les GNC3 regroupent la Maladie des dépôts denses (DDD : *Dense deposit disease*) et la glomérulonéphrite à dépôts de C3 isolés. Ce groupe appelé GNC3 est associé à un défaut de régulation de la voie alterne du complément.

2.2 Les glomérulonéphrites associées aux anomalies de la voie alterne du complément

Les GN à dépôts de C3 sont dues à une hyperactivation non contrôlée de la C3 convertase alterne, en phase fluide et sont responsables d'une production importante de C3b qui s'accumule sous forme de produits de dégradations du C3 (iC3b, C3dg, C3d). Ceux-ci se déposent dans le mésangium et dans la paroi des capillaires glomérulaires. Le C3b peut également participer à la formation de la C5 convertase (C3bBb) C3b qui clive le C5 en C5a et C5b. Le C5a participe à l'inflammation et probablement à la prolifération mésangiale. Le C5b forme avec le C6, C7, C8 et C9, le complexe d'attaque membranaire qui se dépose dans

les glomérules mais participe aussi à la formation de sC5b9¹⁶⁶.

Figure 5 : Hyperactivation de la voie alterne du complément



L'hyperactivation de la voie alterne du complément est responsable d'un excès de production des produits de dégradation de C3 qui se déposent dans le rein.

2.3 Des modèles animaux à l'homme

Cette meilleure compréhension de la physiopathologie de la maladie a été possible grâce aux modèles animaux. Les porcs porteurs d'un déficit complet en FH développent dans 100% des cas, une GNMP précoce proche de la DDD chez l'homme. Ils ont un faible taux sérique de la protéine C3 et des dépôts de C3 dans la membrane basale glomérulaire ainsi que des dépôts sous endothéliaux¹⁶⁷. Ils développent une insuffisance rénale terminale¹⁶⁸. Les souris déficientes en FH, invalidées de l'exon 3 du gène codant pour le FH, développent

elles aussi une GNMP spontanée, caractérisée par un dosage plasmatique en C3 effondré ¹⁶⁹. Le développement de la maladie chez ces souris nécessite la formation d'une C3 convertase et sa dégradation en produits inactifs. En effet, les souris doublement invalidées pour le CFH et le CFB ne développent pas la maladie soulignant le rôle primordial de la formation d'une C3 convertase dans la pathogénèse de la GNMP. Des souris déficientes à la fois en FI et FH ne développent pas de GNMP mais l'injection de Facteur I chez ces souris provoque l'apparition de dépôts de C3 et des produits de dégradation de C3b¹⁷⁰. De plus, l'injection de FH humain purifié à ces souris déficientes pour CFH normalise le taux plasmatique de C3 et diminue clairement les dépôts glomérulaires de C3¹⁷¹. Les souris invalidées pour le CFH et C5 ont un phénotype moins sévère, une baisse de l'inflammation glomérulaire, ce qui n'est pas le cas pour les souris invalidées pour le FH et C6. Cela démontre le rôle majeur du C5a puissante anaphylatoxine dans la pathogénèse de GNMP médiée par les anomalies de la voie alterne du complément.

Table 1: Les modèles animaux permettant la compréhension de la physiopathologie de la maladie.

MBG= membrane basale glomérulaire

Modèle de souris	Dosage plasmatique	Insuffisance Rénale	Dépôts C3/C9 et localisation
CFH^{-/-} <i>(Pickering¹⁶⁹)</i>	Diminution profonde du C3 FH absent	Oui	Dépôts de C3 et C9 dans MBG
CFH^{-/-} and CFB^{-/-} <i>(Pickering¹⁶⁹)</i>	C3 normal	Non	Pas de dépôts intra-rénal
CFH^{-/-} and C5^{-/-} <i>(Pickering¹⁷²)</i>	Diminution profonde du C3	Oui	Dépôts de C3 dans la MBG Réduction de l'inflammation par rapport au rein CFH ^{-/-}
CFI^{-/-} <i>(Rose¹⁷⁰)</i>	Diminution profonde du C3 FH, FB	Non	Augmentation de la matrice mésangiale et des dépôts de C3 Pas de dépôts dans la MBG
CFH^{-/-} and CFI^{-/-} <i>(Rose¹⁷⁰)</i>	Diminution du C3 FB	Non	Pas de dépôts dans la MBG

2.4 Anomalies acquises et genetiques chez l'homme

2.4.1 Clinique

Chez l'homme, la présentation clinique, l'évolution et le pronostic est variable et très hétérogène. Lors du diagnostic, les patients peuvent présenter une hématurie macroscopique, une protéinurie isolée découverte lors d'un examen systématique. Un syndrome néphrotique

correspond à une hypoalbuminémie inférieure à 29 g/l et une protéinurie supérieure à 3 g/l. Les signes cliniques sont des oedemes des membres inférieurs ainsi qu'une hypertension artérielle. Ces signes cliniques initiaux peuvent être bruyants, le patient peut en effet présenter un syndrome néphritique responsable de l'apparition de façon brutale d'oedemes, d'une hypertension artérielle et d'un syndrome glomérulaire rapidement progressif à l'origine d'une insuffisance rénale aigue. Selon la sévérité et les lésions aiguës et cicatricielles, chroniques dans le rein, l'évolution est variable. Toutes présentations confondues, 50% des patients après le diagnostic évoluent vers une insuffisance rénale terminale après 10 ans^{173,174}.

La maladie des dépôts denses, représente moins de 20% des GNMP et présente des singularités. Elle touche principalement l'enfant jeune entre 7 et 15 ans. La présentation clinique est variable. Dans une cohorte de 25 enfants ayant une DDD, 40% présentaient une glomérulonéphrite rapidement progressive, 24% présentaient un syndrome néphrotique, 12% une insuffisance rénale aigue, 20% une hématurie ou protéinurie isolée, et 4% une hypertension artérielle ¹⁷⁵. Cette pathologie peut être associée à une lipodystrophie partielle acquise responsable des joues creuses et d'un amaigrissement de la racines des membres supérieurs et du buste dans 10% des cas (Syndrome de Barraquer Simon). Il a aussi été rapporté en association une forme précoce de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) impliquant la formation de drusens. Ces drusens sont secondaires à la présence de dépôts de complément localisés entre l'épithélium pigmentaire de la rétine et la membrane de bruch. Ils peuvent être à l'origine d'une rétinopathie et de troubles de vision. Il n'y a pas de corrélation entre la gravité de l'atteinte oculaire et celle de l'atteinte rénale ¹⁷⁶. Les lésions histologiques peuvent être variables¹⁷⁷.

Le diagnostic différentiel est la glomérulonephrite post-infectieuse. Elle a un début le plus souvent bruyant, survient souvent quand l'infection est résolue et est responsable d'œdèmes explosifs, d'un syndrome néphritique, et d'une insuffisance rénale. A la biopsie rénale, les dépôts sont des dépôts isolés de C3 sans Immunoglobuline. Il existe des humps qui sont des volumineux dépôts épithéliaux. Elle peut être associée à un C3 bas et à la présence d'un C3 Nef¹⁷⁸. La persistance des anomalies du complément à distance de l'épisode peut révéler une GNC3¹⁷⁹.

2.4.2 Histologie

Les lésions histologiques des GNC3 sont très hétérogènes. En microscopie optique, il peut y avoir des lésions mésangiales prolifératives, endocapillaires prolifératives, membrano-prolifératives et dans certains cas, des croissants. L'ensemble de ces anomalies morphologiques complexifie la maladie et le diagnostic. Dans deux séries de patients ayant une DDD, les lésions associées aux dépôts denses sont très variables, 30% des patients avaient une prolifération mésangiale, parfois avec des exudats, 40% ont une prolifération membrano-proliférative, et 10% ont des croissants ^{177 175}. Dans les glomérulonéphrites à dépôts de C3, il n'y a pas de dépôts denses intramembraneux, les lésions sont également très variables allant de dépôts isolés de C3 avec en microscopie optique des glomérules quasi normaux, à une prolifération mésangiale, et présence de dépôts sous endothéliaux ^{165 180}.

Ces pathologies ont en commun des dépôts des protéines du complément de C3, C5, C9, mis en évidence par spectroscopie de masse après dissection ^{166 180}. Plus récemment, la présence de dépôts de C5b9 a été mise en évidence par immunofluorescence dans ces pathologies¹⁸¹.

2.4.3 Les anomalies du complément

Une consommation du complément se traduisant par un C3 plasmatique bas est présente dans plus de 50% des GNC3. Un C3 plasmatique bas est retrouvé dans environ 40% des GNC3 à 80% des DDD ^{173 180}. Les principales anomalies retrouvées associées aux GNC3 et responsables d'une hyperactivation de la C3 convertase sont des anticorps. Les anomalies acquises prédominent dans les GNC3 et représentent 80% des anomalies retrouvées, les anomalies génétiques en représentent moins de 20%.

2.4.3.1 Anomalies acquises

- Le C3 nephritic factor (C3 Nef)

Le C3 Nef décrit pour la première fois en 1969 ¹⁸² est un autoanticorps associé aux GNMP qui se lie à un néoépitope de la C3 convertase et qui entraîne un allongement de la durée de vie de la C3 convertase. Il s'agit donc d'un Ac qui stabilise la C3 convertase en phase fluide et à la surface des cellules ¹⁸³. Il a été suggéré que cet Ac pourrait bloquer l'action du FH ⁴⁶, CR1 ¹⁸⁴ et DAF ¹⁸⁵, des régulateurs qui normalement dissocient la C3 convertase. Le C3 NeF entraîne donc un excès de clivage de C3b qui se dépose dans le rein. Les conséquences des C3 NeF sont hétérogènes, certains sont associés à une consommation de C3 en phase fluide et donc une hypocomplémentémie (C3 bas), d'autres sont associés à une normocomplémentémie (C3 normal) ^{173,186}. Il a aussi été suggéré que le C3 Nef se lie à la C3 convertase stabilisée par la Properdine. Deux types de C3 NeF pourraient co-exister, ceux dit properdine-indépendant qui n'ont pas d'effet sur le clivage de C5 et ceux properdine-dépendant qui activent le clivage de C5^{186 187}. La détection du C3 NeF peut se

faire par des tests Elisa, avec ou sans properdine^{178,186}. Le test le plus sensible pour étudier la capacité des Ig du patient à stabiliser la C3 convertase à la surface des globules rouges est le test d'hémolyse des GR¹⁷⁸.

Le C3 NeF est présent dans 80% des DDD^{173,188}, 50% des GNC3^{173,180,189} et est également présent dans les GNMP de type I¹⁷³. Dans la lipodystrophie partielle acquise, 83% des patients ont un C3 Nef¹⁹⁰.

Il a également été retrouvé chez des patients ayant un lupus erythémateux disséminé¹⁹¹, chez des enfants ayant une glomérulonéphrite post-streptococcique¹⁷⁸, ainsi que chez des sujets sains¹⁹².

La contribution du C3 Nef dans la physiopathologie de la maladie et sa responsabilité dans la maladie et la sévérité ne sont pas établies¹⁷³.

- Les anticorps anti Facteur H :

Les anticorps anti-FH connus pour être associés au SHU atypique dans 10% des cas, sont également retrouvés dans les GNMP. Le premier cas décrit qui s'apparentait à un Ac anti-FH, était une chaîne légère Lambda d'Ig monoclonale qui liait le SCR3 du FH et empêchait le FH de se lier à l'un de ses ligands, le C3b^{193,194}. Depuis cette observation, sept patients ayant des anticorps anti-FH associés à une GNMP ont été décrits¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Pour trois d'entre eux, l'épitope mapping a été identifié dans le domaine N terminale du facteur H, empêchant la liaison du facteur H de jouer le rôle du cofacteur du FI. Ils ne sont pas associés à une délétion de CFHR1.

- Les Anticorps anti-B et anti-C3 :

Récemment, un anticorps anti-B, se liant à la fraction Bb, et a été décrit chez un patient ayant une maladie des dépôts denses¹³³. Cet anticorps stabilise la C3 convertase, empêche l'action du FH, augmente le turn over de formation et de dégradation de la C3 convertase. In vitro, il diminue la formation de la C5 convertase. Zang et al¹⁸⁸ ont montré que 10% de la cohorte de 32 patients ayant une DDD ont des anticorps anti-B. La plupart des patients avaient également un C3 Nef positif. La présence combinée d'un anti-C3 et anti-B sans C3Nef a été décrit chez deux patients atteints de DDD¹⁹⁸. Ces anticorps augmentent l'activité de la C3 convertase.

2.4.3.2 Anomalies génétiques

- Les mutations de CFH et CFHR :

Les anomalies homozygotes ou hétérozygotes du FH ont été rapportées chez 12 patients ayant une DDD, mais aussi chez des patients ayant une GNC3 ou GNMP de type I^{180,199-201}. La majeure partie des mutations du FH aboutissent à des protéines tronquées ou à des changements d'acides aminés entraînant une non excrétion ou synthèse de la protéine et d'un déficit en facteur H²⁰⁰. La mutation du FH (delta K224) située dans le SCR 4 est responsable d'un déficit fonctionnel, d'une diminution de la liaison au C3b et d'une diminution de l'activité co-facteur du FI²⁰². A ce jour, une seule mutation associée à une DDD est localisée dans le SCR 20¹⁷³ (R1210C). Elle a été rapportée dans le SHU atypique et dans la DMLA et est responsable d'une diminution de la liaison du C3b au FH à la surface des cellules^{203,204}. La fonction de la partie C terminale est d'assurer la régulation du C3b à la surface des cellules endothéliales. Des mutations de cette région sont plus associées au Syndrome Hémolytique et Urémique Atypique.

- Les anomalies associées aux CFHR :

Les différentes anomalies génétiques dans le cluster du CFHR associées aux GNC3 sont résumées dans la *table II*.

Table II : Anomalies génétiques dans le cluster du CFHR associées aux GNC3

Maladie	Anomalies génétiques	Type de mutation	Conséquences fonctionnelles	Prévalence	Références
GNC3	Dup CFHR1	Mutant FHR1 avec SCR123412345	Compétition avec FH pour la liaison au C3b	Rare	Abarrategui-garido ⁵²
GNC3	CFHR3 CFHR1 Gène Hybride	Protéine hybride contenant SCR1-2 de CFHR3 suivi de CFHR1	Compétition avec FH pour la liaison à la C3 convertase	Rare	Malik ²⁰⁵
CFHR5 Néphropathie	Dup CFHR5	Mutant FHR5 avec SCR 12123456789	Compétition avec FH pour la liaison au C3b	Plusieurs cas	Gale ²⁰⁶

La « CFHR 5 néphropathie » :

La CFHR5 néphropathie est une forme de GNC3 à transmission autosomique dominante qui touche des patients d'origine chypriotes. Les patients se présentent avec des hématuries macroscopiques survenant au cours d'infections rhinopharyngées, ce qui s'apparente à une présentation de néphropathie à IgA. Les lésions histologiques associent des dépôts sous endothéliaux et mésangiaux, associés à des dépôts de C3. La moitié des patients progressent vers l'insuffisance rénale chronique au delà de 50 ans ²⁰⁷. Les patients ont un C3 plasmatique normal. L'anomalie est une duplication des SCRs 1 et 2. La protéine CFHR5 mutée lie moins le C3b membranaire que le CFHR5 non muté ²⁰⁶.

Une autre anomalie de CFHR5 a récemment été rapportée, associée à une glomérulonéphrite post-streptococcique infectieuse. L'anomalie génétique est une insertion d'un nucléotide dans l'exon 4 du CFHR5 à l'origine d'un codon stop prématuré²⁰⁸.

L'hybride CFHR3-CFHR1 a été identifié dans une famille où 8 individus étaient atteints d'une glomérulonéphrite membrano-proliférative. La protéine hybride comprend les deux premiers SCR de CFHR3 et les 5 SCR du CFHR1 et est responsable d'une dérégulation de la voie alterne complément⁵⁵.

La duplication du SCR1-4 du CFHR1 a également été identifiée dans une forme familiale de GNC3⁵⁶.

- Mutation des composants de la C3 convertase du C3:

Une mutation du C3²⁰⁹ (923 del DG) a été identifiée dans une famille espagnole, les patients avaient une DDD, un C3 plasmatique était normal dans toute la famille. Il a été démontré que la protéine C3 mutée peut former une C3 convertase, et n'est pas régulée en phase fluide par le Facteur H. Cette protéine mutée ne peut pas être un substrat des C3 convertases. Seul le C3 non muté est clivé. Cette observation illustre que la DDD est secondaire à une activation excessive de l'activation en phase fluide du complément. Ces données illustrent la nécessité de rechercher les conséquences fonctionnelles des mutations, car dans ce cas, l'administration de FH ne serait pas utile.

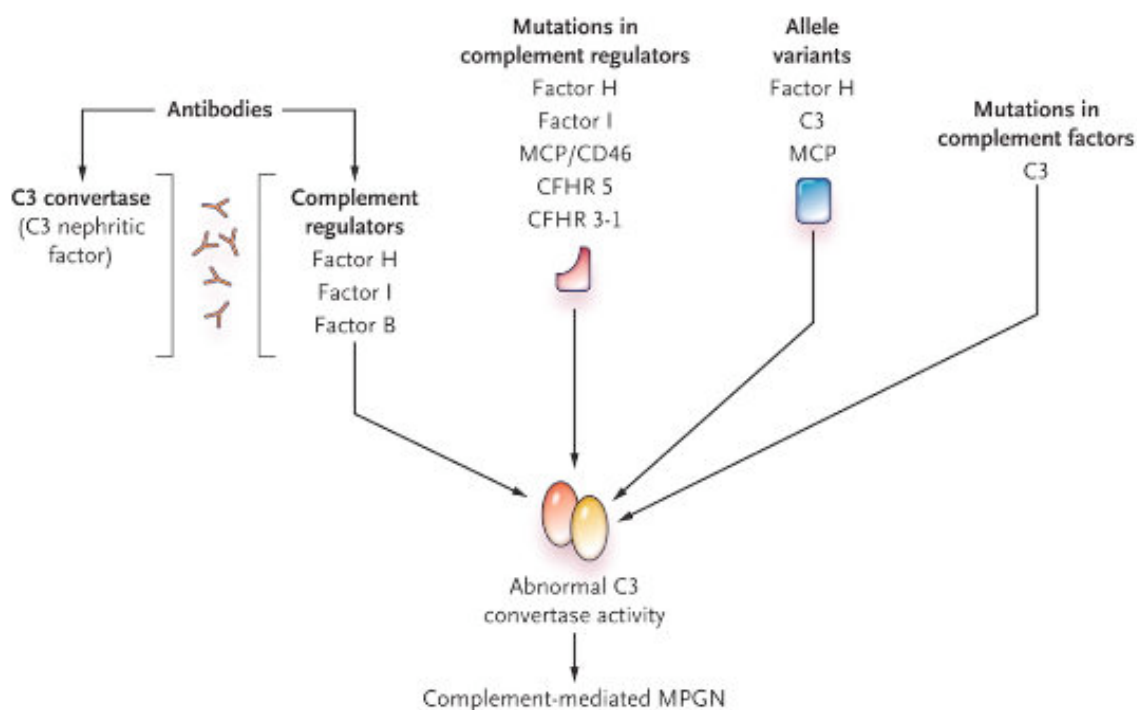
- Mutations des régulateurs de la voie alterne du complément FI, MCP :

Plus rarement, des mutations de CFI et MCP sont décrites. Dans une large cohorte française de patients (n=134) atteints de GNC3, DDD et GNMP de type I, les anomalies génétiques affectant des protéines de régulations du complément le FH, le facteur I et le MCP ont été recherchées et retrouvées dans 18% des cas. Les mutations du CFH , CFI et MCP ont été retrouvées dans 17 (12.7%), 6 (4.5%), et 1(0.7%) cas.

- Variants de CFH et C3 :

Récemment l'équipe de R. Smith a étudié l'influence de variants génétiques dans la prédisposition à la DDD. Quatre variants du CFH et de C3 semblent augmenter le risque de développer la maladie : les variants 402 H et V62 de CFH et R102 et L 314 de C3. La combinaison des variants CFH 402H × CFH V62 × C3 314L (H × V × L) est associée à un risque 4 fois supérieur de présenter une DDD. La fréquence dans les populations étudiées passant de 7% chez les contrôles à 18% dans la population de patients ²¹⁰.

Figure 6 : Anomalies génétiques et acquises associées aux GNMP médiées par le Complément¹⁶⁰



2.5 Corrélation entre le phénotype et le génotype

Très peu d'études récentes sont disponibles sur le pronostic rénal en fonction des anomalies génétiques et la consommation de C3, les résultats sont contradictoires. En 1977, une large étude (n=112 cas) de patients atteints de MPGN, montrait que plus de 50% d'entre eux avaient un C3 bas. Ni le type histologique, ni le C3 bas influençaient le pronostic rénal, mais celui-ci était corrélé à l'insuffisance rénale et au syndrome néphrotique. Servais et al en 2012 sur une large série de patients (n=134) n'ont également pas trouvé de corrélation entre la sévérité de l'atteinte rénale et le C3 bas. La présence d'un C3 Nef ou d'anomalies génétiques ne modifiaient pas le pronostic¹⁷³. En revanche plusieurs autres études montrent que le C3 bas est associé à une moins bonne survie rénale²¹¹⁻²¹³. Ces études sont rétrospectives, le C3 peut-être fluctuant, le C3 Nef n'est pas toujours associé à une baisse du C3. Quelle que soit l'étiologie de la GNMP, le pronostic est sombre puisque 10 ans après le diagnostic, 50% des patients développent une insuffisance rénale terminale.

2.6 Les traitements

Les publications sur les traitements sont limitées et il est difficile de conclure sur les résultats de ces derniers, car les patients traités ont très souvent des pathologies très hétérogènes (GNMP avec dépôts de complexe immun, GNMP dues à d'autres pathologies).

Le blocage du système rénine-angiotensine peut améliorer la survie rénale comme dans d'autres néphropathies glomérulaires²¹⁴.

Les traitements immunosuppresseurs pourraient être utiles pour préserver la fonction rénale, en particulier chez les patients qui ont un C3 Nef ¹⁷⁵ mais ils ne sont pas toujours efficaces.^{173,215,216}

Les corticoïdes semblent plus efficaces chez l'enfant que chez l'adulte²¹⁷⁻²¹⁹.

Les expériences d'utilisation de la plasmathérapie sont limitées et les résultats mitigés. Deux jumelles ayant une DDD et un déficit en FH ont été traités avec succès^{202,220}, ce qui n'est pas toujours le cas.

L'expérience d'utilisation de l'Eculizumab est limitée pour le moment et les résultats sont plus aléatoires que dans le SHU atypique. La présence d'une prolifération endo et extra capillaire ainsi que le sC5b9 élevé sembleraient associés à une bonne réponse à l'anti-C5^{216,218,221,222 223}. Quelques patients biopsiés à distance de l'utilisation de l'Eculizumab ont une majoration de la fibrose et la présence d' IgG kappa qui colocalise avec le C3 et C5, suggérant l'accumulation de l'Eculizumab dans le rein.

Compte-tenu des étiologies très variées et des présentations cliniques et histologiques hétérogènes, les indications de traitement restent à mieux définir et à adapter individuellement.

Chapitre 3 : Récidives en post-transplantation

Durant ces 20 dernières années, la survie des greffons en post transplantation rénale à court et long terme s'est nettement améliorée avec une baisse nette des rejets aigus, une meilleure prévention des infections virales²²⁴. L'enjeu de la transplantation est l'amélioration de la survie des greffons. Les causes de pertes de greffons après 10 ans sont respectivement, par ordre de fréquence, le rejet chronique, le décès avec un greffon fonctionnel à 10 ans, et la récurrence de la néphropathie^{161,225,226}. L'incidence et la gravité des récurrences des néphropathies en post transplantation rénale sont très variables selon le type.

Le Syndrome hémolytique et urémique atypique et les GNMP sont deux pathologies associées à une dérégulation du complément qui récidivent après la transplantation rénale. Seront traitées dans ce chapitre, les récurrences du SHU atypique et de la GNMP ainsi que les anomalies du complément en transplantation

1 Récurrence de SHU atypique

Le diagnostic de SHU atypique :

En post transplantation rénale, la survenue d'une microangiopathie thrombotique associant une anémie hémolytique mécanique, une thrombopénie, une insuffisance rénale avec des signes histologiques de MAT peut être due à une récurrence de SHU atypique ou à un SHU ou encore une MAT *de novo*, survenant lorsque la maladie initiale n'est pas un SHU.

En effet, le SHU typique secondaire à une infection à un *Escherichia coli* ne récidive jamais après transplantation (<1%)²²⁷. Si c'est le cas, une étiologie et notamment une anomalie du complément est à rechercher²²⁸.

Dans 60 à 70% des cas de SHU atypiques, les patients ont une anomalie génétique de la voie alterne du complément. Les récurrences en cas de SHU atypique sont fréquentes, elles sont estimées entre 40 et 60% des cas^{92,229 230} et sont responsables d'une perte importante de greffon. Soixante pourcent des patients ayant une récurrence de SHU post-transplantation perdent leur greffon^{92,229 230,231}.

L'enjeu majeur est de définir le risque de récurrence en pré-transplantation. Les patients ayant une anomalie génétique dans un gène codant pour une protéine plasmatique (FH, FI, C3, FB) serait plus à risque de récurrence. En effet, les cas report et séries^{92, 231} rapportent un taux de récurrence chez les porteurs de mutation du CFH de 70%, allant de 40% lorsque les mutations sont situées dans la partie N terminale à 80% lorsque celles-ci sont dans la partie C terminale¹⁴⁶. Les patients porteurs d'une mutation de CFI ont également un risque très important de perte de greffon^{102,121}. En revanche les patients ayant une mutation de MCP, protéine membranaire apportée par le greffon ont un risque évalué à moins de 20%^{92,231}. Seules deux récurrences ont été rapportées^{232,233}. Un seul patient ayant une mutation de la thrombomoduline a récidivé¹⁰⁵ en sachant que le nombre de patients ayant une mutation est limité. Les patients porteurs de mutations de C3 et de B, ont, après transplantation rénale un taux très important de récurrence^{127 100 99 94}.

Diagnostic différentiel : SHU *de novo*

Le SHU *de novo* est retrouvé dans 1 à 10% des cas et survient le plus souvent très rapidement après la transplantation rénale. L'incidence est variable en fonction de la manière dont est posé le diagnostic, celui-ci est établi soit par une biopsie protocole (biopsie systématiquement faite après la transplantation), soit sur des signes biologiques de MAT. Cette incidence varie alors de 15% à 1%^{234 235 236}. Les étiologies associées au SHU *de novo* post-transplantation sont l'ischémie-reperfusion, le traitement immunosuppresseur (les inhibiteurs de m-Tor, les anticalcineurines), les infections virales (CMV, BK, parvovirus B19), le rejet humoral médié par les anticorps anti HLA. La responsabilité de ces facteurs dans le risque de récurrence n'est pas évaluée en post-transplantation chez les patients ayant un SHU atypique. Pour complexifier le problème, dans une cohorte de patient ayant une MAT *de novo* post-transplantation, nous avons montré que 7 des 24 patients (29%) avaient une mutation dans le Facteur CFH ou CFI alors que plus de 60% des patients avaient un diagnostic connu autre qu'un SHU atypique en pré-transplantation²³⁷.

Le génome du donneur peut également jouer un rôle dans le risque de récurrence. L'ensemble des protéines de régulation membranaire du complément (MCP, THBD) sont synthétisées par les cellules endothéliales. Si le donneur est porteur d'un polymorphisme ou d'une mutation d'un gène codant pour une protéine membranaire, il peut être responsable d'un défaut de protection des cellules endothéliales et d'une récurrence en post transplantation.

Les questions posées en post TR qui restent en suspens :

- L'influence du patrimoine génétique du donneur sur le risque de récurrence.
- L'impact des différentes mutations et des polymorphismes principalement celui de FH sur le risque de récurrence.

- Les triggers ont-ils la même influence sur le risque de survenue de la MAT de novo que sur celui d'une récurrence de SHU
- La dérégulation de la voie alterne du complément influence-t-elle le risque de rejet humoral ? Quelle immunosuppression doit-on donner aux patients ?

2 Les récurrences de GNMP

La récurrence des glomérulonéphrites est une cause de perte de greffon ^{225 161}. Le nombre d'études disponibles concernant les GNMP est limité et résumé dans la Table A ^{238, 239, 240, 241}.

En ce qui concerne les GNMP de type I/III, les récurrences varient entre 10 et 49% . Elles peuvent être diagnostiquées de façon systématique par des biopsies de protocoles ²³⁹ ou sur un point d'appel, une protéinurie, hématurie, syndrome néphrotique ou insuffisance rénale faisant réaliser une biopsie rénale. La sévérité du tableau clinique est corrélée à la sévérité des lésions histologique²³⁹. La survenue des récurrences est le plus souvent précoce puisque qu'elles surviennent en moyenne dans les trois premiers mois de la transplantation rénale ²⁴⁰. Les facteurs de risque associés à la récurrence sont l'âge précoce de survenue de la maladie initiale, la présence d'une gammopathie monoclonale, la présence d'un C3/C4 bas et la présence de croissants et de prolifération mésangiale à la biopsie rénale ^{239 240}.

Le C3 bas reste un facteur de gravité très controversé car il n'est pas toujours associé à un risque de récurrence ou à une diminution de la survie rénale chez les patients ayant une GNMP¹⁷³. Les facteurs de mauvais pronostic et de risque de perte de greffon, chez des patients transplantés pour une GNMP sont l'âge jeune au moment du diagnostic, le

syndrome néphrotique, la présence de croissants sur la biopsie initiale, la prolifération mésangiale et fibrose interstitielle sur le transplant²³⁹.

Concernant les DDD, la fréquence des récurrences varie de 40 à 100% selon la réalisation ou non de la ponction de biopsie rénale systématique après la transplantation rénale. L'analyse de 19 publications de 1979 à 1990 chez des patients transplantés rénaux pour une DDD montre que sur 115 patients transplantés, 65 (55%) patients ont eu une récurrence clinique, 113 (95%) ont une récurrence histologique et 16 (26%) ont perdu leur greffon de récurrence. Ces données sont confirmées et identiques 30 ans plus tard (Table A) ^{238 241}. Les récurrences en post-transplantation sont très précoces et surviennent en moyenne dans les deux mois qui suivent la transplantation. Dans ce registre pédiatrique Nord Américain, aucune corrélation n'a été retrouvée entre les données cliniques pré-transplantation, le niveau de C3 plasmatique et la survenue d'une récurrence post-transplantation ²³⁸. La survie des greffons dans cette étude était de 50% à 5 ans, chez les patients ayant une DDD vs 75% pour l'ensemble de la cohorte du registre pédiatrique américaine. Les facteurs associés à la perte de greffon sont la protéinurie glomérulaire et la présence de croissants à la biopsie rénale, la prolifération mésangiale. Dans cette étude, les patients greffés avec un donneur vivant avaient une survie rénale nettement meilleure que les patients transplantés avec un rein de cadavre.

Très peu de données sont disponibles sur les glomérulonéphrites à dépôts isolés de C3 entité récemment décrite un travail publié par Aude Servais qui retrouvait 60% de récurrences (6/10)¹⁷³.

Un cas de récurrence sévère de CFHR5 néphropathie a été rapporté chez un patient chypriote à 6 semaines de la transplantation ²⁴².

Concernant le risque de récurrence sur le deuxième greffon, lorsque les patients ont perdu le premier de récurrence, très peu de données sont disponibles dans la littérature. Une étude mentionne que 4 des 5 patients ayant reçu un deuxième greffon après avoir perdu le premier de récurrence ont récidivé sur le deuxième greffon²⁴¹. De même, la greffe à partir d'un donneur vivant reste controversée, en revanche il y a très peu de données publiées pour étayer cette contre-indication à la transplantation.

Traitement :

En post-transplantation, le traitement anti-protéinurique (IEC, ARA_{II}) est également la première ligne de traitement lorsque les patients n'ont pas d'insuffisance rénale et une protéinurie minime. S'il existe un syndrome néphrotique, une insuffisance rénale, différents traitements ont été essayés, la corticothérapie à fortes doses, la plasmathérapie, et plus récemment Eculizumab. Une récurrence grave d'une deuxième transplantation rénale, récemment traitée par anti-CD20 et plasmathérapie a permis une régression de la maladie. Un autre patient a été traité pour une récurrence sévère de DDD sur le transplant par Eculizumab et le traitement après échec des corticoïdes à 1mg/kg/j, la plasmathérapie et le rituximab ont permis une nette amélioration de la fonction rénale²²¹.

Les problèmes posés en post transplantation :

Très peu de données sont disponibles et les données très souvent anciennes regroupent les GNMP primitives et secondaires, les différents types de GNMP. La nouvelle classification récemment publiée à l'avantage de séparer les GNC3 des GNMP à dépôts de complexe immuns.

L'évolution en post-transplantation est très variable, allant de l'absence de récurrence, à la récurrence histologique isolée diagnostiquée à la ponction biopsie systématique, à la récurrence clinique peu sévère, ou sévère responsable de la perte de greffon.

Actuellement aucun marqueur prédictif de sévérité de la récurrence et de perte de greffon n'est disponible. L'évolution de la consommation de la voie alterne du complément et du C3 Nef en pré et post transplantation n'a pas non plus été évaluée.

Il paraît donc essentiel avant de définir des protocoles thérapeutiques et de mieux classer les patients en fonction de leur risque de récurrence, si possible.

Table A : GNMP en post-transplantation : récurrences et perte de greffon

Références	Patients (n)	Récurrences (%)		Perte de greffon/récurrence (%)	
		Type I/III	Type II	Type I/III	Type II
<i>Braun</i> ²³⁸	29	-	50	-	30
<i>Andresdottir</i> ²⁴¹	11	-	100	-	33
<i>Lorenz</i> ²³⁹	29	42	-	17	-
<i>Briganti</i> ²²⁵	88	10	-	14	-
<i>Little</i> ²⁴⁰	70	49	-	50	-

Objectifs du travail

La survie des greffons en post-transplantation rénale à court terme s'est nettement améliorée avec une baisse nette des rejets aigus et une meilleure prévention des infections virales²²⁴. Les enjeux de la transplantation sont d'améliorer la survie au long cours des greffons. Les causes de perte de greffons après 10 ans sont respectivement dans l'ordre, le rejet chronique, le décès avec un greffon fonctionnel à 10 ans, et la récurrence de la néphropathie initiale^{161,224-226}. Le SHU atypique et les glomérulonéphrites à C3 sont deux pathologies qui récidivent fréquemment après la transplantation rénale et sont responsables de la diminution de la survie de la transplantation rénale²²⁵.

A partir de deux larges cohortes de patients que j'ai constituées issues des centres Français de transplantation rénale, j'ai déterminé les facteurs du complément prédisposant à la récurrence et à la sévérité de la maladie. Les évolutions de ces pathologies en post-transplantation sont très différentes. Ce travail a pour objectif de mettre en place des traitements adaptés prophylactiques afin d'éviter la récurrence et la perte de greffon.

Résultats

1 SHU atypique - Complément dépendant : Etude en post-transplantation rénale

1.1 Contexte-objectif de l'étude

Plus de 60% des patients atteints de SHU atypique (SHUa) développent une insuffisance rénale terminale et un certain nombre d'entre eux ont bénéficié d'une transplantation rénale. La récurrence du SHU atypique en post-transplantation est la première cause de perte du greffon. Il est donc essentiel de définir les facteurs de risque de récurrence afin de mettre en place une thérapeutique adaptée. Le dépistage des anomalies de la voie alterne du complément et surtout la caractérisation de leurs conséquences fonctionnelles sont un des enjeux pour définir ce risque.

Les deux objectifs de ce travail sont, à partir d'une large cohorte de patients transplantés pour un SHU atypique :

- l'étude des facteurs de risque de récurrence et plus particulièrement ceux liés à des anomalies du complément,
- la caractérisation des anomalies génétiques de la voie alterne du complément.

1.2 Cohorte

Il s'agit d'une étude rétrospective multicentrique française qui regroupe une large cohorte de patients transplantés rénaux pour un syndrome hémolytique et urémique atypique. Les sujets inclus dans cette étude étaient des patients de plus de 18 ans, ayant eu un SHU atypique et ayant bénéficié d'une transplantation rénale entre janvier 1995 et décembre 2009. Tous les patients ont bénéficié d'une étude génétique complète des anomalies du complément. Les critères d'exclusion concernaient les patients perdus de vue, ceux ayant eu un SHU typique, un déficit en ADAMTS 13, un SHU secondaire à un cancer ou une maladie auto-immune. Le dernier suivi a été effectué en juin 2010. Soixante six patients ont été sélectionnés dans l'étude, 9 ont été exclus car ils ont été perdus de vue. Cinquante sept patients ayant reçu 72 transplantations ont finalement été inclus. Quarante trois patients ont été transplantés une seule fois, 14 ont été transplantés deux fois. Quarante huit des 57 patients (87%) étaient des femmes. Deux membres d'une même famille ont été inclus. La moyenne d'âge au moment de la première poussée de SHU, de l'insuffisance rénale terminale et de la transplantation rénale était respectivement de 32, 34 et 38 ans. Les caractéristiques de la transplantation et du traitement immunosuppresseur donné sont résumées dans le tableau ci-dessous (*Table III*). La survie du greffon est l'intervalle de temps (en mois) entre la date de la transplantation rénale et la date du retour en hémodialyse. Le diagnostic de récurrence correspond à la présence de microangiopathie thrombotique dans les artérioles et glomérules dans le greffon survenant après la transplantation rénale. Le délai de récurrence correspond à l'intervalle de temps qui sépare la transplantation rénale du diagnostic de récurrence (en mois). Le rejet est diagnostiqué par la biopsie rénale selon les critères définis par la classification de Banff.

Table III : Caractéristiques de la greffe et des traitements immunosuppresseurs

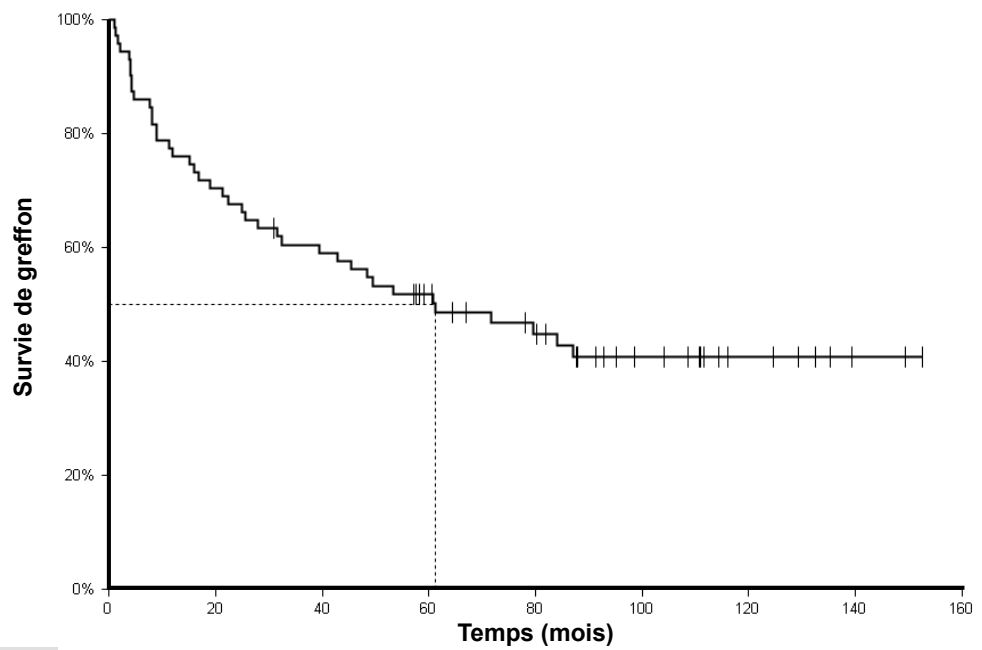
Greffons	N=71
% de donneurs décédés (n/total)	95 (68/71)
Rang de transplantation rénale >1 (%), (n/total)	25 (18/71)
Age donneur (médiane) [années]	44 (15-73)
Nombre d'incompatibilités HLA (moyenne \pm DS)	3.2 \pm 1.2
Nombre d' incompatibilités DR (moyenne DR \pm DS)	1.2 \pm 0.8
Durée ischémie froide (médiane, IC) [heures]	20 (4-39)
% de traitement d'induction (n/total)	98 (66/67)
% Thymoglobuline (n/total)	75 (50/66)
% Antagoniste du R-IL2 (n/total)	25 (16/66)
Traitement immunosuppresseurs	
% Anti-calcineurines (n/total)	84 (57/68)
% Tacrolimus (n/total)	77 (44/57)
% Cyclosporine (n/total)	23 (13/57)
% Inhibiteur de m-TOR (n/total)	16 (11/68)
% Retard de reprise de fonction (n/total)	14 (9/66)
% Plasmathérapie prophylactique (n/total)	13 (9/70)

1.3 Survie des greffons et récidives

La survie des greffons à un et cinq ans est de 76% et 51% respectivement (*Fig 7*). La survie du greffon est significativement moins bonne chez les patients ayant une récidive comparée aux patients n'ayant pas de récidive ; elle est respectivement de $44\pm 7\%$ et $74\pm 5\%$ à un an et de $29\pm 7\%$ et $70\pm 8\%$ à 5 ans selon que les patients aient ou non une récidive. La récidive est le facteur de risque majeur de perte de greffon dans cette population ($p=0.002$) (HR: 3,7 (1,99-6,89) (*Fig 8*)). Quarante trois pourcent (19/44) des récidives surviennent à un mois, 60% (26/44) à 3 mois et 70% (31/44) à un an (*Fig 9*). Huit des quatorze patients transplantés pour la deuxième fois ont perdu leur greffon, six d'une récidive de SHU atypique, un d'une thrombose de la veine rénale et un est décédé d'un infarctus du myocarde avec un greffon fonctionnel. En analyse multivariée, le retard de reprise de fonction (RR=2,6(1,05-6,45); $p=0.04$) et la récidive (RR=9,07(2,08-39,2); $p=0,001$) sont les facteurs de risque de perte de greffon.

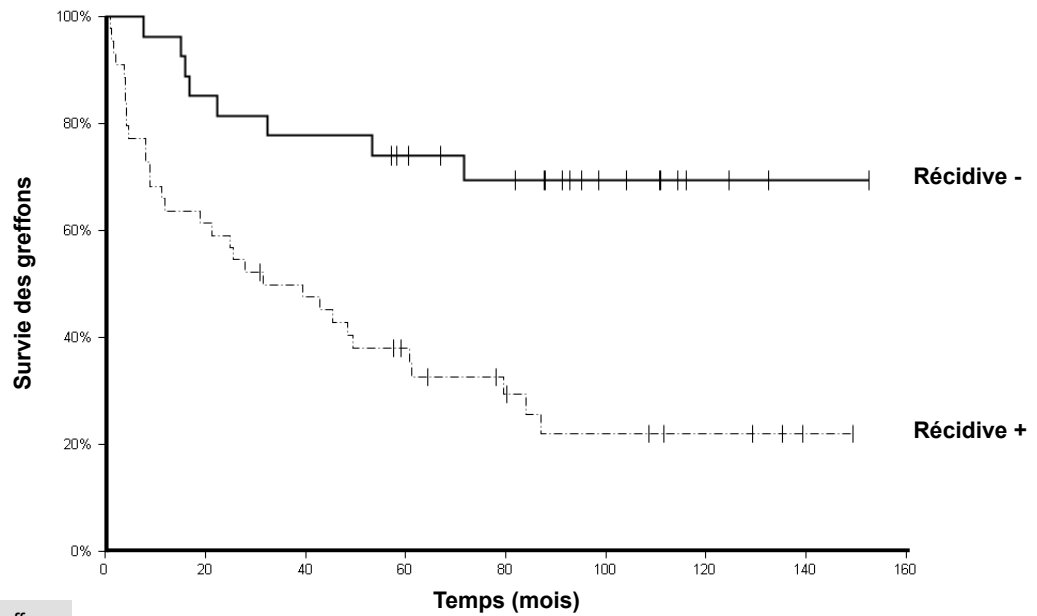
Figure 7 : Survie des greffons chez des patients ayant un SHU atypique (méthode de Kaplan Meier).

La moyenne de survie des greffons est de 61 mois.



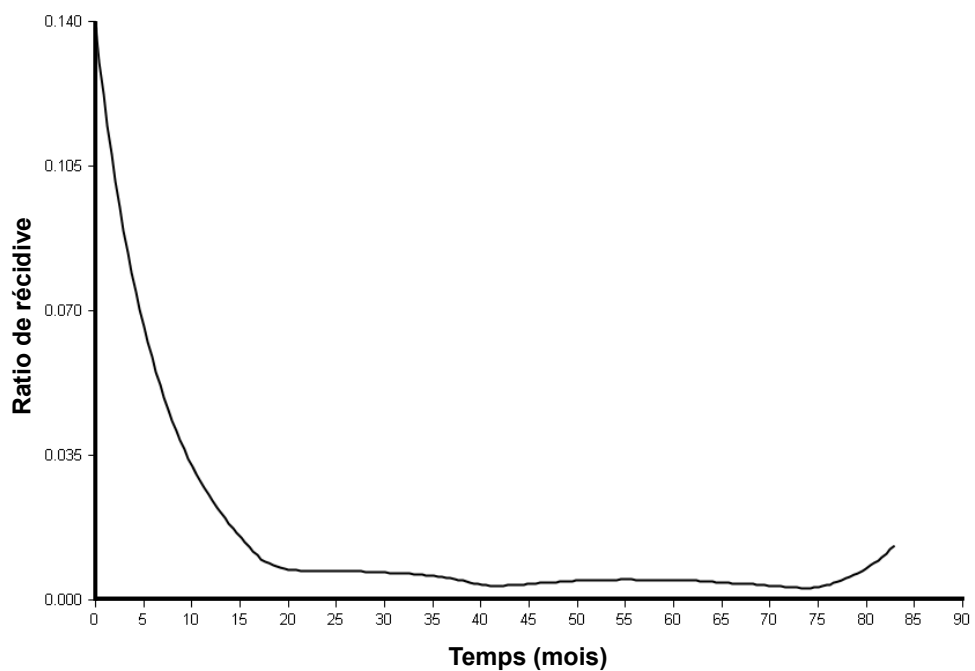
Nombre de greffons	71	51	42	37	25	15	8	3	1
--------------------	----	----	----	----	----	----	---	---	---

Figure 8 : Survie des greffons après transplantation rénale en fonction de la survenue d'une récidence (Kaplan-Meier) ($p=0.0001$, log rank)



Nombre de greffons		Temps (mois)								
Pas de récidence	27	25	21	20	15	9	3	1	0	
Récidence	44	28	20	16	9	6	4	0	0	

Figure 9 : Ratio des récidence en fonction du temps.



1.4 Anomalies de la voie alterne du complement

Tous les patients ont bénéficié d'un dosage des protéines du complément et d'une recherche d'anomalies génétiques sur les gènes codant pour les six facteurs de susceptibilité identifiés dans le SHU atypique (Facteur H, Facteur I, MCP, C3, CFB et Thrombomoduline).

1.4.1 Les dosages des protéines plasmatiques du complément

Les prélèvements pour le dosage des protéines plasmatiques du complément sont effectués sur du plasma EDTA. L'EDTA permet de chélater le calcium et le magnésium des ions nécessaires à l'activation de la voie classique et alterne du complément empêchant l'activation des protéines du complément « *in vitro* ». Les dosages du C3, C4 et facteur B sont effectués par néphélométrie. Le dosage plasmatique de CFH et CFI se fait par une technique ELISA. La quantification de l'expression membranaire de la MCP est effectuée sur les granulocytes du sang périphérique, par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps anti-CD46 couplés à la phycoerythrine (PE).

Ces dosages permettent un dépistage rapide d'une consommation des protéines plasmatiques par la voie alterne du complément (C3 bas avec un C4 normal, parfois associé à une baisse du FB) et la mise en évidence d'un déficit quantitatif des protéines de régulation (FH, FI, MCP).

Dix huit patients (33%) ont un dosage plasmatique de C3 inférieur à la normale (<660mg/l). Le dosage de C4 plasmatique est normal chez tous les patients. Le facteur H plasmatique est diminué chez 7 patients. Le facteur I est bas chez 2 patients et l'expression du MCP à la membrane est abaissée chez un patient.

La diminution des protéines de régulation (FH, FI) inférieure à 60% de la normale permet de suspecter une mutation de type I entraînant un déficit de synthèse.

Un dosage normal des protéines plasmatiques du complément n'élimine pas un déficit fonctionnel. Il est nécessaire de faire une étude génétique quelque soit le résultat des dosages plasmatiques. Tous les gènes d'intérêt *CFH*, *CFI*, *MCP*, *C3*, *FB*, *THBD* doivent être analysés afin de rechercher la présence de mutations combinées.

1.4.2 Anomalies génétiques : mutations des protéines de régulations, des composants de la C3 convertase et polymorphisme du CFH

Une mutation des protéines du complément est retrouvée chez 39 des 57 patients (68%) (Table IV). Vingt patients ont une mutation de CFH identifiée, soit 35% (20/57) des patients de la cohorte. Soixante dix pourcent (14/20) des mutations de CFH sont diagnostiquées par séquence direct du gène (23 exons) et 30% (6/20) par une technique MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification). Sept des 20 patients (35%) ayant une mutation de CFH ont un facteur H plasmatique diminué. Treize (65%) patients ont un facteur H plasmatique normal. Toutes les mutations du facteur H identifiées sont hétérozygotes.

La fréquence des mutations de CFI, MCP, C3 et FB sont respectivement de 21%(n=12), 8%(n=5), 7% (n=4) et 3% (n=2). Quatre patients (7%) ont des mutations combinées. Dans cette étude, deux membres d'une même famille ont été inclus, l'un d'entre eux a une mutation du CFH et MCP et l'autre porte en plus une troisième mutation sur le gène de CFI. Deux autres patients ont respectivement une mutation de CFI et CFB et l'autre du MCP et CFI. Aucune mutation de la Thrombomoduline (THBD) n'a été retrouvée. Deux patients

sont porteurs d'un variant rare A43T de la Thrombomoduline, associé pour un patient à une mutation du gène du C3 (R570Q) et pour un autre à une mutation du gène du CFH (C864S). Trente deux pourcent (18/57) des patients n'ont pas de mutation identifiée dans l'ensemble des gènes analysés CFH, CFI, MCP, C3, FB. L'haplotype de CFH à risque pour le SHU atypique (gtgt) a été recherché chez tous les patients et est présent sous la forme homozygote dans 23% (13/57). Parmi les 18 patients transplantés pour un SHU atypique et n'ayant pas de mutation identifiée, un tiers (6/18) est porteur de l'haplotype homozygote du CFH à risque.

Table IV : Mutations et haplotype gtgt de CFH dans la cohorte de patients.

Anomalies génétiques ou acquises	Patients (n=57)	
	n	%
Mutations	39	68
CFH	18	31.6
CFI	9	16.0
MCP	3	5.5
C3	4	7.0
CFB	1	1.8
THBD	0	0
Mutations combinées	4	7.0
Aucune mutation	18	32
Haplotype à risque "gtgt" homozygote CFH -	12	66.5
Haplotype à risque "gtgt" homozygote CFH +	6	33.5
Ac anti-CFH	0	0

Mutations combinées : Présence de plus d'une mutation chez le même patient.

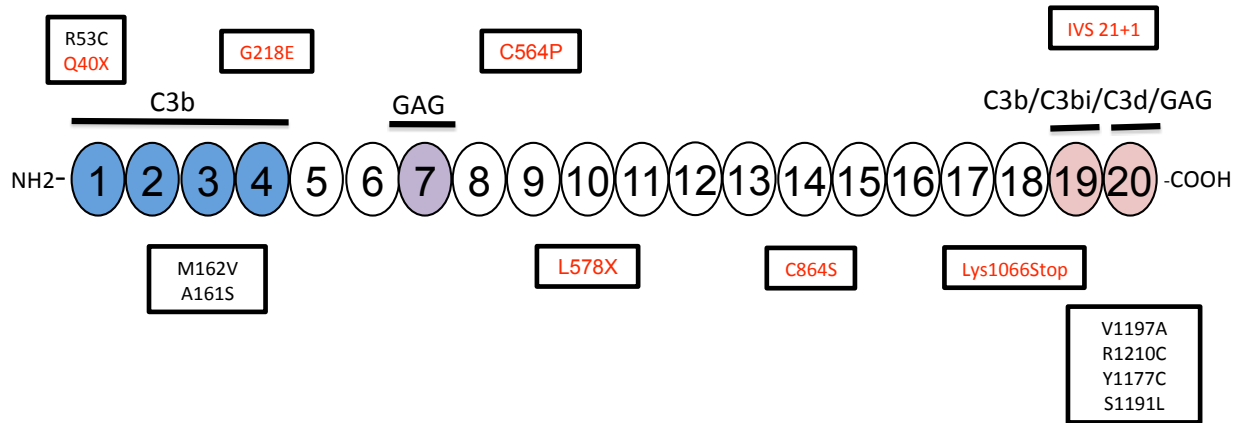
1.4.2.1 Facteur H : Mutations et recombinaison homologues non alléliques

- diagnostic par séquençage direct

Soixante dix pourcent (14/20) des mutations du facteur H sont diagnostiquées par un séquençage direct (*figure 10*). Trente cinq pourcent (7/18) sont des mutations responsables d'un déficit quantitatif en FH (le dosage plasmatique du FH est inférieur à 60%). Elles sont localisées sur tous les exons du gène. Les mutations *Q40X*, *L578X*, *Lys1065Stop*, dues à des substitutions de bases d'ADN à l'origine d'un codon stop entraînent l'arrêt prématuré de la synthèse de la protéine. Les mutations *C564P* ou *C864S* entraînent un changement d'une cystéine par une proline ou une sérine. Les cystéines sont impliquées dans le maintien des ponts disulfure entre les SCR et permettent à la protéine d'avoir une bonne conformation. Ces mutations sont responsables de l'absence de synthèse de la protéine, de sa dégradation rapide en intracellulaire ou de de la non excrétion de la protéine à l'extérieur de la cellule. Le changement IVS21 +1 est localisé en intronique et entraîne vraisemblablement un défaut de l'épissage entre les exons 21 et 22 du gène de CFH.

Trente cinq pourcent (7/18) sont des mutations de type II, responsables d'un déficit fonctionnel en facteur H. La protéine circule mais elle n'est pas fonctionnelle. La localisation des mutations se situe soit dans sa partie N terminale du Facteur H (SCR 1-4) (dans un domaine de liaison au C3b) soit dans la partie C terminale (dans les domaines de liaison SCR19-20) permettant la liaison du facteur H au C3b et aux surfaces (*Figure 11 et 12*).

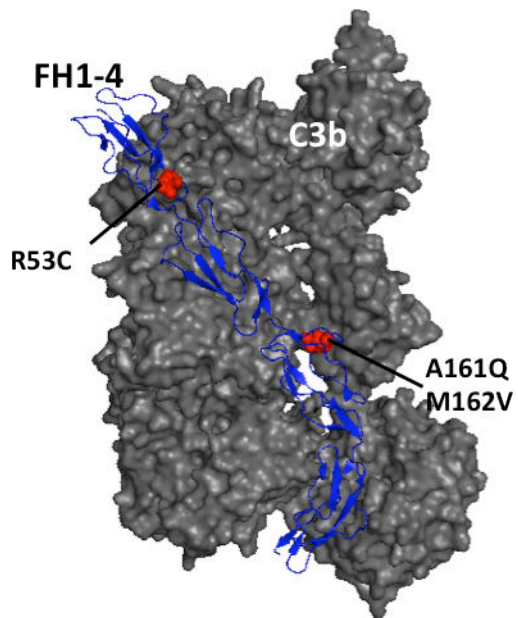
Figure 11: Représentation schématique des différentes mutations du FH.



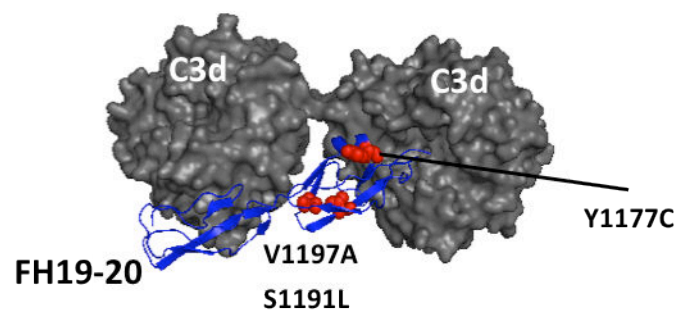
En rouge, sont représentées les mutations du CFH responsables d'un déficit quantitatif et en noir sont représentées les mutations responsables d'un déficit fonctionnel.

Figure 12 : Localisation des mutations du CFH de type II sur le Complexe C3b/C3d-FH.

Mutations FH 1-4



Mutations FH 19-20



Les mutations sont représentées en rouge, le C3b et la partie C3d du C3b en gris et le facteur H en bleu.

-Recombinaison homologue non allélique

Le gène FH est situé dans le locus RCA (*Regulator of Complement activation*) sur le chromosome 1, à proximité des gènes codant pour des protéines appelées les CFHR, des protéines ayant une grande homologie avec le FH (*Fig 13*). Des études comparatives ont permis de mettre en évidence des homologies de 100% entre le SCR 18 et 19 du FH et le SCR 3 et 4 du CFHR1, l'homologie est de 98% entre le SCR 20 du FH et le SCR 5 du CFHR1 puisqu'ils ne diffèrent que de deux acides aminés (*Fig 14*). Cette grande similitude entre ces deux gènes (CFH et CFHR1) peut aboutir à des recombinaisons homologues non alléliques (*Figure 14*).

Six des patients de la cohorte ont des réarrangements affectant la partie C terminale du FH. Deux patients ont une recombinaison aboutissant à la perte du SCR20 remplacé par le SCR5 du CFHR1 (*Figure 7*) et mise en évidence par la MLPA (*Figure 15*).

Figure 13 : Représentation schématique des exons du Facteur H et des CFHR dans le locus RCA. Les séquences présentant de grandes homologies sont représentées avec des couleurs identiques ¹¹¹

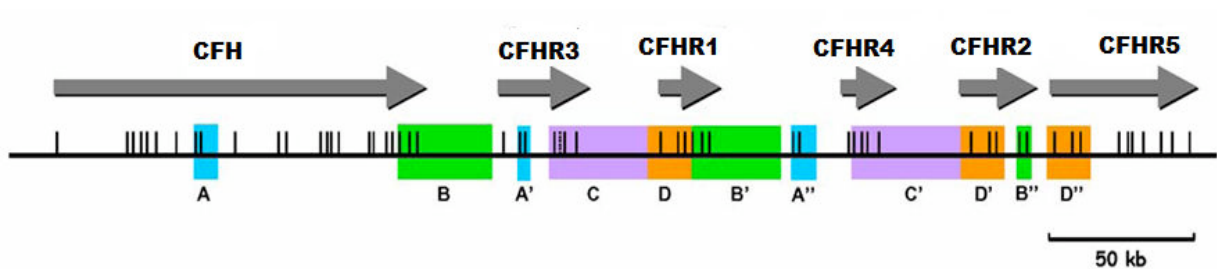
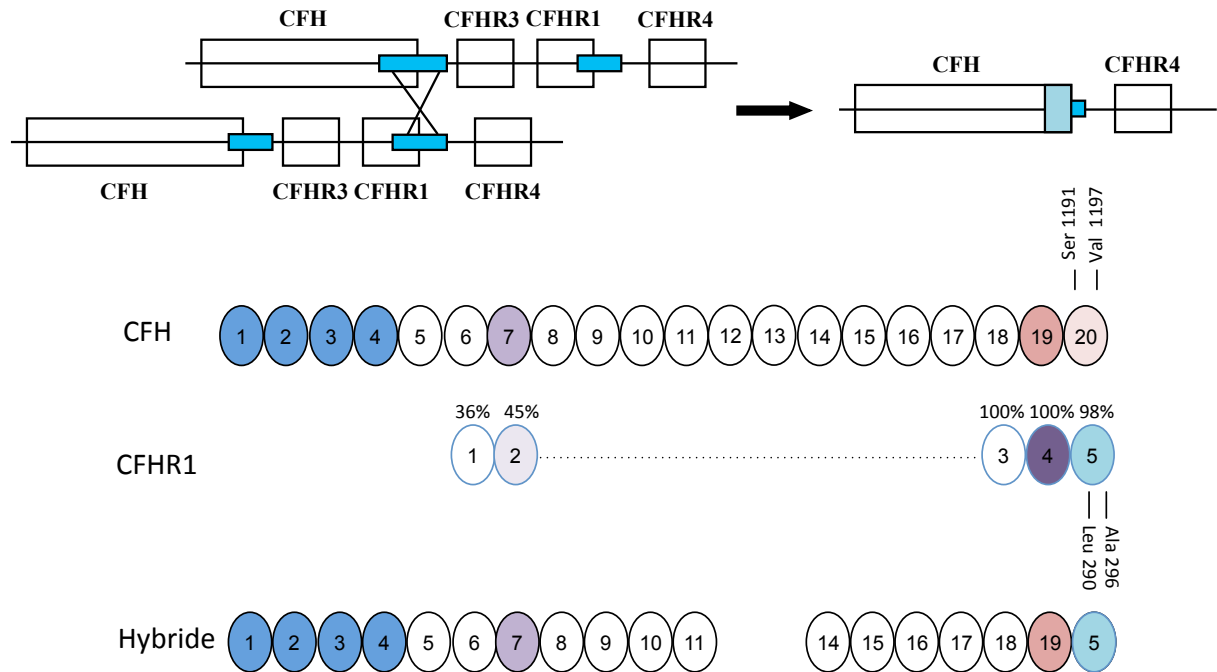


Figure 14 : Recombinaison homologue non allélique entre le CFH et CFHR1 aboutissant à la formation d'un gène hybride CFH/CFHR1.

Représentation schématique du mécanisme de recombinaison.



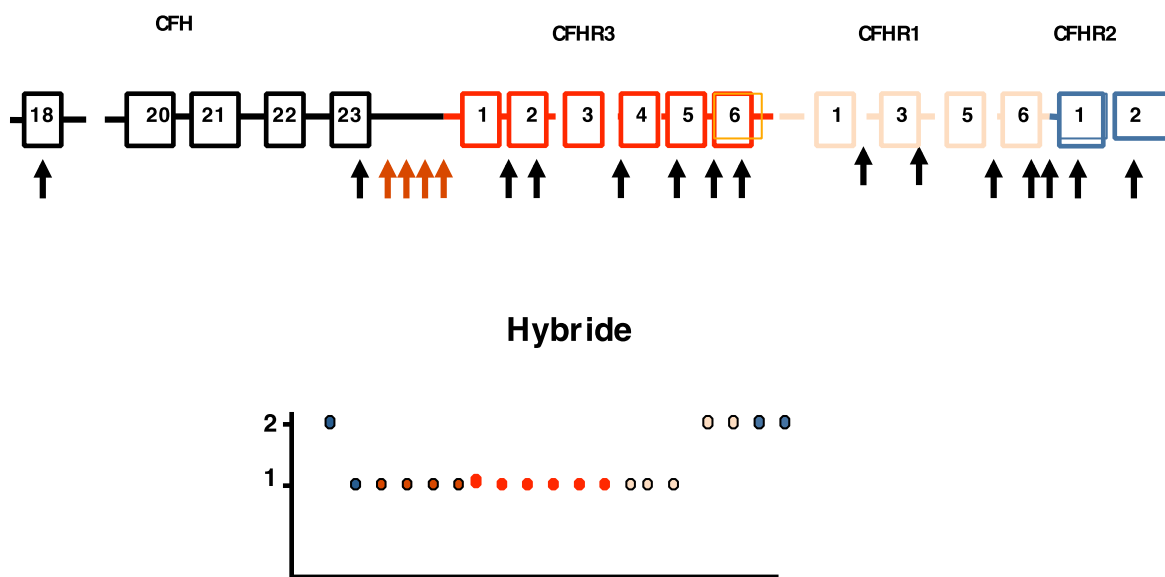
Au cours de la méiose, il existe un appariement entre deux séquences homologues de tailles variables entre l'exon 23 du Facteur H (codant pour le SCR20 du Facteur H) et l'exon 6 de CFHR1 (codant pour le SCR5) entraînant la perte d'informations génétiques ou des recombinaisons entre deux séquences homologues.

Ces mécanismes entraînent la production d'une protéine CFH circulante contenant deux substitutions au niveau du SCR20 en position 1191 et 1197

Figure 15 : Diagnostic de recombinaison aboutissant à un « gène Hybride CFH/CFHR1 » par Multiplex ligand probe protein (MLPA)

Réarrangement responsable de la perte du SCR20 du facteur H, de CFHR3 et des cinq premiers exons de CFHR1. Le CFH a 23 exons et le CFHR1 a 6 exons.

Les sondes se fixent sur deux copies de l'exon 18 de CFH et de l'exon 6 de CFHR1. A l'inverse une copie d'ADN est détectée par les sondes localisées entre l'exon 23 codant pour le SCR20 du Facteur H et l'exon 5 de CFHR1.



Deux patients ont des réarrangements complexes responsables d'un remplacement de l'exon 5 et 6 du CFHR1 par l'exon 22 et 23 du CFH. Ceci est appelé l' « Hybride reverse ». La protéine CFHR1 mutée devient hyperactive, capable de se lier plus efficacement que le Facteur H à ses ligands. Deux autres patients ont des réarrangements complexes non identifiés (manuscrit en préparation, V Fremeaux-Bacchi et al).

1.4.2.2 Mutations de CFI et MCP

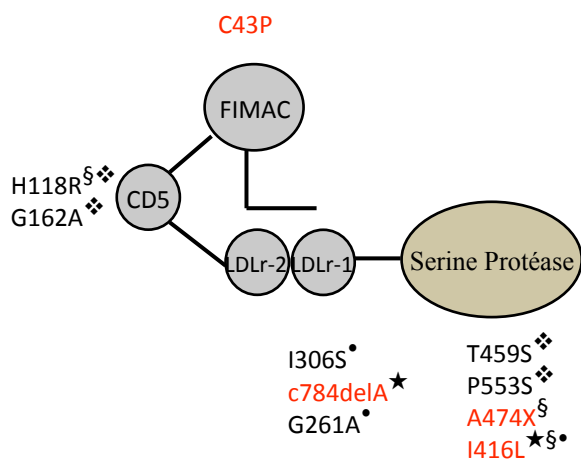
-Mutation du FI

Douze patients (23%) sont porteurs d'une mutation dans le gène de CFI (*figure 16*). Trois mutations sont retrouvées chez deux patients. Ces mutations sont toutes hétérozygotes exceptée une, responsable d'un déficit complet en CFI (pI416L). Onze des douze mutations sont des mutations « missenses » correspondant au changement d'un acide aminé. Un patient a une délétion responsable d'un décalage du cadre de lecture entraînant l'apparition d'un codon stop (c.784delA). Quatre des 12 mutations sont responsables d'un déficit quantitatif en FI.

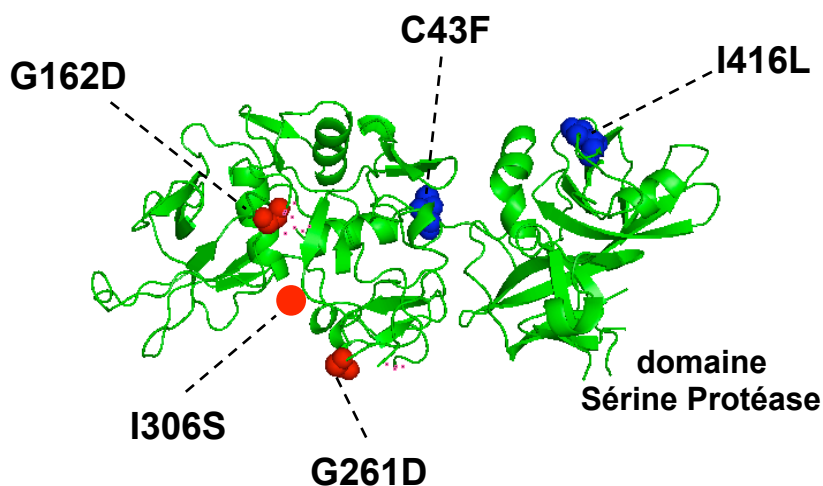
Huit patients ont des dosages de FI normaux. Les conséquences fonctionnelles des mutations de type II (H118R, G162A, I306S, G261A) sont inconnues. Neufs patients ont soit une mutation sur un autre gène (n=4), soit un haplotype du CFH à risque (n=3) ou une délétion homozygote de CFHR1/CFHR3 (n=3). Les anomalies retrouvées et leur imputabilité dans le SHU sont répertoriées dans la **Table V**.

Figure 16 : Mutations schématiques dans les différents domaines de CFI

Les mutations notées en rouge sont responsables d'un déficit plasmatique. ★ : deux patients sont porteurs de la même mutation. § patients porteurs de l'haplotype à risque du CFH, ❖ patients ayant autre mutation associée, • patients porteurs d'une délétion CFHR1 associée.



Localisation des mutations du CFI de type I et II sur le FI.

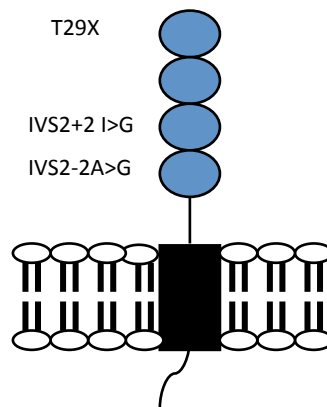


en rouge : mutations de type II
 en bleu : mutations de type I

-Mutations du MCP :

Cinq patients ont des mutations dans le gène du MCP. Deux patients ont une même mutation R29X combinée pour l'un à une mutation du CFI et pour l'autre, à une mutation CFH et CFI. Cette mutation est responsable d'un déficit quantitatif en MCP se traduisant par une diminution d'expression à la surface membranaire. Deux patients ont une mutation de 2 nucléotides après la fin de la région codant pour l'exon 2 (IVS 2+2 T>G). Cette mutation induit un saut d'exon entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré ²⁴³.

Fig 17 : Représentation schématique des mutations présentes sur le MCP

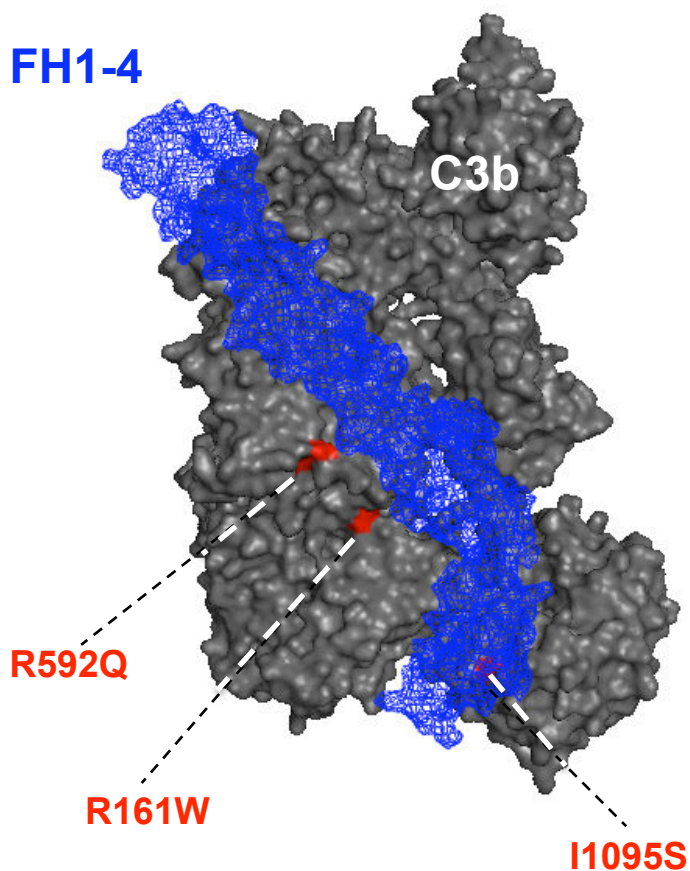


1.4.2.3 Mutations dans les composants de la C3 convertase : C3 et FB

-Mutations du C3 :

Trois mutations de C3 ont été identifiées chez quatre patients. Trois des quatre patients ayant une mutation de C3 ont un C3 plasmatique diminué. Deux de ces mutations, la R592Q, R161W sont responsables d'une diminution de la liaison au MCP et d'une diminution de son activité cofacteur du FI qui permet de dégrader le C3b en iC3b ¹²⁸ (Figure 18)(Table VI). Les conséquences fonctionnelles du I1095S ne sont pas connues à ce jour.

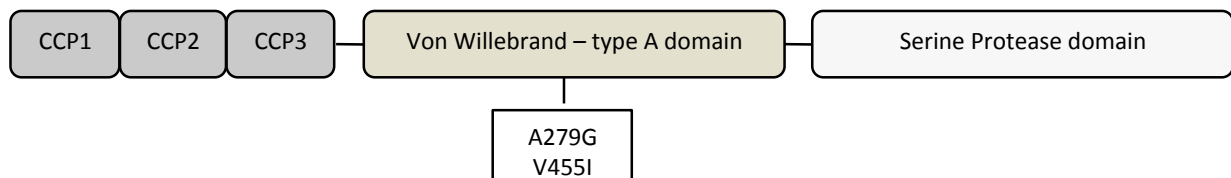
Figure 18 : Localisation des mutations du C3



-Mutations du FB :

Deux patients ont une mutation du facteur B. Les deux mutations se situent dans le domaine *vWF-A*, qui est le site de liaison du Facteur B sur C3b. (Figure 19). Le patient ayant la mutation D279G a un dosage plasmatique de C3 effondré. Cette mutation a comme conséquence fonctionnelle une augmentation de la liaison de C3b au Facteur B (Table VI). Aucune conséquence fonctionnelle n'a été identifiée pour la seconde mutation V455I.

Figure 19 : Représentation schématique du Facteur B et des deux mutations du gène CFB



Représentation des mutations de FB sur le C3b.

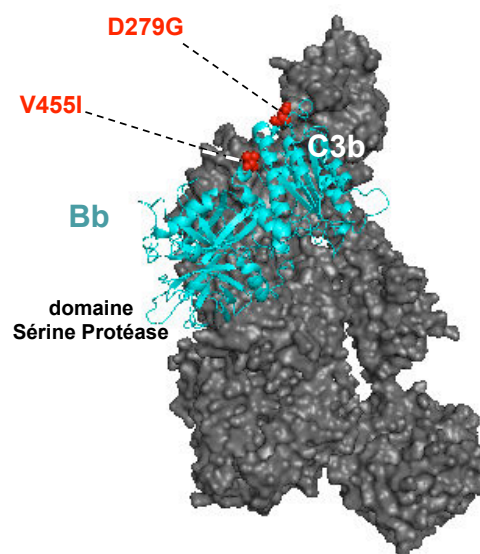


Table V: Conséquences fonctionnelles des mutations retrouvées du FI et MCP et description dans la littérature.

Mutations	Type	Localisation	Conséquences fonctionnelles	Références
FI				
p.Cys43Phe	I		Déficit quantitatif	Bienaime ¹²²
p.H118R	II	Domaine CD5	Non connue	Bienaime ¹²²
p.G162Asp	II	Domaine CD5	Non connue	Sullivan ²⁴⁴
c.784delA; p.G243fsX46	I		Déficit quantitatif	Bienaime ¹²²
p.Gly261Asp	II		Pas de défaut de fonction retrouvé	Nilsson ²⁴⁵ Kavanagh ¹⁰² Bienaime ¹²²
p.Ile 306Ser	II	LDLr domain	Non connue	Bienaime ¹²²
p.Ile 416Leu	I	SP domain	Deficit total en FI	Sellier- Leclerc ¹⁴⁴ Bienaime ¹²²
p.Arg474X	I	SP domain	Déficit quantitatif	Fremaux- Bacchi ¹²¹ Bienaime ¹²²
Tyr459Ser	II	SP domain	Non connue	Bienaime ¹²²
p.Pro553Ser	II	SP domain	Non connue	Bienaime ¹²²
MCP				
p.Tyr29X	I	SCR1	Déficit quantitatif	Fremaux- Bacchi ^{59,91}
IVS2+2; T>G	II		Déficit quantitatif	Fremaux- Bacchi ⁹¹
IVS2-2; A>G	II		Déficit quantitatif	Fremaux- Bacchi ⁹¹

Table VI: Conséquences fonctionnelles des mutations retrouvées du FB et C3 et description dans la littérature.

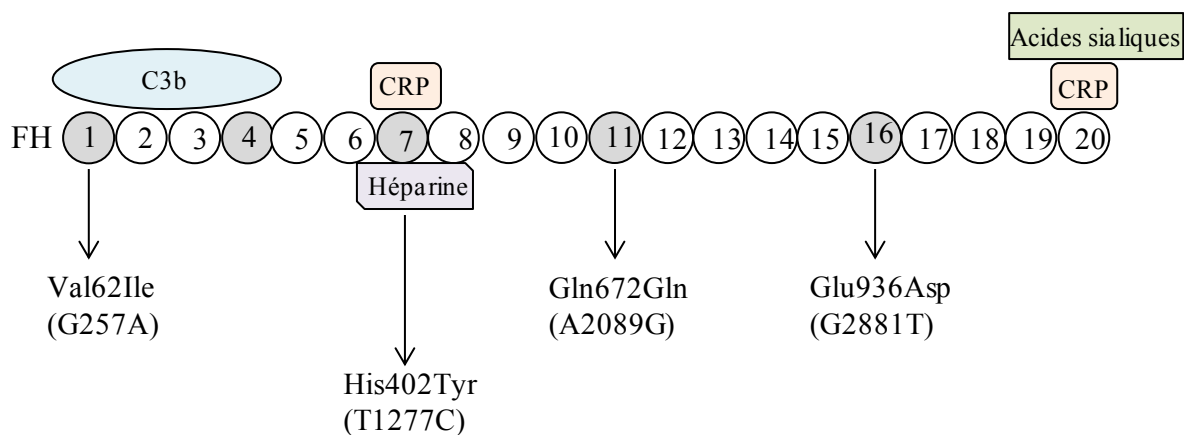
Mutations	Type	Localisation	Conséquences fonctionnelles	Références
FB				
p.Asp279Gly	II	vWF-A domain	Hyperactivation de la C3 convertase, Résistance à la dissociation par le FH	Roumenina ¹⁰⁰
p.Val455I	II		Aucune conséquence fonctionnelle	Marinozzi et al en révision
C3				
p.Arg161Trp	II	MG2	Hyperactivation de la C3 convertase, Résistance à la dissociation par le FH	Roumenina ¹²⁸ Fakhouri ²⁰³
p.Arg592Gln	II	MG6	Réduction de la liaison au MCP diminuant son activité cofacteur de FI	Fremaux-Bacchi ⁹⁹
p.Ile1095Ser	II	TED	Non connue	Fremaux-Bacchi ⁹¹

1.4.2.4 Haplotype à risque de CFH :

Quatre polymorphismes du FH, respectivement dans le SCR1, SCR7, SCR11, SCR16 sont transmis en bloc et forment donc un haplotype. Six haplotypes différents sont retrouvés dans plus de 95% de la population. Les patients ont un risque plus important de faire un SHU atypique s'ils expriment les nucléotides gtgt sur deux allèles des variants, présents sur le SCR1, 7, 11 et 16 du Facteur H. (*figure 20*). Dans notre cohorte de patients, 13 patients sont porteurs de l'haplotype gtgt homozygote du CFH. Sept patients ont une mutation associée, deux des trois patients sont porteurs d'une mutation de MCP, trois des patients ont une mutation du CFI, un patient a un déficit quantitatif en H et un patient a une mutation de C3.

Six des patients n'ont pas de mutation associée. Aucune conséquence fonctionnelle n'a été décrite sur cet haplotype à risque.

Figure 20 : Représentation schématique de la localisation des variants de CFH qui sont transmis en bloc formant un haplotype



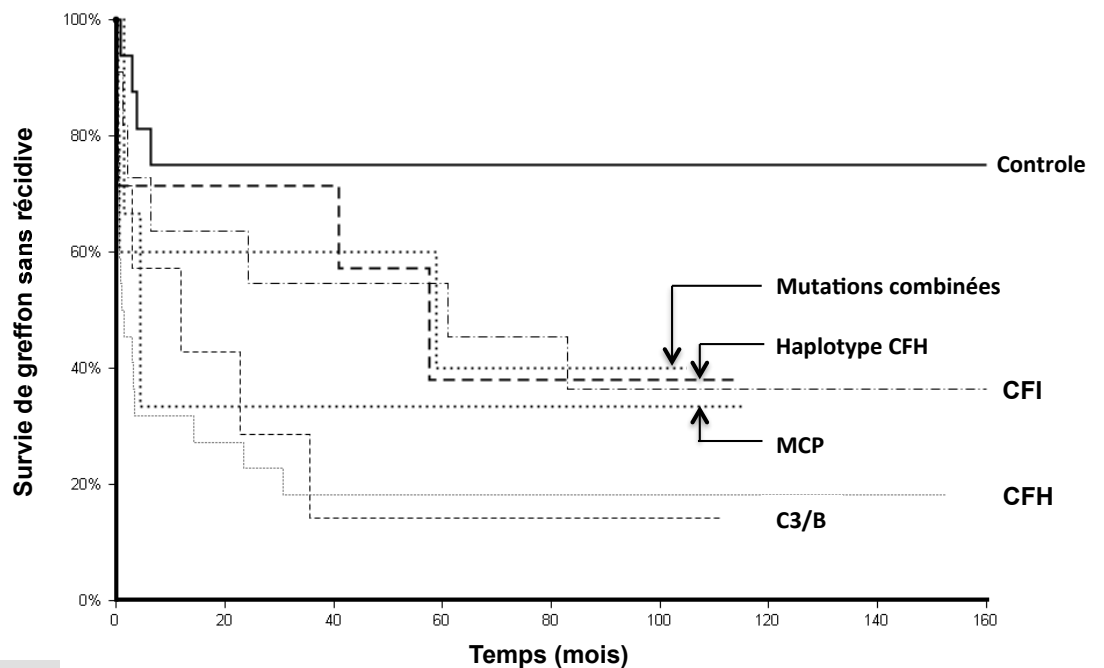
1.5 Corrélation entre les anomalies génétiques et la survenue d'une récurrence

La présence d'un C3 bas ($p=0.035$) et d'une mutation ($p=0.004$) dans un gène codant pour une protéine de la voie alterne du complément sont associées à une augmentation du risque de récurrence en analyse univariée. En analyse multivariée, seule la présence d'une mutation est associée avec un risque de récurrence multiplié par 4 ($HR= 4.3 (1.80-10.42)$; $p=0.001$). Afin de mieux évaluer le risque de récurrence en fonction des anomalies génétiques identifiées sur les différents gènes, différents groupes ont été évalués : les patients porteurs de mutations du CFH, des composants de la C3 convertase (C3/FB), du CFI, du polymorphisme du CFH, des mutations combinées en prenant comme groupe contrôle les patients n'ayant ni mutation, ni polymorphisme du CFH. Les patients ayant une mutation gain de fonction de B ou de C3 ont été regroupés pour l'analyse (*Figure 21*).

Les patients porteurs d'une mutation dans un gène codant pour FH et C3/B ont un risque de récurrence très important multiplié par plus de 5 (HR=5,6 (2,42-13,01) ; p=0,0004) pour le CFH et 4,9 pour le C3/B(HR=4,9(1,4-17,6) ; p=0,014) comparés aux patients n'ayant ni mutation ni polymorphisme du CFH. Le risque de récurrence des patients porteurs d'une mutation de CFH est significativement plus élevé par rapport à celui des patients porteurs d'une mutation du CFI (HR=3,3 (0,91-1,61) ; p=0,039) ou des patients porteurs de l'haplotype du CFH sans mutation (HR=2,75 (0,57-13,21); p=0,135). Les patients ayant une mutation du CFH avec un déficit plasmatique (n=7) n'ont pas un risque significativement différent de récurrence des patients ayant une mutation de CFH avec un déficit fonctionnel (66% versus 88%). Tous les patients ayant une anomalie génétique dans le SCR 20 ou ayant un gène hybride ont fait une récurrence et ont perdu leur greffon. Un des trois patients ayant une mutation du CFH de type II, dans le domaine de régulation, a fait une récurrence. Deux des trois patients porteurs d'une mutation de MCP ont eu une récurrence responsable de la perte du greffon. Ces deux patients étaient porteurs de l'haplotype homozygote de CFH.

Les patients porteurs de l'haplotype gtgt du CFH (même si l'effectif est réduit) ont un risque plus important de perte de greffon que les patients n'ayant ni mutation ni l'haplotype à risque. Le risque de récurrence défini pour ce groupe de patient n'est pas statistiquement différent ni de celui des patients ayant une mutation du Facteur I, ni de celui des patients n'ayant pas de mutation.

Figure 21 : Survie des greffons sans récurrence en fonction des différentes mutations et polymorphisme de CFH identifiés. Tous les groupes sont comparés à un groupe contrôle (greffons issus de patients sans mutation, ou haplotype de CFH à risque)



Patient à risque	0	20	40	60	80	100	120	140	160
Controle	16	12	12	11	10	4	3	2	2
CFH	22	6	4	4	3	2	2	0	0
C3/B	7	3	1	1	1	1	0	0	0
Haplotype CFH	7	5	5	2	2	2	0	0	0
CFI	11	7	6	5	3	3	2	0	0
MCP	3	1	1	1	1	1	0	0	0
Mutations combinées	5	3	3	2	2	1	0	0	0

L'ensemble de ces résultats permet d'approcher au mieux le risque de récurrence en fonction des gènes mutés et de leur localisation. Le risque de récurrence est de 100% pour les patients ayant une mutation dans la partie C terminale du FH. De plus, 80% des patients porteurs d'une mutation du C3 ou du FB et 50% des patients ayant une mutation de CFI ou un polymorphisme de CFH ont fait une récurrence. Les patients, sans aucun facteur de

susceptibilité génétique diagnostiqué ont le risque le plus faible de récurrence, évalué à 20%.

Les patients ayant une mutation de CFH ont une récurrence plus précoce puisque quatre vingt pourcent des récurrences de CFH surviennent dans les trois premiers mois. Cinquante pourcent des récurrences chez les patients ayant une mutation de C3, FB, MCP, CFI ou un polymorphisme de CFH surviennent dans les trois mois qui suivent la transplantation rénale.

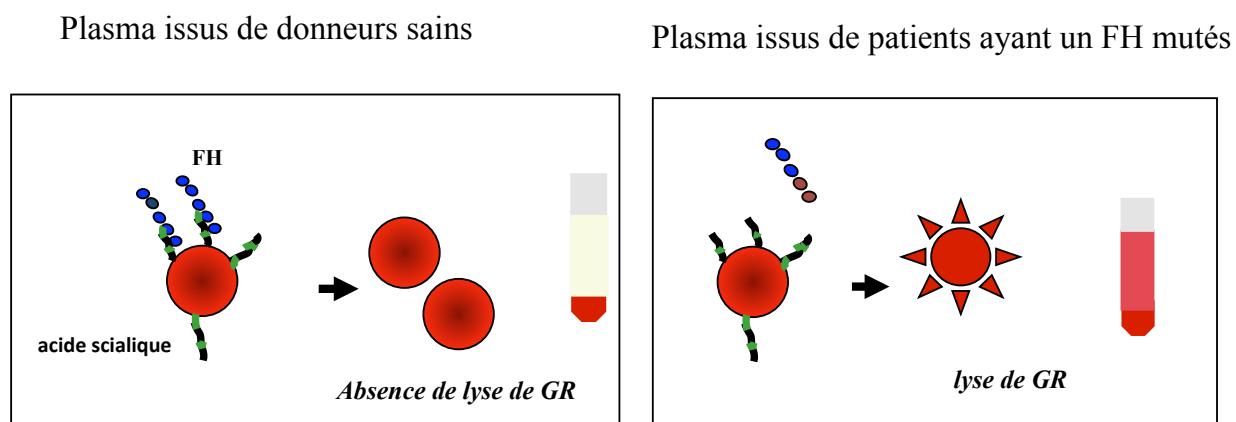
1.6 Tests fonctionnels du facteur H

L'analyse des conséquences fonctionnelles des mutations est un enjeu majeur dans la complexité de la génétique. Plusieurs tests ont été développés afin de préciser quelles fonctions de régulation de la voie alterne sont altérées. Dans la cohorte de patients, j'ai étudié l'analyse des conséquences fonctionnelles des mutations de type II du CFH.

1.6.1 Protection des cellules : Test de lyse des globules rouges de moutons

Contrairement aux globules rouges de lapin qui activent spontanément le complément par la voie alterne, les globules rouges de moutons sont riches en acide sialique à leur surface. Le FH se lie par sa partie C terminale à ces polyanions présents à la surface. Le facteur H empêche la formation de la C3 convertase, permet une protection du GR contre l'attaque du complément et de la lyse (**Figure 22**). Si les globules rouges de moutons se trouvent en présence d'un plasma avec FH muté dans la partie C terminale, celui-ci est incapable de se lier aux polyanions. La surface des GR n'est pas protégée et l'activation du complément et la lyse des globules rouges est possible²⁴⁶.

Figure 22 : Test de lyse des globules rouges de mouton



J'ai réalisé ce test fonctionnel chez dix patients de la cohorte ayant une mutation de CFH. Les contrôles sont des plasmas issus de donneurs sains et du pool correspondant au mélange de plasma issus de 99 donneurs sains.

Le plasma est dilué dans un tampon VBS EGTA-Mg pH 7.2-7.4 à 50%, 40%, 30%, 20%, 10%. 100µl de globules rouges de moutons à 108 cellules/ml équilibrés dans le même tampon sont ajoutés dans les tubes. Les tubes sont ensuite incubés pendant 30 minutes, à 37°C au bain marie avec une légère agitation. Ensuite, le NaCl est ajouté pour stopper la réaction. La lyse des cellules mesurée par la quantification de l'hémoglobine libérée est déterminée par mesure de la densité optique à 415 nm. Pour chaque plasma de patient testé, il y a un contrôle interne pour lequel l'ajout de GR est omis, le but étant de connaître le bruit de fond pour chaque échantillon qui doit être soustrait du signal émis par le plasma en présence des GR. Le tube T0 correspondant à l'hémolyse spontanée contenant 100µl de globules rouges de moutons à 108 cellules/ml dans le tampon est arrêté par du NaCl. Le tube T100 (correspondant à la lyse maximale des GR) contenant 100µl de globules rouges de moutons à 108 cellules/ml est stoppé par ajout de eau à la fin de l'expérience. Pour

chaque plasma testé et chaque plasma de donneurs sains les contrôles et dilutions de plasmas sont identiques.

Figure 23 : Test de lyse des GR réalisé chez 10 patients

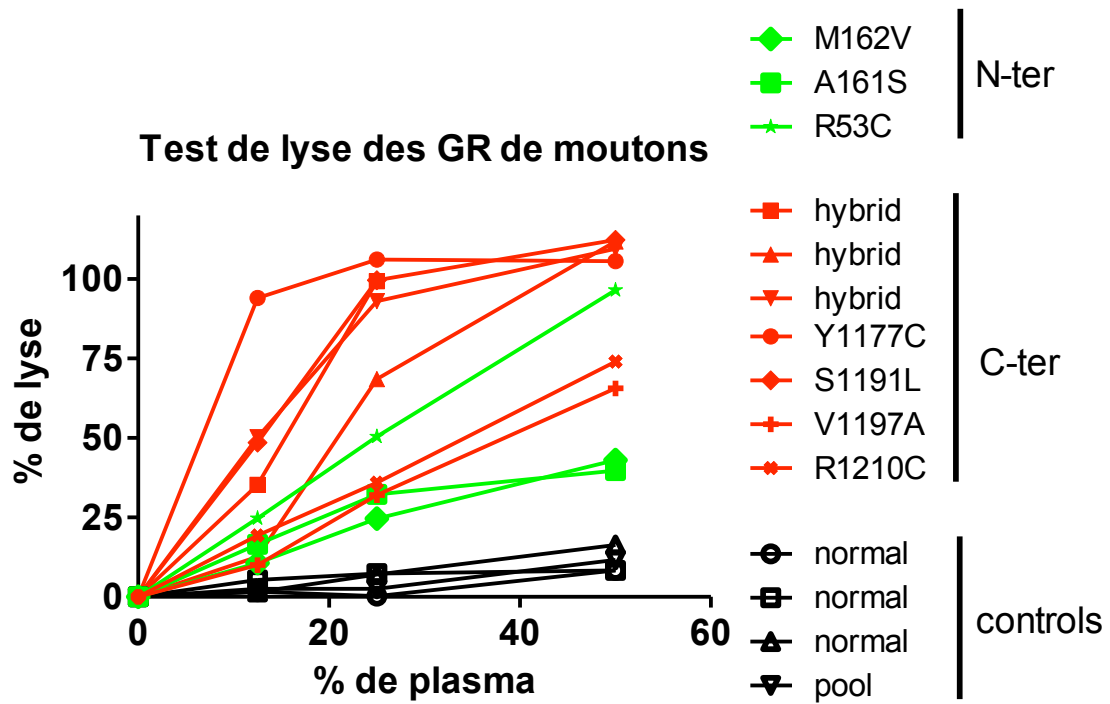
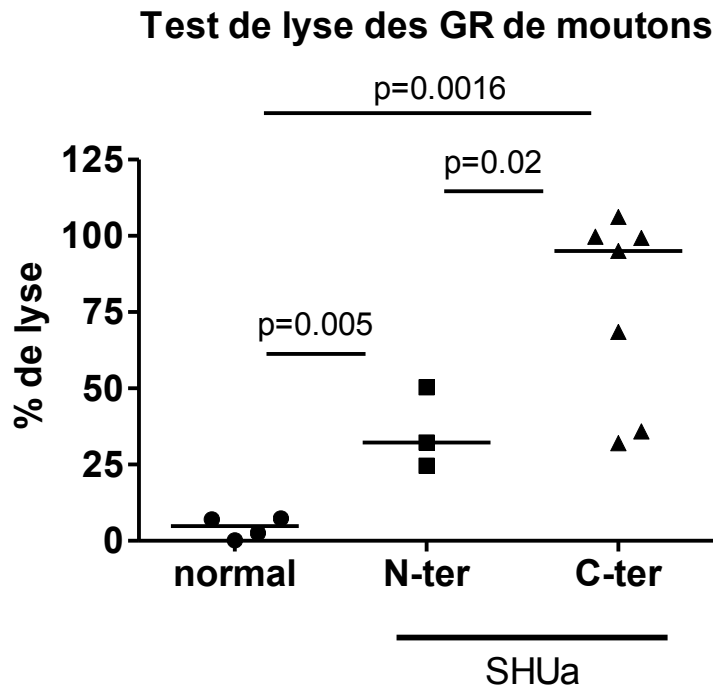


Figure 24 : Analyse du pourcentage de lyse des GR de Moutons en fonction de la localisation de la mutation de CFH.

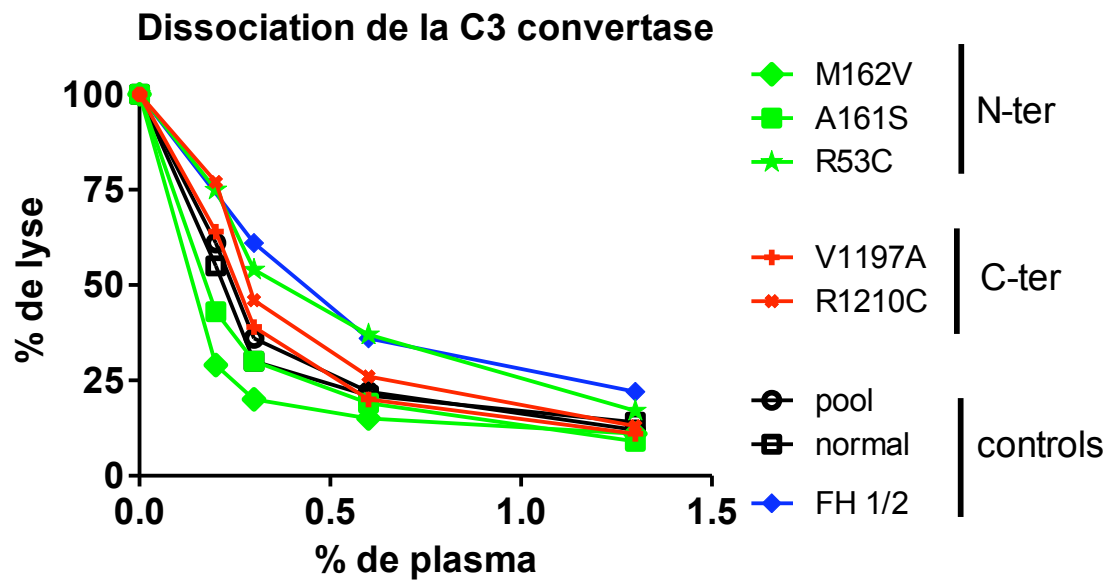


La lyse des globules rouges de moutons est minimale quelque soit la dilution avec des plasmas issus de donneurs sains ou provenant du pool. La lyse des GR de moutons en présence de plasma des patients ayant une mutation dans la partie C terminale est significativement supérieure à la lyse des plasmas de donneurs sains ($p=0.0016$) et à celle des patients ayant une mutation dans la partie N terminale ($p=0.02$). Les patients ayant une mutation dans la partie N terminale du CFH ont une lyse des GR de moutons significativement plus importante que celle des plasmas issus de donneurs sains ($p=0.005$) mais inférieure à celle des plasmas de patients ayant une mutation de la partie C terminale (Figure 24).

1.6.2 Etude de la dissociation de la C3 convertase

Pour tester la capacité du facteur H à dissocier une C3 convertase à la surface des globules rouges de mouton, des globules rouges de mouton préalablement recouverts de C3b sont incubés avec du facteur B et D dans un tampon GVB Mg^{++}/Ca^{++} permettant le clivage du facteur B et la formation de la C3 Convertase alterne. Des dilutions de plasma issus de patients ayant une mutation du facteur H et des plasmas issus de donneurs sains sont ensuite ajoutés. Après 30 min au bain marie en agitation, le sérum de rat contenant le C5, C6, C7, C8, C9 dans un tampon GVB-EDTA est ajouté. Après 45 min à 37°C, la réaction est stoppée et l'hémolyse des GR est mesurée et comparée aux plasmas normaux. Le FH dissocie la C3 convertase. Si la fonction est préservée, il n'existe donc pas de formation de C5 convertase et donc pas de lyse des GR. Les plasmas des patients incapables de dissocier la C3 convertase lysent leurs globules rouges de mouton dans cet essai (Figure 25).

Figure 25: Test de dissociation de la C3 convertase



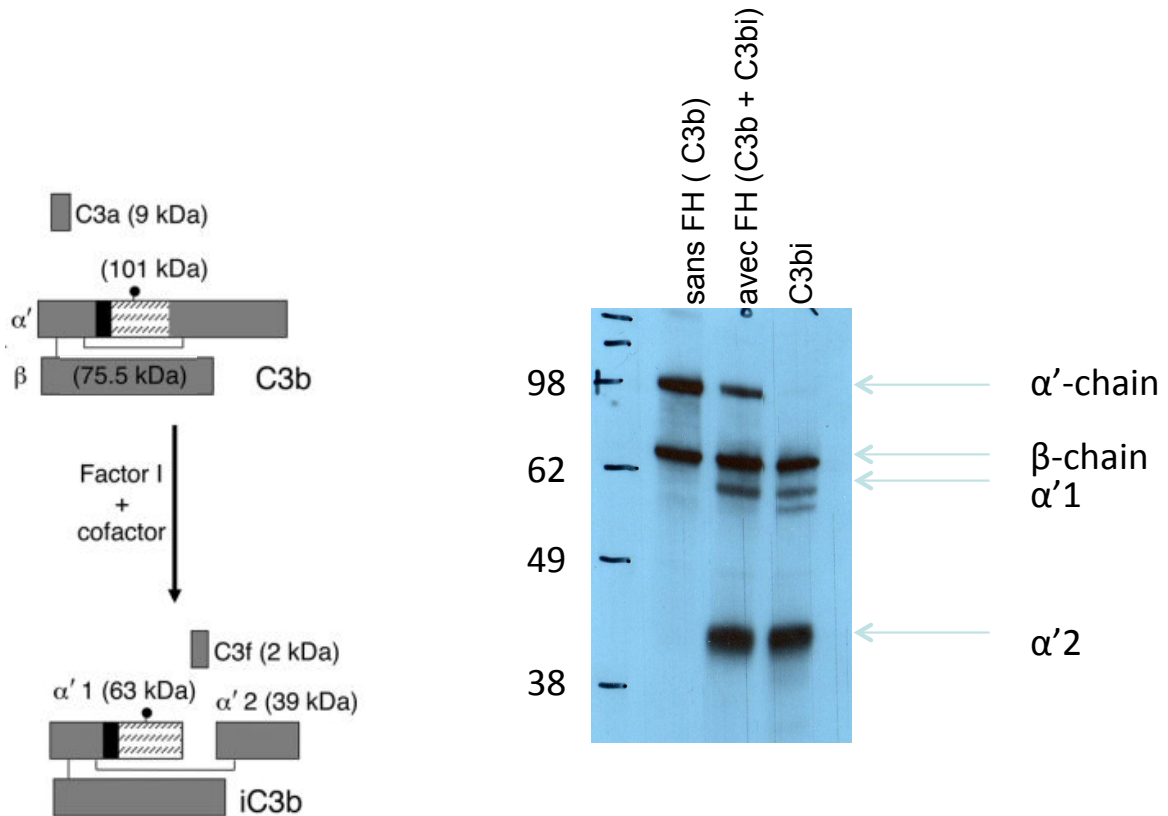
La dissociation de la C3 convertase est perturbée uniquement chez le patient porteur de la mutation R53C située dans le SCR1 dans la partie N terminale du FH et est comparable à celle d'un déficit plasmatique de 50% du FH. Les deux patients porteurs de la mutation M162V et A161S ont une fonction de dissociation préservée.

1.6.3 Etude de l'activité cofacteur du Facteur I

Le FH, en phase fluide, agit en tant que cofacteur du FI qui ensuite clive le C3b. Le FI coupe la chaîne α' de 110 kDa du C3b libérant un fragment α de 43 kDa et produit ainsi le iC3b.

Figure 26 : a) Représentation schématique du clivage du C3 en présence du Facteur I et d'un cofacteur (FH, MCP)²⁴⁷

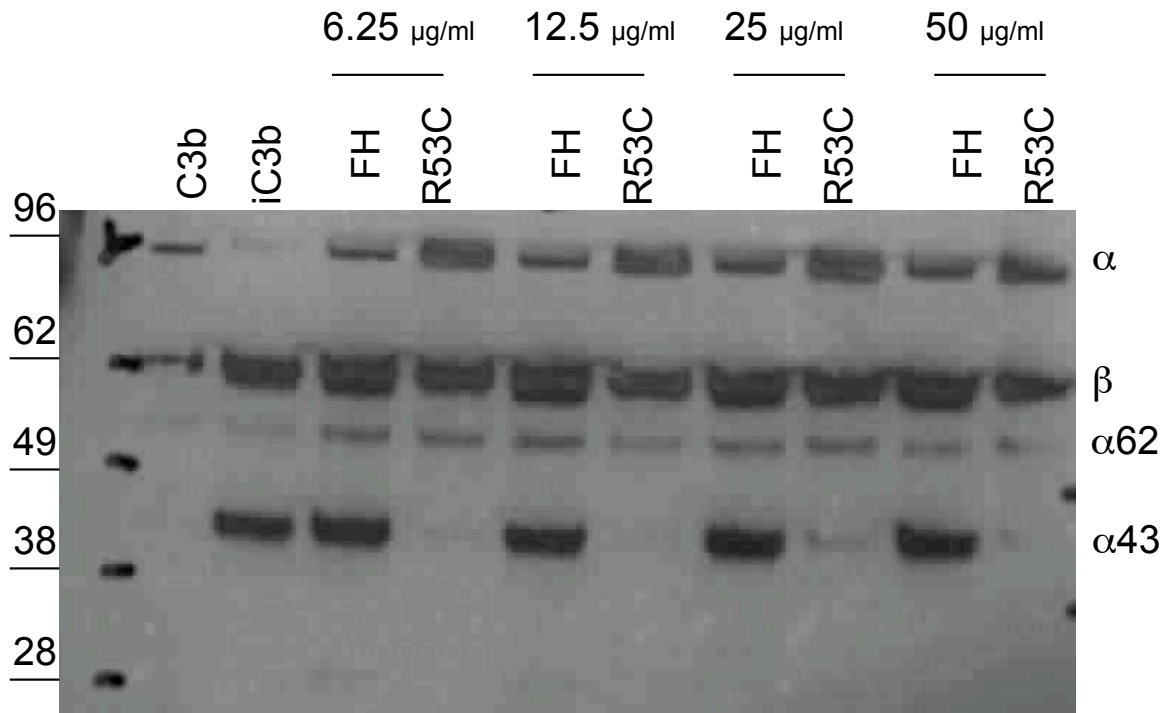
b) Western Blot du clivage de C3 en présence et en l'absence du FH.



Le clivage du C3b par le FI en présence de FH purifié, à partir du plasma de patients ayant une mutation du CFH et de donneurs sains (contrôle positif) est étudié. Le Facteur H normal et R53C sont incubés à différentes concentrations, avec du FI et du C3b purifiés (20 et 100 ng respectivement), pendant 30 minutes à 37°C. Après arrêt de la réaction, avec du NuPage, sample buffer (Invitrogen) en condition réductrice, un Western-blot a été effectué et les fragments de clivage du C3 ont été révélés par un anticorps de chèvre anti-C3 polyclonal (Calbiochem, France) et par un anticorps secondaire anti-chèvre couplé à l'enzyme HRP. Du C3bi purifié (100 ng, Calbiochem, France) permet de contrôler la taille des fragments de clivage de C3. En présence du FH muté, le R53C, quelque soit la concentration, le FI ne clive pas le C3b en C3bi. Le FH muté ne joue plus son rôle de cofacteur (Figure 25).

Figure 25 : Test cofacteur de clivage de C3

Réalisation d'un western Blot en présence du FH muté R53C dans la partie N terminale



le test cofacteur du clivage de C3b en C3bi a été réalisé à partir d'un plasma de donneur sain et un patient ayant la mutation homozygote R53C. Une concentration fixe de FI et C3b a été incubée avec des concentrations croissantes de FH. Après une incubation de 30 min, la réaction a été arrêtée et les fragments de clivage de C3 ont été étudiés.

Table VII : Conséquences fonctionnelles des mutations de FH de type II

Mutations	Localisation	Conséquences fonctionnelles	Références
p.R53C	SCR1	Diminue la liaison au C3b et l'activité de dissociation de la C3 convertase	nouvelle, Pechtl ²⁴⁸
p.A161S [□]	SCR3	Diminue la liaison au C3b, ne perturbe pas l'activité de dissociation de la C3 convertase	Sellier-Leclerc ¹⁴⁴ Fakouri ²⁰³
p.M162V [□]	SCR3	Diminue la liaison au C3b, ne perturbe pas l'activité de dissociation de la C3 convertase	Nouvelle mutation
p.S411T	SCR7	Non connue	Nouvelle mutation
p.R582H p.Y1177C [□]	SCR10 SCR20	Non connue Diminue la liaison au C3b	Nouvelle mutation Nouvelle mutation
p.S1191L	SCR20	Diminue la liaison au C3b et à la cellule endothéliale, défaut de protection des cellules	Richards ²⁴⁹ Heinen ²⁵⁰ Sellier-Leclerc ¹⁴⁴ Sullivan ²⁴⁴
p.R1210C	SCR20	Défaut de liaison du FH au C3b et à la surface des cellules. Considéré comme un SNP rare.	Sanchez-Corral ^{117,251} Martinez-Barricarte ¹³⁷
p.V1197A	SCR20	Diminue la liaison au C3b et à la cellule endothéliale, défaut de protection des cellules	Richards ²⁴⁹ Heinen ²⁵⁰ Noris ⁹² Sullivan ²⁴⁴
CFH hybrid	FH/CFHR	Inefficacité de liaison au C3b et à la surface des cellules endothéliales entraînant un défaut de protection des cellules contre le complexe d'attaque membranaire.	Heinen ²⁵⁰ Venables ¹¹¹ Kird ²⁵²

[□] Données nouvelles

Parmi les trois patients ayant une mutation fonctionnelle de CFH dans la partie N terminale

sans déficit plasmatique, seul le patient ayant la mutation R53C a fait une récurrence en post-transplantation.

1.7 Facteurs environnementaux

La reprise retardée de la fonction rénale définie par le besoin d'au moins une séance de dialyse dans les 7 jours qui suivent la transplantation rénale est associée à un risque de perte de greffon plus importante (RR=2,6 (1,05-6,45) ; p=0,04) en analyse multivariée.

Trente pourcent des transplantations rénales se sont compliquées d'un rejet, soit cellulaire, (24% 17/71) soit humoral (7%, 5/71). Même si le nombre de rejet est important, il n'est pas associé à une perte significative de greffon. Soixante pourcent des rejets surviennent en même temps que la récurrence.

L'âge du donneur, le rejet aigu, la prise d'anticalcineurine, la reprise retardée de la fonction rénale, facteurs environnementaux susceptibles d'augmenter le risque de récurrence, ne sont pas associés à un risque de récurrence en analyse uni et multivariée.

En revanche, l'utilisation des inhibiteurs de m-Tor tend à être significativement associée à un risque de récurrence (RR=2,1 (0.99-4.79) ; p=0,059).

1.8 Discussion

La survie des greffons est conditionnée par la récurrence de SHU atypique, facteur de risque majeur de perte de greffon. La survie des greffons est de 30% à 5 ans chez les patients ayant eu une récurrence et de 70% chez les patients n'ayant pas eu de récurrence. La fréquence de la récurrence est très élevée puisque 68% des transplantations se sont compliquées d'une

récidive.

L'enjeu essentiel est de déterminer les facteurs de risque de récurrence dans cette population afin de mieux les prévenir. Le SHU atypique est une maladie liée à une dysfonction aiguë de la cellule endothéliale secondaire à une activation incontrôlée du complément à l'origine du phénomène de « *micro-thrombose* » définissant une microangiopathie thrombotique.

Chez ces patients ayant présenté un SHU atypique, la transplantation rénale rend la compréhension de la physiopathologie de la récurrence de la maladie sur le greffon complexe. En effet, un certain nombre de facteurs déclenchants peuvent être liés à la transplantation : ischémie-reperfusion, traitements immunosuppresseurs, rejet aigu, infections opportunistes comme le CMV, autant de triggers pouvant également activer les cellules endothéliales.

Je discuterai successivement, les anomalies du complément associées à la récurrence de SHU atypique, l'intérêt de l'analyse fonctionnelle des mutations, les triggers spécifiques de la transplantation et l'implication d'une dérégulation de la voie alterne du complément dans les pathologies liées à la transplantation : ischémie froide et rejet.

1.8.1 Anomalies du complément associées à la récurrence de SHU atypique

La présence d'une anomalie génétique de la voie alterne du complément augmente par trois le risque de récurrence. Une mutation dans un des six gènes à risque est retrouvée dans 68% de la cohorte et dans 78% de la cohorte lorsque l'on y associe l'haplotype de CFH (*gtgt*) à risque. Les anomalies génétiques les plus fréquemment associées au SHU atypique quelques soient les séries publiées (Italie et France) sont les mutations du CFH, suivi du MCP, du CFI, du C3. Des mutations de la Thrombomoduline ont été identifiées uniquement dans le registre italien⁹². Les mutations du CFB, quelque soit la cohorte étudiée sont très rares puisqu'elles sont retrouvées dans moins de 2% des cas.^{92,100}.

Dans notre étude, le risque génétique est différent en fonction des mutations retrouvées. En

effet, les patients porteurs d'une mutation dans le facteur CFH ont un risque 5 fois plus important de récurrences en comparaison des patients n'ayant ni mutation ni haplotype de CFH à risque. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature. En effet, sur les 42 patients transplantés avec une mutation du FH publiés, 32 (86%) ont présenté une récurrence⁹². Le « hot spot » des mutations du FH, responsable du SHU atypique, est situé dans la partie C terminale du CFH²³¹. Dans notre cohorte, 50% des mutations sont responsables d'un dysfonctionnement de la partie C terminale du FH. Nos résultats montrent que les patients ayant une mutation dans le SCR20 ou un réarrangement homologue non allélique responsable d'une modification de la partie C terminale du FH ont le risque le plus élevé de présenter une récurrence précoce et une perte de greffon. La fréquence des réarrangements complexes du facteur H est nettement plus élevée dans la cohorte des patients transplantés, en comparaison des cohortes des patients (adultes et enfants) ayant un SHU atypique (15% vs 4.5%) sur rein natif. L'augmentation de ces anomalies génétiques à risque, chez les patients transplantés, est représentatif de la sévérité de la maladie sur le rein natif responsable de la perte de fonction rénale. Les réarrangements complexes et les mutations du SCR 20 sont responsables d'un déficit fonctionnel du FH, entraînant un défaut de liaison à ses ligands le C3b et les GAG à la surface de la cellule endothéliale¹¹³ et donc un défaut de protection de la cellule endothéliale.

Le test fonctionnel de lyse des globules rouges de moutons visualise « in vitro » le défaut de protection des membranes. Les plasmas des patients avec une mutation au niveau du SCR20 du Facteur H ont la lyse des GR la plus importante. L'ancrage du FH via les GAG est donc essentiel pour la protection des cellules. Dans ces mutations, il n'est pas suffisant. Le plasma du patient ayant la mutation R53C, en N terminale a une lyse des GR importante, suggérant que la liaison du SCR1 du Facteur H participe à la stabilisation du complexe C3b/CFH au niveau des tissus . Les fonctions du FH assurées par la partie N terminale sont la

dissociation de la C3 convertase, et l'activité cofacteur de C3b par FI. Ces fonctions sont perturbées avec le plasma du patient porteur de la mutation R53C. Il a présenté une récurrence en post-transplantation rénale. Les analyses fonctionnelles sont donc très importantes et doivent compléter l'étude génétique afin d'établir le profil de risque de récurrence selon l'anomalie génétique trouvée. Les autres mutations du FH sont secondaires à un déficit quantitatif dans 40% des cas. Il n'y a pas de différence significative de risque de récurrence en fonction du type de mutation (I ou II).

Les mutations du CFB et C3 sont également responsables d'une récurrence très importante plus de quatre fois supérieure à celle mesurée parmi les patients n'ayant pas de mutation. Les mutations C3 décrites dans la cohorte sont responsables de la perte de l'activité du cofacteur du MCP⁹⁹, ou de la résistance à la dissociation par le facteur H¹²⁸. La récurrence survient chez trois des quatre patients de notre cohorte alors que seulement deux patients sur sept ont eu une récurrence dans la littérature⁹². Les deux patients décrits ayant une mutation du FB, ont eu une récurrence et une perte de greffons. Un des deux patients déjà rapporté dans la littérature¹⁰⁰ a une mutation (Asp279Gly) entraînant la formation d'une « hyper C3 convertase » responsable de l'absence de dissociation en présence de FH. Celle-ci entraîne une formation importante de C3b participant à la formation du complexe d'attaque membranaire, la lyse de la cellule et la récurrence du SHU. Les mutations du CFB sont rares, et peu rapportées dans la littérature, cependant elles sont décrites comme étant à très haut risque de récurrence. Les tests fonctionnels sont nécessaires à chaque fois que cela est possible car une mutation n'est pas toujours à l'origine de conséquences fonctionnelles. Très récemment, il a été montré que la mutation CFB, la Val455Ile présente chez le deuxième patient ayant une mutation combinée de CFB et CFI, n'avait pas de conséquence fonctionnelle (donnée non publiée)

De nombreuses études suggèrent que les patients ayant des mutations de FI ont le même risque de récurrence que les patients ayant une mutation du FH^{92,231,253}. Dans notre cohorte, les patients porteurs d'une mutation du CFI ont significativement un risque de récurrence moins important par rapport à celui des patients ayant une mutation de CFH. Ce risque est plus élevé que celui des patients n'ayant ni mutation ni polymorphisme (non significatif). Dans cette cohorte, la délétion CFHR1 associée ne semble ne pas être un facteur additionnel de sévérité, en sachant que l'effectif de ce groupe est restreint puisque trois patients ayant une mutation du CFI ont une délétion CFHR1 associée, ¹²². Plus de 50% des patients ayant une mutation de CFI ont une ou plusieurs anomalies génétiques associées, comme une mutation de CFH ou de MCP. Le nombre important de mutations combinées, a été rapporté récemment chez les patients ayant une mutation de CFI et de MCP¹²³. Compte tenu du faible effectif de patients ayant une mutation du FI, il est difficile de définir des sous-groupes de patients à risque selon les nombres d'anomalies génétiques présentes. Il a été bien démontré sur le rein natif que l'addition d'un haplotype à risque de CFH (gtgt), MCP (ggaac) chez les patients ayant une mutation de C3⁹⁴, CFH, CFI augmentent le risque de développer la maladie¹²³.

Dans notre cohorte, deux des trois patients ayant une mutation isolée de MCP (*membrane cofactor protein*; CD46) ont une récurrence inattendue de SHU sur le greffon. Le MCP est une protéine transmembranaire produite par les cellules endothéliales locales. Le MCP est un cofacteur du FI membranaire. En présence du FI, il dégrade le C3b en C3bi produit inactif, ce qui ne permet pas la formation d'une C3 convertase. Lors d'une greffe, le MCP produit par les cellules endothéliales du greffon est apporté par le donneur. Chez ces patients transplantés pour un SHU atypique associé à une mutation de MCP isolée, conformément aux premiers cas publiés²⁵⁴, le pronostic attendu de la transplantation rénale est excellent. Un de ces deux patients de la cohorte ayant récidivé a fait l'objet d'une publication²⁵⁵ et le

mécanisme évoqué pour expliquer la récurrence était un microchimérisme rénal, se traduisant par la présence de cellules endothéliales du receveur dans le greffon. Celui-ci a été démontré par le marquage HLA A10 de classe I à la surface des cellules endothéliales positif, seul le receveur était HLA A10. Le rôle microchimérisme rénal a souvent été recherché en transplantation rénal pour expliquer les rejets, la tolérance. Des études assez récentes montrent que le microchimérisme endothélial est marginal et que les cellules endothéliales du receveur ne représentent pas plus de 10% des cellules endothéliales du greffon^{256,257}. Ce microchimérisme endothéliale n'augmente pas lors d'une microangiopathie thrombotique et de la reconstitution de l'endothélium²⁵⁸. Il est donc très peu probable que celui-ci explique à lui seul la récurrence de SHU atypique.

Dans cette étude, le risque de récurrence est variable selon les anomalies génétiques retrouvées. Les mutations des protéines plasmatiques FH, C3, FB sont à très haut risque de récurrence. Les patients porteurs d'une mutation de CFI ont un risque de récurrence moins important que les patients porteurs d'une mutation de CFH. Les patients ayant une mutation de MCP n'ont pas un pronostic différent des autres patients, en présence de l'haplotype à risque. L'haplotype à risque du CFH est associé à un risque de récurrence, soit chez les patients porteurs de l'haplotype CFH à risque de façon isolé, soit chez les patients porteurs de MCP. L'ensemble de ces données permet d'isoler un groupe à plus faible risque de récurrence, les patients sans mutation ni haplotype de CFH à risque et souligne la nécessité de rechercher l'haplotype CFH à risque modulant la sévérité de la maladie, et la nécessité d'établir une cartographie complète des anomalies génétiques chez les patients. Très récemment, le groupe Italien a confirmé que l'haplotype de CFH et de MCP ainsi que l'augmentation du nombre de mutations augmentent le risque de faire un SHU atypique sur le rein natif¹²³.

En post-transplantation rénale, l'impact de l'haplotype à risque du CFH sur le risque de récurrence reste à confirmer sur une plus grande série de patients. A ce jour il n'existe pas de données fonctionnelles comparant les différents haplotypes du Facteur H. Ce travail pourra être effectué avec les prélèvements des patients présentant les haplotypes de CFH sous la forme homozygote.

Chez les patients ayant une mutation de CFI, il faudra mieux définir ceux à risque de récurrence, en fonction des conséquences fonctionnelles des mutations identifiées .

Une analyse des gènes du donneur est également nécessaire. Dans le contexte particulier de la greffe, de vulnérabilité de la cellule endothéliale, il est possible que les variants et mutations des protéines membranaires de MCP et de la thrombomoduline augmentent le risque de récurrence et/ou favorisent la survenue de la MAT de novo.

Trente pourcent des patients n'ont pas de mutation ; seuls 20% d'entre eux ont une récurrence. La MAT peut être retrouvée dans le syndrome des antiphospholipides²⁵⁹, le lupus érythémateux disséminé⁸⁵, l'hypertension artérielle maligne, la glomérulonéphrite à un stade terminale responsable de MAT secondaire, la néphropathie à IgA^{85,259,260}, la GNMP²³⁷. Le diagnostic de SHU atypique repose entre autre sur l'élimination de ces causes secondaires de MAT, avant l'inclusion.

Chez ces 30% des patients transplantés pour un SHU atypique et n'ayant pas de mutations, il est donc nécessaire de poursuivre la recherche de nouveaux gènes, de polymorphismes candidats pouvant être impliqués dans le SHU atypique. Le panel des anomalies génétiques potentielles associées au SHU atypique s'élargit puisque récemment des mutations de

DGKE, non complément-dépendante ont été mises en évidence.

Mieux définir, caractériser les anomalies génétiques est un des enjeux majeurs puisqu'il permettra d'établir une corrélation entre le génotype et le phénotype, de définir un risque génétique de récurrence et d'établir une prise en charge individuelle avant la transplantation rénale.

1.8.2 Facteurs environnementaux : triggers potentiels

L'histoire naturelle du SHU atypique montre que la pénétrance de la maladie est de 50% et que les anomalies génétiques sont nécessaires mais insuffisantes pour créer la maladie. Elles sont considérées comme des facteurs de risque majeurs. L'association de plusieurs facteurs génétiques, de triggers (infection, grossesse) est retrouvée dans plus de 30% des cas^{91,123}. De plus, la première poussée de SHU atypique peut survenir tout au long de la vie, des premiers jours de vie à 85 ans. Plus de 50% des découvertes de la maladie surviennent à l'âge adulte⁹¹ quelque soit la mutation. L'histoire naturelle en post-transplantation rénale est différente puisque 70% des récurrences de SHU atypique surviennent dans la première année en post-transplantation rénale, 50% dans les trois premiers mois. Ceci souligne que la transplantation rénale crée un milieu où les facteurs potentiels d'agression de la cellule endothéliale se combinent au risque génétique.

Le retard de reprise de la fonction rénale, est associé dans notre étude à un risque plus important de perte de greffon. Elle traduit des phénomènes d'ischémie-reperfusion dus à l'ischémie froide et/ou la mort encéphalique. Ces phénomènes sont responsables d'une augmentation de l'inflammation locale, de lésions tubulo-interstitielles et de lésions de l'endothélium glomérulaire et artériolaire. De plus en plus de données soutiennent l'idée que

l'activation de la voie alterne du complément joue un rôle central dans ces phénomènes d'ischémie-reperfusion. En effet, la mort encéphalique est responsable d'une augmentation du C5a circulant et d'une augmentation de l'expression du récepteur C5a dans le rein, responsable d'une diminution de la survie rénale²⁶¹. L'augmentation de l'expression des gènes du complément (C3, C6) dans le rein lors de la réalisation de biopsies pré implantatoires est également retrouvée²⁶². La surexpression de ces gènes, notamment de la voie alterne du complément, et l'augmentation du sC5b-9 mesuré dans la veine rénale²⁶³ après reperfusion sont associées à une diminution de la survie des greffons au long cours. Chez la souris, le blocage du RC5a par un inhibiteur ou gène silencieux (siRNA/RC5A) protège de l'ischémie-reperfusion et améliore la survie des greffon²⁶⁴. L'ischémie-reperfusion est responsable d'une souffrance des cellules endothéliales. Le glycocalyx endothélial est dégradé dans ces phénomènes d'ischémie-reperfusion²⁶⁵ empêchant la fixation du FH et la dégradation des dépôts C3b en iC3b à la surface des cellules endothéliales. L'expression des protéines membranaires le MCP et Thrombomoduline, cofacteur du FI peut être diminuée^{94,266}. Les cellules endothéliales, hypoxiques, activées, libèrent des cytokines proinflammatoires, des substances procoagulantes favorisant la formation des thrombus (p-selectine, le facteur von Willebrand des cytokines). L'ensemble des ces changements sont propices à la survenue d'une récurrence de SHU atypique précoce.

Dans notre étude, trente pourcent des patients ont un rejet cellulaire ou humoral. La moyenne des rejets chez les patients transplantés tout confondu est de 10-15% avec la trithérapie classique (anticalcineurines, MMF, corticoïdes) ²⁶⁷. Dans notre étude, la moitié des rejets sont contemporains de la récurrence. D'autres publications ont déjà retrouvé une augmentation de l'incidence des rejets dans cette population spécifique^{268 269}.

D'autre part, 13% des patients ayant un rejet humoral ont de la *MAT* associée. La

dérégulation de la voie alterne du Complément et l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires, dans un modèle d'ischémie-reperfusion contribuent au rejet cellulaire²⁷⁰ et humoral²⁴⁷. La nécrose tubulaire induite par un défaut de régulation des contrôles des protéines du complément ²⁷¹contribue à une augmentation des rejets. Il est difficile dans cette étude rétrospective de conclure au rôle majeur de la dérégulation de la voie alterne dans l'augmentation de l'incidence des rejets puisque certains patients ont eu une baisse ou un arrêt des traitements immunosuppresseurs type anticalcineurines. Cependant, les données expérimentales montrent à présent un véritable lien entre dérégulation de la voie alterne du complément et l'activation des lymphocytes T alloréactifs²⁷², et l'augmentation de la production d'anticorps induisant la stimulation des lymphocyte B alloréactifs²⁷³. Ces informations indiquent que ces patients doivent être considérés à haut risque immunologique et en aucun cas le traitement immunosuppresseur ne doit être allégé.

Les infections virales à CMV, virus influenza, H1N1, parvovirus B19, BK virus peuvent être responsables d'une MAT de novo ou associées à une récurrence de SHU²⁷⁴⁻²⁷⁸. L'implication de ces virus peut-être considérée comme un trigger de SHU par toxicité directe sur la cellule endothéliale²⁷⁹.

Les anti-calcineurines (ciclosporine et tacrolimus), trépied de la trithérapie donnée aux patients ayant une transplantation d'organes sont responsables de MAT. Selon les séries publiées, la MAT est présente entre 1%²³⁶ à 10%, dans l'analyse des biopsies rénales des patients transplantés d'un autre organe²⁸⁰. Des conversions des anticalcineurines aux inhibiteurs de M-Tor ont été faites avec succès chez des patients ayant eu un échec de la première transplantation due à une MAT²⁶⁸. Dans notre étude, nous n'avons pas montré de relation entre la récurrence de SHU atypique et l'utilisation des anti-calcineurines (p=0.3)

contrairement aux données de la littérature^{236,281,282}. En revanche, nous avons montré que 30% des patients qui présentaient une MAT de novo ou un SHU de novo, avaient un facteur génétique favorisant puisqu'une mutation de CFH ou de CFI a été retrouvée chez 7 des 24 patients²³⁷. L'utilisation ou le switch aux inhibiteurs de M-Tor doit être réalisé avec prudence car les inhibiteurs de M-Tor (anti-VEGF) ont été décrits comme responsables de MAT chez les patients transplantés du rein^{283,284} ou d'autres organes^{285,286}. D'autre part, l'incidence des rejets est plus élevée chez les patients transplantés et bénéficiant d'un régime par inhibiteur de M-Tor. Compte tenu du risque plus important de rejet et de l'absence de bénéfice retrouvé, les inhibiteurs de M-Tor ne paraissent plus être une immunosuppression adaptée.

L'ensemble de ces données permet d'établir une stratégie thérapeutique en fonction du risque de récurrence principalement génétique. En fonction du risque, les traitements prophylactiques par plasmathérapie ou anti-C5 doivent être considérés¹⁵⁴.

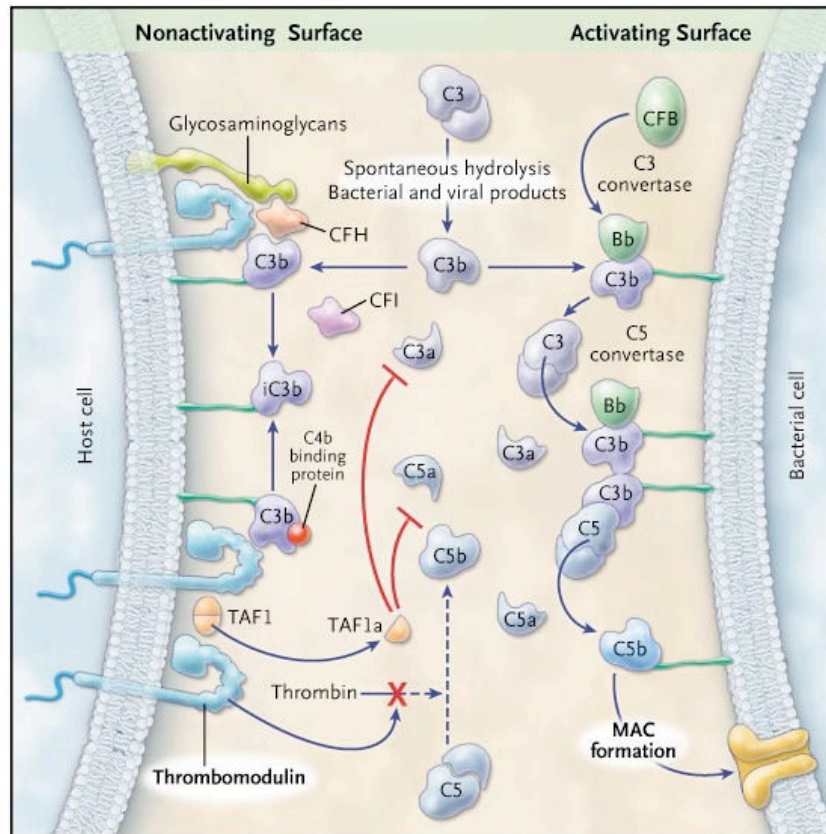
Chez les patients ayant un risque génétique très élevé, patients ayant une mutation du FH, C3, FB, un traitement préventif par Eculizumab paraît adapté. Chez les patients ayant un risque intermédiaire ou faible, il se discute une prophylaxie par plasmathérapie. La durée du traitement n'est pas définie mais elle doit couvrir la période à très haut risque, c'est à dire la première année de transplantation. Les anti-calcineurines, ne doivent pas être arrêtés dans cette population spécifique considérée à haut risque de rejet. Les grossesses, infection virales ou rejet sont des triggers potentiels et considérés comme des périodes à haut risque de récurrences.

1 SHU atypique non lié à une anomalie d'une protéine du complément

1.1 La thrombomoduline

Les mutations du gène de la Thrombomoduline (THBM) associées au SHU atypique ont été décrites pour la première fois en 2009 par le groupe Italien¹⁰⁵. Avant cette découverte, les anomalies génétiques retrouvées dans le SHU atypique étaient des mutations ou variants des protéines de régulation ou des composants de la C3 convertase^{59,100,103,135}. La Thrombomoduline (TM) était connue par ses propriétés anticoagulantes. C'est une protéine membranaire présente à la surface des cellules endothéliales qui fixe la thrombine et la rend anticoagulante. Elle augmente les capacités de la thrombine à activer la Protéine C. Elle bloque également la capacité de la thrombine à activer les plaquettes. Des nouvelles fonctions anti-inflammatoires de la thrombomoduline ont été décrites et notamment son implication dans la régulation de la voie alterne du complément ; elles sont résumées ci-dessous (figure 26). Le rôle des mutations du domaine de la lectine de thrombomoduline potentialise la *MAT*²⁸⁷ chez des souris exposées aux toxines de SHU typique.

Figure 26 : Rôle de la thrombomoduline dans le contrôle de la voie alterne du complément¹⁰⁵



La thrombomoduline, protéine membranaire des cellules endothéliales accélère la dégradation de C3 par le Facteur I, en présence du facteur H ou de C4 *binding protein* (C4BP). En se liant à la thrombine elle empêche l’activation du C5b, et elle favorise la formation du carboxypeptidase B (TAFIa) qui inactive le C3a et C5a.

J’ai mis au point et effectué le séquençage du gène de la thrombomoduline pour tous les patients de la cohorte(*THBM*). L’étude a été réalisée à partir d’ADN génomique extrait des cellules sanguines circulantes, par séquençage direct après amplification par “ Polymérase Chain Reaction ” (PCR). Les quatre exons du gène codant pour la Thrombomoduline ont été amplifiés par PCR en utilisant des amorces nucléotidiques situées dans les régions

introniques adjacentes et choisies d'après la séquence déposée dans les banques (*Table VIII*). La purification des fragments amplifiés a été faite en microplaques (Millipore, France), à partir de 50 ng de cDNA, de Taq polymérase 0.2, le cycle réalisé est de 94°C pendant 5 minutes suivie de 35 cycles à 94°C, 60°C pendant 30 sec et 72°C pendant 45 secondes puis 7 minutes. Les produits d'amplification ont été séquencés en sens (5'→3') et en anti-sens (3'→5') à l'aide de la technique "Dye terminator Cycle sequencing" (Applied biosystems, Courtaboeuf, France) et du séquenceur 96 capillaires ABI Prism 3700 (Applied biosystems) mis à disposition par le Service de Génétique Moléculaire de l'Hôpital Européen Georges Pompidou. Les séquences ont été analysées grâce au logiciel Sequencher.

Table VIII : Amorces de PCR pour le séquençage de la Thrombomoduline

Exons	Sequences Primers		Température (°C)
	Sens 3' - 5'	Anti-sens 5' - 3'	
1	AGAACCCAGCAATCCGAGTAT	CAGTAGCAAGGAAATGACATC	60°C
2	CAACATGCTTGGGGTCCTGGT	CGCGGTGCACATTAGCTGTAA	60°C
3	CTTCCTCTGCGAGTTCCACTT	TCGATGTCCGTGCAGATGAAA	60°C
4	AACCAAAGCTAGCTACCTCTGC	TAAGGTGCTTTGGTAGCAAAG	60°C

Aucune mutation n'a été retrouvée dans la cohorte.

Deux patients sont porteurs du variant rare A43T de la Thrombomoduline. Ce variant a aussi été rapporté par le groupe Italien dans la cohorte de SHU atypique. Il est situé dans le domain lectin-like de la protéine. L'analyse du dépôt de C3bi à la surface des cellules CHO-K1, mesuré en cytométrie de flux a été réalisé à partir d'un sérum de patients porteur du variant A43T et d'un sérum de donneur sain. Le dépôt de C3bi à la surface des cellules est moins important chez le patient porteur du variant de la thrombomoduline. Le clivage de C3b en iC3b, en présence de CFH et CFI est diminué en présence du variant A43T de la

thrombomoduline mesuré par Western blot. De plus, ce variant diminue la synthèse de TAFI, inhibiteur du C3a et C5a¹⁰⁵. Dans la cohorte italienne, ce variant a été retrouvé chez un patient de 24 ans ayant présenté un SHU atypique récidivant dans l'enfance. Quatre de ces huit sœurs ont présenté un SHU atypique, trois d'entre elles sont décédées. Ce variant de la thrombomoduline a aussi été associé à un risque accru de thrombose veineuse et d'infarctus du myocarde^{288,289}. En post-transplantation, un patient ayant une mutation isolée de la thrombomoduline a présenté deux récurrences et une perte de greffon²⁹⁰. Le lien du variant A43T et le SHU atypique est très discuté. En effet, le variant A43T n'est pas transmis avec la maladie dans deux formes familiales de SHUa.

Les deux patients de la cohorte, ayant le variant A43T de la THBM ont tous les deux récidivé et perdu leurs greffons. Ces deux patients cumulent une autre anomalie génétique, l'un est porteur d'un variant ultra rare de C3 Arg592Gln connu pour être responsable d'une diminution de l'activité cofacteur de MCP⁹⁹ et l'autre est porteur d'une mutation du FH dans le SCR14 (C864S) dont les conséquences fonctionnelles ne sont pas connues.

L'expression membranaire de la Thrombomoduline sur les cellules endothéliales et donc l'apport du greffon corrige le défaut de thrombomoduline, ce qui a priori prédit un risque faible de récurrence pour les patients ayant une mutation de la thrombomoduline¹⁰⁵. Cette hypothèse reste à confirmer en étudiant le devenir des patients transplantés de la cohorte beaucoup plus large européenne. Le rôle de la thrombomoduline soluble et du microchimérisme rénal restent à définir dans la survenue de la récurrence. Ces considérations sont probablement toutefois marginales compte tenu de la faible fréquence de mutations de la thrombomoduline dans les différentes séries de SHU atypique européennes.

En revanche, l'expression de la thrombomoduline est diminuée à la surface des cellules

endothéliales qui souffrent. Lorsque celles-ci sont traitées par des shiga toxines, les shiga toxines font excréter les corps de weibel palade qui contiennent le facteur prothrombotique vWF, la P-sélectine qui est un ligand du C3b et des marqueurs proinflammatoires qui permettent le recrutement des cellules inflammatoires des plaquettes et du TFA (enzyme qui coupe la thrombomoduline)²⁹¹. Ces données in vitro ont également été retrouvées lorsque les cellules endothéliales étaient exposées à l'hème⁹⁴. In vivo dans un modèle de rat transplanté rénal, ayant une souffrance des cellules endothéliales induites par une ischémie, la thrombomoduline est également diminuée²⁶⁶.

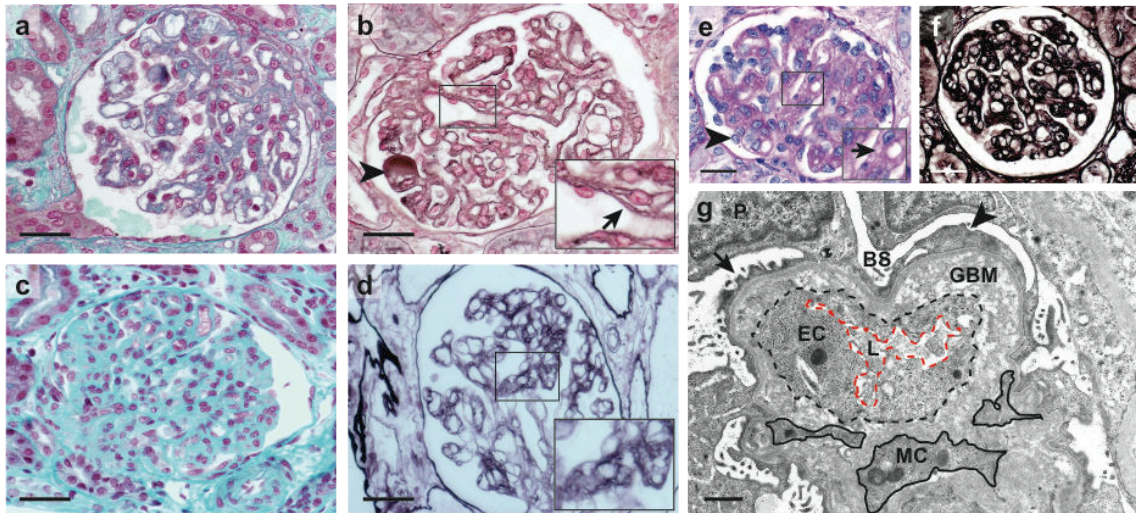
La thrombomoduline recombinante est une thérapeutique potentielle. Elle a permis la régression de la *MAT* chez trois patients ayant une SHU²⁹² et un patient ayant une néphropathie lupique²⁹³. Cette thérapeutique pourrait être employée quelque soit la cause de *MAT* indépendamment des mutations.

1.2 SHU atypique associé a des mutations de DGKE

L'identification des mutations de DGKE associées au SHU atypique a récemment été rapportée par notre équipe en collaboration avec l'équipe de Richard Lifton à Yale¹⁰⁶. La transmission de la maladie est autosomique récessive. Les mutations sont soit homozygotes, soit hétérozygotes composites. Tous les patients ont présenté un SHU atypique avant l'âge de un an ; l'évolution a été marquée par des rechutes et une insuffisance rénale terminale vers 20 ans. Seul un patient n'avait pas d'hématurie microscopique et de protéinurie persistante après le premier épisode de SHU atypique.

Les patients ayant une mutation de DKGE ont tous un C3 plasmatique normal. Les biopsies rénales des patients montrent la présence d'un signe de *MAT* chronique. Les mutations mises en évidence sont toutes nouvelles et rares. La pénétrance de la maladie à un an est de 100%.

Figure 27 : Biopsie rénale à l'âge de 2 ans et 9 ans d'une patiente ayant présenté un SHU atypique à 3 mois



La biopsie rénale réalisée un an et demi après la poussée de SHU met en évidence des signes de microangiopathie thrombotique chronique avec une diminution des lumières capillaires, une hypercellularité et prolifération mésangiale, la présence de décollement des cellules endothéliales et d'interposition de fibrine. A l'âge de neuf ans, une nouvelle biopsie rénale a été réalisée. Elle montre une aggravation des lésions glomérulaires, la présence d'une obturation des lumières des capillaires glomérulaires, une augmentation de la matrice mésangiale et la présence d'une glomérulosclérose (c-d).

Pour la première fois, les facteurs de susceptibilité génétiques associés au SHU atypique n'impliquaient pas une dérégulation de la voie alterne du complément. La difficulté de cette découverte a été d'effectuer le lien entre les mutations de DGKE et le SHU atypique. En effet, la dérégulation de la voie alterne, due à une mutation des protéines du complément au facteur de coagulation (Thrombomoduline) était jusqu'alors au centre de la physiopathologie du SHU atypique.

Le gène du DGKE a été mis en évidence pour la première fois dans une lignée de cellules

endothéliales humaines²⁹⁴. Il est également exprimé par les plaquettes.

Ces cellules sont deux acteurs majeurs impliqués dans la thrombose. L'étape supplémentaire a été de montrer que le DGKE était exprimé dans le rein et de localiser la protéine.

J'ai identifié et localisé la protéine de DGKE dans les podocytes et les cellules endothéliales d'un rein humain par technique d'immunohistochimie.

Les coupes de rein péri-tumoral issues du bloc en paraffine proviennent du service anatomopathologie de l'hôpital Foch. Après un séchage à l'étuve à 37°C pendant 12 heures, les coupes ont été déparaffinées dans trois bains successifs de xylène de 5 minutes chacun, puis réhydratées progressivement par immersion successive pendant 5 minutes dans des bains d'éthanol à 100%, 90%, 70% et 50% puis de l'eau distillée. Le démasquage antigénique a été réalisé en plongeant les lames au bain-marie dans un tampon citrate à pH6. Après 30 min à 97°C, les bains de démasquage contenant les lames, ont été sortis du bain-marie et laissés 30 min à température ambiante. Les coupes de tissus ont ensuite été lavées dans un tampon Tris-salin. Elles sont ensuite traitées pendant 15 min avec de l'eau oxygénée 5% afin d'inactiver les peroxydases endogènes. puis pendant 30 minutes avec du sérum humain, afin de saturer les récepteurs des parties constantes FC des Immunoglobulines. L'anticorps primaire est un anticorps polyclonal de lapin anti-DGKE (Novus) dilué au 1/100 incubé durant 1 heure, à température ambiante, dans une chambre humide. Après deux lavages en TBS-T, les coupes ont été incubées pendant 30 min à température ambiante avec l'anticorps secondaire chèvre anti lapin, couplé à l'HRP (Dako) dilué au 1/50 et dirigé contre le fragment Fc de l'anticorps primaire. Le révélateur est le DAB (3,3' diaminobenzédine) (Dako) donnant une coloration brune. Les lames ont finalement été montées grâce à un milieu aqueux (Glycergel, Dako).

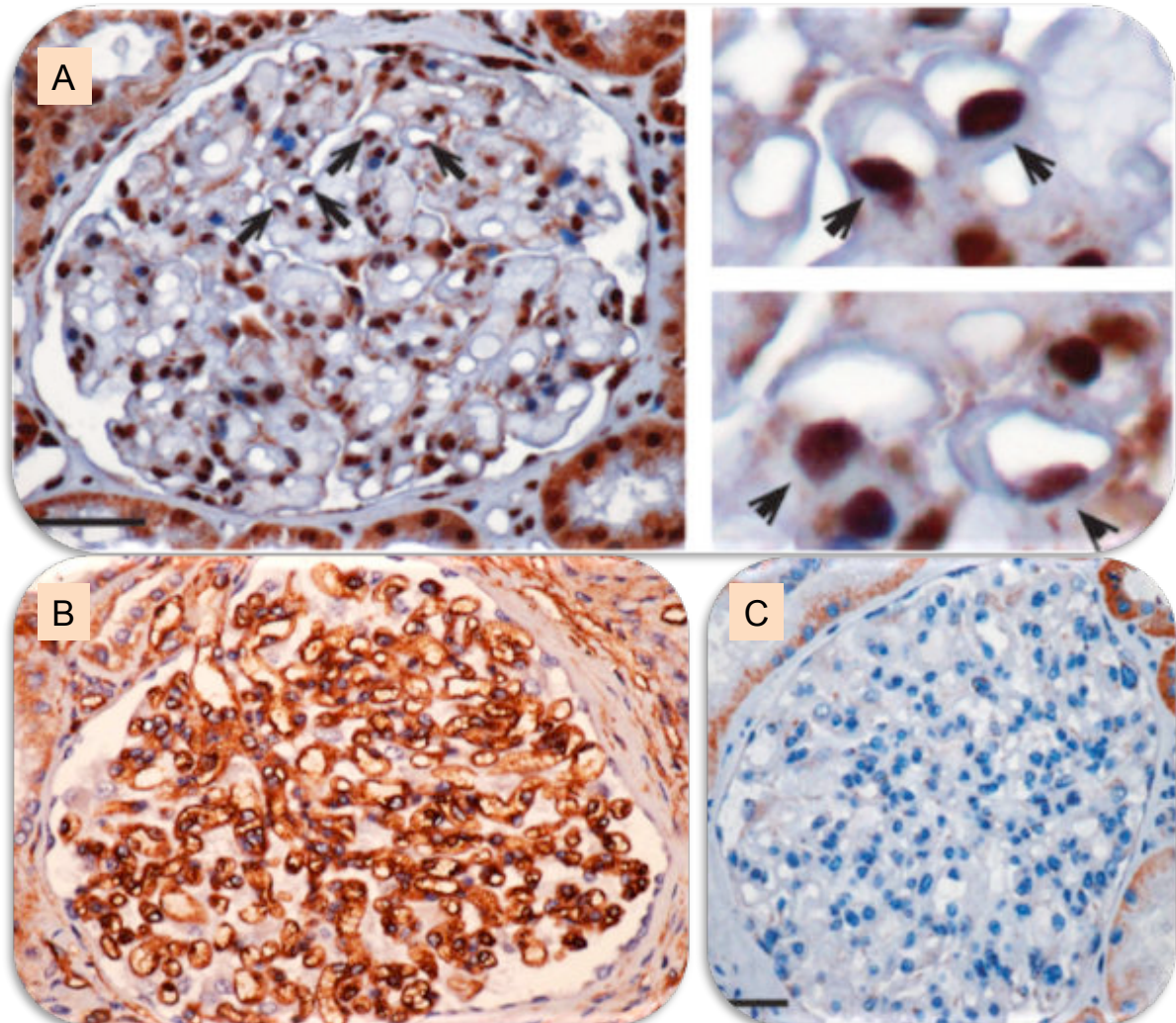
L'observation des lames s'est faite à l'aide d'un microscope optique Nikon Eclipse 80i.

Figure 28 : Immunohistochimie d'un anti-DGKE dans une biopsie rénale dans un glomérule normal

A) Marquage positif par un anti-DGKE (Novus), des cellules endothéliales et podocytes d'un rein peri-tumoral.

B) Marquage par un anti-CD34 positif des cellules endothéliales du même rein péri-tumoral.

C) Marquage par un anti-DGKE Novus dilué au 1/50 négatif dans une coupe de rein issu de la patiente ayant une double mutation hétérozygote Arg63Pro et Val163Ser fs* 3 responsable de l'absence de synthèse de la protéine.



Pour la première fois, mon travail a permis de démontrer que le rein humain exprimait le DGKE dans les cellules endothéliales et podocytaires.

Le DGKE est responsable de la phosphorylation du diacylglycérol de l'acide arachidonique en acide phosphatidique. La perte de fonction du DGKE pourrait amplifier la voie d'activation de la PKC (protéine kinase). L'activation de la PKC dans les cellules endothéliales augmente les facteurs thrombotiques comme le FvW, les inhibiteurs de l'activation du plasminogène stockés dans les corps de Weibel-Palade. On peut supposer que comme ces facteurs clivent la thrombomoduline stockée dans les corps de Weibel-Palade, ils participent à la MAT. Le facteur tissulaire diminue l'expression de VEGR2 du VEGF impliqué dans la microangiopathie thrombotique²⁹⁵.

Une autre équipe, a montré que des mutations du DGKE étaient associées à une glomérulonéphrite membrano-proliférative sans dépôt¹³⁰.

2 Facteurs prédictifs de récurrence des GNC3 en post-TR

2.1 Contexte

Les récurrences des glomérulonéphrites membrano-prolifératives sont fréquentes en post-transplantation et responsables de la diminution de survie des greffons ²²⁵. La difficulté principale à laquelle est confronté le clinicien est l'absence de données sur les facteurs de risques associés à une récurrence. L'évolution est très hétérogène allant d'une protéinurie isolée minime à une insuffisance rénale responsable de la perte de greffon. Les lésions histologiques peuvent être quelques dépôts de C3, une prolifération mésangiales/croissants, des lésions de glomérulosclérose.

En post-transplantation rénale, le diagnostic peut-être fait par des biopsies rénales protocolaires, faites systématiquement quelque soit l'évolution de la transplantation rénale à un délai variable et fixé par chaque centre de transplantation, le délai de 3 mois et un an est classique. Le patient n'a ni anomalie du sédiment urinaire (ni hématurie ni protéinurie) ni insuffisance rénale. La biopsie rénale du greffon peut mettre en évidence la présence de dépôts de C3 avec plus ou moins la présence d'immunoglobulines dans les glomérules ou des dépôts denses dans les membranes basales glomérulaires. Il s'agit d'une récurrence histologique.

La récurrence peut-être clinique. Dans ce cas la biopsie rénale est effectuée en raison d'une anomalie clinique ou biologique : hypertension artérielle, oedèmes des membres inférieurs, présence d'une protéinurie, d'une hématurie, d'un syndrome néphrotique ou d'une insuffisance rénale. La biopsie rénale confirme le diagnostic par la présence de dépôts de

C3, de dépôts denses dans la membranes glomérulaire, d'une prolifération mésangiale, d'une hypertrophie mésangiale et/ou la présence de croissants.

Les facteurs de risque associés à la récurrence clinique connus sont l'âge précoce de survenue de la maladie sur le rein natif, la sévérité de la pathologie initiale, la présence de croissants et de prolifération mésangiale à la biopsie rénale initiale^{239 240}, la greffe donneur vivant. La baisse du C3 serait peut-être associée à une récurrence mais les résultats peu nombreux sont contradictoires. Actuellement il n'existe pas de marqueurs biologiques prédictifs de récurrence clinique et perte de greffons.

2.2 Objectif de l'étude

Nous avons émis l'hypothèse que la persistance de l'hyperactivation de la voie alterne du complément (le C3 plasmatique bas et/ou sC5b9 élevé) et la présence de dépôts de C5b9 dans le rein en post-transplantation sont associées à une récurrence clinique (associant une récurrence histologique et des anomalies du sédiment urinaire) et une perte de greffon. Ces marqueurs pourraient être des marqueurs de suivi en post-transplantation.

2.3 Matériels et méthodes

2.3.1 Patients

J'ai réalisé une étude rétrospective multicentrique qui regroupe des patients, adultes, transplantés rénaux pour une glomérulonéphrite à dépôts de C3 (goupant la GNC3 et la maladie des dépôts denses) ou une GNMP de type I avec des dépôts de C3 et des Ig.

Lorsqu'une cause infectieuse, une hémopathie, la présence d'une Ig monoclonale ou une maladie auto-immune étaient retrouvées à l'origine de la maladie, les patients étaient exclus. Les médecins de neuf centres de transplantation ont été contactés et ont inclus des patients dans cette étude (Paris (Necker), Suresnes (Foch), Tours, Dijon, Toulouse, Lille, Poitiers, Stasbourg, Limoges).

Pour être sélectionnés, les patients devaient avoir :

- un diagnostic de certitude de la maladie rénale sur le rein natif.
- bénéficier d'une transplantation rénale pour une insuffisance rénale terminale secondaire à la glomérulonéphrite à C3 ou GNMP de type I sans cause identifiée
- avoir une exploration complète du complément
- des données cliniques, histologiques exploitables.

Les patients inclus ont reçu une transplantation rénale entre le premier janvier 1998 et le premier janvier 2012 inclus. Le dernier suivi est en juin 2013. L'ensemble des comptes rendus des biopsies de reins natifs ont été relus attentivement par des pathologistes et 47 des 57 biopsies rénales de rein natif ont été revues.

2.3.2 Analyse du Complément

L'analyse du complément a été réalisée à partir du plasma sur EDTA des patients. Les dosages plasmatiques de C3, C4 et du FB ont été réalisés par néphélométrie dans le laboratoire de l'HEGP.

Le dosage du s C5b9 a été réalisé par Elisa (kit commercial Quidel) à partir des échantillons de plasma prélevés avant et après la transplantation rénale.

La recherche de C3 NeF, auto-anticorps stabilisant la C3 convertase a été réalisée selon la technique employée à l'HEGP chez tous les patients ¹⁷⁸. Cette technique étudie la capacité des IgG à stabiliser la C3 convertase alterne à la surface des globules rouges de moutons préalablement formés avec du C3b, du Facteur B et du Facteur D. On ajoute la quantité de Facteur B permettant d'obtenir un site lytique par cellule. Après la formation de la convertase à la surface des globules rouges, les IgG du patient testé sont ajoutés. La C3 convertase se dissocie normalement en 20 minutes. Si les IgG des patients se lient et stabilisent la convertase, il n'y a pas de dissociation de la C3 convertase et en présence de sérum de rat ajouté à 37°C pendant 45 minutes contenant les protéines C5, C6, C7, C8, C9, on observe une lyse des globules rouges de moutons. Si en revanche, la C3 convertase n'a pas été stabilisée par les IgG, il n'y a pas de lyse des globules rouges de moutons.

La recherche des anticorps anti-C3 et anti-B a été faite par Technique Elisa selon une technique mise au point dans le laboratoire. Les anomalies génétiques ont été recherchées par séquençage direct pour les gènes MCP, CFH, CFI, C3 et CFHR5.

2.3.3 Analyse histologique

L'ensemble des biopsies de greffon disponibles qu'elles soient réalisées de façon systématique pour surveillance ou pour établir un diagnostic devant une anomalie biologique (apparition d'une protéinurie, élévation de la créatinine) ont été analysées. Seules, les « biopsies diagnostiques » réalisées lorsque les patients ont une anomalie du sédiment urinaire ou une augmentation de la créatinine seront analysées dans cette étude. La relecture de toutes les lames a été réalisée par le Docteur Marion Rabant anatomopathologiste à Necker. Le score de Banff a été analysé selon les recommandations et critères définis par les experts ²⁹⁶ ; les lésions aiguës, g (glomerulite), t (tubulite) i

(intestitium), v (arterite), mm (dépôts) et chronique (cg, ct, ci, cv) ont été quantifiées. La prolifération mésangiale, sous endothéliale, les présences de dépôts et leurs localisations ont été analysées. Le C4d marqueur du rejet humoral a également été réalisé pour tous les patients.

J'ai mis au point les marquages de C3 et C5b9 à partir des coupes issues du bloc en paraffine par technique en immunoperoxydase.

L'évaluation du marquage est semi-quantitative, en fonction de l'intensité du marquage, du nombre de glomérules atteints et de l'intensité du marquage au sein du glomérule, une gradation a été faite de 0 à 3.

2.3.3.1 Immunohistochimie C5b9

A partir des coupes de reins transplantés issues du bloc en paraffine, après un séchage à l'étuve à 37°C, pendant 12 heures, les coupes ont été déparaffinées dans trois bains successifs de xylène de 5 minutes chacun, puis réhydratées progressivement par immersion successive pendant 5 minutes dans des bains d'éthanol à 100%, 90%, 70% et 50% puis dans l'eau distillée. Le démasquage antigénique a été réalisée en plongeant les lames au bain-marie dans un tampon citrate pH=6. Après 30 min à 97°C, les bains de démasquage contenant les lames sont sortis du bain-marie et laissés 30 min à température ambiante. Les coupes de tissus sont ensuite lavées dans un tampon Tris Buffer Saline. Elles sont ensuite traitées pendant 15 min avec de l'eau oxygénée 0.05% afin d'inactiver les peroxydases endogènes puis incubés 30 minutes par 5% de sérum humain afin de saturer le récepteur Fc des immunoglobulines. L'anticorps primaire est anti-néo-épitope de C9 monoclonal de souris (donné par Paul Morgan) dilué au 1/50 et incubé pendant une heure, l'anticorps

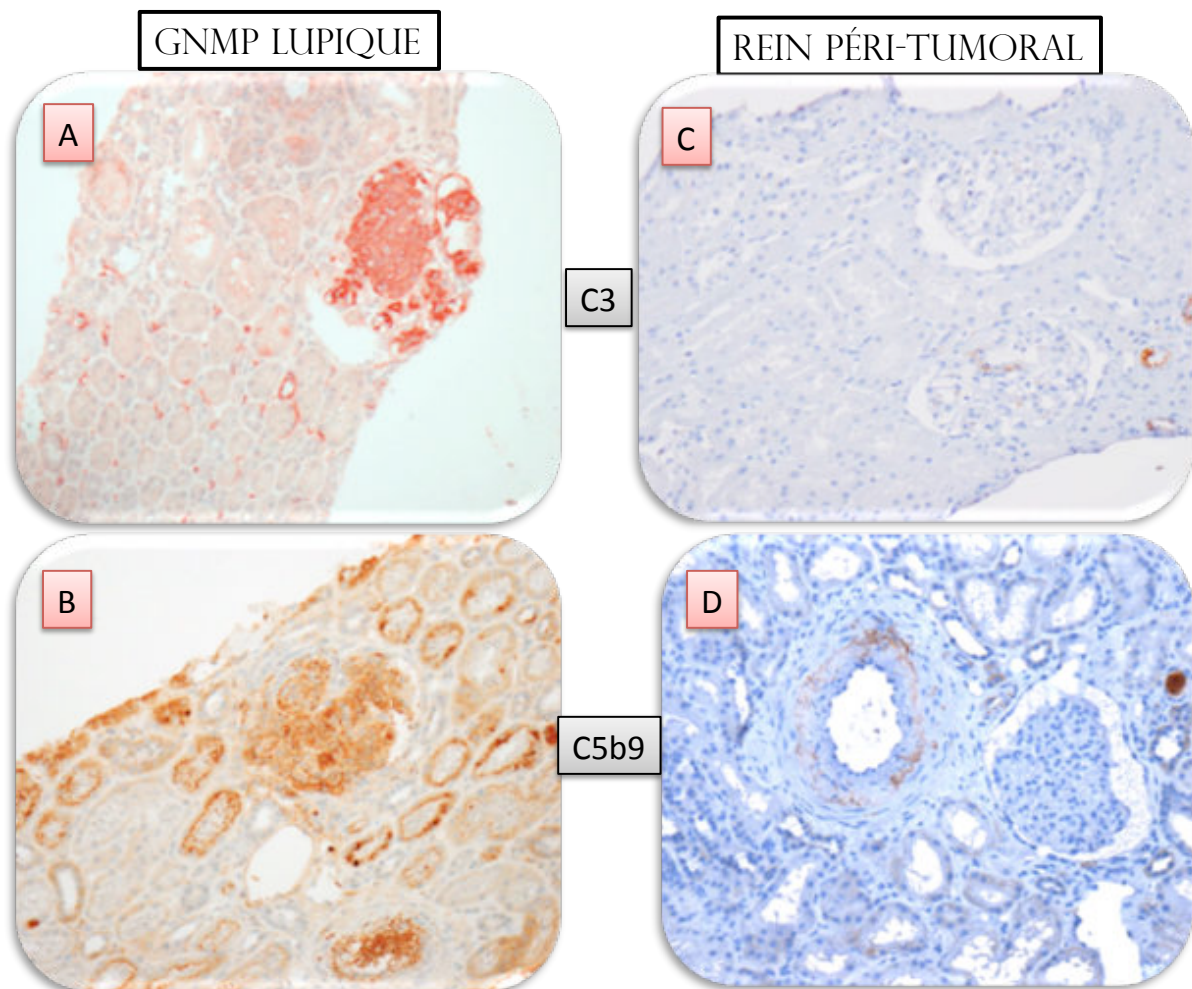
secondaire est un anticorps anti-souris IgG1 biotynilé (Dako) dilué au 1/100 incubé pendant 30 minutes, à température ambiante, dans une chambre humide. L'amplification est réalisée par la streptavidine-biotine-peroxydase diluée 1/300 (Dako) incubée pendant trente minutes. La révélation est réalisée en présence des substrats de la peroxydase, le DAB (Dako) pendant 30 minutes. La réaction est arrêtée en plongeant les lames dans de l'eau. Les lames sont finalement montées grâce à un milieu aqueux (Glycergel, Dako).

2.3.3.2 Immunohistochimie du C3d

De la même façon, les coupes ont été déparaffinées dans trois bains successifs de xylène de 5 minutes chacun, puis réhydratées progressivement par immersion successive pendant 5 minutes dans des bains d'éthanol à 100%, 90%, 70% et 50% puis de l'eau distillée. Le démasquage antigénique est réalisé par la protéinase K (Dako), à température ambiante dans la chambre humide pendant 10 minutes. Les coupes de tissus sont ensuite lavées dans un tampon TBS. Les marquages sont réalisés en incubant 100 µl d'anticorps polyclonal de lapin anti-C3d (Abcam) dilué au 1/300 pendant 30 minutes à température ambiante. Après deux lavages, les lames sont incubées avec l'anticorps polyclonal anti-lapin couplé à la streptavidine/péroxydase (système en vision anti-rabbit/HRP Dako) pendant trente minutes, à température ambiante, dans une chambre humide. Après deux lavages en TBS-T, la révélation est réalisée en AEC colorant en rouge le tissu, la réaction stoppée à 20 minutes. Les lames sont finalement montées grâce à un milieu aqueux (Glycergel, Dako). J'ai analysé par western blott la spécificité de cet anticorps. Il n'est pas spécifique de C3d mais reconnaît le C3b et les fragments de clivage de C3, C3c et C3bi.

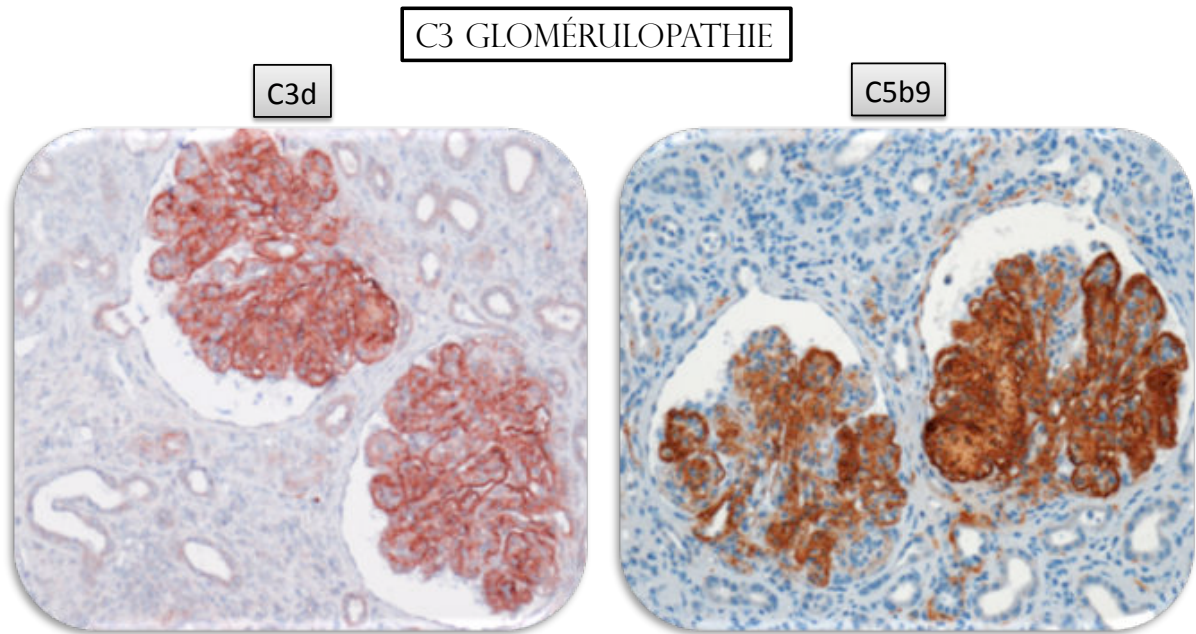
Les mises au point ont été réalisées en utilisant comme contrôle positif des lames de biopsies rénales issues de patients ayant une néphropathie lupique de stade IV, et une maladie des dépôts dense et GNC3. Le contrôle négatif est un rein normal (rein péri-tumoral).

Figure 29 : Mise au point des marquage C3b et C5b9, Contrôle positif (néphropathie lupique) et Contrôle négatif (rein péri-tumoral)



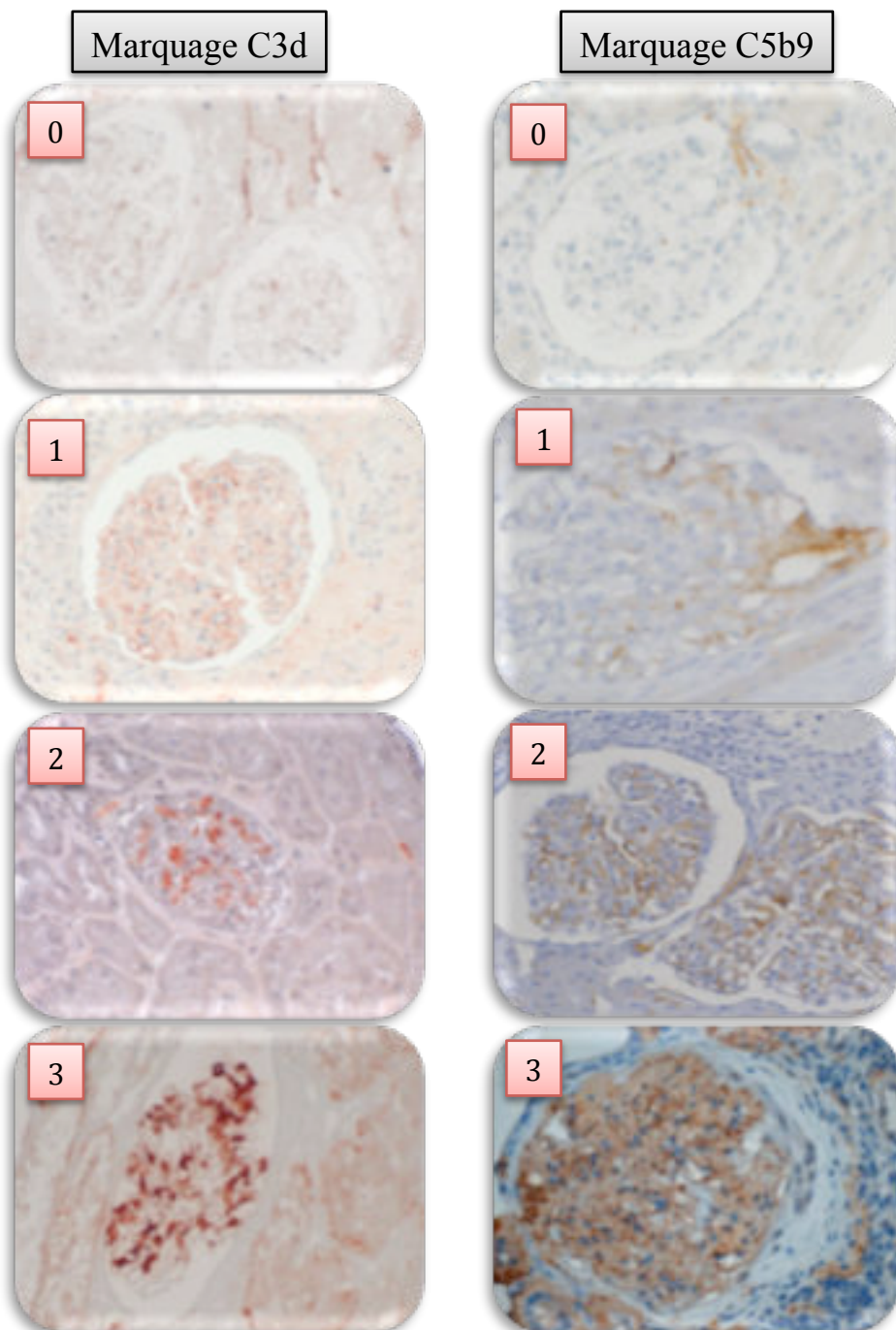
- A Marquage positif du C3d dans le glomérule, dépôts mésangiaux et pariétaux
- B Marquage positif de C5b9 glomérulaire et tubulaire.
- C Marquage glomérulaire de C3 négatif dans le rein peri tumoral.
- D Marquage glomérulaire de C5b9 négatif, la présence du marquage positif de C5b9 dans la paroi des vaisseaux est aspécifique.

Figure 30 : Analyse du marquages C3 et C5b9 réalisé dans une C3 glomérulonéphrite sur rein natif.



L'évaluation du marquage est semi-quantitative (fig.31), en fonction de l'intensité du marquage des glomérules ; noté 0 = absence, 1 = minime, 2 = modérée et 3 = intense. Le nombre de glomérules marqués est également pris en compte dans l'analyse.

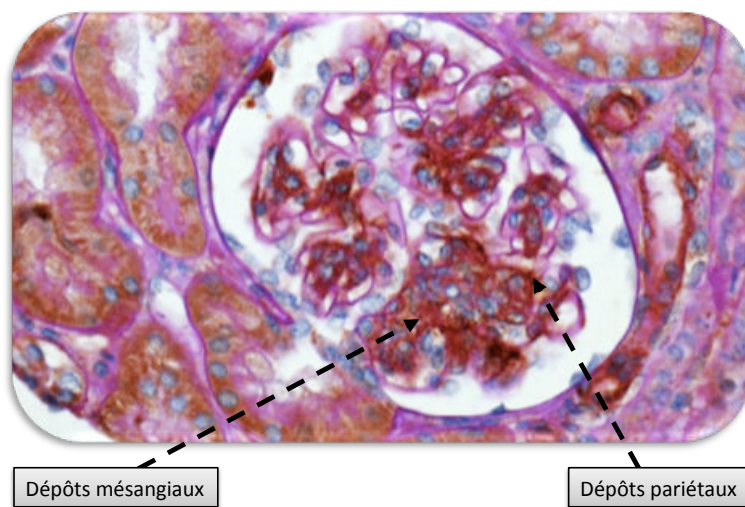
Figure 31 : Exemple de cotation du marquage de C3d et C5b9 en fonction de l'intensité



La localisation des dépôts est variable ; ils peuvent être pariétaux ou mésangiaux (fig. 32).

La coloration au PAS (periodic acide schiff) des membranes basales glomérulaires permet de mieux localiser le marquage.

Figure 32 : Localisation du marquage C5b9 après coloration des membranes par le PAS d'une glomérulonéphrite membranoproliférative



La localisation des dépôts a été analysée et peut-être pariétale, mésangiale ou pariéto-mésangiale.

2.3.4 Les critères d'analyse

La récurrence clinique est définie par :

- la présence d'une protéinurie supérieure à 1g/24h, une hématurie microscopique et/ou une insuffisance rénale (augmentation de la créatinine de 30% par rapport au nadir)
- la présence de dépôts de C3 glomérulaire, de lésions de prolifération mésangiale, membranaire, extracapillaire, la présence de volumineux dépôts à la biopsie rénale
- l'absence de rejet ou d'autres pathologies rénales expliquant les anomalies cliniques
- la récurrence est histologique isolée lorsqu'il n'existe pas d'anomalie clinique associée ou expliquée par les lésions histologiques de récurrence.

Le rejet aigu est diagnostiqué par une biopsie rénale selon les critères définis par la classification de Banff. Le C4d a été réalisé par une technique d'immunoperoxydase chez tous les patients.

La survie des greffons est définie par l'intervalle de temps (en mois) qui sépare la transplantation rénale, du retour en hémodialyse. Le délai de récurrence correspond à l'intervalle de temps (en mois) qui sépare la transplantation rénale de la "biopsie rénale diagnostique".

2.3.5 Les données

Les données collectées sont l'âge au diagnostic de la maladie initiale, le type de glomérulonéphrite soit à dépôts de C3 soit associée à des complexes immuns, la date de

dialyse, la date de transplantation, la date de récurrence et la date de dernier suivi et/ou de remise en hémodialyse. L'ensemble des caractéristiques du donneur, du receveur, du traitement immunosuppresseur, des données de la transplantation et du suivi post-transplantation ont été recueillies.

2.3.6 Analyse statistique

La survie globale des greffons, la survie sans récurrence ont été analysées par Kaplan Meier. Le type histologique, le taux de C3, de s C5b9, la présence d'un C3 Nef ont été pris en compte dans l'analyse. La corrélation entre le taux de C3, de s C5b9 et la présence d'un marquage C5b9 et C3 seront analysées.

2.4 Résultats préliminaires de cette étude

2.4.1 Les caractéristiques de la population

Des 75 patients pré-sélectionnés, 57 patients ont finalement été inclus. Les patients exclus l'ont été pour :

- absence de biopsies rénales sur le rein natif (n=3),
- résultats de biopsies non disponibles (n= 7),
- patients perdus de vue (n=8).

Trente cinq pourcent des patients ont une glomérulonéphrite avec la présence de complexes de immuns (appelé GNMP de type I)(n=20), 28% (n=16) des patients ont une maladie des dépôts denses et 37% (n=21) patients ont une GNC3. Trente neuf patients ont une transplantation rénale pour la première fois, 14 patients ont bénéficié de 2 transplantations

rénales et 4 patients en ont eu 3. L'âge moyen au moment du diagnostic de la maladie est de 23 ans [1-47], celui de l'insuffisance rénale terminale est de 30 ans [1-64], et l'âge au moment de la première transplantaion est de 38 ans [17-63].

2.4.2 Le complément

2.4.2.1 C3, sC5b9, C3 Nef

Les dosages d'au moins deux des trois marqueurs suivant (C3 plasmatique, sC5b9, C3 Nef) ont été réalisés chez 32 patients avant la transplantation et chez 54 patients après la transplantation rénale.

Cinquante six pourcent (23/41) des patients ont un C3 plasmatique bas (<660mg/l) avant la transplantation rénale, 24% (13/54) ont un C3 bas après la transplation rénale. Cinquante et un pourcent (15/29) des patients ont un C5b9 soluble (>420mg/l) augmenté avant la transplantation rénale et 28% ont un C5b9 soluble augmenté après la transplantation. Le C3 nephritique facteur est positif chez 50% (19/38) des patients avant et 24% (13/54) après la transplantation rénale.

Table IX : Anomalies du C3, sC5b9, C3 Nef chez les patients avant et après transplantation rénale en fonction des différentes GNMP (DDD, GNC3, GNMP type I) retrouvées sur le rein natif.

	GNMP type I n=21		DDD n=16		GNC3 n=20	
	Avant TR	Après TR	Avant TR	Après TR	Avant TR	Après TR
C3 bas (<660mg/l)	41% (5/12)	31% (6/19)	72% (8/11)	13% (2/15)	55% (10/18)	25% (5/20)
s C5b9 (>420mg/ml)	40% (4/10)	33% (5/15)	71% (5/7)	14% (2/14)	50% (6/12)	35% (6/17)
C3 Nef positif	33% (4/12)	26% (5/19)	70% (7/10)	26% (4/15)	50% (8/16)	20% (4/20)

En pré-transplantation, la présence d'un C3 plasmatique bas, d'un sC5b9 augmenté et d'un C3 Nef positif est présent chez 70% , 50% et 40% des patients atteints DDD, GNC3 et GNMP de type I (ou glomérulopathie à dépôts de complexe immuns). En post-transplantation, ces anomalies persistent dans le groupe de patients atteints de GNMP de type I, la normalisation du C3, sC5b9 et la négativation du C3 Nef sont obtenues chez plus de 50% des patients atteints de maladies des dépôts denses et chez 20 à 30% des patients ayant une GNC3.

2.4.2.2 Autres anomalies

Chez 2 patients ayant une GNMP de type I, nous avons mis en évidence la présence d'anticorps anti- Facteur B.

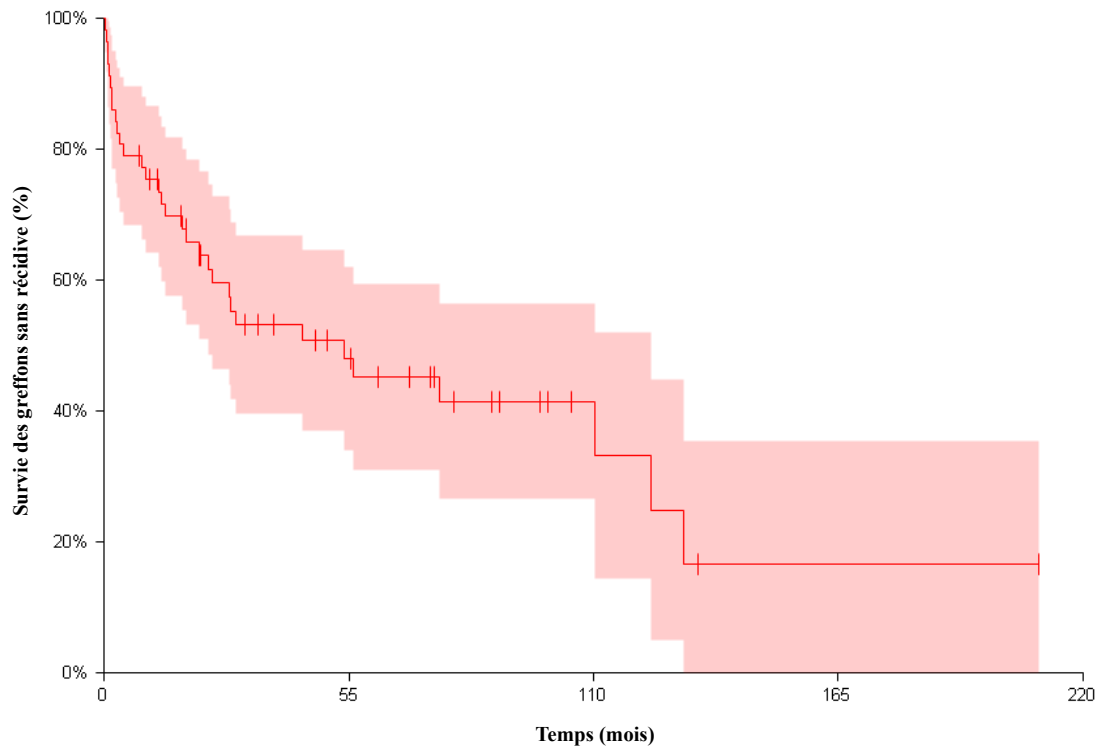
A titre systématique tous les exons des gènes CFH, C3, CFI et CFHR5 ont été analysés. Quatre patients de cette cohorte ont une mutation ou un variant rare sur le gène de CFH localisée sur les SCR 12 (p.Phe 717Leu), SCR 2 (p.Lys 144Asn), SCR 3 (p.Phe192Leu) et SCR11 (p.Gly650Val). Les conséquences fonctionnelles de ces variants ne sont pas caractérisées. Le dosage du Facteur H est normal. Deux patients ont un C3 NeF. Un patient présente un variant sur le gène de CFHR5 (p.Gly 278Ser), dont les conséquences ne sont pas connues.

2.4.3 Survie des greffons

La survie des greffons sans récurrence est de 70% à 12 mois et de 50% à 60 mois.

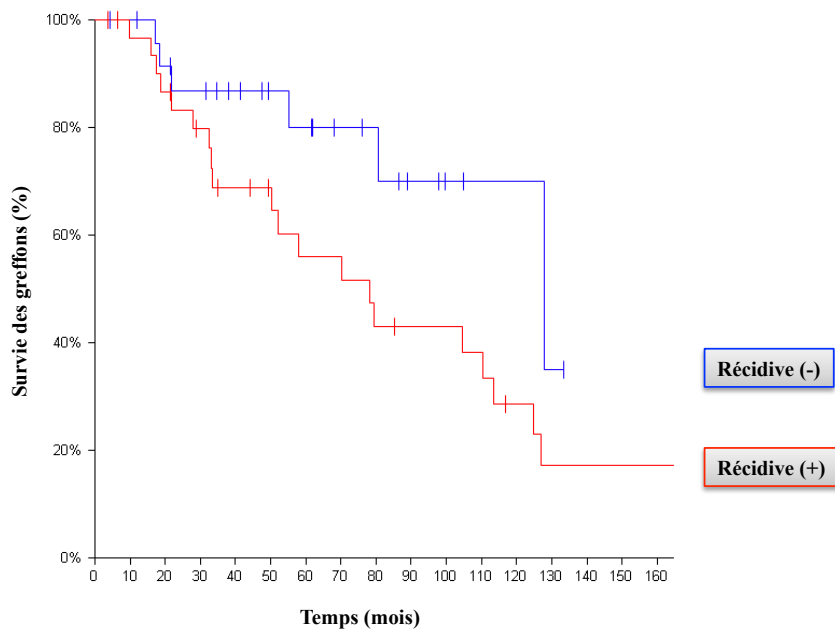
Figure 33 : Survie des greffons dans cette cohorte, analyse par la méthode de Kaplan

Meier



La survie des greffons est significativement moins bonne chez les patients ayant une récurrence par rapport aux patients n'ayant pas de récurrence ($p=0.05$). La médiane du délai de perte de greffon après récurrence clinique est de 32,2 mois [16,5-58,1].

Figure 34 : Survie des greffons après transplantation rénale en fonction de la survenue d'une récurrence analysée par Kaplan-Meier ($p = 0.05$, log rank)



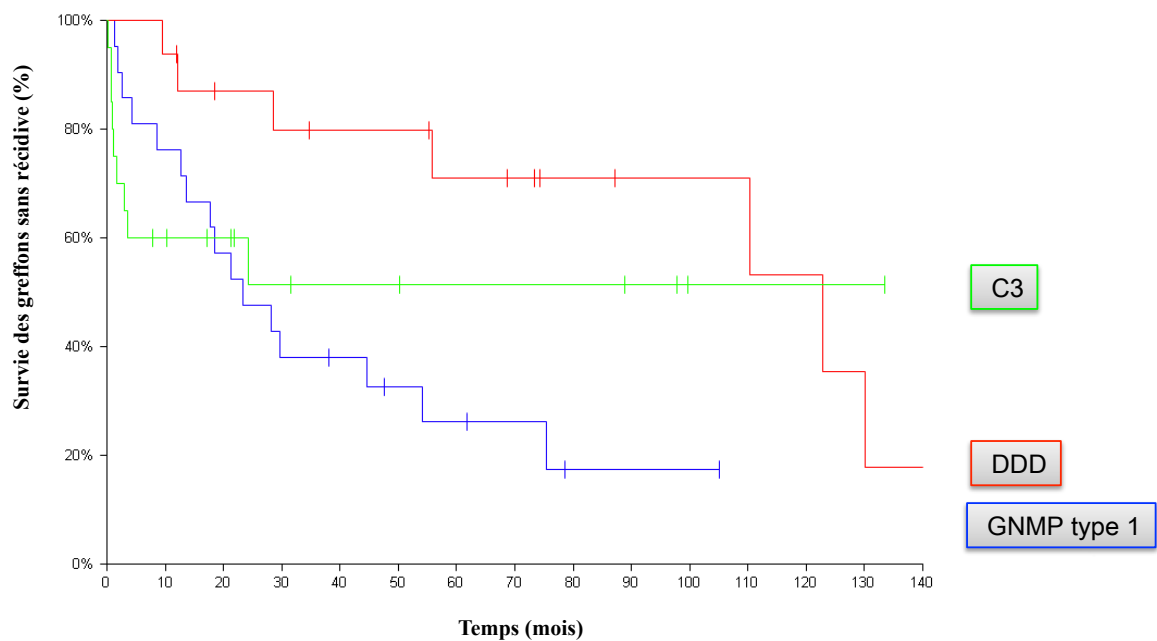
2.4.4 Facteurs associés à la survenue d'une récurrence

2.4.4.1 Type histologique

- La survie des greffons sans récurrence clinique est différente selon le type histologique de GNMP sur le rein natif. Les patients ayant une GNMP de type de I ont un risque trois

fois plus important de récurrence clinique que les patients ayant une DDD (HR= 3.19 (1.39-7.30) (p=0.0069)

Figure 35: Survie des greffons sans récurrence clinique en fonction des différents types histologiques identifiés DDD, GNC3, GNMP de type I, méthode de Kaplan Meier (p=0.05)



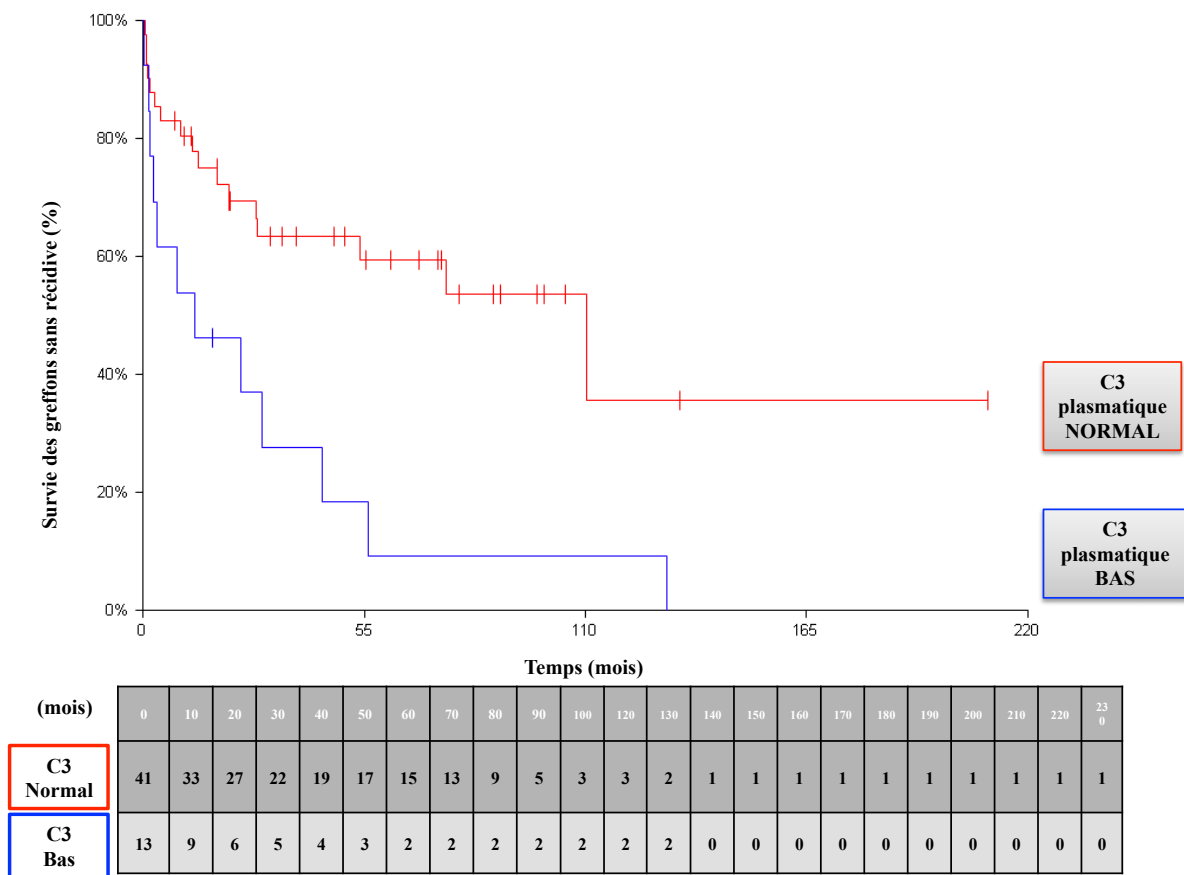
Le risque de récurrence clinique chez les patients ayant une GNMP de type I est 3 fois plus important chez les patients ayant une DDD, HR 3.19(1.39-7.30) p=0.0069.

2.4.4.2 En fonction du C3 plasmatique

Le C3 plasmatique diminué (<660mg/l) avant la transplantation n'est pas associé à un risque plus important de récurrence clinique en post-transplantation en comparaison des patients ayant un C3 plasmatique normal.

En revanche, la présence d'un C3 bas en post-transplantation augmente le risque de récurrence clinique par trois (HR= 2,95(1,17-7,41) p=0,0024 (Fig 36) en comparaison des patients ayant un C3 plasmatique normal. A 5 ans, la survie sans récurrence est de 9% chez les patients ayant un C3 plasmatique bas alors qu'il est 59% chez les patients ayant un C3 normal.

Figure 36 : Survie des greffons sans récurrence en fonction du C3 plasmatique bas ou normal en post-transplantation. Log rank (p=0.027)

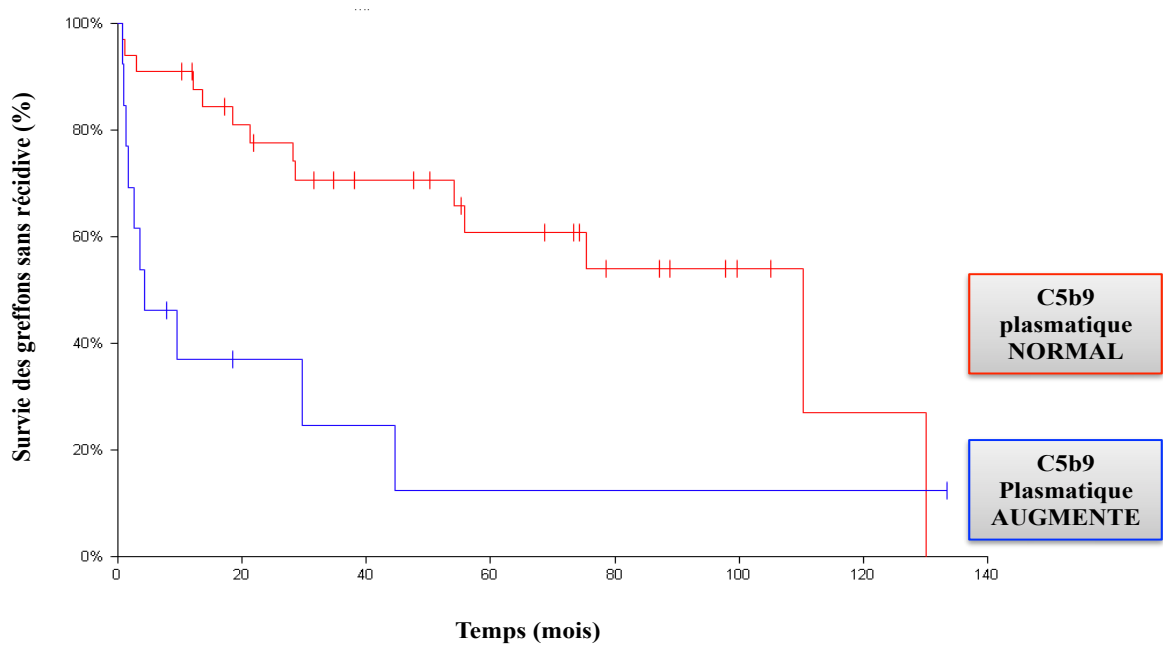


2.4.4.3 En fonction du sC5b9

En pré-transplantation, le s C5b9 augmenté n'est pas associé à un risque de récurrence plus important en comparaison des patients ayant un sC5b9 normal. En post-transplantation, les patients ayant un sC5b9 augmenté ont un risque de récurrence trois fois plus élevé que les patients ayant un C5b9 soluble normal (HR=3,01 (1,09-8,33) p=0,0038 (fig. 37).

A 5 ans, le risque de survie sans récurrence est de 12% chez les patients ayant un sC5b9 augmenté et de 48% chez les patients ayant un sC5b9 normal.

Figure 37 : Survie des greffons sans récurrence en fonction de la présence d'un C5b9 soluble augmenté ou normal en post-transplantation rénale. Log rank (p=0.027)



(mois)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
C5b9 normal	33	31	25	21	18	17	13	12	8	6	4	2	2	1
C5b9 augmenté	13	5	4	3	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1

2.4.4.4 En fonction du C3 Nef

La présence d'un C3 Nef en pré-transplantation ou en post-transplantation n'est pas associée à un risque augmenté de récurrence par rapport aux patients ayant un C3 Nef négatif.

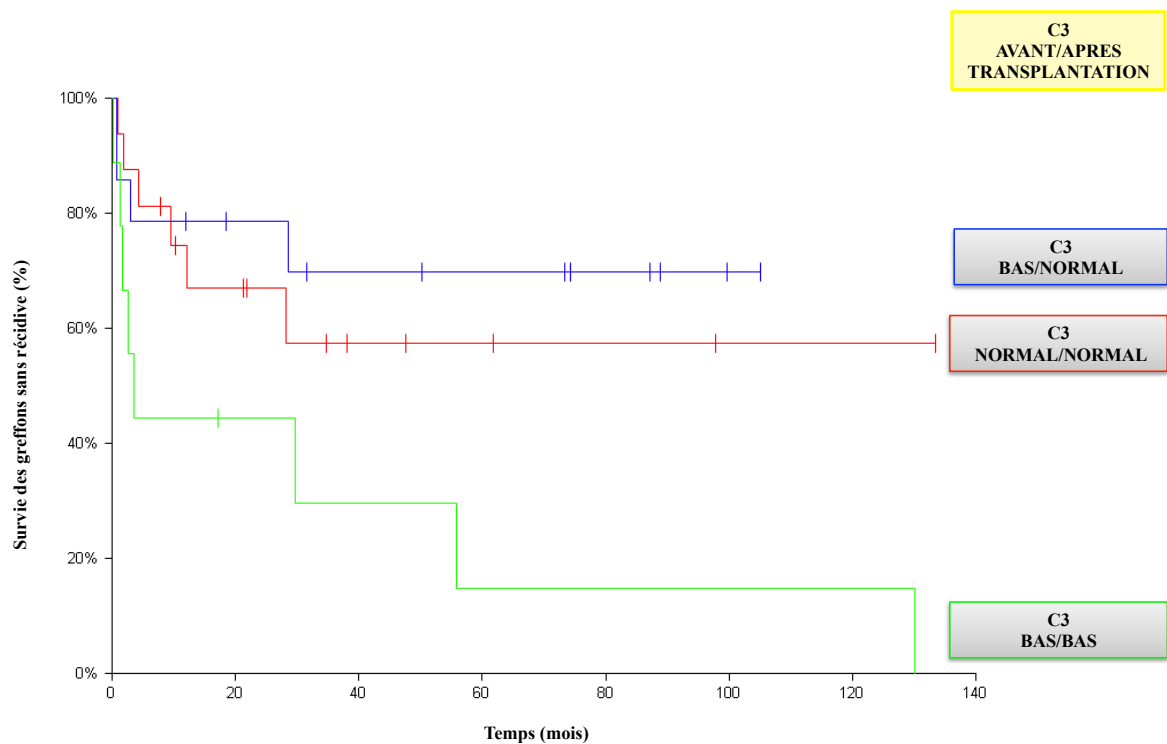
2.4.4.5 Influence du C3 plasmatique en fonction des dosages pré et post-transplantation

Trois groupes de patients quelque soit l'histologie initiale ont été définis en fonction du statut de C3 plasmatique en pré et post-transplantation rénale (fig. 38).

Le premier groupe de patients (en rouge) sont les patients ayant un C3 plasmatique normal avant et après transplantation (**C3n/C3n**), le deuxième groupe de patients (en bleu) sont les patients ayant un C3 bas avant la transplantation et un C3 normal après la transplantation (**C3b/C3n**) et le troisième groupe (en vert) sont les patients ayant un C3 bas avant et après la transplantation (**C3b/C3b**).

A 5 ans, les groupes **C3n/C3n**, **C3b/C3n** et **C3b/C3b** ont un risque de récurrence de 30%, 43% et 85% respectivement. Le risque de récurrence dans le groupe **C3b/C3b** est trois fois plus important dans le **C3n/C3n** (HR : 3,20(1-10,23) (p=0.03).

Figure 38 : Survie des greffons sans récurrence en fonction de l'évolution du C3 en pré et post-transplantation



2.4.4.6 Influence du C5b9 plasmatique en fonction des dosages pré et post-transplantation

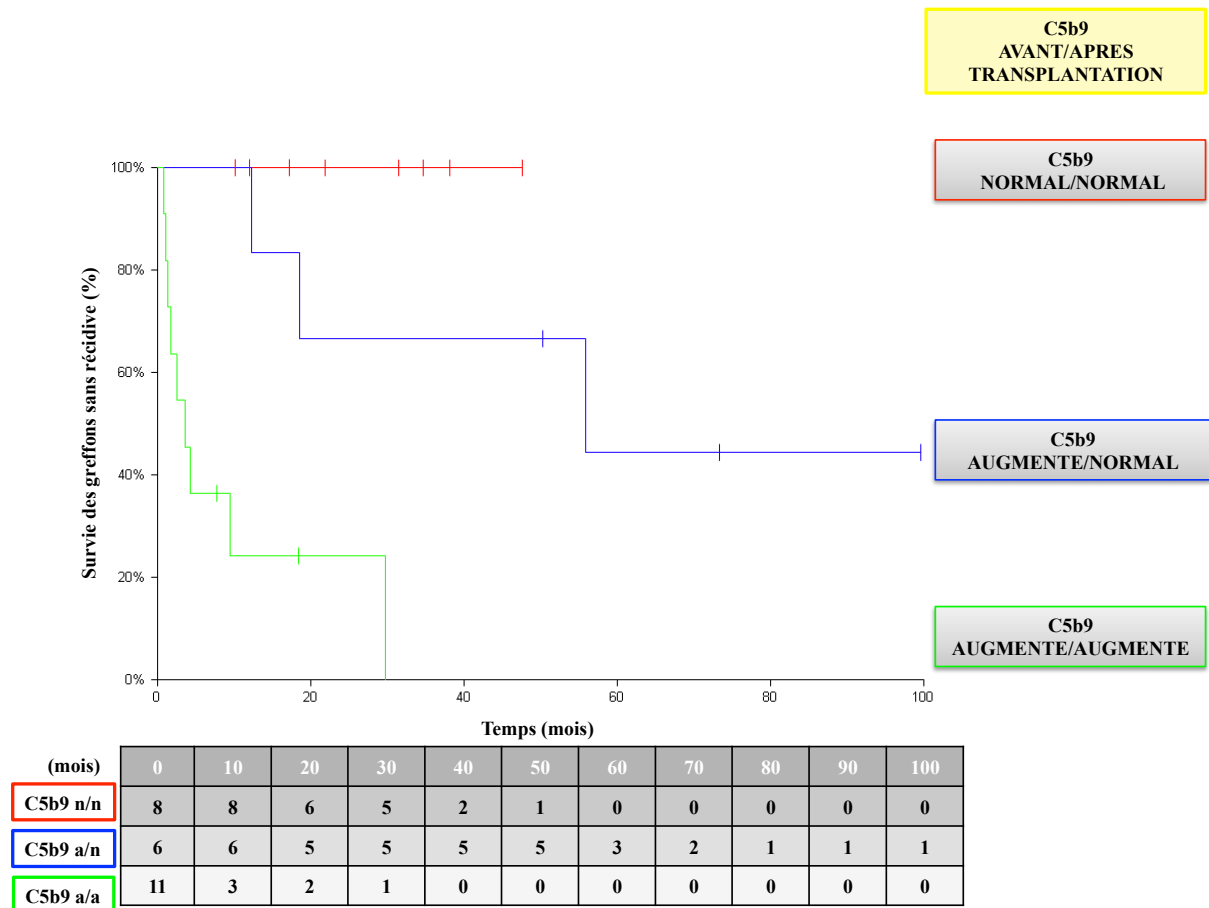
Trois groupes de patients quelque soit l'histologie initiale ont été définis en fonction du statut du s C5b9 en pré et post-transplantation rénale.

Le premier groupe de patient (en rouge) sont les patients ayant un s C5b9 normal avant et après transplantation (**sC5b9 n/ sC5b9 n**), le deuxième groupe de patients (en bleu) sont les patients ayant un sC5b9 augmenté avant la transplantation et un sC5b9 normal après la transplantation (**sC5b9 a/ sC5b9 n**) et le troisième groupe (en vert) sont les patients ayant un s C5b9 augmenté avant et après la transplantation (**sC5b9 a/ sC5b9 a**).

A 5 ans, les groupes **sC5b9 n/ sC5b9 n** , **sC5b9 a/ sC5b9 n** , **sC5b9 a/ sC5b9 a** ont un risque de récurrence de 0%, 44% et 100% respectivement. Le risque de récurrence dans le groupe

(sC5b9 a/ sC5b9 a). est 11 fois plus important que celui du groupe sC5b9 n/ sC5b9n et 5 fois plus important que chez les patients ayant sC5b9 b/ sC5b9 n (p=0.0001).

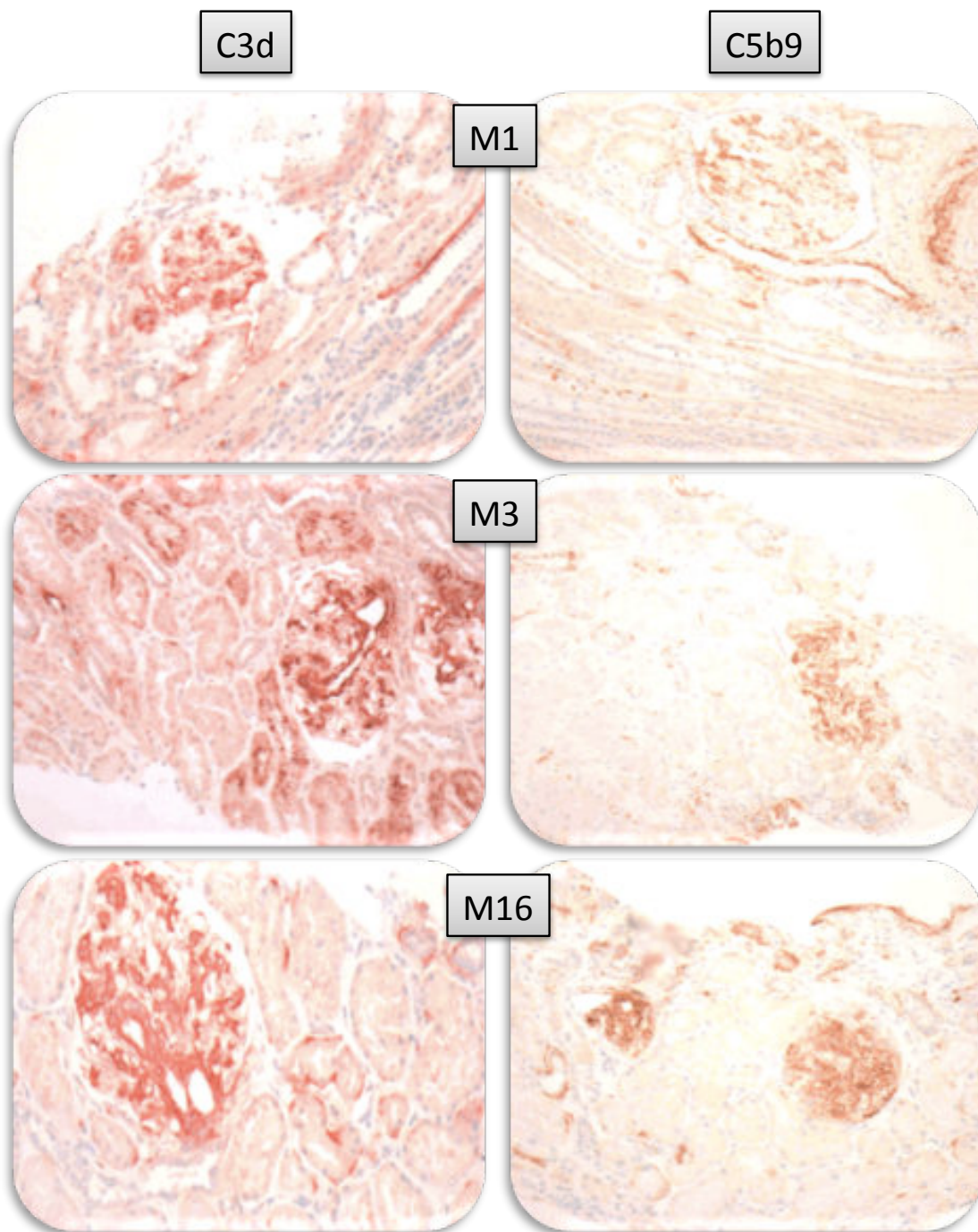
Figure 39: Survie des greffons sans récurrence en fonction de l'évolution du s C5b9 en pré et post-transplantation (p=0.0001 log rank)



2.4.5 Résultats histologiques

Les biopsies itératives réalisées chez des patients ayant une récurrence clinique précoce sévère montrent une augmentation de l'intensité des dépôts de C3 et C5b9 au fil du temps.

Figure 40 : Evolution du marquage de C3d et de C5b9 sur des biopsies itératives chez un patient ayant eu une récurrence précoce



Les analyses des résultats des biopsies sont en cours. Les données de 11 biopsies rénales issues de patients ayant eu une récurrence clinique ont été comparées à 16 biopsies rénales réalisées dans le cadre d'un protocole de biopsies à un an.

Les données sont résumées dans la table 10.

Table X : Description anatomopathologique des biopsies protocolaires et des biopsies pour récurrence

	Biopsies protocolaires (n=16)	Biopsie pour récurrence (n=10)
Dépôts mésangiaux/intra-membranaires	4/16	8/10
Prolifération mésangiale/croissants	4/16	9/10
C3d positif	6/16	10/10
C5b9 positif	1/16	7/10

Les patients ayant une récurrence clinique ont tous un marquage C3d positif et dans 70% des cas, le marquage C5b9 est positif. La prolifération et les dépôts intra-membraneux ou mésangiaux sont quasi constants.

3.5 Discussion

Les premiers résultats montrent que la survie des greffons est diminuée de façon significative chez les patients ayant une récurrence. Pour la première fois, nous décrivons l'évolution du C3, sC5b9 et C3 NeF en pré et post-transplantation selon le type histologique. Les patients ayant une GC3 (DDD ou GNC3) ont une consommation par la voie alterne et/ou la présence d'un C3 NeF plus fréquemment que dans la GNMP de type I (Table IX). En revanche, il est intéressant de constater que après la transplantation rénale ces anomalies se corrigent chez 50% des patients ayant une DDD, chez 30% de ceux présentant une GNC3 et chez seulement 10% des patients ayant une GNMP de type I.

Pour la première fois, nous démontrons que le C3 abaissé et le sC5b9 élevé en post-transplantation sont associés avec un risque majeur de récurrence. En revanche, le C3 bas et le sC5b9 augmentés en pré-transplantation ne prédisent pas le risque de récurrence. Ces données

fondamentales peuvent expliquer la fréquence élevée des récurrences chez les patients ayant une GNMP de I. Il est très intéressant de constater qu'un grand nombre de patients normalisent leurs C3 et sC5b9 suggérant l'arrêt de la consommation de la voie alterne du complément. Ces résultats sont satellites de la disparition du C3 NeF vraisemblablement induite par le traitement immunosuppresseur.

La quantification du marquage a été réalisée sur l'ensemble des biopsies. La corrélation entre la consommation du C3 plasmatique, l'élévation du C5b9 soluble et la présence de dépôts de C3 et C5b9 sera analysée prochainement

DISCUSSION-PERSPECTIVES

Mon travail de thèse a porté sur la recherche de facteurs de risque de récurrence du SHU atypique et de la GC3 en post-transplantation, deux pathologies liées à des anomalies du complément.

L'enjeu d'évaluer au mieux le risque de récurrence est essentiel afin de cibler les thérapeutiques prophylactiques adaptées individuellement.

1 SHU atypique en post-transplantation

Le travail effectué sur le SHU atypique en post transplantation a permis de démontrer que la génétique est le risque majeur de récurrence, mais qu'il est variable selon les mutations retrouvées. Les patients porteurs d'une mutation du FH, C3, et FB ont un risque de récurrence supérieur ou égal à 80%. A l'opposé, les patients n'ayant pas de mutation identifiée ont un risque de récurrence estimé à 20%. La présence de certains variants de *CFH* ou de *MCP* augmente la pénétrance de la maladie sur rein natif qu'ils soient associés ou non à des mutations ²⁹⁷. Ce travail a permis pour la première fois de préciser le rôle des variants de CFH dans le risque de récurrence en post transplantation. Cette étude a montré qu'un haplotype homozygote de CFH pourrait être associé à une augmentation du risque de récurrence.

La limitation de ces recherches est le nombre de patients. Pour répondre à cette question, je vais coordonner une étude européenne qui regroupera les données cliniques des patients suivis en Italie, en Angleterre et en France dans le cadre du projet Européen EURenOmics.

L'objectif de cette nouvelle étude est d'analyser l'influence de des haplotypes de CFH sur le risque de récurrence de la maladie initiale sur une population d'environ 150 patients. Les conséquences fonctionnelles des nouvelles mutations de CFH et des haplotypes de CFH seront étudiées et nous analyserons s'il existe une corrélation entre les anomalies fonctionnelles retrouvées et l'évolution clinique. La nature des marqueurs testés évolue rapidement en fonction des progrès de la recherche. Récemment l'équipe de Santiago de Cordoba en Espagne a souligné l'importance du variant CFHR1*B dans le SHU atypique⁵². Ce variant est en déséquilibre de liaison avec l'haplotype de CFH gtgt. L'augmentation du risque de récurrence en post-transplantation pourrait donc être due au CFHR1*B. Il est donc nécessaire de réaliser une recherche de ce variant et de le corréler au devenir clinique.

Le diagnostic moléculaire peut encore être amélioré afin de pouvoir approcher individuellement le risque de récurrence en tenant compte de l'ensemble des facteurs de risques génétiques. Le délai de survenue des récurrences de SHU atypique en post-transplantation rénale peut être très variable, en particulier chez les patients ayant des mutations de CFI. D'autre part, des mutations sur le même gène sont associées à différents phénotypes. Il est donc nécessaire chez ces patients d'analyser les conséquences fonctionnelles des mutations et de chercher des anomalies génétiques associées.

Dans cette recherche, nous n'avons pas pu mettre en évidence une différence significative du risque de récurrence entre les patients porteurs d'une mutation associée à un déficit quantitatif ou un déficit fonctionnel en Facteur H. L'analyse fonctionnelle de ces anomalies doit être reprise pour améliorer la connaissance individuelle du risque.

Chez 30% des patients ayant un SHU atypique, aucune anomalie génétique n'est identifiée et 20% d'entre eux récidivent après transplantation. La recherche de nouvelles anomalies génétiques est nécessaire. Le champ des anomalies génétiques potentielles s'est élargi

puisque récemment, dans un travail collaboratif notre groupe a montré que des mutations du DGKE, gène non lié au complément, sont associées au SHU atypique. Une étude par exome est actuellement en cours sur la cohorte des patients ayant un SHU atypique sans mutation sur les gènes du complément. Ce travail permettra d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la récurrence après greffe.

La cellule endothéliale est au centre de la physiopathologie. Elle joue un rôle essentiel dans le contrôle de la perméabilité capillaire, la régulation de l'inflammation, le contrôle de l'activation du complément et la coagulation afin de réduire le risque de formation de thrombus. En post-transplantation, l'activation des cellules endothéliales peut-être potentialisée soit par des triggers soit par un défaut de protection de ses constituants. L'ischémie-reperfusion, la mort encéphalique, les anticalcineurines exercent une toxicité directe ou indirecte via la production de C3a, C5a et C5b9. Le glycocalyx peut être lésé, il est normalement présent à la surface de la cellule endothéliale et joue le rôle de « gel anti-adhésif », il réduit l'adhésion à l'endothélium des leucocytes (effet anti-inflammatoire) et des hématies, et exerce un rôle antithrombotique. La production de VEGF peut être diminuée en post transplantation or la sécrétion du VEGF est un composant majeur de la réparation des cellules endothéliales. L'activation du complément et la production de C5a importante durant la période de post-transplantation contribuent à la baisse de l'activité de VEGF via son récepteur. L'ensemble de ces données peut expliquer la survenue précoce des récurrences en post-transplantation rénale.

Le poids de ces différents acteurs responsables de la MAT est variable selon que le patient ait un SHU atypique ou une MAT de Novo. Trente pourcent des patients ayant une MAT de novo en post-transplantation ont une mutation dans les protéines de régulation du

complément dans CFH et CFI ²³⁷. A l'opposé, 70% des patients transplantés pour un SHU atypique ont une mutation complément-dépendante. La responsabilité des triggers dans la MAT est différente, dans ces deux groupes. Les triggers, la toxicité des immunosuppresseurs, le rejet humoral, l'ischémie froide jouent un rôle probablement plus important dans la survenue de la MAT de novo que chez les patients ayant un SHU atypique. En revanche, la présence de lésions de microangiopathie thrombotique dans le rein ou sur le greffon quelque soit la cause initiale est associée à une mauvaise survie rénale ou du greffon ^{237,260,298}

Les mécanismes déclenchant la MAT sont différents selon la cause ; i) activation initiale de la voie classique pour le SAPL, le rejet humoral, ii) dérégulation de la voie alterne pour les patients ayant un SHU atypique complément-dépendant iii) toxicité directe sur les cellules endothéliales due aux médicaments, rejet cellulaire, infection à CMV, BK , Parvovirus B19. Le traitement par un blocage de la voie d'activation finale, par l'anti-C5 (Eculizumab) est le traitement de référence de SHU atypique. En post-transplantation rénale, la survenue des récurrences est le plus souvent très précoce. Les patients à très haut risque de récurrence (porteurs de mutations de CFH, CFB/C3), doivent bénéficier du traitement par anti-C5. Pour les patients avec un risque intermédiaire (polymorphisme de CFH, CFI), le traitement se discute et pour les patients ayant un risque faible, la plasmathérapie prophylactique est suffisante. La durée du traitement n'est pas définie. Le traitement est pour le moment donné à vie. Compte tenu de la survenue des récurrences précoces, l'arrêt du traitement à un an doit pouvoir être discuté.

L'éculizumab a également été proposé avec succès dans les MAT de novo ²⁹⁹, les récurrences de SAPL en post-transplantation²⁹⁸, le rejet humoral avec de la MAT³⁰⁰, lors d'échec de la plasmathérapie en deuxième intention.

2 C3G et GNMP de type I en post-transplantation

Les résultats préliminaires du travail réalisé chez les patients transplantés pour une C3G/GNMP de type I ouvrent des voies prometteuses dans la prise en charge des patients.

Pour la première fois, nous montrons à partir d'une cohorte de patients transplantés pour une C3G ou GNMP de type I, que la dérégulation de la voie alterne du complément, baisse du C3 et augmentation du sC5b9, en post-transplantation est associée à un risque majeur de récurrence clinique. Par ce modèle, nous confirmons chez l'homme, les données acquises dans les modèles animaux.

Durant cette dernière décennie, il a été montré dans des modèles animaux que l'absence de Facteur H dans le sérum, responsable de l'hyperactivation de la C3 convertase, induit une C3G chez les animaux ^{167 169}. Dans un modèle de souris, la présence d'une double délétion homozygote de CFH et C5, diminue la sévérité du phénotype de C3G, ce qui veut dire que le C5 (C5a et C5b9) participe à la sévérité de la maladie ¹⁷². Chez l'homme, la C3G et la GNMP de type I sont associées à des anomalies du complément. En revanche, aucune étude n'a pu démontrer que l'hyperactivation de la voie alterne du complément était à l'origine de la maladie et impactait la sévérité de la maladie.

Nous avons étudié les facteurs de risques de survenue de la récurrence clinique en fonction de la consommation de la voie alterne du complément. Nous montrons pour la première fois, chez l'homme que la maladie (traduit par la récurrence sur le greffon) est liée à l'hyperactivation de la voie alterne du complément. En effet, les patients qui normalisent l'hyperactivation de la voie alterne du complément en post-transplantation ont un risque faible de récurrence comparable à celui des patients n'ayant pas de consommation de la voie

alterne du complément. Les patients ayant un C5b9 augmenté ont 100% de récurrence clinique en post transplantation. Dans le modèle de souris, la gravité du phénotype est liée au C5.

Dans cette même cohorte, j'ai étudié les biopsies de greffon en post-transplantation et réalisé des marquages du complément (C3, C5b9). Les premiers résultats montrent que les anomalies histologiques (dépôts, prolifération), la présence de C3, C5b9 sont plus importantes chez les patients ayant une récurrence clinique que chez les patients ayant une récurrence histologique isolée, sans anomalie clinique. Les corrélations entre les anomalies retrouvées en phase fluide, les anomalies histologiques et le phénotype clinique seront analysées.

Cette étude a permis d'identifier les marqueurs de sévérité de la récurrence clinique qui permettront de définir des nouveaux protocoles thérapeutiques.

Les C3G et GNMP de type I sont associées à une prolifération mésangiale. Le lien entre l'activation du complément et la prolifération mésangiale n'est pas bien compris.

Les anaphylatoxines C3a et C5a se lient à leur récepteur RC3a et RC5a présents sur les cellules mésangiales en culture et peuvent induire leur prolifération^{301,302}. La présence des récepteurs C3a et C5a sur les cellules mésangiales est controversée³⁰³. Les anaphylatoxines C3a et C5a pourraient être responsables d'une prolifération des cellules mésangiales via la stimulation des monocytes, polynucléaires neutrophiles qui libèrent des oxydants et protéases ayant un rôle dans la stimulation des cellules endothéliales/mésangiales^{304,305}. La prolifération mésangiale peut être induite via la libération de PDGF- β par les cellules endothéliales qui activent la prolifération des cellules mésangiales³⁰⁵. Le C5b9 induit sur des cellules mésangiales dans un modèle de rat^{306,307}. Les lignées de cellules mésangiales seront incubées avec le plasma des patients ou avec un plasma issu de donneur sain. Les dépôts de C3d et prolifération mésangiales seront quantifiés.

3 Liens entre les G3N/GNMP de type I et le SHU atypique

Il est admis qu'une hyperactivation ou un défaut de contrôle de la voie alterne du complément en phase fluide est responsable d'une G3N/GNMP de type I alors qu'un défaut de contrôle à la surface cellulaire serait associé à une MAT. En effet, dans les modèles animaux les souris transgéniques déficientes en FH (CFH^{-/-}) ont un taux de C3 circulant effondré et développent une atteinte rénale de type GNMP¹⁶⁹. En revanche les souris déficientes dans la partie C terminale du FH développent un SHU atypique¹¹⁸.

Les données chez l'homme confortent cette hypothèse : les mutations du FH associées à une G3N/GNMP sont des mutations qui interviennent dans la régulation en phase fluide du complément. A l'inverse les mutations associées à un SHU sont généralement localisées dans le domaine C terminal impliqué dans la reconnaissance des complexes C3b/polyanions. Néanmoins, même si les conséquences fonctionnelles des mutations sont bien établies, des patients porteurs d'une même mutation développent un SHU atypique et d'autres une GNC3. En effet, des patients ayant une mutation du FH dans la partie N terminale ou un déficit quantitatif en FH peuvent développer un SHUa. D'autre part, dans la cohorte de patients ayant une GNC3, un patient a une mutation dans la partie C terminale, au niveau du SCR20 du FH (R1210C). Il existe de manière évidente d'autres facteurs additionnels qui peuvent être responsables du changement de phénotype. En effet les SNP et haplotypes qui prédisposent au SHU atypique ou à la GNMP sont différents¹¹⁸ et pourraient jouer un rôle de gène modificateur. On observe en effet des switches de phénotypes avant et après transplantation rénale. Nous avons décrit des patients présentant une GNMP sur le rein natif, un SHU atypique sur le greffon²³⁷ et un autre cas a été rapporté de passage d'un SHU atypique sur le rein propre à une GNMP sur le greffon³⁰⁸. De plus chez les patients ayant

une des anomalies non complément dépendante comme une mutation du DGKE, certains patients développent un SHU atypique¹⁰⁶ et d'autres une protéinurie isolée¹³⁰. Le VEGF sécrété par les podocytes joue un rôle central dans le maintien de la barrière de filtration via son implication dans le maintien du podocyte. Son rôle dans ces pathologies et les switches de phénotypes restent à définir.

La connaissance de la génétique du complément et le début de compréhension de son rôle dans la physiopathologie de la maladie ont permis d'orienter les recherche thérapeutiques dans de nouvelles directions. Les approches seront de plus en plus dirigées vers de nouvelles cibles qui stopperont tous les acteurs pathogènes en conservant les fonctions physiologiques du complément. Les travaux de recherche que j'ai effectués ont des retombées multiples qui devraient permettre à terme de proposer aux patients et à leurs familles des moyens de prévention fiables et des traitements adaptés à chaque cas.

BIBLIOGRAPHIE

1. Walport MJ. Complement. First of two parts. *The New England journal of medicine*. 2001;344(14):1058-1066.
2. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology*. 2010;11(9):785-797.
3. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *The New England journal of medicine*. 2001;344(15):1140-1144.
4. Agrawal A SA, Greenhough TJ, Volanakis JE. Topology and structure of the C1q-binding site on C-reactive protein. *J Immunol*. 2001;166(6):3998-4004.
5. Roumenina LT RM, Zlatarova A, Ghai R, Kolev M, Olova N, Gadjeva M, Agrawal A, Bottazzi B, Mantovani A, Reid KB, Kishore U, Kojouharova MS. Interaction of C1q with IgG1, C-reactive protein and pentraxin 3: mutational studies using recombinant globular head modules of human C1q A, B, and C chains. *Biochemistry*. 2006;45(13):4093-4104.
6. Bindon CI HG, Brüggemann M, Waldmann H. Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *J Exp Med*. 1988;168(1):127-142
7. Wallis R, Mitchell DA, Schmid R, Schwaeble WJ, Keeble AH. Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology*. 2010;215(1):1-11.
8. Dodds AW RX, Willis AC, Law SK. The reaction mechanism of the internal thioester in the human complement component C4. *Nature*. 1996;379:177-179.
9. Pangburn MK, Schreiber RD, Muller-Eberhard HJ. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *The Journal of experimental medicine*. 1981;154(3):856-867.
10. Fishelson Z, Pangburn MK, Muller-Eberhard HJ. Characterization of the initial C3 convertase of the alternative pathway of human complement. *Journal of immunology*. 1984;132(3):1430-1434.
11. Pangburn MK, Schreiber RD, Muller-Eberhard HJ. C3b deposition during activation of the alternative complement pathway and the effect of deposition on the activating surface. *Journal of immunology*. 1983;131(4):1930-1935.
12. Rambach G, Maier H, Vago G, et al. Complement induction and complement evasion in patients with cerebral aspergillosis. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2008;10(14-15):1567-1576.
13. Lutz HU, Jelezarova E. Complement amplification revisited. *Molecular immunology*. 2006;43(1-2):2-12.
14. Hugli TE. Structure and function of the anaphylatoxins. *Springer Semin Immunopathol*. 1984;7(2-3):193-219.
15. Schraufstatter IU, Trieu K, Sikora L, Sriramarao P, DiScipio R. Complement c3a and c5a induce different signal transduction cascades in endothelial cells. *Journal of immunology*. 2002;169(4):2102-2110.
16. Laudes IJ, Chu JC, Huber-Lang M, et al. Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells. *Journal of immunology*. 2002;169(10):5962-5970.

17. Camous L, Roumenina L, Bigot S, et al. *Complement alternative pathway acts as a positive feedback amplification of neutrophil activation*. Vol 117. 2010/11/11 ed2011.
18. Werfel T, Oppermann M, Schulze M, Krieger G, Weber M, Gotze O. Binding of fluorescein-labeled anaphylatoxin C5a to human peripheral blood, spleen, and bone marrow leukocytes. *Blood*. 1992;79(1):152-160.
19. Nataf S, Davoust N, Ames RS, Barnum SR. Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a. *Journal of immunology*. 1999;162(7):4018-4023.
20. Laudes IJ, Chu JC, Sikrath S, et al. Anti-c5a ameliorates coagulation/fibrinolytic protein changes in a rat model of sepsis. *The American journal of pathology*. 2002;160(5):1867-1875.
21. Goodman MG, Chenoweth DE, Weigle WO. Potentiation of the primary humoral immune response in vitro by C5a anaphylatoxin. *Journal of immunology*. 1982;129(1):70-75.
22. Schindler R, Gelfand JA, Dinarello CA. Recombinant C5a stimulates transcription rather than translation of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor: translational signal provided by lipopolysaccharide or IL-1 itself. *Blood*. 1990;76(8):1631-1638.
23. Albrecht EA, Chinnaiyan AM, Varambally S, et al. C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *The American journal of pathology*. 2004;164(3):849-859.
24. Nilsson G, Johnell M, Hammer CH, et al. C3a and C5a are chemotaxins for human mast cells and act through distinct receptors via a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway. *Journal of immunology*. 1996;157(4):1693-1698.
25. Dobrina A, Pausa M, Fischetti F, et al. Cytolytically inactive terminal complement complex causes transendothelial migration of polymorphonuclear leukocytes in vitro and in vivo. *Blood*. 2002;99(1):185-192.
26. Fishelson Z. Complement C3: a molecular mosaic of binding sites. *Molecular immunology*. 1991;28(4-5):545-552.
27. Fearon DT. Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B lymphocyte, and monocyte. *The Journal of experimental medicine*. 1980;152(1):20-30.
28. Klickstein LB, Barbashov SF, Liu T, Jack RM, Nicholson-Weller A. Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. *Immunity*. 1997;7(3):345-355.
29. Liu D, Niu ZX. The structure, genetic polymorphisms, expression and biological functions of complement receptor type 1 (CR1/CD35). *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 2009;31(4):524-535.
30. Ross GD, Cain JA, Lachmann PJ. Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin as functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. *Journal of immunology*. 1985;134(5):3307-3315.
31. Pepys MB. Role of complement in the induction of immunological responses. *Transplant Rev*. 1976;32:93-120.
32. Cornacoff JB, Hebert LA, Smead WL, VanAman ME, Birmingham DJ, Waxman FJ. Primate erythrocyte-immune complex-clearing mechanism. *The Journal of clinical investigation*. 1983;71(2):236-247.

33. Carroll MC. The complement system in B cell regulation. *Mol Immunol*. 2004;41(2-3):141-146.
34. Astier AL, Meiffren G, Freeman S, Hafler DA. Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(12):3252-3257.
35. Kemper C, Verbsky JW, Price JD, Atkinson JP. T-cell stimulation and regulation: with complements from CD46. *Immunol Res*. 2005;32(1-3):31-43.
36. Warwicker P, Goodship TH, Donne RL, et al. Genetic studies into inherited and sporadic hemolytic uremic syndrome. *Kidney international*. 1998;53(4):836-844.
37. de Cordoba SR, de Jorge EG. Translational mini-review series on complement factor H: genetics and disease associations of human complement factor H. *Clinical and experimental immunology*. 2008;151(1):1-13.
38. Esparza-Gordillo J, Soria JM, Buil A, et al. Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels. *Immunogenetics*. 2004;56(2):77-82.
39. Ripoche J, Mitchell JA, Erdei A, et al. Interferon gamma induces synthesis of complement alternative pathway proteins by human endothelial cells in culture. *The Journal of experimental medicine*. 1988;168(5):1917-1922.
40. Perkins SJ, Nealis AS, Sim RB. Oligomeric domain structure of human complement factor H by X-ray and neutron solution scattering. *Biochemistry*. 1991;30(11):2847-2857.
41. Barlow PN, Norman DG, Steinkasserer A, et al. Solution structure of the fifth repeat of factor H: a second example of the complement control protein module. *Biochemistry*. 1992;31(14):3626-3634.
42. Aslam M, Perkins SJ. Folded-back solution structure of monomeric factor H of human complement by synchrotron X-ray and neutron scattering, analytical ultracentrifugation and constrained molecular modelling. *Journal of molecular biology*. 2001;309(5):1117-1138.
43. Oppermann M, Manuelian T, Jozsi M, et al. The C-terminus of complement regulator Factor H mediates target recognition: evidence for a compact conformation of the native protein. *Clinical and experimental immunology*. 2006;144(2):342-352.
44. Jokiranta TS, Hellwage J, Koistinen V, Zipfel PF, Meri S. Each of the three binding sites on complement factor H interacts with a distinct site on C3b. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(36):27657-27662.
45. Roversi P, Johnson S, Caesar JJ, et al. Structural basis for complement factor H control and its disease-associated sequence polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(31):12839-12844.
46. Weiler JM, Daha MR, Austen KF, Fearon DT. Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1976;73(9):3268-3272.
47. Wu J, Wu YQ, Ricklin D, Janssen BJ, Lambris JD, Gros P. Structure of complement fragment C3b-factor H and implications for host protection by complement regulators. *Nature immunology*. 2009;10(7):728-733.
48. Meri S, Pangburn MK. A mechanism of activation of the alternative complement pathway by the classical pathway: protection of C3b from inactivation by

- covalent attachment to C4b. *European journal of immunology*. 1990;20(12):2555-2561.
49. Pangburn MK, Rawal N, Cortes C, Alam MN, Ferreira VP, Atkinson MA. Polyanion-induced self-association of complement factor H. *Journal of immunology*. 2009;182(2):1061-1068.
 50. Jokiranta TS, Cheng ZZ, Seeberger H, et al. Binding of complement factor H to endothelial cells is mediated by the carboxy-terminal glycosaminoglycan binding site. *The American journal of pathology*. 2005;167(4):1173-1181.
 51. Kazatchkine MD, Fearon DT, Austen KF. Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and beta1 H for cell-bound C3b. *Journal of immunology*. 1979;122(1):75-81.
 52. Abarrategui-Garrido C, Martinez-Barricarte R, Lopez-Trascasa M, de Cordoba SR, Sanchez-Corral P. Characterization of complement factor H-related (CFHR) proteins in plasma reveals novel genetic variations of CFHR1 associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2009;114(19):4261-4271.
 53. Zipfel PF, Skerka C. FHL-1/reconectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function. *Immunology today*. 1999;20(3):135-140.
 54. Skerka C, Chen Q, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement factor H related proteins (CFHRs). *Molecular immunology*. 2013;56(3):170-180.
 55. Goicoechea de Jorge E, Caesar JJ, Malik TH, 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):4685-4690.
 56. Tortajada A, Yebenes H, Abarrategui-Garrido C, et al. C3 glomerulopathy-associated CFHR1 mutation alters FHR oligomerization and complement regulation. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(6):2434-2446.
 57. Fritsche LG, Lauer N, Hartmann A, 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):4694-4704.
 58. Heinen S, Hartmann A, Lauer N, et al. Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood*. 2009;114(12):2439-2447.
 59. Fremeaux-Bacchi V, Moulton EA, Kavanagh D, et al. Genetic and functional analyses of membrane cofactor protein (CD46) mutations in atypical hemolytic uremic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2006;17(7):2017-2025.
 60. Holmes LV, Strain L, Staniforth SJ, et al. Determining the population frequency of the CFHR3/CFHR1 deletion at 1q32. *PloS one*. 2013;8(4):e60352.
 61. Dragon-Durey MA, Blanc C, Marliot F, et al. The high frequency of complement factor H related CFHR1 gene deletion is restricted to specific subgroups of patients with atypical haemolytic uraemic syndrome. *Journal of medical genetics*. 2009;46(7):447-450.
 62. Hughes AE, Orr N, Esfandiary H, Diaz-Torres M, Goodship T, Chakravarthy U. A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration. *Nature genetics*. 2006;38(10):1173-1177.
 63. Eberhardt HU, Uzonyi B, Hälbisch S, Zipfel P F, Skerka C. Complement factor H-related protein 2 (CFHR2) is a C3b and heparin binding protein. 2009.

64. Hellwage J, Jokiranta TS, Koistinen V, Vaarala O, Meri S, Zipfel PF. Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin. *FEBS letters*. 1999;462(3):345-352.
65. Catterall CF, Lyons A, Sim RB, Day AJ, Harris TJ. Characterization of primary amino acid sequence of human complement control protein factor I from an analysis of cDNA clones. *The Biochemical journal*. 1987;242(3):849-856.
66. Harrison RA, Lachmann PJ. Novel cleavage products of the third component of human complement. *Molecular immunology*. 1980;17(2):219-228.
67. Medicus RG, Melamed J, Arnaout MA. Role of human factor I and C3b receptor in the cleavage of surface-bound C3bi molecules. *European journal of immunology*. 1983;13(6):465-470.
68. Blom AM, Kask L, Dahlback B. CCP1-4 of the C4b-binding protein alpha-chain are required for factor I mediated cleavage of complement factor C3b. *Molecular immunology*. 2003;39(10):547-556.
69. Liszewski MK, Leung M, Cui W, et al. Dissecting sites important for complement regulatory activity in membrane cofactor protein (MCP; CD46). *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(48):37692-37701.
70. Seya T, Turner JR, Atkinson JP. Purification and characterization of a membrane protein (gp45-70) that is a cofactor for cleavage of C3b and C4b. *The Journal of experimental medicine*. 1986;163(4):837-855.
71. Barilla-LaBarca ML, Liszewski MK, Lambris JD, Hourcade D, Atkinson JP. Role of membrane cofactor protein (CD46) in regulation of C4b and C3b deposited on cells. *J Immunol*. 2002;168(12):6298-6304.
72. Roumenina LT, Zuber J, Fremeaux-Bacchi V. Physiological and therapeutic complement regulators in kidney transplantation. *Current opinion in organ transplantation*. 2013;18(4):421-429.
73. Krahenbuhl OP, Peter HH, Tschopp J. Absence of homologous restriction factor does not affect CTL-mediated cytolysis. *European journal of immunology*. 1989;19(1):217-219.
74. Tschopp J, Chonn A, Hertig S, French LE. Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9. *Journal of immunology*. 1993;151(4):2159-2165.
75. Moake JL. Moschowitz, multimers, and metalloprotease. *The New England journal of medicine*. 1998;339(22):1629-1631.
76. Loirat C. [Hemolytic uremic syndrome caused by Shiga-toxin-producing Escherichia coli]. *La Revue du praticien*. 2013;63(1):11-16.
77. Siegler R, Oakes R. Hemolytic uremic syndrome; pathogenesis, treatment, and outcome. *Current opinion in pediatrics*. 2005;17(2):200-204.
78. Thorpe CM. Shiga toxin-producing Escherichia coli infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2004;38(9):1298-1303.
79. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing Escherichia coli and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*. 2005;365(9464):1073-1086.
80. Besbas N, Karpman D, Landau D, et al. A classification of hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura and related disorders. *Kidney international*. 2006;70(3):423-431.
81. Johnson S, Taylor CM. What's new in haemolytic uraemic syndrome? *European journal of pediatrics*. 2008;167(9):965-971.

82. Buchholz U, Bernard H, Werber D, et al. German outbreak of Escherichia coli O104:H4 associated with sprouts. *The New England journal of medicine*. 2011;365(19):1763-1770.
83. Magnus T, Rother J, Simova O, et al. The neurological syndrome in adults during the 2011 northern German E. coli serotype O104:H4 outbreak. *Brain : a journal of neurology*. 2012;135(Pt 6):1850-1859.
84. Noris M, Remuzzi G. Atypical hemolytic-uremic syndrome. *The New England journal of medicine*. 2009;361(17):1676-1687.
85. Song D, Wu LH, Wang FM, et al. The spectrum of renal thrombotic microangiopathy in lupus nephritis. *Arthritis research & therapy*. 2013;15(1):R12.
86. Joseph RE, Radhakrishnan J, Appel GB. Antiphospholipid antibody syndrome and renal disease. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2001;10(2):175-181.
87. Copelovitch L, Kaplan BS. The thrombotic microangiopathies. *Pediatric nephrology*. 2008;23(10):1761-1767.
88. Moake JL. Thrombotic microangiopathies. *The New England journal of medicine*. 2002;347(8):589-600.
89. Waters AM, Kerecuk L, Luk D, et al. Hemolytic uremic syndrome associated with invasive pneumococcal disease: the United kingdom experience. *The Journal of pediatrics*. 2007;151(2):140-144.
90. Jeejeebhoy FM, Zaltzman JS. Thrombotic microangiopathy in association with cytomegalovirus infection in a renal transplant patient: a new treatment strategy. *Transplantation*. 1998;65(12):1645-1648.
91. Fremeaux-Bacchi V, Fakhouri F, Garnier A, et al. Genetics and outcome of atypical hemolytic uremic syndrome: a nationwide French series comparing children and adults. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(4):554-562.
92. Noris M, Caprioli J, Bresin E, et al. Relative role of genetic complement abnormalities in sporadic and familial aHUS and their impact on clinical phenotype. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2010;5(10):1844-1859.
93. Sallee M, Daniel L, Piercecchi MD, et al. Myocardial infarction is a complication of factor H-associated atypical HUS. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2010;25(6):2028-2032.
94. Frimat M, Tabarin F, Dimitrov JD, et al. Complement activation by heme as a secondary hit for atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2013;122(2):282-292.
95. Cameron JS, Vick R. Letter: Plasma-C3 in haemolytic-uraemic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Lancet*. 1973;2(7835):975.
96. Carreras L, Romero R, Requesens C, et al. Familial hypocomplementemic hemolytic uremic syndrome with HLA-A3,B7 haplotype. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1981;245(6):602-604.
97. Thompson RA, Winterborn MH. Hypocomplementaemia due to a genetic deficiency of beta 1H globulin. *Clinical and experimental immunology*. 1981;46(1):110-119.
98. Le Quintrec M, Roumenina L, Noris M, Fremeaux-Bacchi V. Atypical hemolytic uremic syndrome associated with mutations in complement regulator genes. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36(6):641-652.

99. Fremeaux-Bacchi V, Miller EC, Liszewski MK, et al. Mutations in complement C3 predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2008;112(13):4948-4952.
100. Roumenina LT, Jablonski M, Hue C, et al. Hyperfunctional C3 convertase leads to complement deposition on endothelial cells and contributes to atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2009;114(13):2837-2845.
101. Kavanagh D, Kemp EJ, Mayland E, et al. Mutations in complement factor I predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005;16(7):2150-2155.
102. Kavanagh D, Richards A, Noris M, et al. Characterization of mutations in complement factor I (CFI) associated with hemolytic uremic syndrome. *Molecular immunology*. 2008;45(1):95-105.
103. Kavanagh D, Burgess R, Spitzer D, et al. The decay accelerating factor mutation I197V found in hemolytic uraemic syndrome does not impair complement regulation. *Molecular immunology*. 2007;44(12):3162-3167.
104. Stahl AL, Vaziri-Sani F, Heinen S, et al. Factor H dysfunction in patients with atypical hemolytic uremic syndrome contributes to complement deposition on platelets and their activation. *Blood*. 2008;111(11):5307-5315.
105. Delvaeye M, Noris M, De Vriese A, et al. Thrombomodulin mutations in atypical hemolytic-uremic syndrome. *The New England journal of medicine*. 2009;361(4):345-357.
106. Lemaire M, Fremeaux-Bacchi V, Schaefer F, et al. Recessive mutations in DGKE cause atypical hemolytic-uremic syndrome. *Nature genetics*. 2013;45(5):531-536.
107. Maga TK, Nishimura CJ, Weaver AE, Frees KL, Smith RJ. Mutations in alternative pathway complement proteins in American patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Human mutation*. 2010;31(6):E1445-1460.
108. Dragon-Durey MA, Loirat C, Cloarec S, et al. Anti-Factor H autoantibodies associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005;16(2):555-563.
109. Pickering MC, Cook HT. Translational mini-review series on complement factor H: renal diseases associated with complement factor H: novel insights from humans and animals. *Clinical and experimental immunology*. 2008;151(2):210-230.
110. Rougier N, Kazatchkine MD, Rougier JP, et al. Human complement factor H deficiency associated with hemolytic uremic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 1998;9(12):2318-2326.
111. Venables JP, Strain L, Routledge D, et al. Atypical haemolytic uraemic syndrome associated with a hybrid complement gene. *PLoS Med*. 2006;3(10):e431.
112. Francis NJ, McNicholas B, Awan A, et al. A novel hybrid CFH/CFHR3 gene generated by a microhomology-mediated deletion in familial atypical hemolytic uremic syndrome. Vol 119. 2011/11/08 ed2012.
113. Manuelian T, Hellwage J, Meri S, et al. Mutations in factor H reduce binding affinity to C3b and heparin and surface attachment to endothelial cells in hemolytic uremic syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(8):1181-1190.
114. Ferreira VP, Herbert AP, Cortes C, et al. The binding of factor H to a complex of physiological polyanions and C3b on cells is impaired in atypical hemolytic uremic syndrome. *Journal of immunology*. 2009;182(11):7009-7018.

115. Jokiranta TS, Jaakola VP, Lehtinen MJ, Parepalo M, Meri S, Goldman A. Structure of complement factor H carboxyl-terminus reveals molecular basis of atypical haemolytic uremic syndrome. *The EMBO journal*. 2006;25(8):1784-1794.
116. Jozsi M, Heinen S, Hartmann A, et al. Factor H and atypical hemolytic uremic syndrome: mutations in the C-terminus cause structural changes and defective recognition functions. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2006;17(1):170-177.
117. Sanchez-Corral P, Perez-Caballero D, Huarte O, et al. Structural and functional characterization of factor H mutations associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *American journal of human genetics*. 2002;71(6):1285-1295.
118. Pickering MC, de Jorge EG, Martinez-Barricarte R, et al. Spontaneous hemolytic uremic syndrome triggered by complement factor H lacking surface recognition domains. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(6):1249-1256.
119. de Jorge EG, Macor P, Paixao-Cavalcante D, et al. The development of atypical hemolytic uremic syndrome depends on complement C5. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(1):137-145.
120. Saunders RE, Abarrategui-Garrido C, Fremeaux-Bacchi V, et al. The interactive Factor H-atypical hemolytic uremic syndrome mutation database and website: update and integration of membrane cofactor protein and Factor I mutations with structural models. *Human mutation*. 2007;28(3):222-234.
121. Fremeaux-Bacchi V, Dragon-Durey MA, Blouin J, et al. Complement factor I: a susceptibility gene for atypical haemolytic uraemic syndrome. *Journal of medical genetics*. 2004;41(6):e84.
122. Bienaime F, Dragon-Durey MA, Regnier CH, et al. Mutations in components of complement influence the outcome of Factor I-associated atypical hemolytic uremic syndrome. *Kidney international*. 2010;77(4):339-349.
123. Bresin E, Rurali E, Caprioli J, et al. Combined complement gene mutations in atypical hemolytic uremic syndrome influence clinical phenotype. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2013;24(3):475-486.
124. Richards A, Kemp EJ, Liszewski MK, et al. Mutations in human complement regulator, membrane cofactor protein (CD46), predispose to development of familial hemolytic uremic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(22):12966-12971.
125. Richards A, Kathryn Liszewski M, Kavanagh D, et al. Implications of the initial mutations in membrane cofactor protein (MCP; CD46) leading to atypical hemolytic uremic syndrome. *Molecular immunology*. 2007;44(1-3):111-122.
126. Fang CJ, Fremeaux-Bacchi V, Liszewski MK, et al. Membrane cofactor protein mutations in atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS), fatal Stx-HUS, C3 glomerulonephritis, and the HELLP syndrome. *Blood*. 2008;111(2):624-632.
127. Goicoechea de Jorge E, Harris CL, Esparza-Gordillo J, et al. Gain-of-function mutations in complement factor B are associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(1):240-245.
128. Roumenina LT, Frimat M, Miller EC, et al. A prevalent C3 mutation in aHUS patients causes a direct C3 convertase gain of function. Vol 119. 2012/01/17 ed2012.
129. Sartz L, Olin AI, Kristoffersson AC, et al. A novel C3 mutation causing increased formation of the C3 convertase in familial atypical hemolytic uremic syndrome. Vol 188. 2012/01/18 ed2012.

130. Ozaltin F, Li B, Rauhauser A, et al. DGKE variants cause a glomerular microangiopathy that mimics membranoproliferative GN. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(3):377-384.
131. Jozsi M, Strobel S, Dahse HM, et al. Anti factor H autoantibodies block C-terminal recognition function of factor H in hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2007;110(5):1516-1518.
132. Moore I, Strain L, Pappworth I, et al. 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*. 2010;115(2):379-387.
133. Strobel S, Zimmering M, Papp K, Prechl J, Jozsi M. Anti-factor B autoantibody in dense deposit disease. *Molecular immunology*. 2010;47(7-8):1476-1483.
134. Blanc C, Roumenina LT, Ashraf Y, et al. *Overall neutralization of complement factor H by autoantibodies in the acute phase of the autoimmune form of atypical hemolytic uremic syndrome*. Vol 189. 2012/08/28 ed2012.
135. Dragon-Durey MA, Sethi SK, Bagga A, et al. *Clinical features of anti-factor H autoantibody-associated hemolytic uremic syndrome*. Vol 21. 2010/11/06 ed2010.
136. Fremeaux-Bacchi V, Kemp EJ, Goodship JA, et al. The development of atypical haemolytic-uraemic syndrome is influenced by susceptibility factors in factor H and membrane cofactor protein: evidence from two independent cohorts. *Journal of medical genetics*. 2005;42(11):852-856.
137. Martinez-Barricarte R, Pianetti G, Gautard R, et al. The complement factor H R1210C mutation is associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2008;19(3):639-646.
138. Blom AM, Bergstrom F, Edey M, et al. A novel non-synonymous polymorphism (p.Arg240His) in C4b-binding protein is associated with atypical hemolytic uremic syndrome and leads to impaired alternative pathway cofactor activity. *Journal of immunology*. 2008;180(9):6385-6391.
139. Zhan X, Larson DE, Wang C, et al. Identification of a rare coding variant in complement 3 associated with age-related macular degeneration. *Nature genetics*. 2013.
140. Seddon JM, Yu Y, Miller EC, et al. Rare variants in CFI, C3 and C9 are associated with high risk of advanced age-related macular degeneration. *Nature genetics*. 2013.
141. Helgason H, Sulem P, Duvvari MR, et al. A rare nonsynonymous sequence variant in C3 is associated with high risk of age-related macular degeneration. *Nature genetics*. 2013.
142. Feng S, Eyler SJ, Zhang Y, et al. Partial ADAMTS13 deficiency in atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2013;122(8):1487-1493.
143. Rayes J, Roumenina LT, Dimitrov JD, et al. The interaction between factor H and VWF increases factor H cofactor activity and regulates VWF prothrombotic status. *Blood*. 2013.
144. Sellier-Leclerc AL, Fremeaux-Bacchi V, Dragon-Durey MA, et al. Differential Impact of Complement Mutations on Clinical Characteristics in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007.

145. Zuber J, Le Quintrec M, Sberro-Soussan R, Loirat C, Fremeaux-Bacchi V, Legendre C. New insights into postrenal transplant hemolytic uremic syndrome. *Nature reviews. Nephrology*. 2011;7(1):23-35.
146. Saland JM, Ruggenenti P, Remuzzi G. Liver-kidney transplantation to cure atypical hemolytic uremic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2009;20(5):940-949.
147. Loirat C, Garnier A, Sellier-Leclerc AL, Kwon T. Plasmatherapy in atypical hemolytic uremic syndrome. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36(6):673-681.
148. Remuzzi G, Ruggenenti P, Codazzi D, et al. Combined kidney and liver transplantation for familial haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*. 2002;359(9318):1671-1672.
149. Cheong HI, Lee BS, Kang HG, et al. Attempted treatment of factor H deficiency by liver transplantation. *Pediatric nephrology*. 2004;19(4):454-458.
150. Remuzzi G, Ruggenenti P, Colledan M, et al. Hemolytic uremic syndrome: a fatal outcome after kidney and liver transplantation performed to correct factor h gene mutation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005;5(5):1146-1150.
151. Saland JM, Emre SH, Shneider BL, et al. Favorable long-term outcome after liver-kidney transplant for recurrent hemolytic uremic syndrome associated with a factor H mutation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2006;6(8):1948-1952.
152. Jalanko H, Peltonen S, Koskinen A, et al. Successful liver-kidney transplantation in two children with aHUS caused by a mutation in complement factor H. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2008;8(1):216-221.
153. Wang Y. Complementary therapies for inflammation. *Nature biotechnology*. 2006;24(10):1224-1226.
154. Zuber J, Fakhouri F, Roumenina LT, Loirat C, Fremeaux-Bacchi V, French Study Group for a HCG. *Use of eculizumab for atypical haemolytic uraemic syndrome and C3 glomerulopathies*. Vol 8. 2012/10/03 ed2012.
155. Zuber J, Le Quintrec M, Krid S, et al. Eculizumab for atypical hemolytic uremic syndrome recurrence in renal transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012;12(12):3337-3354.
156. Fakhouri F, Delmas Y, Provot F, et al. Insights From the Use in Clinical Practice of Eculizumab in Adult Patients With Atypical Hemolytic Uremic Syndrome Affecting the Native Kidneys: An Analysis of 19 Cases. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2013.
157. Lapeyraque AL, Malina M, Fremeaux-Bacchi V, et al. Eculizumab in severe Shiga-toxin-associated HUS. *The New England journal of medicine*. 2011;364(26):2561-2563.
158. Legendre CM, Licht C, Muus P, et al. Terminal complement inhibitor eculizumab in atypical hemolytic-uremic syndrome. *The New England journal of medicine*. 2013;368(23):2169-2181.

159. Hillmen P, Muus P, Roth A, et al. Long-term safety and efficacy of sustained eculizumab treatment in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *British journal of haematology*. 2013;162(1):62-73.
160. Sethi S, Fervenza FC. Membranoproliferative glomerulonephritis--a new look at an old entity. *The New England journal of medicine*. 2012;366(12):1119-1131.
161. Golgert WA, Appel GB, Hariharan S. Recurrent glomerulonephritis after renal transplantation: an unsolved problem. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2008;3(3):800-807.
162. Levy M, Gubler MC, Sich M, Beziau A, Habib R. Immunopathology of membranoproliferative glomerulonephritis with subendothelial deposits (Type I MPGN). *Clinical immunology and immunopathology*. 1978;10(4):477-492.
163. Habib R, Gubler MC, Loirat C, Maiz HB, Levy M. Dense deposit disease: a variant of membranoproliferative glomerulonephritis. *Kidney international*. 1975;7(4):204-215.
164. Smith RJ, Harris CL, Pickering MC. Dense deposit disease. *Molecular immunology*. 2011;48(14):1604-1610.
165. Servais A, Fremeaux-Bacchi V, Lequintrec M, et al. Primary glomerulonephritis with isolated C3 deposits: a new entity which shares common genetic risk factors with haemolytic uraemic syndrome. *Journal of medical genetics*. 2007;44(3):193-199.
166. Sethi S, Gamez JD, Vrana JA, et al. Glomeruli of Dense Deposit Disease contain components of the alternative and terminal complement pathway. *Kidney international*. 2009;75(9):952-960.
167. Hogasen K, Jansen JH, Mollnes TE, Hovdenes J, Harboe M. Hereditary porcine membranoproliferative glomerulonephritis type II is caused by factor H deficiency. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95(3):1054-1061.
168. Jansen A, Cook T, Taylor GM, et al. Induction of nitric oxide synthase in rat immune complex glomerulonephritis. *Kidney international*. 1994;45(4):1215-1219.
169. Pickering MC, Cook HT, Warren J, et al. Uncontrolled C3 activation causes membranoproliferative glomerulonephritis in mice deficient in complement factor H. *Nature genetics*. 2002;31(4):424-428.
170. Rose KL, Paixao-Cavalcante D, Fish J, et al. Factor I is required for the development of membranoproliferative glomerulonephritis in factor H-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(2):608-618.
171. Fakhouri F, de Jorge EG, Brune F, Azam P, Cook HT, Pickering MC. Treatment with human complement factor H rapidly reverses renal complement deposition in factor H-deficient mice. *Kidney international*. 2010;78(3):279-286.
172. Pickering MC, Warren J, Rose KL, et al. Prevention of C5 activation ameliorates spontaneous and experimental glomerulonephritis in factor H-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(25):9649-9654.
173. Servais A, Noel LH, Roumenina LT, et al. *Acquired and genetic complement abnormalities play a critical role in dense deposit disease and other C3 glomerulopathies*. Vol 82. 2012/03/30 ed2012.
174. Cameron JS, Turner DR, Heaton J, et al. Idiopathic mesangiocapillary glomerulonephritis. Comparison of types I and II in children and adults and long-term prognosis. *The American journal of medicine*. 1983;74(2):175-192.

175. Nasr SH, Valeri AM, Appel GB, et al. Dense deposit disease: clinicopathologic study of 32 pediatric and adult patients. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2009;4(1):22-32.
176. Appel GB, Cook HT, Hageman G, et al. Membranoproliferative glomerulonephritis type II (dense deposit disease): an update. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005;16(5):1392-1403.
177. Walker PD, Ferrario F, Joh K, Bonsib SM. Dense deposit disease is not a membranoproliferative glomerulonephritis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2007;20(6):605-616.
178. Fremeaux-Bacchi V, Weiss L, Demouchy C, May A, Palomera S, Kazatchkine MD. Hypocomplementaemia of poststreptococcal acute glomerulonephritis is associated with C3 nephritic factor (C3NeF) IgG autoantibody activity. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 1994;9(12):1747-1750.
179. Sethi S, Fervenza FC, Zhang Y, et al. Atypical postinfectious glomerulonephritis is associated with abnormalities in the alternative pathway of complement. *Kidney international*. 2013;83(2):293-299.
180. Sethi S, Fervenza FC, Zhang Y, et al. C3 glomerulonephritis: clinicopathological findings, complement abnormalities, glomerular proteomic profile, treatment, and follow-up. *Kidney international*. 2012;82(4):465-473.
181. Herlitz LC, Bomback AS, Markowitz GS, et al. Pathology after eculizumab in dense deposit disease and C3 GN. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2012;23(7):1229-1237.
182. Spitzer RE, Vallota EH, Forristal J, et al. Serum C'3 lytic system in patients with glomerulonephritis. *Science*. 1969;164(3878):436-437.
183. Daha MR, Fearon DT, Austen KF. C3 nephritic factor (C3NeF): stabilization of fluid phase and cell-bound alternative pathway convertase. *Journal of immunology*. 1976;116(1):1-7.
184. Fischer E, Kazatchkine MD, Mecarelli-Halbwachs L. Protection of the classical and alternative complement pathway C3 convertases, stabilized by nephritic factors, from decay by the human C3b receptor. *European journal of immunology*. 1984;14(12):1111-1114.
185. Ito S, Tamura N, Fujita T. Effect of decay-accelerating factor on the assembly of the classical and alternative pathway C3 convertases in the presence of C4 or C3 nephritic factor. *Immunology*. 1989;68(4):449-452.
186. Paixao-Cavalcante D, Lopez-Trascasa M, Skattum L, et al. Sensitive and specific assays for C3 nephritic factors clarify mechanisms underlying complement dysregulation. *Kidney international*. 2012;82(10):1084-1092.
187. Mollnes TE, Ng YC, Peters DK, Lea T, Tschopp J, Harboe M. Effect of nephritic factor on C3 and on the terminal pathway of complement in vivo and in vitro. *Clinical and experimental immunology*. 1986;65(1):73-79.
188. Zhang Y, Meyer NC, Wang K, et al. Causes of alternative pathway dysregulation in dense deposit disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2012;7(2):265-274.
189. Schwertz R, Rother U, Anders D, Gretz N, Scharer K, Kirschfink M. Complement analysis in children with idiopathic membranoproliferative glomerulonephritis:

- a long-term follow-up. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2001;12(3):166-172.
190. Misra A, Peethambaram A, Garg A. Clinical features and metabolic and autoimmune derangements in acquired partial lipodystrophy: report of 35 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2004;83(1):18-34.
 191. Walport MJ, Davies KA, Botto M, et al. C3 nephritic factor and SLE: report of four cases and review of the literature. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 1994;87(10):609-615.
 192. Tedesco F, Tovo PA, Tamaro G, Basaglia M, Perticarari S, Villa MA. Selective C3 deficiency due to C3 nephritic factor in an apparently healthy girl. *La Ricerca in clinica e in laboratorio*. 1985;15(4):323-329.
 193. Jokiranta TS, Solomon A, Pangburn MK, Zipfel PF, Meri S. Nephritogenic lambda light chain dimer: a unique human miniautoantibody against complement factor H. *Journal of immunology*. 1999;163(8):4590-4596.
 194. Meri S, Koistinen V, Miettinen A, Tornroth T, Seppala IJ. Activation of the alternative pathway of complement by monoclonal lambda light chains in membranoproliferative glomerulonephritis. *The Journal of experimental medicine*. 1992;175(4):939-950.
 195. Brackman D, Sartz L, Leh S, et al. Thrombotic microangiopathy mimicking membranoproliferative glomerulonephritis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2011;26(10):3399-3403.
 196. Goodship TH, Pappworth IY, Toth T, et al. Factor H autoantibodies in membranoproliferative glomerulonephritis. *Molecular immunology*. 2012;52(3-4):200-206.
 197. Lorcy N, Rioux-Leclercq N, Lombard ML, Le Pogamp P, Vigneau C. Three kidneys, two diseases, one antibody? *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2011;26(11):3811-3813.
 198. Chen Q, Muller D, Rudolph B, et al. Combined C3b and factor B autoantibodies and MPGN type II. *The New England journal of medicine*. 2011;365(24):2340-2342.
 199. Dragon-Durey MA, Fremeaux-Bacchi V, Loirat C, et al. Heterozygous and homozygous factor h deficiencies associated with hemolytic uremic syndrome or membranoproliferative glomerulonephritis: report and genetic analysis of 16 cases. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2004;15(3):787-795.
 200. Ault BH, Schmidt BZ, Fowler NL, et al. Human factor H deficiency. Mutations in framework cysteine residues and block in H protein secretion and intracellular catabolism. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(40):25168-25175.
 201. Zipfel PF, Heinen S, Jozsi M, Skerka C. Complement and diseases: defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases. *Molecular immunology*. 2006;43(1-2):97-106.
 202. Licht C, Heinen S, Jozsi M, et al. Deletion of Lys224 in regulatory domain 4 of Factor H reveals a novel pathomechanism for dense deposit disease (MPGN II). *Kidney Int*. 2006;70(1):42-50.
 203. Fakhouri F, Roumenina L, Provot F, et al. Pregnancy-associated hemolytic uremic syndrome revisited in the era of complement gene mutations. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(5):859-867.

204. Raychaudhuri S, Iartchouk O, Chin K, et al. A rare penetrant mutation in CFH confers high risk of age-related macular degeneration. *Nature genetics*. 2011;43(12):1232-1236.
205. Malik TH, Lavin PJ, Goicoechea de Jorge E, et al. A hybrid CFHR3-1 gene causes familial C3 glomerulopathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2012;23(7):1155-1160.
206. Gale DP, de Jorge EG, Cook HT, et al. Identification of a mutation in complement factor H-related protein 5 in patients of Cypriot origin with glomerulonephritis. *Lancet*. 2010;376(9743):794-801.
207. Deltas C, Gale D, Cook T, Voskarides K, Athanasiou Y, Pierides A. C3 Glomerulonephritis/CFHR5 Nephropathy Is an Endemic Disease in Cyprus: Clinical and Molecular Findings in 21 Families. *Advances in experimental medicine and biology*. 2013;734:189-196.
208. Vernon KA, Goicoechea de Jorge E, Hall AE, et al. Acute presentation and persistent glomerulonephritis following streptococcal infection in a patient with heterozygous complement factor H-related protein 5 deficiency. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2012;60(1):121-125.
209. Martinez-Barricarte R, Heurich M, Valdes-Canedo F, et al. Human C3 mutation reveals a mechanism of dense deposit disease pathogenesis and provides insights into complement activation and regulation. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(10):3702-3712.
210. Abrera-Abeleda MA, Nishimura C, Frees K, et al. Allelic variants of complement genes associated with dense deposit disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(8):1551-1559.
211. Klein M, Poucell S, Arbus GS, et al. Characteristics of a benign subtype of dense deposit disease: comparison with the progressive form of this disease. *Clinical nephrology*. 1983;20(4):163-171.
212. Garcia-de la Puente S, Orozco-Loza IL, Zaltzman-Girshevich S, de Leon Bojorge B. Prognostic factors in children with membranoproliferative glomerulonephritis type I. *Pediatric nephrology*. 2008;23(6):929-935.
213. Kashtan CE, Burke B, Burch G, Gustav Fisker S, Kim Y. Dense intramembranous deposit disease: a clinical comparison of histological subtypes. *Clinical nephrology*. 1990;33(1):1-6.
214. Ruggenti P, Perna A, Gherardi G, et al. Renoprotective properties of ACE-inhibition in non-diabetic nephropathies with non-nephrotic proteinuria. *Lancet*. 1999;354(9176):359-364.
215. Donadio JV, Jr., Offord KP. Reassessment of treatment results in membranoproliferative glomerulonephritis, with emphasis on life-table analysis. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1989;14(6):445-451.
216. Bomback AS, Smith RJ, Barile GR, et al. Eculizumab for dense deposit disease and C3 glomerulonephritis. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2012;7(5):748-756.
217. Tarshish P, Bernstein J, Tobin JN, Edelmann CM, Jr. Treatment of mesangiocapillary glomerulonephritis with alternate-day prednisone--a report of the International Study of Kidney Disease in Children. *Pediatric nephrology*. 1992;6(2):123-130.

218. Daina E, Noris M, Remuzzi G. Eculizumab in a patient with dense-deposit disease. *The New England journal of medicine*. 2012;366(12):1161-1163.
219. McEnery PT, McAdams AJ, West CD. The effect of prednisone in a high-dose, alternate-day regimen on the natural history of idiopathic membranoproliferative glomerulonephritis. *Medicine (Baltimore)*. 1985;64(6):401-424.
220. Licht C, Weyersberg A, Heinen S, et al. Successful plasma therapy for atypical hemolytic uremic syndrome caused by factor H deficiency owing to a novel mutation in the complement cofactor protein domain 15. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2005;45(2):415-421.
221. McCaughan JA, O'Rourke DM, Courtney AE. Recurrent dense deposit disease after renal transplantation: an emerging role for complementary therapies. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012;12(4):1046-1051.
222. Radhakrishnan S, Lunn A, Kirschfink M, et al. Eculizumab and refractory membranoproliferative glomerulonephritis. *The New England journal of medicine*. 2012;366(12):1165-1166.
223. Vivarelli M, Pasini A, Emma F. Eculizumab for the treatment of dense-deposit disease. *The New England journal of medicine*. 2012;366(12):1163-1165.
224. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *The New England journal of medicine*. 2000;342(9):605-612.
225. Briganti EM, Russ GR, McNeil JJ, Atkins RC, Chadban SJ. Risk of renal allograft loss from recurrent glomerulonephritis. *The New England journal of medicine*. 2002;347(2):103-109.
226. Choy BY, Chan TM, Lai KN. Recurrent glomerulonephritis after kidney transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2006;6(11):2535-2542.
227. Loirat C, Niaudet P. The risk of recurrence of hemolytic uremic syndrome after renal transplantation in children. *Pediatric nephrology*. 2003;18(11):1095-1101.
228. Alberti M, Valoti E, Piras R, et al. Two patients with history of STEC-HUS, posttransplant recurrence and complement gene mutations. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013;13(8):2201-2206.
229. Sellier-Leclerc AL, Fremeaux-Bacchi V, Dragon-Durey MA, et al. Differential impact of complement mutations on clinical characteristics in atypical hemolytic uremic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18(8):2392-2400.
230. Lahlou A, Lang P, Charpentier B, et al. Hemolytic uremic syndrome. Recurrence after renal transplantation. Groupe Cooperatif de l'Ile-de-France (GCIF). *Medicine (Baltimore)*. 2000;79(2):90-102.
231. Caprioli J, Noris M, Brioschi S, et al. Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood*. 2006;108(4):1267-1279.

232. Davin JC, Buter N, Groothoff J, et al. Prophylactic plasma exchange in CD46-associated atypical haemolytic uremic syndrome. *Pediatric nephrology*. 2009;24(9):1757-1760.
233. Fremeaux-Bacchi V, Arzouk N, Ferlicot S, Charpentier B, Snanoudj R, Durrbach A. Recurrence of HUS due to CD46/MCP mutation after renal transplantation: a role for endothelial microchimerism. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2007;7(8):2047-2051.
234. Zarifian A, Meleg-Smith S, O'Donovan R, Tesi RJ, Batuman V. Cyclosporine-associated thrombotic microangiopathy in renal allografts. *Kidney international*. 1999;55(6):2457-2466.
235. Hastings MC, Wyatt RJ, Ault BH, et al. Diagnosis of de novo localized thrombotic microangiopathy by surveillance biopsy. *Pediatric nephrology*. 2007;22(5):742-746.
236. Reynolds JC, Agodoa LY, Yuan CM, Abbott KC. Thrombotic microangiopathy after renal transplantation in the United States. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2003;42(5):1058-1068.
237. Le Quintrec M, Lionet A, Kamar N, et al. Complement mutation-associated de novo thrombotic microangiopathy following kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2008;8(8):1694-1701.
238. Braun MC, Stablein DM, Hamiwka LA, Bell L, Bartosh SM, Strife CF. Recurrence of membranoproliferative glomerulonephritis type II in renal allografts: The North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study experience. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005;16(7):2225-2233.
239. Lorenz EC, Sethi S, Leung N, Dispenzieri A, Fervenza FC, Cosio FG. Recurrent membranoproliferative glomerulonephritis after kidney transplantation. *Kidney international*. 2010;77(8):721-728.
240. Little MA, Dupont P, Campbell E, Dorman A, Walshe JJ. Severity of primary MPGN, rather than MPGN type, determines renal survival and post-transplantation recurrence risk. *Kidney international*. 2006;69(3):504-511.
241. Andresdottir MB, Assmann KJ, Hoitsma AJ, Koene RA, Wetzels JF. Renal transplantation in patients with dense deposit disease: morphological characteristics of recurrent disease and clinical outcome. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 1999;14(7):1723-1731.
242. Vernon KA, Gale DP, de Jorge EG, et al. Recurrence of complement factor H-related protein 5 nephropathy in a renal transplant. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2011;11(1):152-155.
243. Couzi L, Contin-Bordes C, Marliot F, et al. Inherited deficiency of membrane cofactor protein expression and varying manifestations of recurrent atypical hemolytic uremic syndrome in a sibling pair. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2008;52(2):e5-9.
244. Sullivan M, Erlic Z, Hoffmann MM, et al. Epidemiological approach to identifying genetic predispositions for atypical hemolytic uremic syndrome. *Annals of human genetics*. 2010;74(1):17-26.
245. Nilsson SC, Karpman D, Vaziri-Sani F, et al. A mutation in factor I that is associated with atypical hemolytic uremic syndrome does not affect the

- function of factor I in complement regulation. *Molecular immunology*. 2007;44(8):1835-1844.
246. Sanchez-Corral P, Anton LC, Alcolea JM, Marques G, Sanchez A, Vivanco F. Proteolytic activity of the different fragments of factor B on the third component of complement (C3). Involvement of the N-terminal domain of Bb in magnesium binding. *Molecular immunology*. 1990;27(9):891-900.
 247. Thurman JM, Kulik L, Orth H, et al. Detection of complement activation using monoclonal antibodies against C3d. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(5):2218-2230.
 248. Pechtl IC, Kavanagh D, McIntosh N, Harris CL, Barlow PN. Disease-associated N-terminal complement factor H mutations perturb cofactor and decay-accelerating activities. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(13):11082-11090.
 249. Richards A, Buddles MR, Donne RL, et al. Factor H mutations in hemolytic uremic syndrome cluster in exons 18-20, a domain important for host cell recognition. *American journal of human genetics*. 2001;68(2):485-490.
 250. Heinen S, Sanchez-Corral P, Jackson MS, et al. De novo gene conversion in the RCA gene cluster (1q32) causes mutations in complement factor H associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Human mutation*. 2006;27(3):292-293.
 251. Sanchez-Corral P, Gonzalez-Rubio C, Rodriguez de Cordoba S, Lopez-Trascasa M. Functional analysis in serum from atypical Hemolytic Uremic Syndrome patients reveals impaired protection of host cells associated with mutations in factor H. *Molecular immunology*. 2004;41(1):81-84.
 252. Krid S, Roumenina LT, Beury D, et al. Renal transplantation under prophylactic eculizumab in atypical hemolytic uremic syndrome with CFH/CFHR1 hybrid protein. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012;12(7):1938-1944.
 253. Geelen J, van den Dries K, Roos A, et al. A missense mutation in factor I (IF) predisposes to atypical haemolytic uraemic syndrome. *Pediatric nephrology*. 2007;22(3):371-375.
 254. Caprioli J, Noris M, Brioschi S, et al. Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood*. 2006;108(4):1267-1279.
 255. Frémeaux-Bacchi V, Arzouk N, Ferlicot S, Charpentier B, Snanoudj R, Dürrbach A. Recurrence of HUS due to CD46/MCP mutation after renal transplantation: a role for endothelial microchimerism. *Am J Transplant*. 2007;7(8):2047-2051.
 256. Varga Z, Gaspert A, Behnke S, von Teichman A, Fritzsche F, Fehr T. Tubular and endothelial chimerism in renal allografts using fluorescence and chromogenic in situ hybridization (FISH, CISH) technology. *Pathol Int*. 2012;62(4):254-263.
 257. Ferlicot S, Vernochet A, Romana S, et al. Microchimerism in renal allografts: clinicopathological associations according to the type of chimeric cells. *Histopathology*. 2010;56(2):188-197.
 258. Schirutschke H, Vogelbacher R, Stief A, Parmentier S, Daniel C, Hugo C. Injured kidney endothelium is only marginally repopulated by cells of extrarenal origin. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;305(7):F1042-1052.

259. Johnsen SJ, Valborgland T, Gudlaugsson E, Bostad L, Omdal R. Thrombotic microangiopathy and the antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2010;19(13):1569-1572.
260. El Karoui K, Hill GS, Karras A, et al. A clinicopathologic study of thrombotic microangiopathy in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(1):137-148.
261. van Werkhoven MB, Damman J, van Dijk MC, et al. Complement mediated renal inflammation induced by donor brain death: role of renal C5a-C5aR interaction. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013;13(4):875-882.
262. Naesens M, Li L, Ying L, et al. Expression of complement components differs between kidney allografts from living and deceased donors. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2009;20(8):1839-1851.
263. Blogowski W, Dolegowska B, Salata D, Budkowska M, Domanski L, Starzynska T. Clinical analysis of perioperative complement activity during ischemia/reperfusion injury following renal transplantation. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2012;7(11):1843-1851.
264. Gueler F, Rong S, Gwinner W, et al. Complement 5a receptor inhibition improves renal allograft survival. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2008;19(12):2302-2312.
265. Snoeijs MG, Vink H, Voesten N, et al. Acute ischemic injury to the renal microvasculature in human kidney transplantation. *American journal of physiology. Renal physiology*. 2010;299(5):F1134-1140.
266. Ozaki T, Anas C, Maruyama S, et al. Intrarenal administration of recombinant human soluble thrombomodulin ameliorates ischaemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(1):110-119.
267. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *The New England journal of medicine*. 2007;357(25):2562-2575.
268. Oyen O, Strom EH, Midtvedt K, et al. Calcineurin inhibitor-free immunosuppression in renal allograft recipients with thrombotic microangiopathy/hemolytic uremic syndrome. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2006;6(2):412-418.
269. Artz MA, Steenbergen EJ, Hoitsma AJ, Monnens LA, Wetzels JF. Renal transplantation in patients with hemolytic uremic syndrome: high rate of recurrence and increased incidence of acute rejections. *Transplantation*. 2003;76(5):821-826.
270. Sacks S, Zhou W. The effect of locally synthesised complement on acute renal allograft rejection. *Journal of molecular medicine*. 2003;81(7):404-410.
271. Renner B, Strassheim D, Amura CR, et al. B cell subsets contribute to renal injury and renal protection after ischemia/reperfusion. *Journal of immunology*. 2010;185(7):4393-4400.
272. Sacks SH, Zhou W. The role of complement in the early immune response to transplantation. *Nature reviews. Immunology*. 2012;12(6):431-442.
273. Fuquay R, Renner B, Kulik L, et al. Renal ischemia-reperfusion injury amplifies the humoral immune response. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2013;24(7):1063-1072.

274. Trachtman H, Sethna C, Epstein R, D'Souza M, Rubin LG, Ginocchio CC. Atypical hemolytic uremic syndrome associated with H1N1 influenza A virus infection. *Pediatric nephrology*. 2011;26(1):145-146.
275. Murer L, Zacchello G, Bianchi D, et al. Thrombotic microangiopathy associated with parvovirus B 19 infection after renal transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2000;11(6):1132-1137.
276. Bolovan-Fritts CA, Spector SA. Endothelial damage from cytomegalovirus-specific host immune response can be prevented by targeted disruption of fractalkine-CX3CR1 interaction. *Blood*. 2008;111(1):175-182.
277. Olie KH, Goodship TH, Verlaak R, et al. Posttransplantation cytomegalovirus-induced recurrence of atypical hemolytic uremic syndrome associated with a factor H mutation: successful treatment with intensive plasma exchanges and ganciclovir. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2005;45(1):e12-15.
278. Davin JC, Strain L, Goodship TH. Plasma therapy in atypical haemolytic uremic syndrome: lessons from a family with a factor H mutation. *Pediatric nephrology*. 2008;23(9):1517-1521.
279. Simmonds J, Fenton M, Dewar C, et al. Endothelial dysfunction and cytomegalovirus replication in pediatric heart transplantation. *Circulation*. 2008;117(20):2657-2661.
280. Schwarz A, Haller H, Schmitt R, et al. Biopsy-diagnosed renal disease in patients after transplantation of other organs and tissues. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2010;10(9):2017-2025.
281. Pham PT, Peng A, Wilkinson AH, et al. Cyclosporine and tacrolimus-associated thrombotic microangiopathy. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2000;36(4):844-850.
282. Quan A, Sullivan EK, Alexander SR. Recurrence of hemolytic uremic syndrome after renal transplantation in children: a report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study. *Transplantation*. 2001;72(4):742-745.
283. Pelle G, Xu Y, Khoury N, Mougnot B, Rondeau E. Thrombotic microangiopathy in marginal kidneys after sirolimus use. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2005;46(6):1124-1128.
284. Sartelet H, Toupance O, Lorenzato M, et al. Sirolimus-induced thrombotic microangiopathy is associated with decreased expression of vascular endothelial growth factor in kidneys. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005;5(10):2441-2447.
285. Paramesh AS, Grosskreutz C, Florman SS, et al. Thrombotic microangiopathy associated with combined sirolimus and tacrolimus immunosuppression after intestinal transplantation. *Transplantation*. 2004;77(1):129-131.
286. Lovric S, Kielstein JT, Kayser D, et al. Combination of everolimus with calcineurin inhibitor medication resulted in post-transplant haemolytic uraemic syndrome in lung transplant recipients--a case series. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2011;26(9):3032-3038.
287. Zoja C, Locatelli M, Pagani C, et al. Lack of the lectin-like domain of thrombomodulin worsens Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome in mice. *Journal of immunology*. 2012;189(7):3661-3668.

288. Norlund L, Zoller B, Ohlin AK. A novel thrombomodulin gene mutation in a patient suffering from sagittal sinus thrombosis. *Thrombosis and haemostasis*. 1997;78(4):1164-1166.
289. Doggen CJ, Kunz G, Rosendaal FR, et al. A mutation in the thrombomodulin gene, 127G to A coding for Ala25Thr, and the risk of myocardial infarction in men. *Thrombosis and haemostasis*. 1998;80(5):743-748.
290. Sinibaldi S, Guzzo I, Piras R, Bresin E, Emma F, Dello Strologo L. Post-transplant recurrence of atypical hemolytic uremic syndrome in a patient with thrombomodulin mutation. *Pediatr Transplant*. 2013;17(8):E177-181.
291. Morigi M, Galbusera M, Gastoldi S, et al. Alternative pathway activation of complement by Shiga toxin promotes exuberant C3a formation that triggers microvascular thrombosis. *J Immunol*. 2011;187(1):172-180.
292. Honda T, Ogata S, Mineo E, et al. A novel strategy for hemolytic uremic syndrome: successful treatment with thrombomodulin alpha. *Pediatrics*. 2013;131(3):e928-933.
293. Tonooka K, Ito H, Shibata T, Ozaki S. Recombinant human soluble thrombomodulin for treatment of thrombotic microangiopathy associated with lupus nephritis. *The Journal of rheumatology*. 2012;39(8):1766-1767.
294. Tang W, Bunting M, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Molecular cloning of a novel human diacylglycerol kinase highly selective for arachidonate-containing substrates. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(17):10237-10241.
295. Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, et al. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *The New England journal of medicine*. 2008;358(11):1129-1136.
296. Mengel M, Sis B, Haas M, et al. Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012;12(3):563-570.
297. Bresin E, Daina E, Noris M, et al. Outcome of renal transplantation in patients with non-Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: prognostic significance of genetic background. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2006;1(1):88-99.
298. Canaud G, Kamar N, Anglicheau D, et al. Eculizumab improves posttransplant thrombotic microangiopathy due to antiphospholipid syndrome recurrence but fails to prevent chronic vascular changes. *Am J Transplant*. 2013;13(8):2179-2185.
299. Wilson CH, Brown AL, White SA, Goodship TH, Sheerin NS, Manas DM. Successful treatment of de novo posttransplant thrombotic microangiopathy with eculizumab. *Transplantation*. 2011;92(8):e42-43.
300. Chandran S, Baxter-Lowe L, Olson JL, Tomlanovich SJ, Webber A. Eculizumab for the treatment of de novo thrombotic microangiopathy post simultaneous pancreas-kidney transplantation--a case report. *Transplant Proc*. 2011;43(5):2097-2101.
301. Braun M, Davis AE. Cultured human glomerular mesangial cells express the C5a receptor. *Kidney Int*. 1998;54(5):1542-1549.
302. Wilmer WA, Kaumaya PT, Ember JA, Cosio FG. Receptors for the anaphylatoxin C5a (CD88) on human mesangial cells. *J Immunol*. 1998;160(11):5646-5652.

303. Lhotta K, König P, Mayer G, Oppermann M. Glomerular cells do not express the C5a receptor in human glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15(11):1888-1889.
304. Schlöndorff D, Banas B. The mesangial cell revisited: no cell is an island. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(6):1179-1187.
305. Floege J, Eitner F, Alpers CE. A new look at platelet-derived growth factor in renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(1):12-23.
306. Liu L, Qiu W, Wang H, et al. Sublytic C5b-9 complexes induce apoptosis of glomerular mesangial cells in rats with Thy-1 nephritis through role of interferon regulatory factor-1-dependent caspase 8 activation. *J Biol Chem.* 2012;287(20):16410-16423.
307. Qiu W, Zhang Y, Liu X, et al. Sublytic C5b-9 complexes induce proliferative changes of glomerular mesangial cells in rat Thy-1 nephritis through TRAF6-mediated PI3K-dependent Akt1 activation. *J Pathol.* 2012;226(4):619-632.
308. Boyer O, Noel LH, Balzamo E, et al. Complement factor H deficiency and posttransplantation glomerulonephritis with isolated C3 deposits. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation.* 2008;51(4):671-677.

ANNEXES

Complement Genes Strongly Predict Recurrence and Graft Outcome in Adult Renal Transplant Recipients with Atypical Hemolytic and Uremic Syndrome

M. Le Quintrec^{a,b,*}, J. Zuber^c, B. Moulin^d,
N. Kamar^{e,f}, M. Jablonski^c, A. Lionet^g,
V. Chatelet^h, C. Moussonⁱ, G. Mourad^j,
F. Bridoux^k, E. Cassuto^l, C. Loirat^m, E. Rondeauⁿ,
M. Delahousse^a and V. Frémeaux-Bacchi^{o,*}

^aNéphrologie et Transplantation Rénale, Hôpital Foch, Suresnes, France

^bINSERM U255, Cordeliers Biomedical Research Center, Paris

^cTransplantation Rénale, Hôpital Necker, Paris, France

^dService de Néphrologie et Transplantation Rénale Strasbourg, France

^eService de Néphrologie, Dialyse et Transplantation d'Organes, Hôpital Rangueil, Toulouse, France

^fINSERM U1043, IFR-BMT, CHU Purpan, Toulouse, France

^gNéphrologie et Transplantation rénale CHU Calmette, Lille, France

^hNéphrologie et Transplantation rénale CHU Caen, Caen, France

ⁱNéphrologie et Transplantation rénale CHU Dijon, Dijon, France

^jNéphrologie et Transplantation rénale, Hôpital Lapeyronie, Montpellier, France

^kService de Néphrologie et Transplantation rénale, CHU de Poitiers, France

^lService de Néphrologie et Transplantation rénale, CHU de Nice, Nice, France

^mAssistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Robert Debré, Université Paris 7, Service de Néphrologie, Paris, France

ⁿService de Néphrologie et Transplantation rénale, Hôpital Tenon, Paris, France

^oAssistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges-Pompidou, Laboratoire d'Immunologie, Paris, France

*Corresponding authors: Moglie Le Quintrec, m.lequintrec@hopital-foch.org; and Véronique Frémeaux-Bacchi, veronique.fremeaux-bacchi@egp.aphp.fr

Atypical hemolytic and uremic syndrome (aHUS) is a severe disease strongly associated with genetic abnormalities in the complement alternative pathway. In renal posttransplantation, few data are available on recurrence risk and graft outcome according to genetic background in aHUS patients. The aim of this study was to identify risk factors for recurrence and transplant outcome and, in particular, the role of complement gene abnormalities. We retrospectively studied

57 aHUS patients who had received 71 renal transplants. A mutation in complement gene was identified in 39 (68%), in factor H (*CFH*), factor I (*CFI*), membrane cofactor-protein (*MCP*), *C3* and factor B (*CFB*). At 5 years, death-censored graft survival was 51%. Disease recurrence was associated with graft loss ($p = 0.001$). Mutations in complement genes were associated with higher risk of recurrence ($p = 0.009$). Patients with *CFH* or gain of function (*C3*, *CFB*) mutations had a highest risk of recurrence. M-TOR inhibitor was associated with significant risk of recurrence ($p = 0.043$) but not calcineurin inhibitor immunosuppressive treatment ($p = 0.29$). Preemptive plasmatherapy was associated with a trend to decrease recurrence ($p = 0.07$). Our study highlights that characterization of complement genetic abnormalities predicts the risk of recurrence-related graft loss and paves the way for future genetically based individualized prophylactic therapeutic strategies.

Key words: Acute rejection, atypical hemolytic and uremic syndrome, endothelial cell damage, mutations and polymorphisms in complement alternative pathway, renal transplantation, thrombotic microangiopathy

Abbreviations: aHUS, atypical Hemolytic and uremic syndrome; STEC, shiga toxine-producing *Escherichia coli*; ESRF, end stage renal failure; CAP, complement alternative pathways.

Received 02 July 2012, revised 25 November 2012 and accepted for publication 27 November 2012

Introduction

Hemolytic uremic syndrome (HUS) is a microvascular occlusive disorder characterized by hemolytic anemia with fragmented erythrocytes, thrombocytopenia and acute renal failure (1). Unlike typical HUS, atypical HUS (aHUS) is not related to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) infection and affects both children and adults. aHUS is associated with a poor functional outcome, as up to 50% of patients with aHUS develop end-stage renal disease (ESRD) with a subsequent high risk of recurrence (2–4) after renal transplantation. Over the last decade, a close link between aHUS and uncontrolled activation of the complement alternative pathway (CAP) has been well established (5,6): genetically determined or acquired dysregulation of CAP

Le Quintrec et al.

has been identified in roughly 70% of aHUS patients (3,6). Loss or gain of function mutations have been described in genes encoding for complement regulatory proteins complement factor H (CFH), factor I (CFI), membrane cofactor-protein (MCP) as in those encoding the two components of the C3 convertase, factor B (CFB) or C3 (7–16). In addition, anti-CFH antibodies have been identified in 10% of aHUS patients (17–19). Moreover, genetic variants, including single nucleotide polymorphisms, and haplotypes in the genes encoding for CFH and MCP may also contribute to aHUS development (8,12,20–22). In particular, CFH haplotypes defined with four exonic polymorphisms located in SCR1 (Val62), SCR7 (Tyr402), SCR11 (Gln672) and SCR16 (Asp 936), known as the at-risk CFH *gtgt* haplotype, is strongly associated with aHUS (22). The risk of posttransplant aHUS recurrence, which has been reported as ranging from less than 20% to more than 90%, critically depends on whether the recipient carries a mutation in a gene encoding for a membrane protein membrane cofactor protein (MCP) (2–4) or a circulating factor (CFH, CFI, CFB, C3). Moreover, in posttransplant settings, environmental factors, including acute rejection, immunosuppressive drugs, viral infections and ischemia reperfusion lesions, may initiate endothelial damage (23–26) but their impact on aHUS recurrence has not been investigated. The aim of this retrospective study was to assess the risk of recurrence and graft loss in renal transplanted aHUS patients. Complement genetics and posttransplant characteristics, including acute rejection, immunosuppressive regimen, delayed graft function, aHUS recurrence and plasmatherapy treatment were considered in the analysis.

Material and Methods

Study design

This was a retrospective, multicenter study of renal transplant recipients with aHUS-related ESRD. Sixty-six patients included in the French aHUS registry from 21 French transplantation centers were considered for inclusion. Renal transplant centers were contacted to date and update clinical data regarding graft outcome. Criteria for inclusion in the study were: (1) Patients with adult-onset (≥ 18 years) aHUS who had received a renal transplant between January 1995 and December 2009 and (2) Patients who had undergone a genetic investigation of the complement alternative pathway. Exclusion criteria were: (1) HUS with an identified cause such as STEC-induced HUS, Thrombotic Thrombopenic Purpura (TTP) associated with ADAMST 13 deficiency, malignancy or autoimmune-related HUS. (2) Patients without updated information. (3) Patients who were transplanted before 1995. The last follow-up time point was June 2010.

Complement assays and genetic screening

Complement assessment was performed on EDTA plasma samples at the immunology laboratory of the Georges Pompidou European Hospital. C3, C4 and CFB levels were measured by nephelometry (Dade Behring, Deerfield, IL, USA). CFH and CFI levels were measured by ELISA. Membrane expression of CD46 was analyzed using flow cytometry and anti-CFH antibodies were screened by ELISA as previously reported (27). Complete exon sequencing of *CFH*, *MCP*, *CFI*, *C3*, *CFB*, *THMD* genes was undertaken using direct sequencing analysis as described (27). Screening for nonallelic homologous recombination (NAHR) between CFH and CFHR1 namely “hy-

brid gene” was performed using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA; SALSA MLPA kit P236-A1 ARMD from MRC Holland and probes designed by the laboratory; Ref. (28). Functional evaluation of FH was performed with hemolytic assay using sheep erythrocytes (27). Complete CFHR1/CFHR3 deletion was identified by analysis of the SNP rs7542235 (29). The aHUS at-risk CFH *gtgt* haplotype namely “at risk CFH haplotype” was tagged by genotyping the SNPs rs800292 (c.184G), rs1061170 (c.1204T); rs3753396 (c.2016G) and rs1065489 (c.2808T) as previously reported (22). All patients had provided informed written consent for gene screening.

Recurrence and graft survival

Atypical HUS recurrence or acute rejections were diagnosed by renal graft biopsy. Diagnosis of posttransplant recurrence was assessed by histological criteria of thrombotic microangiopathy (TMA), including arterial and glomerular lesions (30). Biopsy-proven acute rejections (BPAR) were graded using the Banff classification as noted at the time of renal biopsy. C4d staining was routinely performed on biopsies from 2005 to 2009. Graft survival was defined as the time between the date of transplantation and the date of return to dialysis. Death with functioning graft was used as the censor for the graft survival study.

The impact of curative plasmatherapy on graft survival was analyzed. Curative plasmatherapy for recurrence was defined by a minimum of five fresh frozen plasma infusions or by five plasma exchanges over 10 days. The impact of preemptive plasmatherapy on disease recurrence and graft survival was also assessed.

Clinical data

The following clinical data were obtained from medical records: pretransplant characteristics, the age at the time of aHUS onset, ESRD, renal transplantation and posttransplant recurrence. Meaningful independent variables for all kidney transplants were recorded: deceased or living donor kidney, donor age, number of HLA mismatches, cold ischemia time, induction therapy (anti-thymoglobulin [ATG] or interleukin 2 receptor alpha anti-IL2Ra), calcineurin inhibitor (CNI) or mTOR-based maintenance regimen, plasmatherapy regimen, delayed graft function and number of acute rejection episodes.

Statistics

Continuous variables are expressed as mean values with standard deviations. Categorical variables are expressed as tallies and percentages. Statistical analysis was performed on 71 grafts. Kaplan–Meier graft survival estimates were calculated for death-censored graft survival. Death-censored graft survival curves were compared between patients with and without HUS recurrence. Death-censored graft survival without HUS recurrence curves were compared between grafts from patients with and without genetic mutation. Graft survival without HUS recurrence curves for patients with and without individual mutations were then compared. The Bonferroni correction for multiple comparisons was applied. Cox model univariate analysis was used to test the association between independent variables. Variables with *p* values of less than 0.20 in the univariate analysis were entered into multivariate analysis through a forward subset selection with no switching. Risk ratios (RRs) are shown with their upper and lower 95% confidence limits. For all statistical measures, *p* < 0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed using the NCSS software (Hintze, J. 2012. NCSS 8. NCSS, LLC. Kaysville, UT, USA)

Results

Characteristics of the study population

Out of the initial 66 patients considered for inclusion, 57 patients were finally included in the study. Nine patients

Table 1: Characteristics of the grafts and immunosuppressive therapies

Grafts	N = 71
% of deceased donor (n/total)	95 (68/71)
Rank of renal transplantation >1 (%), (n/total)	25 (18/71)
Median donor age (range) [years]	44 (15–73)
Mean HLA mismatch number \pm SD	3.2 \pm 1.2
Mean HLA DR mismatch number \pm SD	1.2 \pm 0.8
Median cold ischemia time (range) [hours]	20 (4–39)
% of induction therapy (n/total)	98 (66/67)
% Anti-thymoglobulin antibodies, (n/total)	75 (50/66)
% Anti-IL2Ra monoclonal antibody, (n/total)	25 (16/66)
Maintenance immunosuppressive therapy	
% CNI-based regimen (n/total)	84 (57/68)
% of tacrolimus-based regimen (n/total)	77 (44/57)
% of cyclosporine-based regimen (n/total)	23 (13/57)
% of mTOR inhibitor-based regimen (n/total)	16 (11/68)
% of delayed graft function (n/total)	14 (9/66)
% of preemptive plasmatherapy (n/total)	13 (9/70)

were not included as they had been transplanted before 1995. The 57 patients received a total of 71 renal transplants: 43 patients had one graft whereas 14 had two grafts. No patients were lost to follow-up. Forty-eight (85%) of the 57 patients were female. Nine (16%) and 48 (84%) patients had a familial or sporadic form of aHUS, respectively. Three grafts were from living related donors and the others were from deceased donors. There were no renal transplantations from donors after cardiac death. The median age at the time of aHUS onset, ESRD and kidney transplantation was 32, 34 and 38 years, respectively. Characteristics of the grafts and immunosuppressive therapies are summarized in Table 1.

Complement investigations

Eighteen patients (33%) displayed a low C3 plasma level (<660 mg/L). Thorough genetic and C3 level assessments were done either before (n = 29) or after (n = 28) renal transplantation. A mutation in complement factors was identified in 39 of the 57 patients (68%; Table 2, Table S1, Figure S1). Forty-six percent (18/39) of these patients carried a CFH mutation identified by direct sequencing analysis of Factor H gene (12/18) or nonallelic homologous recombination (NAHR) (6/18) identified by MLPA. In seven of the 18 patients (39%) CFH/NAHR mutations were associated with low-plasma CFH levels (type I mutation), and 11 (61%) with normal FH levels (type II mutation). All mutations were heterozygous. The frequency of CFI, MCP, C3 and CFB mutations was 23% (n = 9), 8% (n = 3), 10% (n = 4) and 3% (n = 1), respectively. Four of the nine patients with CFI mutations had homozygous CFHR1 deletion. Four patients (7%) had combined mutations. In 18 patients, no mutation was identified in any of the screened genes; six of them carried two at risk CFH haplotypes.

Patient and graft survival

Four patients (7%), aged from 21 to 50 years, died following cardio-vascular events (acute cardiac failure [n = 1],

Table 2: Frequency of complement abnormalities in the cohort

Genetic/acquired abnormality	Patients (n = 57)		Grafts (n = 71)
	n	%	n
Mutation	39	68	48
CFH	18	31.6	22
CFI	9	16.0	11
MCP	3	5.5	3
C3	4	7.0	5
CFB	1	1.8	2
THBD	0	0	0
Combined mutation	4	7.0	5
No mutation	18	32	23
w/o.at-risk CFH haplotype	12	21.1	16
w two at-risk CFH haplotype	6	10.5	7
Anti-CFH antibodies	0	0	0

THBD = Thrombomodulin; w = with; w/o = without.

Combined mutations were (1) in 2 familial cases: CFH/MCP mutations in one and an additional CFI in the other, (2) in 2 sporadic cases: CFI/CFB in one and MCP/CFI in the other.

myocardial infarction [n = 2] and extensive stroke [n = 1]. Three of them died at 17 months, 2 and 3 years post-transplant with a functioning graft and one patient died of myocardial infarction 5 years after he had returned to dialysis.

One and five-year post transplantation death-censored graft survival were 76% and 51%, respectively. The median graft survival time (lower and upper 95% CL) was 61 (32–87) months (Figure 1). Graft survival and recurrence were not different for first and second grafts (Tables 3 and 4). Death-censored graft survival was significantly worse in patients with recurrent aHUS than in those without, in univariate (RR = 3.79 [1.74–8.28]; p = 0.0001) and multivariate analysis RR = 4.86 (1.30–13.81); p = 0.001 (Figure 2, Table 3). The mean time between recurrence and graft lost was 185 days (58–656). Graft survival was 44 \pm 7% and 74 \pm 5% at 1 year and 36 \pm 7% and 70 \pm 8% at 5 years in patients with or without recurrence, respectively. The disease recurrence occurred during the early posttransplant course (Figure 3).

In univariate aHUS was the only factor significantly associated with an increased risk of graft loss (RR = 3.79 [1.7–8.27]; p = 0.0001) whereas in multivariate analysis, delayed graft function (RR = 4.77 [1.81–12.67]; p = 0.002) and aHUS recurrence (RR = 4.86 [1.30–13.81]; p = 0.001) were factors independently associated with an increased risk of graft loss. In multivariate analysis, preemptive plasmatherapy reduced graft loss (RR = 0.11 [0.01–0.85]; p = 0.035; Table 3).

Acute rejection occurred in 30% of the transplanted kidneys (22/71) including 17 cellular rejections (ACR) and five antibody-mediated rejections (AMR). However, they were

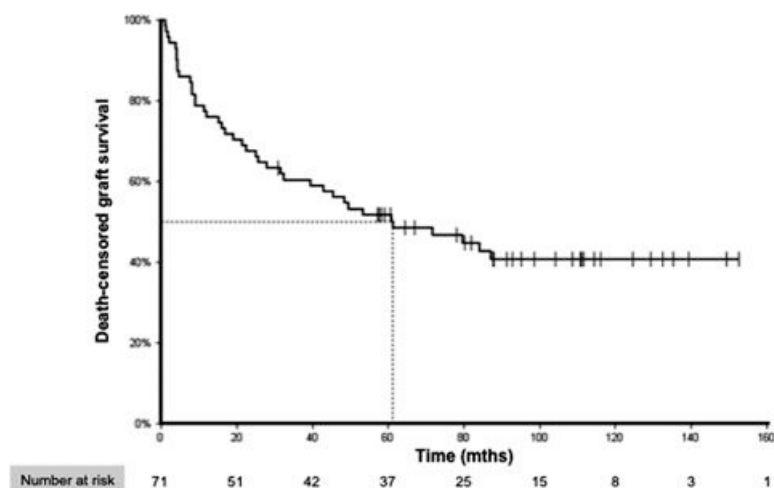


Figure 1: Death-censored graft survival. Kaplan–Meier analysis of overall death-censored graft survival in atypical HUS patients. The median graft survival time (lower and upper 95% CL) was 61 (2.4–87) months.

Table 3: Variables associated with significant graft loss risk by univariate and multivariate Cox analysis (n = 71 grafts)

Independent variable	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	RR (CI)	p	RR (CI)	p
Recipient age	0.99 (0.97–1.03)	0.776		
Donor age	1.00 (0.98–1.02)	0.718		
Living donor	0.40 (0.05–2.91)	0.365		
Cold ischemia time	0.97 (0.93–1.02)	0.286		
HLA MM	1.00 (0.75–1.35)	0.983		
HLADR MM ¹	0.70 (0.42–1.15)	0.158		
Induction	0.39 (0.05–2.90)	0.358		
ATG	1.46 (0.67–3.20)	0.344		
CNI	0.81 (0.36–1.85)	0.624		
mTOR	1.19 (0.53–2.69)	0.676		
DGF	2.05 (0.85–4.95)	0.111	4.77 (1.80–12.67)	0.002
BPAR	1.55 (0.81–2.94)	0.183	1.70 (0.83–3.49)	0.149
Time on dialysis	1.00 (0.99–1.00)	0.648		
Rank of Tx	0.88 (0.39–2.00)	0.766		
HUS recurrence	3.79 (1.74–8.28)	0.0001	4.86 (1.30–13.81)	0.001
Curative PE	2.51 (1.34–4.68)	0.004	1.17 (0.49–2.83)	0.724
Preemptive PE	0.19 (0.03–1.40)	0.103	0.11 (0.01–0.85)	0.035

ATG = anti-thymoglobulin antibodies; BPAR = biopsy proven acute rejection; CNI = calcineurin inhibitors; MM = mismatch; mTOR = mTor inhibitors. Rank of Tx = rank of transplantation.

¹Since patients are eliminated listwise when one missing value is present, the MM HLA DR, which had a significant number of missing values was dropped from the analysis.

not associated with a significant increased risk of graft failure (RR = 1.55 [0.86–2.94]; p = 0.183; Table 3). Sixty per cent (14/22) of acute rejections coincided with aHUS recurrence. Statistical analyses performed per graft and per patient gave similar results (data not shown).

Risk factors for posttransplantation aHUS recurrence

To determine risk factors associated with aHUS recurrence after renal transplantation, we analyzed clinical and genetic variables (Table 4). Donor age, acute rejection and CNI-based immunosuppressive regimen did not represent significant risk factors for aHUS recurrence. In contrast, a low-C3 level (RR = 1.99 [1.05–3.48]; p = 0.035) and the presence of a mutation in genes encoding complement proteins in univariate analysis (RR = 3.10 [1.43–6.68]; p = 0.004) were associated with a greater risk of recurrence

(Figure 4, Table 4). In multivariate analysis, the presence of mutation (RR = 2.88 [1.30–6.37]; p = 0.009), m-Tor inhibitor regimen (RR = 2.21 [1.03–4.74]; p = 0.043) and recipient age (RR = 1.04[1.00–1.07]; p = 0.031) were associated independently with an increased rate of aHUS recurrence. Of the 14 patients who received two grafts, 11 (78%) had a recurrence on the first graft and 11 (78%) on the second. Nine of the 11 patients (81%) who had recurrence on the first graft had a recurrence on the second graft.

To further assess the risk of aHUS recurrence on graft, we compared graft survival (n = 71) without HUS recurrence curves according to the presence of mutations or two at risk CFH haplotypes (Figure 5, Table 5). Grafts in patients with neither mutations nor the two at-risk CFH haplotypes were considered as a control group (n = 16 grafts). Grafts

Table 4: Variables associated with significant recurrence risk by univariate and multivariate Cox analysis (n = 71 grafts)

Independent variable	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	RR (CI)	p	RR (CI)	p
Recipient age	1.022 (0.99–1.05)	0.149	1.04 (1.00–1.07)	0.031
Donor age	1.01 (0.99–1.03)	0.233		
Living donor	0.85 (0.21–3.50)	0.817		
HLA MM	0.92 (0.70–1.20)	0.532		
HLADR MM ¹	0.73 (0.47–1.14)	0.156		
Induction	0.65 (0.26–1.66)	0.361		
ATG	0.80 (0.48–1.58)	0.525		
CNI	0.67 (0.33–1.39)	0.294		
mTOR	2.00 (0.98–4.17)	0.065	2.21 (1.03–4.74)	0.043
DGF	1.382 (0.58–3.29)	0.464		
BPAR	1.15 (0.61–2.18)	0.656		
Time on dialysis	1.00 (0.99–1.06)	0.948		
Rank of Tx	1.20 (0.59–2.44)	0.612		
Previous recurrence	1.26 (0.58–2.72)	0.551		
Low C3	1.99 (1.05–3.48)	0.035	1.61 (0.85–3.04)	0.144
Mutation	3.10 (1.43–6.68)	0.004	2.88 (1.30–6.37)	0.009
Preemptive PE	0.16 (0.02–1.15)	0.068	0.34 (0.10–1.13)	0.078

ATG = anti-thymoglobulin antibodies; BPAR = biopsy proven acute rejection; CNI = calcineurin inhibitors; MM = mismatch; mTOR = mTor inhibitors; PE = plasma exchange; Rank of Tx = rank of transplantation.

¹Since patients are eliminated listwise when one missing value is present, the MM HLA DR, which had a significant number of missing values was dropped from the analysis.

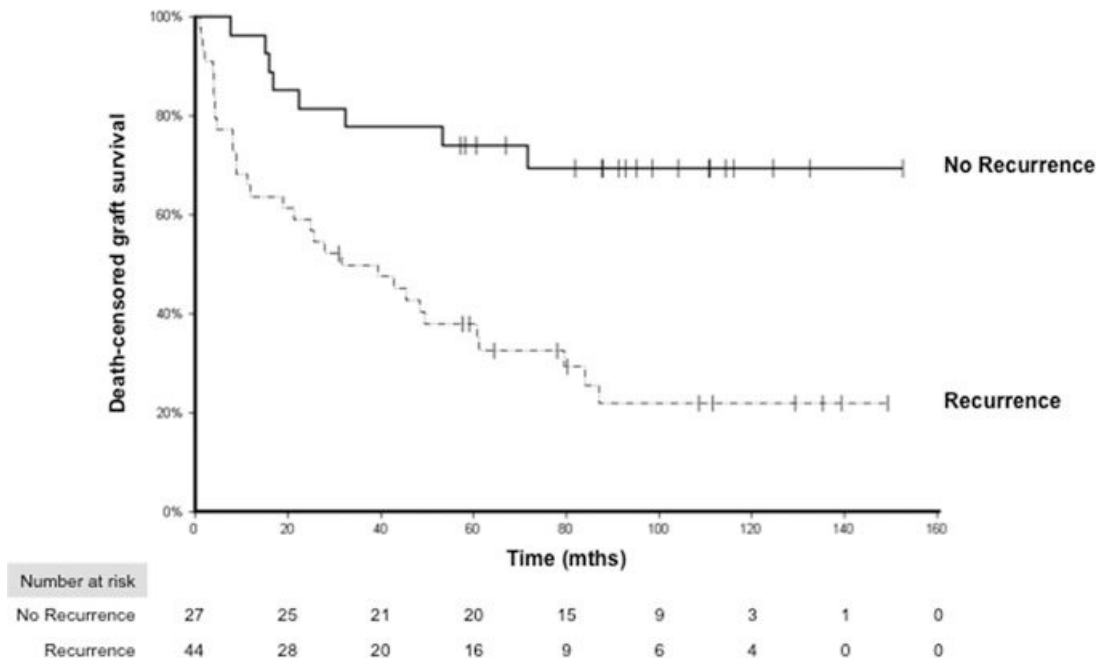


Figure 2: Death-censored graft survival after renal transplantation according to the occurrence of recurrence. Kaplan–Meier analysis (p = 0.0001, log rank).

in C3 or CFB carriers were pooled to analyze gain of function mutations (n = 7). Results of univariate cox are given after Bonferroni correction. Mutations in CFH/NAHR were associated with a significantly greater risk of recurrence as compared with the control group (RR = 5.6 [1.7– 9.6]; p = 0.0024), the seven grafts from the six patients who carried a Hybrid gene mutation experienced a recurrence

in the first year after transplantation. Mutations in C3/CFB had a trend towards significance (RR = 4.80 [1.3–20.9]; p = 0.04; Figure 5, Table 5). No statistically significant difference for recurrence risk was found between carriers of CFI mutations, MCP mutations, combined mutations or two the at-risk CFH haplotypes without mutation compared to the control group (Table 5). Graft recurrence was

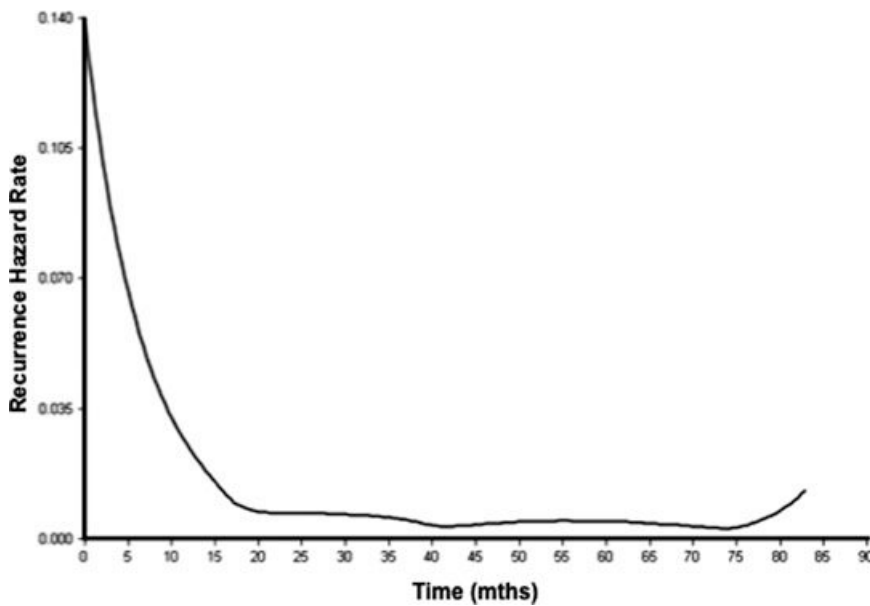


Figure 3: Recurrence hazard rate over posttransplant time. The hazard rate is the derivative (slope) of the cumulative hazard function.

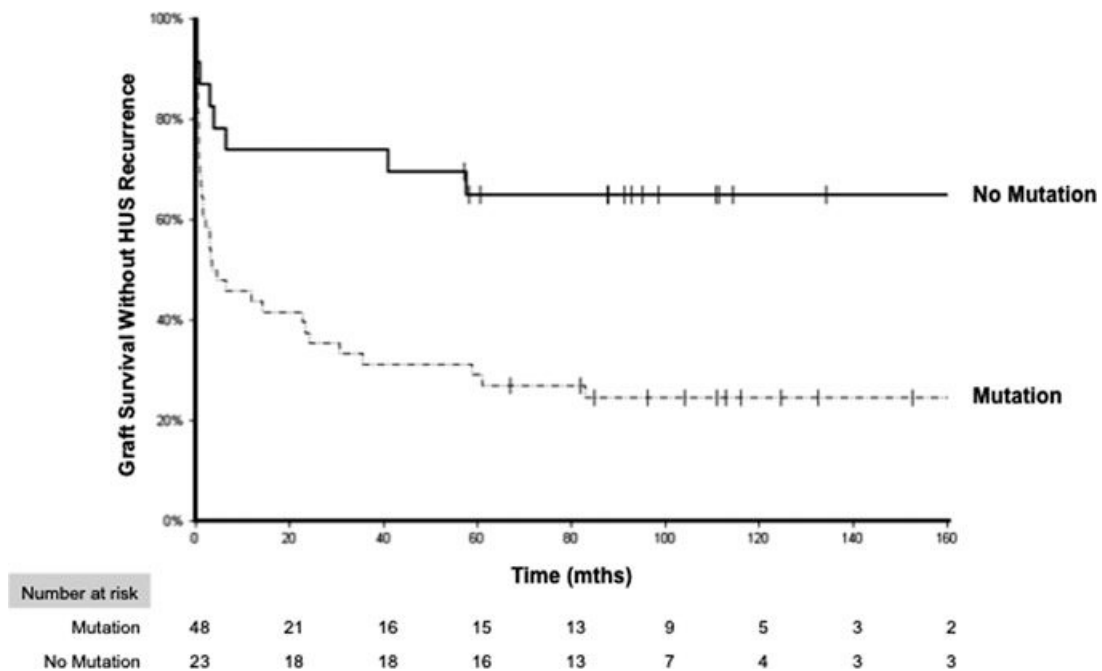


Figure 4: Graft survival without HUS recurrence according to presence or not of a mutation in complement genes ($p = 0.035$, log rank).

not different between patients with CFI mutation associated with CFHR1 deletion and those with CFI mutation without CFHR1 deletion ($p = 0.99$; data not shown). Post-transplant recurrence occurred in two of the three patients with an isolated MCP mutation. Both of them had the two at-risk CFH haplotypes for aHUS. Two years after aHUS recurrence, 75%, 71%, 72% and 50% of grafts from carriers of CFH, CFI, C3/B and MCP were lost.

Influence of plasmatherapy on graft survival or recurrence

Curative plasmatherapy, which consisted either of fresh-frozen plasma infusions ($n = 3$) or plasma exchanges ($n = 30$), was performed in 33 of the 44 patients (75%) with aHUS recurrence. Overall, graft outcome was poor in patients who received curative plasmatherapy for recurrence in univariate analysis $RR = 2.51 [1.34-4.68]$ $p = 0.004$.

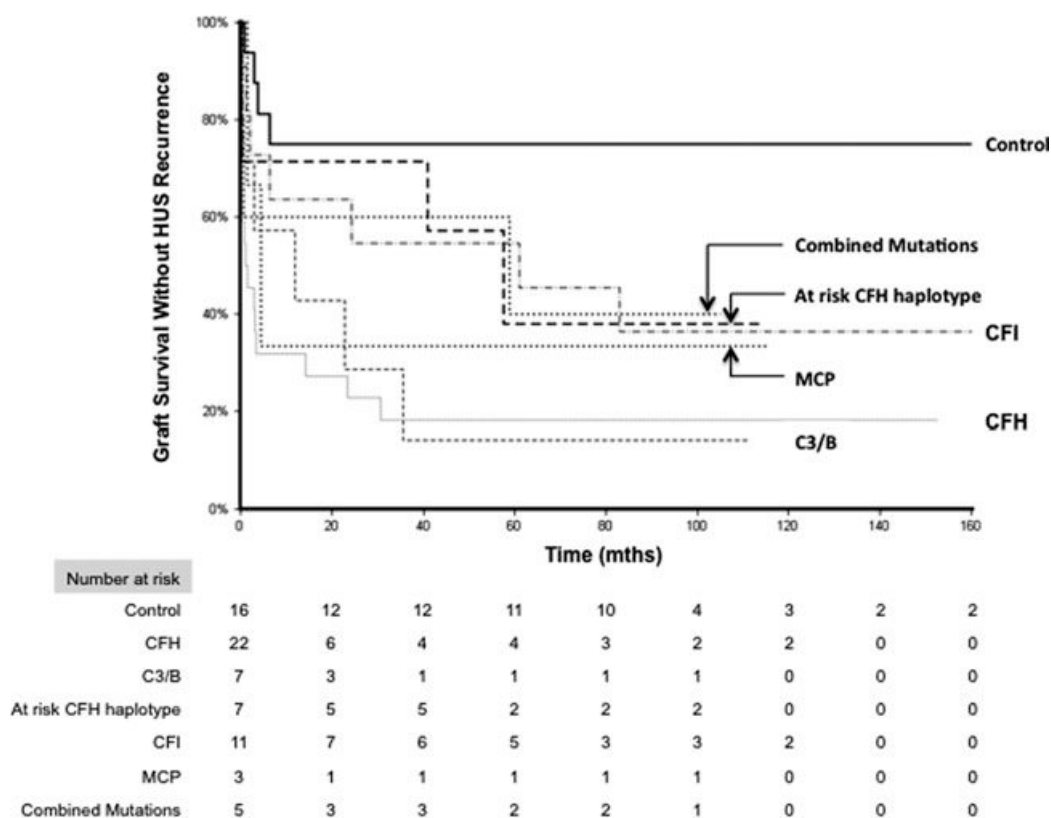


Figure 5: Graft survival without HUS recurrence according to the recipient genetic background. Fractions of graft without aHUS recurrence at any time according to the presence or not of mutations (*CFH*, *C3/CFB*, *CFI*, *MCP*, combined mutations or without mutation but with 2 at risk *CFH* haplotype). All groups were then compared to a control group (grafts from patients with neither mutation nor homozygous at-risk *CFH* haplotype). The results are shown in Table 5.

Table 5: Individual mutations associated with significant recurrence risk by univariate Cox analysis

	RR	95% CI	p-Value
CFH vs. C	5.6	2.4–13.0	0.0024
C3/CFB vs. C	4.8	1.12–20.6	0.042
CFI vs. C	2.9	0.9–9.8	0.444
At risk CFH vs. C	2.8	0.6–13.2	0.810
MCP vs. C	3.4	0.3–37	0.804
Combined mutations vs. C	3.2	0.5–20.8	0.666

C = control, no mutation, no polymorphism.

At risk CFH: two at risk CFH haplotypes.

All groups were then compared to a control group (grafts from patients without mutations or two at-risk CFH haplotypes).

Two at-risk CFH haplotypes without mutation, CFI, gain function mutation (C3/B) and CFH mutations, MCP and Combined mutations were compared to a Control group.

Bonferroni correction for multiple comparisons was applied.

After adjustment for recurrence, multivariate analysis showed that curative plasmatherapy did not improve graft survival (RR = 1.17 [0.49–2.83] $p = 0.7$; Table 3, Figure 6).

Nine patients received preemptive plasmatherapy in an attempt to prevent posttransplant recurrence of aHUS

but none received the anti-C5 treatment eculizumab as a preemptive therapy (Table 6). In multivariate analysis, preemptive plasmatherapy decreased graft loss RR = 0.11 [0.01–0.84] $p = 0.035$. There was also a nonsignificant decrease in disease recurrence RR = 0.34 [0.10–1.13] $p = 0.078$ in patients who received preemptive plasmatherapy (Table 4, Figure 7). Four of these patients experienced an event-free successful renal transplantation. Recurrence occurred in three other patients (33%; including the one with CFH mutation and one with combined mutations [CFB and CFI]) with severe concomitant graft impairment rescued by eculizumab, a complete reversal of aHUS activity was obtained in all of them. No patients treated by eculizumab suffered graft loss but renal function sequelae persisted in all of them at 1 year posttransplantation. Two other patients lost their graft due to AMR.

Discussion

We report the outcome of renal transplant in a large cohort of aHUS patients screened for mutation in all known aHUS related genes and for at-risk CFH haplotype. The present study highlights that, overall, poor graft survival is largely

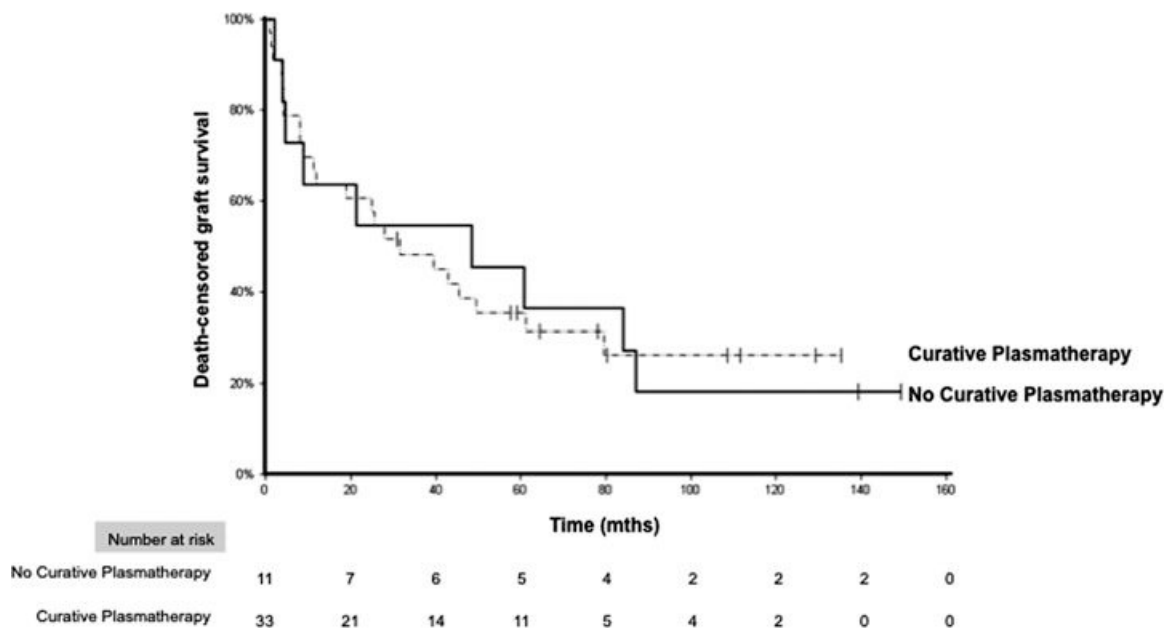


Figure 6: Graft survival following aHUS recurrence in patients treated or not with curative plasma therapy (p = 0.9, log rank).

due to aHUS recurrence. We demonstrated that complement genetic abnormalities strongly impact the rate of early recurrence and thus the graft outcome.

In our study, the overall outcome of kidney transplantation in adults with aHUS was poor with 7% of deaths and 50% of graft failure at 5 years posttransplant. Four patients without major cardiovascular risk factors, aged from 21 to 50 years, died from cardiovascular events. This finding is reminiscent of aHUS cases with arterial involvement, including stenosis of cerebral arteries and myocardial ischemia, suggesting that permanent complement activation may also harm the macrovascular vessels (31–33).

The high frequency of graft loss in aHUS recipients was first documented based on case reports with or without genetics available (2,34) and from an International registry (3).

Our study highlights that, overall, poor graft survival is largely due to aHUS recurrence which occurred in 68% of the patients, and to a lesser extent to delayed graft function. We showed that the recurrence risk is major during the first year (accounting for 70% of recurrence) and decreases markedly after 2 years.

Recurrence is strongly determined by genetic background. Patients with mutations in complement factors had a three-fold increase in posttransplant aHUS recurrence compared to aHUS patients without mutations. More importantly, this study provides new and useful information about the level of the risk of aHUS recurrence. The risk of recurrence is four times higher for patients with mutation in CFH gene or

Hybrid gene between CFH/CFHR1 and CFB/C3 mutations as compared to patients without these genetic abnormalities. It is well documented that kidney transplantation in patients with CFH mutations is associated with a high recurrence rate. Of 42 published cases of transplanted patients (children or adult) with CFH genetic abnormalities, 32 had recurrence and 86% of the recurrences induced graft loss (3,35–37). We confirmed the high frequency of graft loss after recurrence in patients with CFH. Interestingly, in our study, the six patients who carried a Hybrid gene between CFH/CFHR1 in our study lost their renal allograft by early recurrence. This very high-risk subset of patients was not detected with the sequencing of the exonic sequence of the CFH but with MLPA technology. This finding is in line with the critical role of the C-terminus of CFH for binding to and protecting the endothelium (22,36). Data are emerging that patients with C3 and CFB mutations have a high risk of graft recurrence and graft loss. In our study, the risk of recurrence may be high for C3/B carriers, it is probably due to the small number of patient. Two patients who carried a CFB mutation lost their graft, one of whom has previously been reported (16). Two other cases of CFB carriers who lost their grafts have been reported in the literature (14). Recurrence occurred in four of the five grafts in four patients who carried C3 mutations. In contrast, Noris et al. reported only two recurrences in seven renal transplantations (3). The main challenge remains to determine the functional consequences of the gene mutations to define the risk of aHUS disease recurrence (13).

Several previous reports suggest that patients with CFI mutation have a similar renal posttransplantation recurrence risk to those with a CFH mutation (9,11,38,39). We

Table 6: Outcome of renal transplantation after preemptive plasmatherapy

Patients	Mutation	Recurrence on previous graft (Y/N)	Perioperative plasmatherapy regimen	Maintenance regimen	Duration of plasmatherapy treatment	Recurrence/rejection (delay) ¹	Outcome Creatinine $\mu\text{mol/L}$ (Follow-up)
1	CFH (SCR1)	–	PI over 4 days	No	4 days	No/No	80 (2 yrs)
2	CFH (SCR4)	–	Daily PI over 7 days	Monthly PI	4 yrs	No/No	80 (4 yrs)
3	CFH (SCR10)	Yes	Daily PI over 7 days	PI every 2 weeks	3 months	Yes/No (3 months)	Anti-C5 at 3 mth 175 (12 mths)
4	Combined ²	–	PE over 10 days	PE every 1 week	1 month	Yes/No (1month)	Anti-C5 1 mth 180 (2 yrs)
5	CFI	–	Daily PE over 5 days following tapering PI	PI every 3 weeks	18 months	No/Yes (AMR at 12 months)	Graft lost (18 mths)
6	CFI	Yes	PI J0 et J1	PI every 2 weeks	2 yrs	Yes /No (2 yrs)	Anti-C5 at 2 yrs 250 (3 yrs)
7	NO	–	PE 3 times per 7 days over 1 month	PI every week	2 yrs	No/Yes (AMR at 6 weeks)	Graft lost (2 yrs)
8	At risk CFH	Yes	PI over 9 days	PE every 1 months	2yrs	No/No	110 (4 yrs)
9	NO	Yes	Daily PI	Monthly PI	4 yrs	No/No	100 (4 yrs)

PE = plasma exchanges; PI = plasma infusion; yrs = years; mth = month.

No = no mutation, no 2 at risk CFH haplotype.

At risk CFH: two at risk CFH haplotypes.

¹Delay between renal transplantation and the event (recurrence or acute rejection).

²Mutations in CFB and CFI.

provide evidence that the risk of recurrence in grafts from patients with CFI mutations is lower compared with grafts from patients with CFH mutations. We have previously reported that complete deletion of the CFHR-1 gene, which is a common polymorphism, could adversely impact on the severity of the HUS disease in patients with Factor I mutation (7). Our study failed to demonstrate that homozygous CFHR1 deletion increased recurrence in CFI carriers. Furthermore, we failed to identify the influence of at-risk CFH haplotype as our study included a relatively small number of patients with two at risk CFH haplotypes and without mutation. It is difficult to conclude about the specific impact of the at-risk CFH haplotype on the recurrence rate after kidney transplantation. Additional studies may help to determine the influence of these various polymorphisms on the risk of recurrence.

However, we determined that aHUS patients without gene mutations or two at-risk CFH haplotypes had a low-recurrence risk.

In our cohort, out of the three patients with an MCP mutation, only one transplantation was successful. MCP is the transmembrane protein which acts as a co-factor for CFI to inactivate C3b on the endothelial cell surface (40–43). After renal transplantation, MCP production is driven by the endothelium cells from the donor and MCP carriers are therefore expected to have a low-recurrence risk (9). To date, only two patients with MCP mutations have been

reported as having experienced recurrence, one of whom was reported in this study (10). The mechanism evoked to explain unexpected recurrence includes chimerism (10) or the presence of another mutation (42). Interestingly, both carriers of an MCP mutation in the present cohort, including one already published (10), harbored two at-risk CFH haplotypes and the mutation in MCP was the only mutation identified.

Plasmatherapy failed to rescue graft function in most patients as previously reported in a review (44). In this respect, we must nonetheless acknowledge that this retrospective study contains several caveats including variable times in plasmatherapy initiation and lack of homogeneity in frequency and duration of plasma exchange sessions. Nevertheless, the negative impact of recurrence on graft survival persisted independently whether patients received plasmatherapy or not. This reinforces the fact that patients should be administered prophylactic treatment.

We confirmed data previously reported that preemptive plasmatherapy may be effective in the prevention of disease recurrence and may reduce graft loss (36)–(49–51). However three of the nine patients experienced disease recurrence. When switched to eculizumab renal dysfunction persisted but renal function was maintained. This study, as well as a recent publication of the outcome of 22 aHUS renal transplanted recipients treated by eculizumab, suggests that patients at very high risk of recurrence

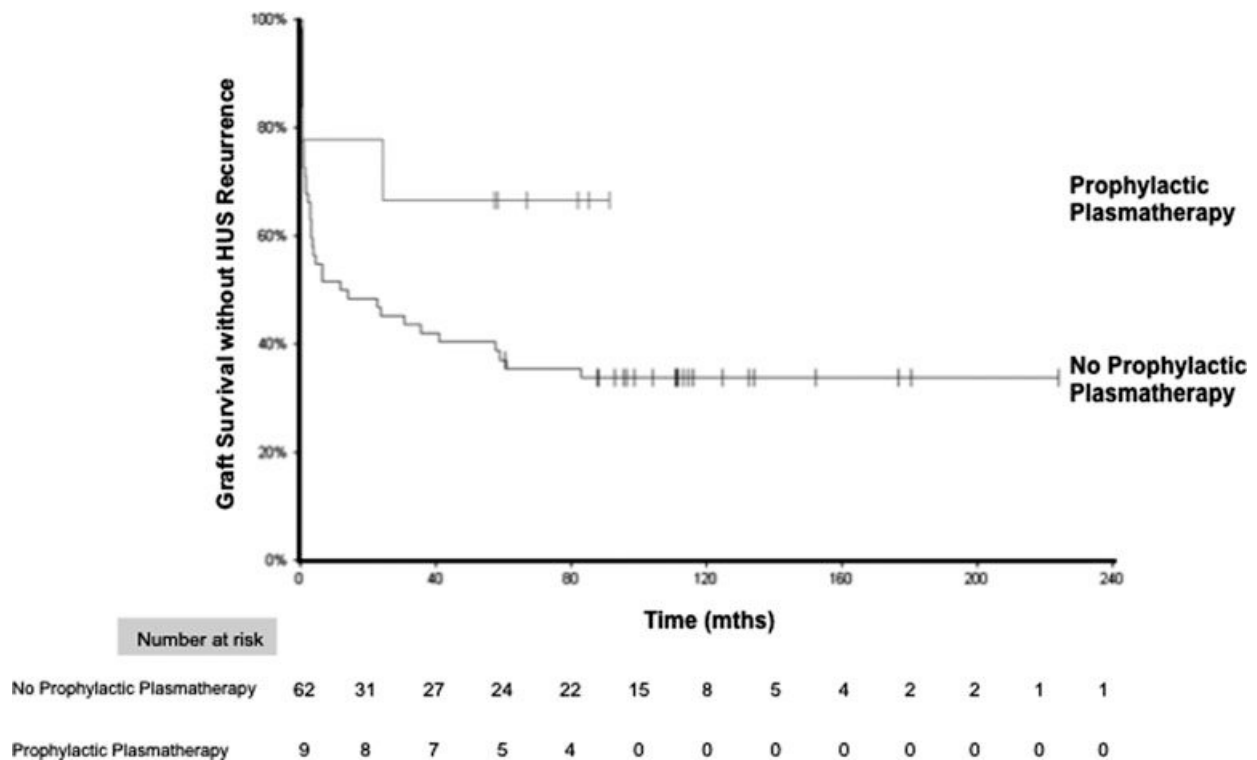


Figure 7: Graft survival without recurrence according to prophylactic preemptive plasmatherapy (p = 0.03, log rank).

(mutations in CFH/Hybrid, or CFB/C3) should be administered preemptive therapy by eculizumab (45,47–49) and that those with recurrence under plasmatherapy be rapidly switched to eculizumab (4–49). Favorable renal outcome is rare in the CFH careers (50–52). Patients at moderate risk, could be administered either preemptive plasmatherapy or eculizumab on a case-per-case basis. Finally, preemptive plasmatherapy may be sufficiently effective in patients at low risk (i.e. patients without mutations).

Although the duration of preemptive treatment is debatable, our study demonstrates that the rate of recurrence decreases markedly 2 years posttransplantation. These data may help clinicians to decide when to stop the treatment.

The estimated incidence of TMA due to CNI-based immunosuppressive therapy in patients without aHUS as initial nephropathy is 0.5% to 1% (53). Our study failed to demonstrate a significant relationship between CNI therapy and recurrence of aHUS, in contrast to previous studies in patients with *de novo* posttransplant HUS (24,53,54). At the opposite, we previously found a 30% prevalence of CFH and CFI mutations in patients with *de novo* posttransplant HUS (55). Moreover, m-TOR inhibitors can induce TMA (25), and we found a significant risk of recurrence in m-TOR inhibitor-treated patients.

These results would suggest that patients should not be put on a CNI-free regimen in this setting as it exposes them to an increased risk of acute rejection (56,57) whereas the recurrence risk is limited. Furthermore, switching to an mTOR inhibitor probably exposes them to a higher risk of recurrence.

Although the rate of acute rejection was high in our study, in line with a previous study which reports a rate of 30% (56), it was not significantly associated with an increased risk of graft loss. Moreover, the humoral rejection rate may be underestimated because the study covered a large period of time, without systematic screening for donor specific antibodies during the posttransplant course or systematic C4d staining on all renal biopsies. So far, it remains unclear whether the high incidence of acute rejection results from low exposure to CNI, fueled by the wish to limit CNI-related endothelial toxicity, or from a complement-dependent enhanced alloimmune response (57,58).

Certain considerations need to be taken into account when interpreting the results. The first is that the patients were retrospectively selected from the French registry of aHUS. A second limitation is that the patients were enrolled over a large period of time and the inclusion criterion for previous genetic testing could have introduced selection bias. Such bias may be minimal as we failed to identify a

significant difference in the outcome of grafts performed between 1995 and 2002 (before the knowledge of complement associated aHUS) and between 2002 and 2009 (data not shown). Third, therapeutic impact should be analyzed with caution. After adjustment for relevant covariates (DGF, BPAR and plasmatherapy) which could impact on graft survival, disease recurrence remains a significant factor associated with graft loss. We thus believe that our analysis represents an appropriate overview of the impact of complement genes on graft outcome.

In conclusion, our study provides strong evidence supporting previously published findings that aHUS disease recurrence impacts the graft outcome in renal transplant recipients. Recurrence is determined by the presence and the type of complement genetic abnormalities. We purpose to classify the risk of recurrence according to the genetic background. Patients with Factor H, C3 and CFB mutations or with CFH/CFHR1 hybrid gene carry a high risk of recurrence after renal transplantation. Patients with CFI, MCP, combined mutations or with two at risk CFH haplotype carry a moderate risk, whereas those with neither mutations nor CFH at risk haplotype have a low risk of recurrence.

Our study paves the way for future genetically based individualized prophylactic therapeutic strategies. In our opinion, preemptive eculizumab therapy should be administered to patients with high-risk mutations (CFH/Hybrid, CFB, C3) whereas preemptive plasmatherapy should be proposed to others patients with moderate and low risk of recurrence. Finally, unlike for mTOR inhibitors, we found no evidence supporting that CNI increased risk of recurrence. CNI-based regimens should thus be the immunosuppressive therapy of choice for aHUS transplanted patients to limit the risk of rejection.

Acknowledgments

We are grateful to the clinicians who referred their patients for complement investigations and accepted that patients were included in the study and particularly to Bruno Hurault De Ligny (Caen), Christophe Legendre (Necker), Benoit Barrou and Nadia Arzouk (Pitié Salpêtrière), Antoine Durrbach (Bicêtre), Maryvonne Hourmant (Nantes), Pierre François Weestel (Amiens), Patrick Le Pogamp and Cécile Vigneau (Rennes), Marie Essig (Limoges), Olivier Toupance (Reims), Christophe Mariat and Nicolas Mailard (Saint Etienne), Denis Glotz (St Louis), Mathias Buchler (Tours), Philippe Lang (Mondor), Stéphane Burtey and Noemie Jourde (Marseille), Isabelle Etienne (Rouen).

We thank Stephanie Ngo, Delphine Beury, Nelly Poulain, Christine Hautreux and Jacques Blouin who provided expert technical support and Lubka Roumenina for the discussion about the functional consequences of complement mutations.

Disclosure

The authors of this manuscript have conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of*

Transplantation. J. Zuber, V. Frémeaux-Bacchi, C. Loirat received fees from Alexion Pharmaceuticals for invited lectures and are members of an expert board supported by Alexion Pharmaceuticals.

References

1. Ruggenti P, Noris M, Remuzzi G. Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Kidney Int* 2001; 60: 831–846.
2. Bresin E, Daina E, Noris M, et al. Outcome of renal transplantation in patients with non-Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: Prognostic significance of genetic background. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1: 88–99.
3. Noris M, Caprioli J, Bresin E, et al. Relative role of genetic complement abnormalities in sporadic and familial aHUS and their impact on clinical phenotype. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5: 1844–1859.
4. Zuber J, Le Quintrec M, Sberro-Soussan R, et al. New insights into postrenal transplant hemolytic uremic syndrome. *Nat Rev Nephrol* 2011; 7: 23–35.
5. Noris M, Remuzzi G. Atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 2009; 361: 1676–1687.
6. Le Quintrec M, Roumenina L, Noris M, Frémeaux-Bacchi V. Atypical hemolytic uremic syndrome associated with mutations in complement regulator genes. *Semin Thromb Hemost* 2010; 36: 641–652.
7. Bienaime F, Dragon-Durey MA, Regnier CH, Mutations in components of complement influence the outcome of Factor I-associated atypical hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int* 2010; 77: 339–349.
8. Caprioli J, Castelletti F, Bucchioni S, et al. Complement factor H mutations and gene polymorphisms in haemolytic uraemic syndrome: The C-257T, the A2089G and the G2881T polymorphisms are strongly associated with the disease. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 3385–3395.
9. Caprioli J, Noris M, Brioschi S, et al. Genetics of HUS: The impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood* 2006; 108: 1267–1279.
10. Frémeaux-Bacchi V, Arzouk N, Ferlicot S, Charpentier B, Snanoudj R, Durrbach A. Recurrence of HUS due to CD46/MCP mutation after renal transplantation: A role for endothelial microchimerism. *Am J Transplant* 2007; 7: 2047–2051.
11. Frémeaux-Bacchi V, Dragon-Durey MA, Blouin J, et al. Complement factor I: A susceptibility gene for atypical haemolytic uraemic syndrome. *J Med Genet* 2004; 41: e84.
12. Frémeaux-Bacchi V, Kemp EJ, Goodship JA, et al. The development of atypical haemolytic-uraemic syndrome is influenced by susceptibility factors in factor H and membrane cofactor protein: Evidence from two independent cohorts. *J Med Genet* 2005; 42: 852–856.
13. Frémeaux-Bacchi V, Miller EC, Liszewski MK, et al. Mutations in complement C3 predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2008; 112: 4948–4952.
14. Goicoechea de Jorge E, Harris CL, Esparza-Gordillo J, et al. Gain-of-function mutations in complement factor B are associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 240–245.
15. Kavanagh D, Kemp EJ, Mayland E, et al. Mutations in complement factor I predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 2150–2155.
16. Roumenina LT, Jablonski M, Hue C, et al. Hyperfunctional C3 convertase leads to complement deposition on endothelial cells and

- intensive plasmatherapy an option? *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 3548–3551.
53. Reynolds JC, Agodoa LY, Yuan CM, Abbott KC. Thrombotic microangiopathy after renal transplantation in the United States. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 1058–1068.
54. Quan A, Sullivan EK, Alexander SR. Recurrence of hemolytic uremic syndrome after renal transplantation in children: A report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study. *Transplantation* 2001; 72: 742–745.
55. Le Quintrec M, Lionet A, Kamar N, et al. Complement mutation-associated de novo thrombotic microangiopathy following kidney transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 1694–1701.
56. Artz MA, Steenbergen EJ, Hoitsma AJ, Monnens LA, Wetzels JF. Renal transplantation in patients with hemolytic uremic syndrome: High rate of recurrence and increased incidence of acute rejections. *Transplantation* 2003 76: 821–826.
57. Oyen O, Strom EH, Midtvedt K, et al. Calcineurin inhibitor-free immunosuppression in renal allograft recipients with thrombotic microangiopathy/hemolytic uremic syndrome. *Am J Transplant* 2006; 6: 412–418.
58. Zhou W, Medof ME, Heeger PS, Sacks S. Graft-derived complement as a mediator of transplant injury. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 569–576.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web site:

Table S1: Graft outcome in aHUS patients according to types of mutations

Figure S1: Summary of CFH, MCP, CFI, CFB, C3 mutations in the cohort.

- contributes to atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2009; 114: 2837–2845.
17. Dragon-Durey MA, Loirat C, Cloarec S, et al. Anti-Factor H autoantibodies associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 555–563.
 18. Dragon-Durey MA, Sethi SK, Bagga A, et al. Clinical features of anti-factor H autoantibody-associated hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 2180–2187.
 19. Jozsi M, Licht C, Strobel S, et al. Factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome correlate with CFHR1/CFHR3 deficiency. *Blood* 2008; 111: 1512–1514.
 20. Ermini L, Goodship TH, Strain L, et al. Common genetic variants in complement genes other than CFH, CD46 and the CFHRs are not associated with aHUS. *Mol Immunol* 2012; 49: 640–648.
 21. Heurich M, Martinez-Barricarte R, Francis NJ, et al. Common polymorphisms in C3, factor B, and factor H collaborate to determine systemic complement activity and disease risk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 8761–8766.
 22. Pickering MC, de Jorge EG, Martinez-Barricarte R, et al. Spontaneous hemolytic uremic syndrome triggered by complement factor H lacking surface recognition domains. *J Exp Med* 2007; 204: 1249–1256.
 23. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schumouder RL. Delayed graft function: Risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997; 63: 968–974.
 24. Pham PT, Peng A, Wilkinson AH, et al. Cyclosporine and tacrolimus-associated thrombotic microangiopathy. *Am J Kidney Dis* 2000; 36: 844–850.
 25. Sartelet H, Toupance O, Lorenzato M, et al. Sirolimus-induced thrombotic microangiopathy is associated with decreased expression of vascular endothelial growth factor in kidneys. *Am J Transplant* 2005; 5: 2441–2447.
 26. Ulinski T, Charpentier A, Colombat M, et al. From humoral rejection to generalized thrombotic microangiopathy—role of acquired ADAMTS13 deficiency in a renal allograft recipient. *Am J Transplant* 2006; 6: 3030–3036.
 27. 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* 2011; 365: 8–26.
 28. Venables JP, Strain L, Routledge D, et al. Atypical haemolytic uraemic syndrome associated with a hybrid complement gene. *PLoS Med* 2006; 3: e431.
 29. Zhao J, Wu H, Khosravi M, et al. Association of genetic variants in complement factor H and factor H-related genes with systemic lupus erythematosus susceptibility. *PLoS Genet* 2011; 7: e1002079.
 30. Moake, JL. Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med* 2002; 347: 589–600.
 31. Davin JC, Majoie C, Groothoff J, et al. Prevention of large-vessel stenoses in atypical hemolytic uremic syndrome associated with complement dysregulation. *Pediatr Nephrol* 2011; 26: 155–157.
 32. Loirat C, Macher MA, Elmaleh-Berges M, et al. Non-atheromatous arterial stenoses in atypical haemolytic uraemic syndrome associated with complement dysregulation. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 3421–3425.
 33. Sallee M, Daniel L, Piercecchi MD, et al. Myocardial infarction is a complication of factor H-associated atypical HUS. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 2028–2032.
 34. Lahlou A, Lang P, Charpentier B, et al. Hemolytic uremic syndrome. Recurrence after renal transplantation. Groupe Cooperatif de l'Île-de-France (GCIF). *Medicine* 2000; 79: 90–102.
 35. Sellier-Leclerc AL, Fremeaux-Bacchi V, Dragon-Durey MA, et al. Differential impact of complement mutations on clinical characteristics in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2392–2400.
 36. Saland JM, Ruggenenti P, Remuzzi G. Liver-kidney transplantation to cure atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 940–949.
 37. Noris M, Remuzzi G. Thrombotic microangiopathy after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2010; 10: 1517–1523.
 38. Chan MR, Thomas CP, Torrealba JR, et al. Recurrent atypical hemolytic uremic syndrome associated with factor I mutation in a living related renal transplant recipient. *Am J Kidney Dis* 2009; 53: 321–326.
 39. Geelen, J, van den Dries, K, Roos, A, et al. A missense mutation in factor I (IF) predisposes to atypical haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2007; 22: 371–375.
 40. Fremeaux-Bacchi V, Moulton EA, Kavanagh D, et al. Genetic and functional analyses of membrane cofactor protein (CD46) mutations in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2017–2025.
 41. Richards A, Kemp EJ, Liszewski MK, et al. Mutations in human complement regulator, membrane cofactor protein (CD46), predispose to development of familial hemolytic uremic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 12966–12971.
 42. Richards A, Kathryn Liszewski M, Kavanagh D, et al. Implications of the initial mutations in membrane cofactor protein (MCP; CD46) leading to atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol* 2007; 44: 111–122.
 43. Liszewski MK, Leung MK, Schraml B, Goodship TH, Atkinson JP. Modeling how CD46 deficiency predisposes to atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol* 2007; 44: 1559–1568.
 44. Loirat C, Garnier A, Sellier-Leclerc AL, Kwon T. Plasmatherapy in atypical hemolytic uremic syndrome. *Semin Thromb Hemost* 2010; 36: 673–681.
 45. Nester C, Stewart Z, Myers D, et al. Pre-emptive eculizumab and plasmapheresis for renal transplant in atypical hemolytic uremic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 1488–1494.
 46. Weitz M, Amon O, Bassler D, Koenigsrainer A, Nadalin S. Prophylactic eculizumab prior to kidney transplantation for atypical hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2011; 26: 1325–1329.
 47. Zimmerhackl LB, Hofer J, Cortina G, et al. Prophylactic eculizumab after renal transplantation in atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 2010; 362: 1746–1748.
 48. Zuber J, Le Quintrec M, Bertoye C, et al. the French Study Group for atypical HUS. Eculizumab for atypical hemolytic uremic syndrome recurrence in renal transplantation. *Am J Transplant* 2012; 8: 643–657.
 49. Al-Akash SI, Almond PS, Savell VH, Jr., Gharaybeh SI, Hogue C. Eculizumab induces long-term remission in recurrent post-transplant HUS associated with C3 gene mutation. *Pediatr Nephrol* 2011; 26: 613–619.
 50. Albertazzi V, Bonucchi D, De Amicis S, Americo C, Ghiandai G, Cappelli G. A favorable 3-year outcome of kidney transplantation in atypical hemolytic uremic syndrome associated with a factor H mutation: Case report. *Transplant Proc* 2010; 42: 1352–1354.
 51. Davin JC, Groothoff J, Gracchi V, Bouts A. Long-term renal function under plasma exchange in atypical hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2011; 26: 1915–1916.
 52. Hirt-Minkowski P, Schaub S, Mayr M, Schifferli JA, Dickenmann M, Fremeaux-Bacchi V, Steiger J. Haemolytic uraemic syndrome caused by factor H mutation: Is single kidney transplantation under

Recessive mutations in *DGKE* cause atypical hemolytic-uremic syndrome

Mathieu Lemaire^{1,2,24}, Véronique Frémeaux-Bacchi^{3,4,24}, Franz Schaefer^{5,6}, Murim Choi^{1,2,7}, Wai Ho Tang⁸, Moglie Le Quintrec⁴, Fadi Fakhouri⁹, Sophie Taque¹⁰, François Nobili¹¹, Frank Martinez¹², Weizhen Ji^{1,2}, John D Overton^{1,7}, Shrikant M Mane^{1,7}, Gudrun Nürnberg¹³, Janine Altmüller¹³, Holger Thiele¹³, Denis Morin¹⁴, Georges Deschenes¹⁵, Véronique Baudouin¹⁵, Brigitte Llanas¹⁶, Laure Collard¹⁷, Mohammed A Majid¹⁸, Eva Simkova¹⁸, Peter Nürnberg^{13,19,20}, Nathalie Rioux-Leclerc²¹, Gilbert W Moeckel²², Marie Claire Gubler²³, John Hwa⁸, Chantal Loirat¹⁵ & Richard P Lifton^{1,2,7}

Pathologic thrombosis is a major cause of mortality. Hemolytic-uremic syndrome (HUS) features episodes of small-vessel thrombosis resulting in microangiopathic hemolytic anemia, thrombocytopenia and renal failure¹. Atypical HUS (aHUS) can result from genetic or autoimmune factors² that lead to pathologic complement cascade activation³. Using exome sequencing, we identified recessive mutations in *DGKE* (encoding diacylglycerol kinase ϵ) that co-segregated with aHUS in nine unrelated kindreds, defining a distinctive Mendelian disease. Affected individuals present with aHUS before age 1 year, have persistent hypertension, hematuria and proteinuria (sometimes in the nephrotic range), and develop chronic kidney disease with age. *DGKE* is found in endothelium, platelets and podocytes. Arachidonic acid-containing diacylglycerols (DAG) activate protein kinase C (PKC), which promotes thrombosis, and *DGKE* normally inactivates DAG signaling. We infer that loss of *DGKE* function results in a prothrombotic state. These findings identify a new mechanism of pathologic thrombosis and kidney failure and have immediate implications for treating individuals with aHUS.

Studies in Mendelian forms of aHUS have implicated mutations in genes of the complement cascade, including those encoding complement

factors B (*CFB*), H (*CFH*) and I (*CFI*), complement component 3 (*C3*), membrane cofactor protein (*MCP*) and thrombomodulin (*THBD*)². All of these mutations result in unrestricted complement activation³. Most are transmitted as autosomal-dominant traits with markedly reduced penetrance; only recessive mutations in *CFH* and *MCP* show an apparently high penetrance². Nonetheless, nearly half of patients with aHUS without secondary causes have no discernable genetic or autoimmune abnormality⁴.

We studied two unrelated families (kindreds 1 and 2), each with two siblings diagnosed with aHUS in infancy and unaffected unrelated parents. There were no pathogenic mutations in known aHUS genes or any antibodies to *CFH* in either kindred (Supplementary Table 1). All four affected individuals presented between 4 and 8 months of age with microangiopathic hemolytic anemia, thrombocytopenia and acute renal failure (Table 1 and Supplementary Table 2). Three of the individuals had renal biopsies before age 3, all showing pathology demonstrating chronic thrombotic microangiopathy (Table 1 and Fig. 1). We performed exome sequencing of these four affected subjects (Supplementary Table 3) and identified high-quality variations from the reference sequence, determined their impact on encoded proteins and estimated their allele frequencies.

We posited autosomal-recessive transmission in these families and sought genes with rare homozygous or compound heterozygous variants (minor allele frequency (MAF) <1% and homozygous or

¹Department of Genetics, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA. ²Howard Hughes Medical Institute, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA. ³Department of Immunology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges-Pompidou, Paris, France. ⁴Centre de Recherche des Cordeliers, Unité Mixte de Recherche en Santé (UMR-S) 872, Paris, France. ⁵Division of Pediatric Nephrology, Heidelberg University Medical Center, Heidelberg, Germany. ⁶Center for Pediatrics and Adolescent Medicine, Heidelberg University Medical Center, Heidelberg, Germany. ⁷Yale Center for Mendelian Genomics, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA. ⁸Department of Internal Medicine, Yale Cardiovascular Research Center, Section of Cardiovascular Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA. ⁹Department of Nephrology, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Nantes, Nantes, France. ¹⁰Department of Pediatrics, CHU Rennes, Rennes, France. ¹¹Department of Pediatrics, CHU Besançon, Besançon, France. ¹²Department of Nephrology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France. ¹³Cologne Center for Genomics, University of Cologne, Cologne, Germany. ¹⁴Department of Pediatric Nephrology, CHU Montpellier, Montpellier, France. ¹⁵Department of Pediatric Nephrology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Universitaire Robert-Debré, Paris, France. ¹⁶Department of Pediatric Nephrology, CHU Bordeaux, Bordeaux, France. ¹⁷Department of Pediatrics, Centre Hospitalier Chrétien (CHC) Liège, Liège, Belgium. ¹⁸Department of Pediatrics, Pediatric Nephrology Unit, Dubai Hospital, Dubai, United Arab Emirates. ¹⁹Center for Molecular Medicine Cologne, University of Cologne, Cologne, Germany. ²⁰ATLAS Biolabs GmbH, Berlin, Germany. ²¹Department of Pathology, CHU Rennes, Rennes, France. ²²Renal Pathology and Electron Microscopy Laboratory, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA. ²³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U983, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France. ²⁴These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to V.F.-B. (veronique.fremeaux-bacchi@egp.aphp.fr) or R.P.L. (richard.lifton@yale.edu).

Received 5 December 2012; accepted 1 March 2013; published online 31 March 2013; doi:10.1038/ng.2590

Table 1 Demographic, laboratory and clinical characteristics for subjects with DGKE nephropathy^a

Subject ID	Age at diagnosis (years)	Gender	Hgb nadir ^b	Evidence of MA ^c	PLT ^d	Cr ^e	Dialysis at onset	Age at diagnosis of first renal biopsy (years)	DGKE alteration 1	DGKE alteration 2
1-3	0.7	M	7.2	Yes	50	2.84	Yes	cTMA (2)	p.Trp322*	p.Trp322*
1-4	0.3	F	5.7	Yes	36	1.89	Yes	ND	p.Trp322*	p.Trp322*
2-5 ^f	0.6	F	7.3	Yes	35	5.32	No	cTMA (1)	p.Arg63Pro	p.Val163Serfs*3
2-7 ^f	0.3	F	6.8	Yes	168	1.35	No	cTMA (1.5)	p.Arg63Pro	p.Val163Serfs*3
3-3 ^f	0.5	F	8.4	Yes	132	0.62	No	cTMA (0.7)	p.Trp322*	p.Ser11*
4-1 ^f	0.3	F	3.7	Yes	390 ^g	8.51	Yes	cTMA (1)	p.Trp322*	p.Trp322*
5-3 ^f	0.6	M	7.1	Yes	88	5.09	Yes	cTMA (1)	p.Trp322*	p.Trp158Leufs*8
6-3	0.5	F	9.0	Yes	99	2.52	Yes	cTMA (1)	p.Gln334*	p.Gln334*
7-3	0.9	M	4.9	Yes	125	6.79	Yes	cTMA (2)	p.IVS5-1	p.IVS5-1
8-3	0.7	M	5.0	Yes	214	7.19	Yes	cTMA (1 ^h)	p.Trp322*	p.Trp322*
9-3	0.3	M	6.4	Yes	33	4.21	Yes	cTMA (7)	p.Arg273Pro	p.Arg273Pro
9-4	0.8	M	8.2	ND	57	0.6	No	ND	p.Arg273Pro	p.Arg273Pro
9-6	0.3	F	7.3	Yes	32	2.21	Yes	ND	p.Arg273Pro	p.Arg273Pro

Cr, creatinine; cTMA, chronic thrombotic microangiopathy; Hgb, hemoglobin; MA, microangiopathy; ND, not done; PLT, platelet count.

^aReference values are for infants <1 year of age³². ^bNormal is defined as >10.3 g/dl. ^cMicroangiopathy diagnosed by high lactate dehydrogenase, low haptoglobin and/or schistocytes on blood smear (details in **Supplementary Table 2**). ^dNormal is being defined as >220 × 10⁹/l. ^eNormal is defined as 0.2 mg/dl. ^fKindreds previously reported³³. ^gSubject had many normal platelet counts with acute aHUS. ^hGlobal renal cortical ischemia and malignant nephroangiosclerosis noted in both kidneys.

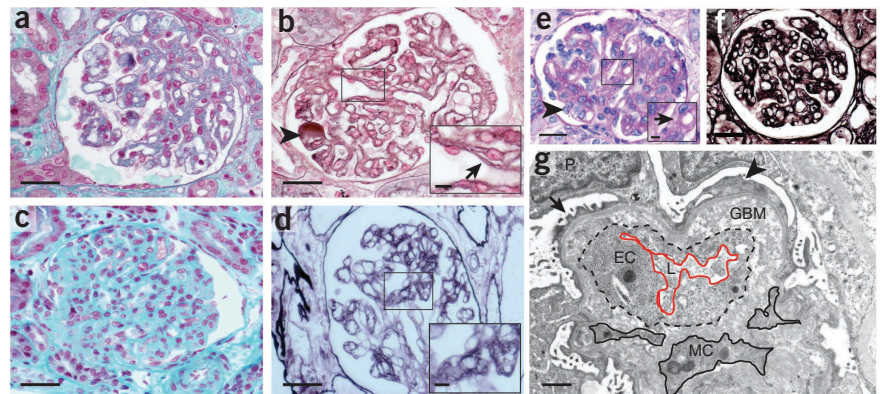
compound heterozygous genotypes not previously seen in databases) that were shared by both affected subjects in each kindred (**Supplementary Table 4**). In kindred 1, there was a single, previously unreported homozygous variant that was shared by both affected subjects, and there was one previously unreported, shared compound heterozygous genotype in kindred 2. These previously unreported genotypes occurred in the same gene, *DGKE*. The first was a homozygous premature termination codon (encoding p.Trp322*), and the second was a compound heterozygote for a frameshift (encoding p.Val163Serfs*3) and a missense mutation (encoding p.Arg63Pro); three unaffected siblings had zero or one of these variants (**Fig. 2, Table 1 and Supplementary Fig. 1a**).

To extend these findings, we sequenced *DGKE* in 47 additional unrelated probands with pediatric-onset aHUS and 36 adult-onset aHUS probands in whom there was no mutation in known aHUS-associated genes or CFH antibodies (**Supplementary Table 1**). From this analysis, we identified six additional index cases harboring rare homozygous or compound heterozygous *DGKE* variants, all of which

had pediatric onset (**Fig. 2, Table 1 and Supplementary Fig. 1a**). Parental samples, which were available for all but one kindred, were heterozygous for one of the mutations, with the exception of kindred 5, in which one mutation was apparently *de novo*. Additionally, kindred 9, independently ascertained in Germany with three affected subjects, showed complete linkage to the *DGKE* locus (log₁₀ odds (LOD) score of 2.53; **Supplementary Fig. 1b**), and sequencing of all exons in the interval identified a homozygous *DGKE* mutation (encoding p.Arg273Pro; **Fig. 2 and Supplementary Fig. 1a**). These nine subjects all met the clinical criteria for aHUS at presentation (**Table 1 and Supplementary Table 2**). Six had renal biopsies before age 2, all of which read as chronic thrombotic microangiopathy (**Table 1 and Fig. 1e–g**).

Collectively, the rare *DGKE* variants found in the nine kindreds included three different premature termination codons, two frameshift mutations, one splice donor-site mutation and two missense mutations that alter conserved residues (**Fig. 2 and Supplementary Fig. 1c**). Only one of these variants (encoding p.Trp322*) was previously

Figure 1 Kidney biopsies of subjects with *DGKE* mutations show histological features of chronic thrombotic microangiopathy. These include glomerular hypercellularity and split glomerular basement membranes (GBM) by light microscopy and endothelial cell swelling and GBM internal lamina rara widening without electron-dense deposits by electron microscopy. (**a,b**) Renal biopsy of subject 1-3 at age 2. The image in **a** shows reduced glomerular capillary lumen, an increased mesangial matrix with mesangial hypercellularity and patchy interstitial fibrosis (Masson's trichrome). The glomerulus in **b** shows split GBM (arrow in inset) with debris accumulation in the subendothelial space and a dilated capillary filled with fibrinous material (arrowhead), consistent with a small thrombus (Jones' stain). (**c,d**) Renal biopsy of subject 1-3 at age 9 showing the progression of renal damage. The image in **c** shows a bloodless, markedly lobular glomerulus with extensive fibrosis (Masson's trichrome), and the image in **d** shows enhanced global GBM splitting (inset; Jones' stain). (**e–g**) Renal biopsy of subject 4-1 at age 1. The image in **e** shows global thickening of capillary walls, split GBM (arrow in inset), a focal increase in mesangial matrix and a prominent podocyte nucleus (arrowhead; Periodic acid-Schiff). The image in **f** illustrates split and thickened GBM (Jones' stain). The electron micrograph in **g** shows a narrow capillary lumen (L; red line) caused by GBM inner lamina rara expansion (devoid of electron-dense deposits) and hypertrophy of endothelial cells (ECs; black dotted line). Also visible are podocytes (P) with normal (arrow) or effaced (arrowhead) foot processes. Mesangial cell (MC; black line) processes are present between endothelial cells and GBM, consistent with mesangial cell interposition (lead citrate and uranyl acetate). Scale bars, 50 μm (**a–f**); 10 μm (insets in **b,d,e**); 1 μm (**g**).



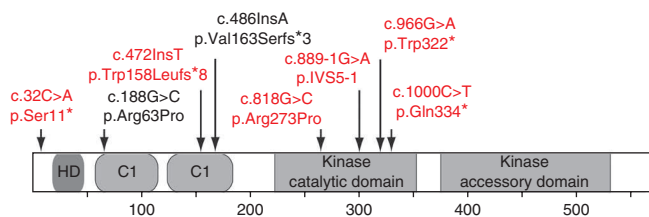


Figure 2 *DGKE* mutations in aHUS. Shown is a schematic of the *DGKE* domains. C1 domains bind DAG, and there is evidence that the hydrophobic domain (HD) is a transmembrane domain³¹. The locations and consequences of the recessive mutations in subjects from nine unrelated kindreds with aHUS are shown. Mutations that were homozygous in one or more families are shown in red; the other mutations were compound heterozygous. The genotypes of the affected subjects are shown in **Table 1**, and pedigrees and sequence chromatograms are shown in **Supplementary Figure 1**.

seen among 8,475 subjects from the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) or Yale exome databases; this variant was heterozygous in two people of European ancestry. The variant encoding p.Trp322* was present in five apparently unrelated subjects with aHUS of European ancestry and was homozygous in three of these five individuals. These three subjects shared an identical and extremely rare haplotype spanning no more than 400 kb at the *DGKE* locus (**Supplementary Fig. 2** and **Supplementary Table 5**). This indicates a common ancestry for the mutation in each family, with the last common ancestor estimated to have occurred 53 generations ago (95% confidence interval 33–73 generations; **Supplementary Fig. 3**). The remote shared ancestry of the mutation is consistent with these three families not being closely related.

Twenty-two percent of siblings of index cases in these families (4/18) had aHUS, consistent with recessive transmission with high penetrance. Moreover, rare *DGKE* variants precisely co-segregated with aHUS in these families, yielding a LOD score of 8.9 (likelihood ratio of 7.9×10^8 in favor of linkage) for complete linkage of these variants to aHUS under a recessive model with rare phenocopies and high penetrance. Similarly, we found no homozygous or compound heterozygous damaging variants (premature termination, frameshift or splice site variants) among 8,475 subjects in the NHLBI and Yale exome databases (**Supplementary Fig. 4**). The association of rare recessive genotypes with aHUS was extremely strong ($P = 2 \times 10^{-16}$,

Fisher's exact test). Together these genetic findings conclusively establish recessive loss-of-function mutations in *DGKE* as the cause of aHUS in these families.

Subjects with *DGKE* mutations all presented with aHUS in the first year of life (mean 0.5 years, range 0.3–0.9 years; **Table 1**). *DGKE* mutations were present in 9 of 22 pediatric patients with aHUS with disease onset before 1 year of age and 0 of 28 patients diagnosed after age 1 year ($P = 2 \times 10^{-4}$). *DGKE* was a frequent cause of aHUS in the first year of life (13 of 49 cases with aHUS, 27%) and accounted for 50% of familial disease in this age group (three of six kindreds). This uniformly early age of onset defines a distinct subgroup of aHUS (**Fig. 3a**). The clinical course in subjects with *DGKE* mutations featured relapsing episodes of aHUS before age 5 years (**Fig. 3b**).

Abnormal complement activation is a feature of all previously described forms of aHUS³. Because *DGKE* encodes an intracellular enzyme, it is not obvious that complement activation has a role in subjects with *DGKE* mutations. Detailed assessment of the complement system showed no compelling abnormality in any subject (**Supplementary Table 1**). Moreover, two subjects with *DGKE* mutations had aHUS relapses while on anticomplement therapy (eculizumab and fresh frozen plasma infusions, respectively), which are thought to be efficacious in individuals with complement defects⁵ (**Supplementary Fig. 5** and **Supplementary Table 2**).

Among subjects with *DGKE* mutations whose renal function recovered after the onset of aHUS, hypertension, microhematuria and proteinuria persisted in all but one (subject 5-3). In contrast, most individuals with other aHUS subtypes have no residual renal abnormalities between episodes. Progression to chronic kidney disease (CKD) stages 4 and 5 was common by the second decade of life, long after the last acute episode of aHUS (**Fig. 3c**). Notably, three subjects with *DGKE* mutations developed nephrotic syndrome 3–5 years after disease onset, a very rare event in other forms of aHUS. Repeat renal biopsies in these subjects were read as chronic thrombotic microangiopathy (**Supplementary Table 2**). This is probably not a genotypic effect, as two affected siblings have not thus far developed nephrotic syndrome. Treating physicians did not report extrarenal phenotypes.

Three subjects received cadaveric renal transplantation at 2, 19 and 21 years of age using standard pre- and post-transplantation protocols (**Supplementary Table 2**). Two allografts have survived 2 years and 4 years so far, whereas the other failed after 6 years due to chronic rejection.

Figure 3 Clinical course of aHUS due to *DGKE* mutation. (a) The age at onset of the first HUS episode is shown for all pediatric subjects from the French aHUS cohort for whom mutations have been identified. Individuals with *DGKE* mutation are notable for their uniformly early diagnoses. (b) The ages of acute episodes of aHUS (red ovals). Gray shading denotes ages at which nephrotic syndrome was present. Subjects who developed CKD stage 4 or 5 or were transplanted are labeled as CKD4, CKD5 and/or Tx, respectively. Subject 5-3 has had no detectable proteinuria after age 9. (c) Kaplan-Meier curve for renal survival, defined as CKD stage 3 or less, from subjects with specific mutations causing aHUS from the French cohort. The table below the graph shows the number of subjects who remained at risk for CKD stage 4 or 5 at each 5-year interval. The black vertical line located under each curve represents subjects that were censored due to age. Curves for the most commonly mutated genes (*CFH*, *MCP*, *C3* and *CFB*) are compared to *DGKE*. The *P* values for the comparisons were as follows: *DGKE* compared to *CFH*, $P < 0.001$; *DGKE* compared to *MCP*, $P = 0.047$; *DGKE* compared to *C3* and *CFB*, $P > 0.05$.

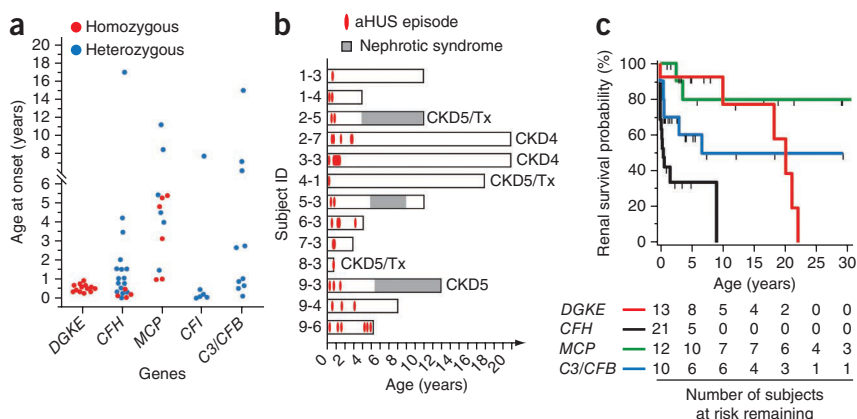
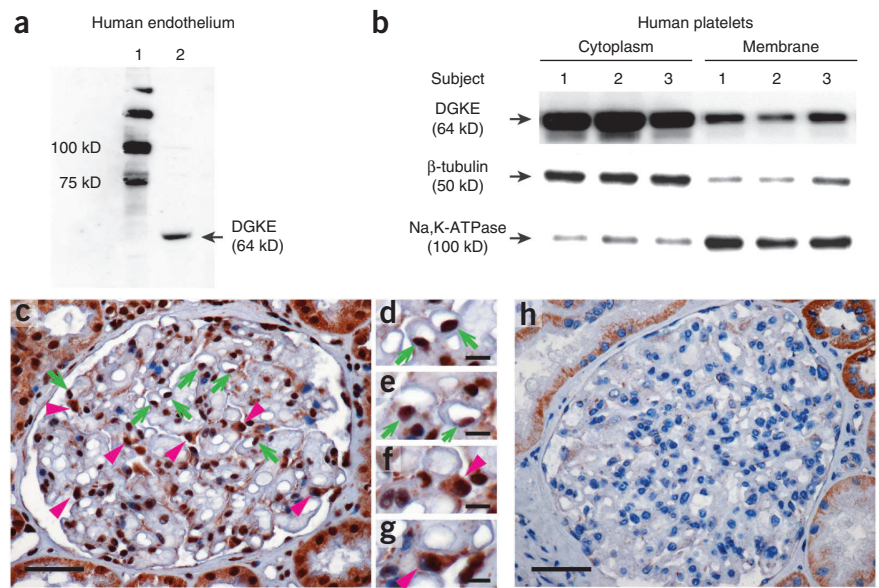


Figure 4 DGKE protein is expressed in endothelium, platelets and podocytes.

(a) Protein blot of total protein extracted from human umbilical vein endothelial cells probed with DGKE antibody identifying a protein the expected size of DGKE (lane 2). Lane 1 contains molecular weight markers. (b) DGKE protein is present in both the cytoplasmic and membrane fractions of unstimulated platelets extracted from healthy human control subjects. Protein was extracted from cytoplasmic and membrane fractions of platelets, and 50 μ g of protein per lane was analyzed by protein blotting; the antibodies used were to DGKE, β -tubulin and Na,K-ATPase. Similar results were found in an analysis of platelets from wild-type C57BL/6 adult mice, and relative amounts of DGKE did not change with age (**Supplementary Fig. 6**). (c) DGKE is expressed in glomerular podocytes and endothelial cells in normal human kidney. Kidney sections were stained with DGKE antibodies exposed to immunoperoxidase-DAB (5 min; Online Methods). Examples of DGKE-positive endothelial cells and podocytes are indicated by green arrows and pink arrowheads, respectively (DAB hematoxylin). (d,e) Higher magnifications of endothelial cells from c. (f,g) Higher magnifications of podocytes from c. (h) Staining of a kidney biopsy from subject 2-7 with anti-DGKE in parallel with the section in c showing no evidence of glomerular DGKE expression. Controls for anti-DGKE staining, co-staining with anti-WT1 and staining with another DGKE antibody are shown in **Supplementary Figures 7 and 8**. Scale bars, 50 μ m (c,h); 10 μ m (d-g). DAB, 3,3'-diaminobenzidine.



Importantly, there have been no aHUS recurrences after transplant. This contrasts with aHUS caused by defects in the soluble complement cascade in which recurrent aHUS is very common and graft failure almost invariably occurs without anticomplement therapy².

DGKE was first cloned from a human endothelial cell line⁶; studies have noted high expression in testes and little expression elsewhere⁶. We examined DGKE expression by protein blotting in human endothelial cells and platelets, the major cell types involved in thrombosis. We found DGKE expression in both (**Fig. 4a,b** and **Supplementary Fig. 6**). Moreover, staining of normal human kidney identified DGKE in the endothelium of glomerular capillaries and podocytes (**Fig. 4c-g** and **Supplementary Fig. 7**). We found similar results in rat, in which Dgke colocalized with Wt1, a podocyte marker (**Supplementary Fig. 8**). We established the specificity of this staining in a parallel study of a renal biopsy of subject 2-7, who is compound heterozygous for a frameshift mutation and a missense mutation in a β -pleated sheet in the first DGKE C1 domain. We found virtually no DGKE expression in glomeruli of this subject (**Fig. 4h** and **Supplementary Fig. 7a**), whereas other antisera, such as anti-CD34, showed normal staining (**Supplementary Fig. 7c**).

These findings establish recessive loss-of-function mutations in DGKE as a frequent cause of aHUS in the first year of life. Consanguinity, recurrence among siblings, persistence of hypertension, microhematuria and proteinuria (especially in the nephrotic range), along with the absence of complement abnormalities, suggest the diagnosis of DGKE nephropathy. The molecular diagnosis of DGKE mutation should be straightforward.

DGKE is the first gene implicated in aHUS that is not an integral component of the complement cascade, raising the question of the pathophysiologic mechanism. DGKE preferentially phosphorylates arachidonic acid-containing diacylglycerol (AADAG) to the corresponding phosphatidic acid⁷. AADAG is a major signaling molecule of the diacylglycerol family and is produced by hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) by phospholipase C (PLC)

in response to cell surface-receptor signaling⁸ (**Supplementary Fig. 9**). AADAGs activate PKC⁹. In endothelial cells, PKC increases the production of various prothrombotic (von Willebrand factor¹⁰, plasminogen activator inhibitor-1 (ref. 11), platelet-activating factor¹² and tissue factor¹³) and antithrombotic factors, such as tissue-type plasminogen activator¹⁴ (**Supplementary Fig. 10a**). What determines the balance between these prothrombotic and antithrombotic factors is poorly understood. AADAG-dependent PKC signaling also drives thrombin-induced platelet activation¹⁵ (**Supplementary Fig. 10b**). Phosphorylation of AADAG to phosphatidic acid by DGKE terminates AADAG signaling. It is therefore plausible that loss of DGKE results in sustained AADAG signaling¹⁶, causing a prothrombotic state. This mechanism is supported by experiments with R59022, a small-molecule inhibitor of several diacylglycerol kinases¹⁷, including DGKE. This produces platelet activation¹⁸ and inhibition of endothelial prostacyclin production¹⁹.

A similar mechanism may pertain to podocytes, where DAGs modify slit diaphragm function²⁰, including inducing endocytosis of nephrin²¹, an effect that could contribute to proteinuria and kidney failure. Additionally, VEGF signaling is essential for podocyte and renal endothelial cell survival, and loss of signaling in the renal endothelium produces thrombotic microangiopathy^{22,23}. PKC-dependent downregulation of VEGFR2 has been reported in podocytes²⁴ and endothelial cells²⁵. This interaction suggests a potential mechanism for the pronounced renal effects of this form of microangiopathy (**Supplementary Fig. 10a**). Further work will be required to determine the detailed biochemical mechanism(s) linking DGKE deficiency to aHUS.

The specific triggers that account for the episodic nature of acute attacks of aHUS are poorly understood. Dgke-null mice were not reported to have a thrombotic phenotype, perhaps because such an inciting factor was missing²⁶ or because of intrinsic species differences.

The universal findings of hypertension, microhematuria and proteinuria, and the unique finding of nephrotic syndrome among

subjects with aHUS who have *DGKE* mutations, suggests that mutations in *DGKE* might have a role in other kidney diseases with similar glomerular phenotypes, such as systemic lupus erythematosus-associated glomerulonephritis²⁷, severe pre-eclampsia and HELLP syndrome²⁸, or membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN)²⁹. It is currently unclear whether the hypertension, microhematuria and proteinuria in subjects with *DGKE* mutations requires prior acute episodes of aHUS or whether renal disease can develop without previous aHUS.

In this regard, it is of great interest that an independent study recently reported three families with an early onset MPGN-like syndrome featuring proteinuria, renal failure and recessive *DGKE* mutations³⁰. None of the affected individuals in that study was noted to have acute episodes suggesting aHUS; however, histologic features of glomerular microangiopathy were noted. The authors of that study also presented experimental evidence that loss of *DGKE* in podocytes might contribute to proteinuria and renal damage through aberrant activation of TRPC6.

These findings have immediate implications for the treatment of aHUS. Current guidelines recommend that individuals with aHUS be treated with eculizumab, a C5 antibody that inhibits the complement cascade, or plasma therapy⁵. The absence of evidence linking *DGKE* deficiency to the complement cascade and relapses of acute aHUS in subjects while receiving these therapies suggests that these treatments may not benefit individuals with *DGKE* mutations. Moreover, unlike individuals with soluble complement defects, it seems that renal transplantation can be efficacious and safe in individuals with aHUS caused by *DGKE* mutations, underscoring the importance of diagnosing *DGKE* nephropathy.

URLs. BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; ClustalW2, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>; NCBI protein, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>; NHLBI Grand Opportunity Exome Sequencing Project (ESP), <https://esp.gs.washington.edu/drupal/>; UCSC Genome browser, <http://genome.ucsc.edu/>; dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.

METHODS

Methods and any associated references are available in the [online version of the paper](#).

Accession codes. The *DGKE* variants described in this study are deposited in dbSNP under batch accession number 1058996. mRNA and protein sequences are available at NCBI under the following accession numbers: human *DGKE*, [NP_003638.1](#); cow *DGKE*, [NP_001179859.1](#); mouse *Dgke*, [NP_062378.1](#); *Xenopus laevis* *dgke*, [NP_001087580.1](#); zebrafish *dgke*, [NP_001165699.1](#); *Drosophila melanogaster* *dgke*, [NP_725228.1](#); and *Caenorhabditis elegans* *dgk-2*, [NP_001024679.1](#). The reference protein sequences for pig ([NP_001161117](#); 428 amino acids) and rat ([NP_001034430](#); 407 amino acids) were ~70% shorter than expected. The full-length pig *DGKE* protein sequence (564 amino acids) was derived by translating the cDNA [AK400222](#), and the full-length rat *DGKE* protein (567 amino acids) was reassembled from the mRNA [NM_001039341](#) by removing a short retained intron.

Note: Supplementary information is available in the online version of the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the subjects with aHUS, their families and the health care professionals whose participation made this study possible; J. Zhang, C. Nelson-Williams, S. Mentone, D. Beury and other members of the complement laboratory at Hôpital

Européen Georges-Pompidou for technical support; the staff of the Yale Center for Genome Analysis for exome sequencing; S. Ishibe, S. Shibata, U. Scholl, M.-A. Dragon-Durey, L. Roumenina, M. Malina, Q. Vincent and L. Abel for helpful discussions; and D. Damotte (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Hôtel-Dieu, Service d'Anatomie Pathologique) for the anti-CD34 staining. This work was supported by US National Institutes of Health (NIH) grants U54 HG006504 01 (Yale Center for Mendelian Genomics), P30 DK079310 05 (Yale O'Brien Center for Kidney Research) and UL1TR00142 07 (Yale Center for Translational Science Award), grants from the Délégation Régionale à la Recherche Clinique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris to V.F.-B., such as Programme Hospitalier de Recherche Clinique (AOM08198) and the Association pour l'Information et la Recherche dans les maladies Rénales génétiques (AIRG France), and a European Community FP7 Grant 2012-305608 (EURenOmics) to F.S. and V.F.-B. M.L. is the recipient of a Kidney Research Scientist Core Education and National Training (KRESCENT) Program Post-Doctoral Fellowship Award from the Kidney Foundation of Canada and is a member of the Investigative Medicine PhD program at Yale University School of Medicine.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.L., V.F.-B. and R.P.L. designed experiments and analyzed data. M.C. and R.P.L. developed the exome analysis protocol. S.M.M., J.D.O., J.A. and H.T. directed the exome capture, DNA sequencing infrastructure and information technology. M.C., M.L., R.P.L., G.N. and P.N. performed bioinformatic and statistical analyses. M.L., W.J. and R.P.L. analyzed the age of shared mutation. M.L., W.J. and V.F.-B. performed Sanger sequencing. W.H.T., J.H. and F.F. performed protein blotting experiments. M.L. performed the immunofluorescence studies. M.L.Q. and F.F. performed the immunohistochemistry studies on human kidneys. F.S., S.T., F.N., F.M., D.M., G.D., V.B., B.L., L.C., M.A.M., E.S. and C.L. ascertained and evaluated patients with aHUS. C.L., V.F.-B. and F.S. recruited patients with aHUS. N.R.-L., G.W.M. and M.C.G. provided renal pathology expertise. M.L., V.F.-B. and R.P.L. wrote the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare competing financial interests: details are available in the [online version of the paper](#).

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- Neild, G.H. Haemolytic-uraemic syndrome in practice. *Lancet* **343**, 398–401 (1994).
- Loirat, C. & Frémeaux-Bacchi, V. Atypical hemolytic uremic syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* **6**, 60 (2011).
- Noris, M., Mescia, F. & Remuzzi, G. STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation. *Nat. Rev. Nephrol.* **8**, 622–633 (2012).
- Noris, M. & Remuzzi, G. Atypical hemolytic-uremic syndrome. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1676–1687 (2009).
- Zuber, J., Fakhouri, F., Roumenina, L.T., Loirat, C. & Frémeaux-Bacchi, V. Use of eculizumab for atypical haemolytic uraemic syndrome and C3 glomerulopathies. *Nat. Rev. Nephrol.* **8**, 643–657 (2012).
- Tang, W., Bunting, M., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M. & Prescott, S.M. Molecular cloning of a novel human diacylglycerol kinase highly selective for arachidonate-containing substrates. *J. Biol. Chem.* **271**, 10237–10241 (1996).
- Shulga, Y.V., Topham, M.K. & Eppard, R.M. Regulation and functions of diacylglycerol kinases. *Chem. Rev.* **111**, 6186–6208 (2011).
- Rhee, S.G. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 281–312 (2001).
- Pettitt, T.R. *et al.* Diacylglycerol and phosphatidate generated by phospholipases C and D, respectively, have distinct fatty acid compositions and functions. Phospholipase D-derived diacylglycerol does not activate protein kinase C in porcine aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 17354–17359 (1997).
- Carew, M.A., Paleolog, E.M. & Pearson, J.D. The roles of protein kinase C and intracellular Ca²⁺ in the secretion of von Willebrand factor from human vascular endothelial cells. *Biochem. J.* **286**, 631–635 (1992).
- Ren, S., Shatadal, S. & Shen, G.X. Protein kinase C-β mediates lipoprotein-induced generation of PAI-1 from vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **278**, E656–E662 (2000).
- Whately, R.E. *et al.* The regulation of platelet-activating factor production in endothelial cells. The role of calcium and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **264**, 6325–6333 (1989).
- Herbert, J.M., Savi, P., Laplace, M.C., Dumas, A. & Dol, F. Chelerythrine, a selective protein kinase C inhibitor, counteracts pyrogen-induced expression of tissue factor without effect on thrombomodulin down-regulation in endothelial cells. *Thromb. Res.* **71**, 487–493 (1993).
- Levin, E.G., Marotti, K.R. & Santell, L. Protein kinase C and the stimulation of tissue plasminogen activator release from human endothelial cells. Dependence on the elevation of messenger RNA. *J. Biol. Chem.* **264**, 16030–16036 (1989).

15. Offermans, S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ. Res.* **15**, 1293–1304 (2006).
16. Pettitt, T.R. & Wakelam, M.J. Diacylglycerol kinase ϵ , but not ζ , selectively removes polyunsaturated diacylglycerol, inducing altered protein kinase C distribution *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **274**, 36181–36186 (1999).
17. Yada, Y., Ozeki, T., Kanoh, H. & Nozawa, Y. Purification and characterization of cytosolic diacylglycerol kinases of human platelets. *J. Biol. Chem.* **265**, 19237–19243 (1990).
18. Nunn, D.L. & Watson, S.P. A diacylglycerol kinase inhibitor, R59022, potentiates secretion by and aggregation of thrombin-stimulated human platelets. *Biochem. J.* **243**, 809–813 (1987).
19. de Nucci, G., Gryglewski, R.J., Warner, T.D. & Vane, J.R. Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2334–2338 (1988).
20. Hofmann, T. *et al.* Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* **397**, 259–263 (1999).
21. Quack, I. *et al.* PKC mediates beta-arrestin2-dependent nephrin endocytosis in hyperglycemia. *J. Biol. Chem.* **286**, 12959–12970 (2011).
22. Eremina, V. *et al.* VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1129–1136 (2008).
23. Sison, K. *et al.* Glomerular structure and function require paracrine, not autocrine, VEGF-VEGFR-2 signaling. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1691–1701 (2010).
24. Hoshi, S., Nomoto, K., Kuromitsu, J., Tomari, S. & Nagata, M. High glucose induced VEGF expression via PKC and ERK in glomerular podocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 177–184 (2002).
25. Rask-Madsen, C. & King, G.L. Differential regulation of VEGF signaling by PKC- α and PKC- ϵ in endothelial cells. *Arterioscl. Throm. Vasc. Biol.* **28**, 919–924 (2008).
26. Rodriguez de Turco, E.B. *et al.* Diacylglycerol kinase ϵ regulates seizure susceptibility and long-term potentiation through arachidonoyl-inositol lipid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4740–4745 (2001).
27. Lansigan, F., Isuffi, I. & Tagoe, C.E. Microangiopathic haemolytic anaemia resembling thrombotic thrombocytopenic purpura in systemic lupus erythematosus: the role of ADAMTS13. *Rheumatology* **50**, 824–829 (2011).
28. Ganesan, C. & Maynard, S.E. Acute kidney injury in pregnancy: the thrombotic microangiopathies. *J. Nephrol.* **24**, 554–563 (2011).
29. Skerka, C. *et al.* Autoimmune forms of thrombotic microangiopathy and membranoproliferative glomerulonephritis: indications for a disease spectrum and common pathogenic principles. *Mol. Immunol.* **46**, 2801–2807 (2009).
30. Ozaltin, F. *et al.* DGKE variants cause a glomerular microangiopathy that mimics membranoproliferative GN. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**, 377–384 (2013).
31. Nørholm, M.H.H., Shulga, Y.V., Aoki, S., Epand, R.M. & von Heijne, G. Flanking residues help determine whether a hydrophobic segment adopts a monotopic or bitopic topology in the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* **286**, 25284–25290 (2011).
32. Soldin, S.J., Brugnara, C. & Wong, E.C. (eds). *Pediatric Reference Intervals* (AACC Press, Washington, DC, 2005).
33. Sellier-Leclerc, A.-L. *et al.* Differential impact of complement mutations on clinical characteristics in atypical hemolytic uremic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 2392–2400 (2007).

ONLINE METHODS

aHUS kindreds. The French aHUS cohort³⁴ includes 139 affected individuals from 131 unrelated kindreds with pediatric-onset aHUS and 36 unrelated subjects with adult-onset aHUS. These subjects were recruited from 24 participating pediatric nephrology centers from France and one from Belgium; 36 adult nephrology centers also enrolled subjects. This cohort includes 55 affected individuals from 49 kindreds without mutation in any of the known aHUS genes or CFH antibodies. One additional kindred that included three affected subjects without mutations in known aHUS genes was ascertained in Dubai and Germany. Institutional Review Board protocols were approved at all sites involved in the study, and all subjects provided informed consent.

For all subjects, relevant data were abstracted from detailed medical records. Cases with aHUS were defined using the classic diagnostic triad: microangiopathic hemolytic anemia (hemoglobin <10 g/dl with lactate dehydrogenase >250 IU/l, haptoglobin <0.4 g/l or presence of schizocytes on blood smear), thrombocytopenia (platelet count lower than the lower limit of normal for age) and renal failure (serum creatinine concentration higher than the upper limit of normal for age). If one of the elements of the diagnostic triad was missing, clear evidence of TMA lesions observed on a kidney biopsy was necessary to substantiate an aHUS diagnosis. Remission was defined by normalization of platelet and lactate dehydrogenase levels, and relapse was defined by recurrence of microangiopathic hemolytic anemia, thrombocytopenia and/or a 25% increase in serum creatinine concentration after at least 2 weeks remission. We specifically excluded individuals with HUS caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and individuals with secondary causes of HUS, such as drug exposure, autoimmune diseases, infections (*Streptococcus pneumoniae* or HIV), bone marrow or solid organ transplantation, or cobalamin deficiency.

Assessment of aHUS susceptibility factors. Assessment of complement system function was done at the complement laboratory at Hôpital Européen Georges-Pompidou (Paris, France), which is the national reference center for the evaluation of complement disorders. Blood samples from subjects with aHUS were collected for investigations of complement function and genetic analyses. Similar studies were performed in parallel on samples from 200 unrelated healthy French subjects to generate reference levels and validate any rare variants identified. Extensive investigations of the complement system were performed as described³⁵. Briefly, complement factor H (CFH) and factor I (CFI) antigen were measured by a sensitive ELISA methods using plates coated with mouse monoclonal anti-human CFH (The Binding Site, PC030) and goat polyclonal anti-human CFI (Abcam, ab8843), respectively. The concentrations of factors 3 (C3), 4 (C4) and B (CFB) were measured by nephelometry (Siemens BN ProSpec) using standard procedures and commercially available diagnostic kits (Siemens, OSAP15 (C3), OSAO15 (C4) and OTNS05 (CFB)). MCP surface expression was assessed by flow cytometry of granulocytes exposed to saturating concentrations of phycoerythrin-conjugated mouse anti-human MCP (Serotec, MCA2113PE) or phycoerythrin-conjugated isotypic mouse immunoglobulin G1 (Serotec, MCA928PE). CH50% was assessed with a standard clinical assay. Soluble C5b-9 (sC5b-9) levels were measured with a commercially available ELISA kit using the manufacturer's protocol (Quidel, A020). The presence or absence of sheep erythrocyte lysis was assessed by adding patient serum to sheep erythrocytes in a solution containing EGTA-Mg buffer (to prevent activation of the classical complement pathway). All subjects were screened for the presence of CFH antibodies using an ELISA plate coated with 0.3 g of purified human CFH (Calbiochem, 341274). ADAMTS13 deficiency was assessed using standard clinical protocol. All coding sequences of the *CFH*, *CFI*, *MCP*, *C3*, *CFB* and *THBD* genes were sequenced as described³⁵. Screening for unequal crossing over between homologous genes at the *CFH*, *CFHR1* and *CFHR3* loci was done with multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) from MRC Holland.

DNA sequencing and analysis. Genomic DNA from two index cases with aHUS and two affected siblings was prepared and subjected to exome capture using NimbleGen 2.1M human exome capture arrays (Life Technologies) followed by next-generation sequencing on the Illumina sequencing platform as previously described³⁶. Illumina's processing software ELAND (CASAVA 1.8.2) was used to map reads to the human reference genome (build 19), and SAMtools³⁷ was used to call single-nucleotide variants and insertions/deletions

(indels) at targeted bases. Variants with minor allele frequencies <1% in the Yale (1,972 European subjects), NHLBI Grand Opportunity (4,300 European and 2,202 African-American subjects; last accessed November 2012), dbSNP (version 135) or 1000 Genomes (1,094 subjects of various ethnicities; May 2011 data release) databases were selected and annotated for impact on the encoded protein and for conservation of the reference base and amino acid among orthologs across phylogeny. Variants of interest were verified by direct Sanger sequencing. Nomenclature of the *DGKE* variants is based on NCBI reference sequence NM_003647.

Genomic DNA of two affected members of kindred 9 underwent targeted enrichment of all exons from the interval 49.4–60.3 Mb on chromosome 17 on the basis of evidence of linkage in this family (see below) followed by next-generation sequencing. The targeted capture reagent was prepared by Roche NimbleGen. The analysis prioritized homozygous protein-altering variants in the linked interval that were not present in the Ensembl SNP database, release 54.

To search for *DGKE* mutations in additional subjects with aHUS, the complete coding region of *DGKE* was amplified by PCR using specific oligonucleotide primer pairs for each of the 11 exons and subjected to direct Sanger sequencing. Samples from 48 index cases with aHUS but without mutation in the known aHUS genes and 38 index cases with heterozygous variants in known aHUS genes were sequenced.

DGKE variants were identified in exome data from subjects not known to have aHUS from the Yale and NHLBI exome databases; potential compound heterozygous variants could only be identified in the Yale database because variants in NHLBI are not linked to genotypes.

Origin of the *DGKE* variant encoding p.Trp322*. SNPs flanking *DGKE* were selected using Haploview 4.2 (ref. 38). All had MAF > 10% and no violation of Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$) among European subjects (HapMap CEU). SNPs were genotyped in three apparently unrelated subjects homozygous for the variant encoding p.Trp322* by PCR and direct Sanger sequencing. The boundaries of the homozygous segments were determined for each family by genotyping additional proximal and distal tag SNPs until heterozygous positions were recorded. This defined a shared homozygous haplotype comprising 16 SNPs no more than 400 kb in length.

The population frequency of the shared haplotype was estimated from the frequency of the haplotype in each block of linkage disequilibrium (LD); a frequency of 0.1% was assigned to haplotypes not previously detected in the HapMap CEU data set.

Given the rarity of the haplotype bearing the *DGKE* variant encoding p.Trp322* in subjects from the CEU population, we examined the ancestry of the siblings from kindred 1 who were homozygous for this mutation by principal component analysis (PCA). All tag SNP genotypes were extracted from exome sequence data using a Perl script that produces PLINK-compatible output files. These SNPs were combined with HapMap data (Phase II release, 2010-08-18). Tag SNPs extracted using PLINK's LD-based SNP pruning algorithm³⁹ were used as inputs to perform PCA with EIGENSTRAT software (version 3.0)⁴⁰.

DMLE+2.3 software⁴¹ was used to estimate the age of the most common ancestor carrying the *DGKE* variant encoding p.Trp322*. DMLE+2.3 uses a Bayesian approach to infer the mutation age of a given variant on the basis of observed LD data from polymorphic markers located within the shared segment. Data for six polymorphic loci spanning the shared segment were entered as genotypes. To minimize bias from consanguinity, we treated the data from these three kindreds as three independent chromosomes; however, results were similar when data from six chromosomes were used. Results were also similar whether analyses were performed under a recessive or dominant genetic model. The three unrelated families harboring the *DGKE* variant encoding p.Trp322* are all of western European ancestry. We estimated western Europe's population growth rate (PGR) using census data from France with the equation $PGR = \ln(T_1/T_0)/g$, where T_1 and T_0 are the French populations in the years 2009 (62.5 million) and 1806 (21 million), respectively, and g is the number of generations during this period ($g = 8.1$, assuming ~25 years per generation). With these parameters, the PGR is estimated at 0.09. When using T_0 from the 1954 census data (42.8 million; $g = 2.2$), the PGR is 0.17. To calculate the proportion of sampled chromosomes (PSC), we used the following

values: the number of chromosomes for patients with *DGKE* nephropathy harboring the variant encoding p.Trp322* ($n = 8$), the estimated MAF in CEU subjects ($MAF \leq 0.01\%$ on the basis of empiric data from control exomes) and western Europe's population ($P = 200$ million), where $PSC = n/(MAF \times P \times 2)$ chromosomes. A sensitivity analysis was performed with various combinations of PSC and PGR values centered around the estimates described above. The software ESTIAGE was used to ascertain whether the results obtained with DMLE+2.3 were plausible⁴². ESTIAGE uses a likelihood-based method to estimate mutation age from information related to polymorphic markers located within or at the boundaries of the shared homozygous segment. Twenty-four SNPs spanning the *DGKE* locus were used for input. The mutation rate was set to 2×10^{-8} . Examples of input files for both software are available upon request.

Analysis of linkage and association. Genome-wide analysis of the linkage analysis in kindred 9 was performed by comparing the inheritance of SNP genotypes (Affymetrix GeneChip Human Mapping 250K SNP NspI Array) to the inheritance of aHUS in all pedigree members, specifying aHUS as a rare recessive trait with high penetrance and rare phenocopies. Multipoint LOD scores were calculated using ALLEGRO⁴³. Haplotypes were reconstructed with ALLEGRO and presented graphically with HaploPainter⁴⁴.

The significance of rare *DGKE* variants in all aHUS kindreds was assessed by comparing their segregation to the inheritance of aHUS in the kindreds. Parametric LOD scores were calculated, specifying aHUS in kindreds with *DGKE* mutations as an autosomal recessive trait with complete penetrance and zero phenocopies. Fisher's exact test was used to compare the prevalence of recessive *DGKE* variants among nonconsanguineous index cases of pediatric-onset aHUS to the corresponding prevalence in 8,475 control exomes from NHLBI and Yale.

DGKE protein expression in platelets and endothelial cells. Venous blood was drawn from three healthy adult human volunteers and three wild-type C57BL/6 adult mice at 8 and 18 weeks of age. Platelets were prepared from blood by differential centrifugation as described⁴⁵. The cytoplasmic and membrane fractions of total protein extracts were harvested by subcellular protein fractionation (Thermo Scientific). Alternatively, whole platelet lysates were prepared by lysis with NP-40 in the presence of protease and phosphatase inhibitors. Whole-cell protein extracts from human embryonic venous endothelial cells were prepared in an analogous fashion.

For protein blotting, 50 μ g of cytoplasmic and membrane platelet extracts, and total platelet and endothelial protein extracts were subjected to SDS-PAGE and analyzed by protein blotting. After blocking, the membranes were probed with the following primary antibodies: for mouse extracts, mouse monoclonal anti-DGKE (1:1,000, Sigma, WH008526M3); and for human extracts, rabbit polyclonal anti-DGKE (1:1,000, Abcam, ab69760) or mouse monoclonal anti-DGKE (1:1,000, R&D, MAB5125). Primary antibodies to β -tubulin (1:500, Santa Cruz, H-235) and Na,K-ATPase (1:500, Cell Signaling, 3010) were also used as loading controls and to assess the purity of the cytoplasmic and membrane fractions, respectively. Secondary antibodies were linked to horseradish peroxidase (1:5,000, Thermo Scientific) and incubated with the membrane for 1 h at room temperature.

Microscopy. We stained kidney sections from two adult subjects with perirenal tumors and from patient 2-7 with aHUS. A standard DAB protocol for renal tissue was used for immunohistochemistry with DGKE and CD34 antibodies. Briefly, paraffin was removed with xylene and alcohol, and heat-induced antigen retrieval was done with 10 mM citrate, pH 6.0. Endogenous peroxidase

activity was quenched with hydrogen peroxide. Slides were washed twice with Tris-buffered saline (TBS)-Tween between each of the following steps: after blocking with 5% human serum in TBS, the slides were incubated with primary antibodies for 1 h, biotin-labeled secondary antibody for 1 h and then streptavidin-horseradish peroxidase (Dako, P0397) for 30 min. DAB reagent (Dako) was then applied for 5 or 30 min, and slides were then washed in water. Hematoxylin counterstain was applied to slides before mounting. The primary antibodies included rabbit polyclonal anti-DGKE (1:50, Novus Biologicals, H00008526-M03) and mouse monoclonal anti-CD34 (1:50, Dako, M7165). The immunoperoxidase protocol used for **Supplementary Figure 7d,e** was similar except for the following modifications: the primary antibody was mouse monoclonal anti-DGKE (1:30, R&D, MAB5125) and was applied overnight at 4 °C; Tris-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 9.0, was used for antigen retrieval; and the PBS-based blocking solution contained 4% bovine serum albumin, 10% normal goat serum and 0.1% Triton X-100.

Kidney specimens were obtained from adult wild-type rats after infusion of PBS and 4% paraformaldehyde and equilibration overnight in 30% sucrose solution before freezing. Cryostat sections were prepared from frozen tissue (thickness, 10 μ m) and fixed using the Nakane protocol (Periodate-Lysine-Paraformaldehyde fixation)⁴⁶. Slides were washed three times with TBS between each of the following steps: after permeabilization with 0.1% Triton X-100, slides were blocked with 10% goat serum, 1% bovine serum albumin and 0.1% Triton X-100 diluted in TBS at room temperature for 1 h. The slides were incubated with primary antibodies at 4 °C overnight and then with secondary antibodies for 1 h at room temperature. Slides were mounted with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) nuclear counterstain (Vector Laboratories). Primary antibodies used were directed against DGKE (monoclonal mouse, 1:30, R&D, MAB5125) or WT1 (polyclonal rabbit, 1:200, Santa Cruz, sc-192). Fluorescent-labeled secondary antibodies (Invitrogen) were used at 1:200.

34. Frémeaux-Bacchi, V. *et al.* Genetics and outcome of atypical hemolytic uremic syndrome: a nationwide French series comparing children and adults. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* published online, <http://dx.doi.org/10.2215/CJN.04760512> (2013).
35. Roumenina, L.T. *et al.* Alternative complement pathway assessment in patients with atypical HUS. *J. Immunol. Methods* **365**, 8–26 (2011).
36. Boyden, L.M. *et al.* Mutations in kelch-like 3 and cullin 3 cause hypertension and electrolyte abnormalities. *Nature* **482**, 98–102 (2012).
37. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079 (2009).
38. Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J. & Daly, M.J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**, 263–265 (2005).
39. Purcell, S. *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 559–575 (2007).
40. Price, A.L. *et al.* Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat. Genet.* **38**, 904–909 (2006).
41. Reeve, J.P. & Rannala, B. DMLE+: Bayesian linkage disequilibrium gene mapping. *Bioinformatics* **18**, 894–895 (2002).
42. Genin, E., Tullio-Pelet, A., Begeot, F., Lyonnet, S. & Abel, L. Estimating the age of rare disease mutations: the example of Triple-A syndrome. *J. Med. Genet.* **41**, 445–449 (2004).
43. Gudbjartsson, D.F., Jonasson, K., Frigge, M.L. & Kong, A. Allegro, a new computer program for multipoint linkage analysis. *Nat. Genet.* **25**, 12–13 (2000).
44. Thiele, H. & Nürnberg, P. HaploPainter: a tool for drawing pedigrees with complex haplotypes. *Bioinformatics* **21**, 1730–1732 (2005).
45. Tang, W.H. *et al.* Glucose and collagen regulate human platelet activity through aldose reductase induction of thromboxane. *J. Clin. Invest.* **121**, 4462–4476 (2011).
46. McLean, I.W. & Nakane, P.K. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **22**, 1077–1083 (1974).

Abstract retenu en communication à L'American Society of Nephrology en Novembre 2013

Uncontrolled pathways activation after renal transplantation and C5b9 deposits on graft predict graft outcome in adult renal transplant with C3 Glomerulopathy.

Moglie Le Quintrec MD, Marion Rabant MD, Maria Chiara PhD student, M Buchler MD, PhD, Christine Mousson MD, PhD, Frank Bridoux MD, PhD, Yves Pirson MD, PhD, Michel Delahousse MD, C Legendre MD and Véronique Frémeaux-Bacchi MD, PhD.

C3 glomerulopathy (C3G) is a severe disease strongly associated with abnormal control of complement alternative pathway activation. In renal posttransplantation, few data are available on recurrence risk and graft outcome in C3G patients. The aim of this study was to identify risk factors for recurrence and transplant outcome in particular the role of alternative pathways consumption, positive C3 Nef and positive C3 and C5b9 staining after renal transplantation.

We retrospectively studied 47 patients with a history of DDD (n=15), GNC3 (17) and MPGN type I (n=15) who received renal transplantation. Plasma level of C3 and sMAC were performed by Elisa. C3 and C5b9 staining were done by immunochemistry on paraffin kidney slides. All clinical data were collected and updated.

Graft survival was 98% (43/47) and 77% (36/47) at one and five years respectively. Two patients (6%), aged 52 and 74 years died following stroke, severe infection. Forty eight percent of patient (23/47) had a clinical graft recurrence biopsy proven; 60% (14/23) of them occurred in the first year after transplantation. The recurrence occurred in 33% (5/15), 47% (8/17) and 60% (9/15) of patients with DDD, GNC3 and MPGN type I respectively. At five years, 54% of graft lost was due to recurrence (n=6/11) and 72% of the graft lost was due to recurrence. Before transplantation, a low C3 levels and positive C3 Nef were documented in 63 % (n=18 of 29 available data) and 60% of patients (n=14 of 23 available data) respectively. After renal transplantation, a low C3 levels, positive C3 Nef and high sMAC were present in 20% (7/34), 33% (11/33) and 37% (6/14) of patient respectively. Only 34% (7/17) of patients with low plasmatic C3 before transplantation had a recurrence but 60% (11/18) of patients at time of recurrence had a low C3 or/and high sMAC. On the opposite only 8% (2/24) of patient with no recurrence had low C3 or/and high sMAC. All patients who lost graft before 5 years due to recurrence had C3 low and/or sMAC high. Positive C3 (34/34) staining was present in all biopsies from patients who had recurrence but C5b9 staining (6/34) was positive in biopsies from patients who lost graft due to recurrence earlier. In conclusion, uncontrolled pathways activation and C5b9 deposits were associated with severe recurrence and poor graft outcome.

