



**Nouveaux marqueurs diagnostiques et pronostiques dans
la glomérulonéphrite extra-membraneuse : suivi des
anticorps anti-PLA2R1 chez le greffé rénal :
caractérisation des épitopes reconnus par les anticorps
anti-PLA2R1 : identification d'une nouvelle cible
antigénique**

Barbara Seitz Seitz-Polski

► **To cite this version:**

Barbara Seitz Seitz-Polski. Nouveaux marqueurs diagnostiques et pronostiques dans la glomérulonéphrite extra-membraneuse : suivi des anticorps anti-PLA2R1 chez le greffé rénal : caractérisation des épitopes reconnus par les anticorps anti-PLA2R1 : identification d'une nouvelle cible antigénique. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2014. Français. NNT : 2014NICE4142 . tel-01423858

HAL Id: tel-01423858

<https://theses.hal.science/tel-01423858>

Submitted on 1 Jan 2017

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

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

UNIVERSITE DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

UFR Faculté des Sciences

THESE

Présentée pour obtenir le titre de

Docteur en Sciences de la Vie

De l'Université de Nice Sophia-Antipolis

Spécialité : Recherche Clinique et Thérapeutique

Par

Barbara SEITZ-POLSKI

Nouveaux marqueurs diagnostiques et pronostiques dans la
Glomérulonéphrite Extra-Membraneuse

Suivi des anticorps anti-PLA2R1 chez le greffé rénal

Caractérisation des épitopes reconnus par les anticorps anti-PLA2R1

Identification d'une nouvelle cible antigénique

Thèse dirigée par Gérard LAMBEAU

Soutenue le 15 décembre 2014

Devant le Jury composé de :

M. Vincent ESNAULT

M. Thierry MARTIN

M. Joseph BOUCRAUT

M. Stéphane BURTEY

M. Gérard LAMBEAU

Professeur

Professeur

Docteur

Professeur

Docteur

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

UNIVERSITE DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

UFR Faculté des Sciences

THESE

Présentée pour obtenir le titre de

Docteur en Sciences de la Vie

De l'Université de Nice Sophia-Antipolis

Spécialité : Recherche Clinique et Thérapeutique

Par

Barbara SEITZ-POLSKI

Nouveaux marqueurs diagnostiques et pronostiques dans la
Glomérulonéphrite Extra-Membraneuse

Suivi des anticorps anti-PLA2R1 chez le greffé rénal

Caractérisation des épitopes reconnus par les anticorps anti-PLA2R1

Identification d'une nouvelle cible antigénique

Thèse dirigée par Gérard LAMBEAU

Soutenue le 15 décembre 2014

Devant le Jury composé de :

M. Vincent ESNAULT
M. Thierry MARTIN
M. Joseph BOUCRAUT
M. Stéphane BURTEY
M. Gérard LAMBEAU

Professeur
Professeur
Docteur
Professeur
Docteur

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

Je remercie les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail.

Le Professeur Vincent Esnault, qui préside ce jury et qui est à l'origine de ce travail. Au-delà de ma formation en néphrologie, il m'a toujours encouragé à aller plus loin avec beaucoup de bienveillance et d'optimisme. Je suis très honorée d'avoir débuté et de poursuivre ce projet de médecin et de chercheur à ses côtés ;

Le Professeur Thierry Martin, pour le précieux temps qu'il a consacré à l'évaluation de ce travail ;

Le Docteur Joseph Boucraut, pour sa disponibilité : j'espère que cette thèse sera l'occasion de débiter une collaboration riche avec son laboratoire ;

Le Professeur Stéphane Burtey, pour la pertinence de son analyse dans la collaboration que nous avons débutée. J'espère qu'elle s'enrichira dans les années à venir ;

Le Docteur Gérard Lambeau, pour la rigueur de son encadrement et ses encouragements. Pour avoir toujours respecté avec beaucoup de bienveillance nos différences de formation et avoir toujours considéré cette différence comme une richesse pour notre équipe. Je suis très heureuse de poursuivre ce projet dans son équipe.

Je remercie le Docteur Ghislaine Bernard qui m'a accueillie au cours de cette thèse dans son laboratoire et me forme à un nouvel art. Qui fait preuve quotidiennement de beaucoup de compréhension et m'encourage dans cette nouvelle voie si riche.

Je remercie très profondément le Docteur Sylvia Benzaken qui m'a mise sur cette nouvelle voie et m'aide à relever tant de défis. Merci pour tous ces encouragements, cette clairvoyance et merci de me montrer que « tout est possible pour qui travaille et n'abandonne jamais ».

Je remercie l'équipe du 510, Christine pour son professionnalisme et la joie de partager ces moments d'amitié, Dominique pour son écoute bienveillante, Guillaume pour sa fiabilité, Joël pour sa bonne humeur, Louise pour sa douceur, Roberto pour sa gentillesse, Nicola pour sa rigueur et son efficacité germanique et enfin Marine pour son amitié. Ainsi que les équipes du Dr Lesage et Honoré pour leurs encouragements : Florian, Guillaume, Sylvain, Franck, Delphine, Sandy, Martine, Eric, Sophie, Amanda...

Je remercie les médecins du Laboratoire d'Immunologie pour cette nouvelle formation qu'ils m'offrent : Mylène, Alessandra, Murielle, Monique et Michel. Ainsi que les techniciens et secrétaires du Laboratoire pour leur accueil.

A mes parents, mon grand-père, mon frère, Marie, Rita et Bonnie, vous savez combien ce travail représente un aboutissement pour moi.

A mes beaux-parents, Jonathan, Aurélie, Bianca, David, Sylvia, Alexandre et Maxime.

A ma famille Niçoise, Marie-Pierre, Pierre, Carole, Marie, Nicolas, Olympia.

A ma famille Vençoise, Joëlle, Lilian, Yannick et Alain.

*A mes enfants Solal et Anna pour tout ce temps volé. A la fierté et au bonheur que vous me
donnez.*

*A Ladislas, l'homme de ma vie. A la vie que nous construisons, au bonheur de vivre à tes
côtés, à la joie et à la légèreté que tu insuffles partout, à tes combats, à nos valeurs, à tous ces
doutes que tu dissipes... A la vie...*

« Une civilisation se transforme lorsque son élément le plus douloureux - l'humiliation chez l'esclave, le travail chez l'ouvrier moderne - devient tout à coup une valeur, lorsqu'il ne s'agit plus d'échapper à cette humiliation, mais d'en attendre son salut, d'échapper à ce travail, mais d'y trouver sa raison d'être. »

André Malraux, La Condition Humaine

Avant-propos

La glomérulonéphrite extra-membraneuse (GEM) est une maladie auto-immune rare décrite pour la première fois en 1929 chez l'homme, à partir de l'analyse histologique sur autopsie du rein d'un patient atteint d'un syndrome néphrotique.

L'histoire de cette maladie s'est enrichie au fil des années par l'identification des cibles antigéniques reconnues par les IgG déposées le long de la membrane basale glomérulaire.

La première étape importante dans le diagnostic de la GEM est l'émergence de la ponction biopsie rénale. Le rein est parmi les derniers organes pleins explorés par ponction-biopsie percutanée, à partir de 1955. Cette technique a depuis bénéficié de nombreuses améliorations liées au repérage du rein par imagerie.

Les moyens d'étude ont eux aussi considérablement progressé, des techniques de marquage immunohistochimiques introduisant les premiers anticorps dans les années 40. L'introduction quasi-simultanée des techniques de microscopie électronique et optique en 1956 permet l'analyse du rein normal et celle des lésions morphologiques glomérulaires. L'invention d'un microscope adapté au dépistage de certaines substances fluorescentes marquant l'anticorps via une lampe à ultraviolets permet de poursuivre cette amélioration.

On trouve dès 1960, les premières séries classant des cas de syndrome néphrotique selon leur analyse histologique. En 1966, un premier cas est rapporté liant syndrome néphrotique, GEM et cancers. Ces observations aboutissent à la classification actuelle des formes primaires et secondaires.

Les années 1970 sont consacrées à l'industrialisation de la technique de biopsie avec notamment l'apparition d'anticorps commerciaux de meilleure qualité. Les marquages sont devenus à la fois plus sensibles et plus spécifiques. Enfin dans les années 1980, la morphométrie et la microscopie confocale améliorent les techniques de marquage et de mesure.

Parallèlement à ces progrès dans la caractérisation des lésions histologiques, le modèle de la néphrite de Heymann en 1959 avait permis de comprendre le principal mécanisme de formation des complexes immuns « in situ ». L'identification de la mégaline comme cible antigénique, et son clonage ne sont réalisés qu'en 1994. Cette protéine est absente du glomérule humain. Son identification chez le rat ne permet pas d'améliorer le diagnostic chez l'homme mais apporte alors une meilleure compréhension dans les mécanismes de formation des complexes immuns.

Il faut attendre 2002 pour identifier la première protéine podocytaire humaine impliquée dans une GEM anténatale, l'endopeptidase neutre (NEP). Cette forme est due à une alloimmunisation contre la NEP après une fausse couche d'une mère déficiente pour cette enzyme. Les anticorps pré-formés, transmis in utero lors d'une deuxième grossesse, induisent une GEM chez le nouveau-né non déficient en NEP. Plusieurs familles sont caractérisées ainsi par la suite, mais ces cas familiaux sont isolés. Le dosage des anticorps anti-NEP n'a donc pas pu apporter d'intérêt diagnostique à large échelle, bien que la confirmation du mécanisme de formation des complexes immuns « in situ » a été apportée.

C'est en 2009 qu'une avancée majeure dans le diagnostic de la GEM intervient avec la caractérisation de PLA2R1 comme principale cible antigénique des formes idiopathiques. De nombreuses études ont depuis permis de corréler le titre d'anticorps anti-PLA2R1 avec l'activité de la maladie et ont confirmé le rôle majeur des anticorps anti-PLA2R1 dans la physiopathologie de la GEM. En 2011, Lawrence Beck apporte la preuve qu'une autre protéine glomérulaire pourrait être impliquée. Elle est caractérisée en 2014 : THSD7A. L'identification de PLA2R1 et de THSD7A devrait permettre de reclasser les formes primaires et secondaires en fonction de la physiopathologie selon laquelle les formes primaires sont liées à la formation in situ de complexes immuns avec des IgG (principalement des IgG4) qui se lient à un antigène podocytaire, alors que dans les formes secondaires les complexes immuns se formeraient en amont du glomérule et viendraient se déposer dans la membrane basale glomérulaire (principalement des IgG1 et des IgG3).

Ni le diagnostic des GEM, ni la prise en charge actuelle de la GEM n'ont pu pour l'instant être améliorés par la caractérisation de PLA2R1 et de THSD7A.

Le diagnostic passe encore par la biopsie rénale et l'élimination des causes de formes secondaires.

La prise en charge passe encore par une période d'observation pendant 6 mois de l'évolution de la protéinurie après mise en route d'un traitement symptomatique.

Les prochaines recommandations devraient prendre en compte ces nouveaux marqueurs et notamment le titre d'anticorps anti-PLA2R1 qui est lié au pronostic de la maladie, afin d'éviter d'attendre 6 mois pour traiter un patient.

Les années à venir devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes lésionnels impliqués dans cette maladie : le rôle du complément, le rôle de l'immunité cellulaire... Mais également les mécanismes d'immunisation comme le mimétisme moléculaire ou le rôle du « spreading » intra ou extra-moléculaire.

On devrait mieux comprendre aussi le lien avec les formes dites « secondaires » : ces

maladies associées sont-elles des facteurs déclenchants de la GEM ou des facteurs pathogéniques de la maladie ?

La compréhension de ces mécanismes permettra une meilleure classification des différentes formes de GEM et une prise en charge plus ciblée des patients.

Nouveaux marqueurs diagnostiques et pronostiques dans la Glomérulonéphrite Extra-Membraneuse

Par le suivi des anticorps anti-PLA2R1 chez le greffé rénal,
la caractérisation des épitopes reconnus par les anticorps anti-PLA2R1 et
l'identification d'une nouvelle cible antigénique

1. Introduction

1.1. Diagnostic de la GEM

1.1.1. Définition de la GEM

1.1.2. Données épidémiologiques

1.1.3. Présentation clinique

1.1.4. Histoire naturelle

1.1.5. Terrain génétique

1.2. Physiopathologie de la GEM

1.2.1. Néphrite de Heymann

1.2.2. NEP

1.2.3. PLA2R1

1.2.4. Autres antigènes intra-podocytaires associés à la GEM

1.2.5. THSD7A

1.2.6. Formes secondaires

1.3. Récepteur PLA2R1 et anticorps anti-PLA2R1

1.3.1. Structure

1.3.2. Ligands de PLA2R1

1.3.3. Rôle de PLA2R1 dans l'inflammation

1.3.4. Rôle de PLA2R1 dans le cancer

1.3.5. Rôle de PLA2R1 dans le rein

1.3.6. Tests diagnostiques

1.3.7. Anticorps anti-PLA2R1 et activité de la maladie

1.3.8. Epitopes de PLA2R1 reconnus par les anticorps dans les GEM idiopathiques

1.4. Prise en charge de la GEM

1.4.1. Facteurs pronostics

1.4.2. Prise en charge de la GEM (KDIGO) Recommandations actuelles

1.4.3. Récidive de GEM après transplantation

1.5. Objectifs

2. Résultats

2.1. Article 1 : Mise au point d'un test ELISA permettant le suivi des anticorps anti-PLA2R1

2.2. Article 2 : Le suivi des Ac anti-PLA2R1 après la transplantation rénale permet de prédire la récidive de GEM sur le greffon

2.3. Article 3 : Réactivité croisée des anticorps anti-PLA2R1 contre le récepteur de lapin et le récepteur de souris et mise au point de deux nouveaux tests ELISA avec des performances différentes dans la Glomérulonéphrite Extra-Membraneuse

2.4. Article 4 : Un « spreading » intra-moléculaire est associé à des formes actives de mauvais pronostic dans les Glomérulonéphrites Extra-Membraneuses avec Ac anti-PLA2R1

2.5. Article 5 : Identification d'une nouvelle cible antigénique dans la Glomérulonéphrite Extra-Membraneuse idiopathique

3. Discussion et perspectives

4. Annexes

5. Bibliographie

Liste des abbréviations

GEM : Glomérulonéphrite Extra-membraneuse

PLA2R1 : Phospholipase A2 Receptor type 1

THSD7A : Thrombospondin containing 7 domain A

kDa : kilo dalton

AR : Aldolase Réductase

SOD2 : Manganèse superoxide dismutase

VIH : Virus Immunodéficience Humain

VHB : Virus Hépatite B

VHC : Virus Hépatite C

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

ANCA : Anticops dirigé contre le Cytoplasme des Polynucléaires Neutrophiles

TPO : Thyroperoxydase

HSF : Hyalinose Segmentaire et Focale

Th1, Th2 : T helper1, 2

IgG : Immunoglobuline G

GWAS : Genome-wide association study

SNP : Single nucleotid polymorphism

HLA : Human leucocyte antigen

CTLD : Domaine lectine de type C

CysR : Cystein rich

FNII : Fibronectine II

LBD : Ligand-binding domain

NEP : Neutral endopeptidase

BSA : Bovine serum albumin

SCID : Severe combined immunodeficiency

ASB : aryl sulfatase B

ACE : Antigen caricno-embryonaire

LBA : Lavage broncho-alvéolaire

sPLA2 : Phospholipase A2 sécrétée

OIS : Oncogen induced senescence

HMEC : Human mammary epithelial cells

HEK 293 : Human embryonic kidney

TNF : Tumor necrosis factor

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

CD : Cluster de différenciation

Cl : Clairance

MMF : Mycophenolate mofetil

ACTH : Adreno Cortico Trophic Hormone

ASAT : Aspartate aminoacide transférase

ROC : Receiver operating characteristic

IL : Interleukine

TSH : Thyréostimuline

1. Introduction

1.1 Diagnostic de la Glomérulonéphrite Extra-Membraneuse

1.1.1. Définition de la Glomérulonéphrite Extra-Membraneuse et histologie

La Glomérulonéphrite Extra-Membraneuse (GEM) est une maladie auto-immune rénale rare qui représente la première cause de syndrome néphrotique de l'adulte.

Le diagnostic de GEM repose exclusivement sur la biopsie rénale. Les signes histologiques de la GEM sont caractéristiques : il existe un épaissement diffus de la membrane basale glomérulaire sans prolifération. La coloration argentique de Jones montre des expansions, ou spicules, qui se projettent à partir de la membrane basale glomérulaire pour s'étendre autour de dépôts immuns. L'expansion de la membrane basale glomérulaire est mieux vue en microscopie électronique où l'on retrouve des dépôts denses à localisation sous-épithéliale pathognomoniques, un effacement extensif des pédicelles du podocyte recouvrant la membrane basale avec un effondrement du cytosquelette d'actine et la rupture des fentes de filtration entre les pédicelles. L'immunofluorescence montre des dépôts granulaires dans la paroi des capillaires glomérulaires contenant des IgG et du C3.

On définit quatre stades d'évolution, dans les stades I les dépôts subépithéliaux ne sont visibles qu'en immunofluorescence, dans le stade II on retrouve un aspect de spicules de la membrane basale glomérulaire en microscopie optique, dans le stade III un aspect des dépôts en chaînettes où les dépôts sont intégrés dans la membrane basale et dans le stade IV la membrane basale est très nettement épaissie (Ehrenreich et al., Pathol Annu 1968).

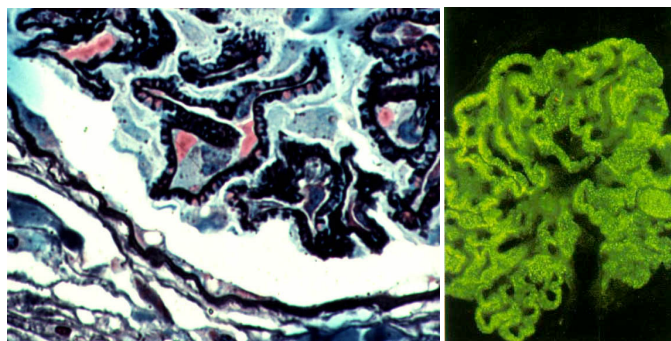


Illustration 1 : en microscopie optique et en immunofluorescence des dépôts d'IgG le long de la membrane basale glomérulaire avec un aspect de spicule définissant une GEM un stade II.

La GEM peut être idiopathique ou secondaire à différentes pathologies. Actuellement le diagnostic de GEM primaire se pose après avoir éliminé l'ensemble des causes de GEM secondaires (Liste ci-dessous d'après (Radhakrishnan and Cattran, 2012)).

Tableau 1 : Pathologies rapportées à des GEM secondaires

Autoimmune	Infections
Autoimmune diseases	Hepatitis B
Systemic lupus erythematosus	Hepatitis C
Rheumatoid arthritis	Human immunodeficiency virus
Mixed connective tissue disease	Malaria
Dermatomyositis	Schistosomiasis
Ankylosing spondylitis	Filariasis
Systemic sclerosis	Syphilis
Myasthenia gravis	Enterococcal endocarditis
Bullous pemphigoid	Hydatid disease
Autoimmune thyroid disease	Leprosy
Sjögren's syndrome	
Temporal arteritis	
Crohn's disease	
Graft-versus-host disease	
Malignancies	
<i>Carcinomas</i>	<i>Noncarcinomas</i>
Lung	Hodgkin's lymphoma
Esophageal	Non-Hodgkin's lymphoma
Colon	Leukemia (chronic lymphocytic leukemia)
Breast	Mesothelioma
Stomach	Melanoma
Renal	Wilm's tumor
Ovary	Hepatic adenoma
Prostate	Angiolymphatic hyperplasia
Oropharynx	Schwannoma
	Neuroblastoma
	Adrenal ganglioneuroma
Drugs/Toxins	Miscellaneous
Gold	Diabetes mellitus (association or cause?)
Penicillamine	Sarcoidosis
Bucillamine	Sickle cell disease
Mercury compounds	Polycystic kidney disease
Captopril	α 1-antitrypsin deficiency
Probenicid	Weber-Christian disease
Trimethadione	Primary biliary cirrhosis
Nonsteroidal anti-inflammatory drugs	Systemic mastocytosis
Cyclooxygenase-2 inhibitors	Guillain-Barre syndrome
Clopidogrel	Urticarial vasculitis
Lithium	Hemolytic-uremic syndrome
Formaldehyde	Dermatitis herpetiformis
Hydrocarbons	Myelodysplasia

Le diagnostic de GEM secondaire se pose rétrospectivement, une fois que le traitement de la maladie initiale a induit une rémission de la GEM.

La recherche de marqueurs performants est nécessaire afin d'améliorer le diagnostic de ces deux formes de GEM et leur prise en charge.

a. Analyse histologique des GEM idiopathiques

En 2009, Beck et al. ont mis en évidence que 70% des patients présentant une GEM idiopathique étaient porteurs d'anticorps dirigés contre le récepteur des Phospholipases A2 (PLA2R1), protéine podocytaire dont la fonction dans le rein est inconnue (Beck et al., 2009). En 2014, notre équipe a mis en évidence que 5 à 10% des patients présentant une GEM idiopathique sans anticorps anti-PLA2R1 sont porteurs d'anticorps dirigés contre une autre protéine glomérulaire la Thrombospondine de type 1 (THSD7A). La fonction glomérulaire de THSD7A ainsi que ses liens fonctionnels avec PLA2R1 sont actuellement inconnus.

Il a été démontré dans les GEM idiopathiques que les IgG4 sont la sous-classe dominante dans les dépôts le long de la membrane basale glomérulaire (Haas, 1994). Plus récemment, Huang et al. ont démontré sur une analyse rétrospective de 114 biopsies secondaires à des GEM que les IgG1 étaient la sous-classe dominante dans les GEM primaire à des stades précoces (64% dans les stades I) alors que les IgG4 étaient prédominantes dans les stades plus tardifs (Huang et al., 2013). Il y aurait au cours de l'évolution de la maladie un changement de sous-classes d'IgG vers les IgG4 comme décrits dans d'autres maladies auto-immunes médiées par les IgG4 comme le pemphigus vulgaris (Warren et al., 2003).

Dans les formes primaires on ne retrouve classiquement pas de prolifération cellulaire associées à ces dépôts.

De plus, l'analyse de ces dépôts a permis de révéler dans les formes associées aux anticorps anti-PLA2R1 comme dans les formes associées aux anticorps anti-THSD7A une augmentation de l'expression de ces protéines dans les dépôts au sein de la membrane basale glomérulaire (Debiec and Ronco, 2011). Le marquage de ces dépôts pourrait permettre un diagnostic rétrospectif de GEM médiée par anticorps anti-PLA2R1 ou anti-THSD7A (Svobodova et al., 2013) (Thomas, NEJM 2014 accepté).

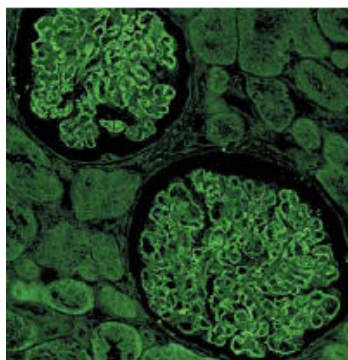


Illustration 2 : Marquage en immunofluorescence de PLA2R1 sur une biopsie de patient présentant une GEM avec anticorps anti-PLA2R1 positifs d'après (Debiec and Ronco, 2011)

D'autres cibles antigéniques ont été identifiées dans les GEM idiopathiques comme l'aldolase reductase (AR) et l'anti-manganèse superoxide dismutase (SOD2) où les IgG4 sont également la sous-classe prédominante dans les dépôts d'IgG et l'on retrouve une augmentation de l'expression de ces protéines par rapport à des biopsies contrôles (Prunotto et al., 2010).

b. Analyse histologique des GEM secondaires

Le diagnostic de GEM secondaire est difficile à poser puisqu'il se fait a posteriori après avoir démontré que le traitement de la maladie primaire a eu un impact sur l'évolution de la maladie secondaire.

Environ 80% des GEM sont idiopathiques dans la plupart des cohortes. La GEM secondaire peut parfois être différenciée de la forme idiopathique par la présence de dépôts immuns sur des sites autres que l'espace sous-épithélial et par la prédominance d'IgG1 ou d'IgG3 quelque soit l'étiologie de la GEM secondaire (Haas, 1994).

i. *GEM secondaires à une infection*

Dans les pays en voie de développement, les GEM secondaires aux infections telles que l'hépatite B, la bilharziose, le paludisme et la syphilis prédominent. L'impact de ces infections sur la prévalence des GEM secondaires a été démontré grâce à des campagnes de vaccination universelle contre l'hépatite B. A Taïwan une étude a montré une baisse significative de l'incidence des GEM secondaire aux infections par le VHB qui représentaient 11.6% des causes de syndrome néphrotique de l'enfant entre 1974 et 1984 et 0% entre 2004 et 2009 après une vaste campagne de vaccination (Liao et al., 2011).

Des dépôts d'antigène du virus de l'hépatite B ont été retrouvés au sein de la membrane basale glomérulaire ainsi qu'au niveau mésangial associés à un niveau variable de prolifération cellulaire (Beck, 2010).

Plusieurs cas de GEM avec anticorps anti-PLA2R1 associées à une infection par le virus de l'hépatite B ou C ont été décrits. Nous avons retrouvé plusieurs cas dans notre cohorte (Seitz-Polski et al., 2014). Pour ces cas nous n'avons pas pu démontrer que le traitement anti-viral a induit une rémission du syndrome néphrotique puisque ces cas ont été pris en charge tardivement à des stades avancés de fibrose mais la positivité des anticorps anti-PLA2R1 a été confirmée par différentes techniques notamment en western blot.

Qin et al. ont également décrit sur une cohorte chinoise, trois cas de patients porteurs d'une GEM secondaire à une hépatite B avec anticorps anti-PLA2R1 positifs en western blot. Dans

ces trois cas, les IgG4 était la sous-classe d'IgG dominante dirigée contre PLA2R1 dans le sérum mais également au niveau des dépôts le long de la membrane basale et aucun cas n'est rentré en rémission suite au traitement anti-viral (Qin et al., 2011). Ces éléments rapprochent plus ces cas de formes primaires de GEM avec une hépatite B surajoutée que de véritables formes secondaires.

Nous avons également décrit le cas d'un patient porteur d'anticorps anti-THSD7A avec une co-infection VIH/VHC dont une hépatite C active. La prise en charge initiale a consisté en un traitement anti-viral mal toléré et une réponse partielle sur sa protéinurie probablement liée à l'hypotension induite par l'interféron. Il a ensuite bénéficié d'un traitement immunosuppresseur par Rituximab 1g, deux injections à deux semaines d'intervalle avec une rémission partielle un an après ce traitement et des anticorps anti-TSHD7A négatifs. Puis il a bénéficié d'un traitement anti-viral par Sovaldi® (Sofosbuvir) qui a pu négativer sa charge virale sans impact sur sa protéinurie résiduelle probablement séquellaire de lésions anciennes. Dans ce cas, l'immunisation contre le virus de l'hépatite C est probablement un phénomène aggravant la maladie auto-immune initiale comme décrit dans d'autres maladies auto-immunes (Agmon-Levin et al., 2014) mais pas à l'origine de la maladie.

Ces cas illustrent bien la difficulté de poser un diagnostic de GEM secondaire.

ii. GEM lupique

La GEM lupique est la cause la plus fréquente de GEM secondaire dans les pays développés. La GEM est l'un des cinq types de glomérulonéphrite secondaire au cours du lupus systémique. Cette atteinte n'est pas rare au cours du lupus puisque Bhinder et al. ont montré en analysant 92 biopsies rénales successives de patients lupiques sur 5 ans effectuées dans le même centre (Université du Mississippi), que 40% des atteintes rénales étaient des GEM lupiques (Bhinder et al., 2010).

Le lupus est une maladie auto-immune systémique dont la physiopathologie n'est pas à ce jour complètement élucidée. Le développement du lupus a été attribué à une perte de tolérance des lymphocytes induisant l'apparition d'auto-anticorps de spécificités multiples. Une dérégulation de l'apoptose ou de l'épuration des corps apoptotiques est à l'origine de l'exposition au système immunitaire d'antigènes cryptiques et à la formation d'anticorps dirigés contre des antigènes nucléaires et des phospholipides membranaires. L'atteinte rénale au cours du lupus peut-être secondaire à la toxicité cellulaire de complexes immuns circulants ou à la fixation d'anticorps à des antigènes glomérulaires (nucléosome et double brin d'ADN) (Berden, 1997). Le type de lésion dépend du secteur glomérulaire où se déposent ces

complexes immuns. Dans le secteur mésangial on retrouve une prolifération cellulaire définissant une glomérulonéphrite mésangiale proliférative (classe II). Dans le secteur endothélial on retrouve une prolifération endocapillaire pouvant aller jusqu'à la formation de croissants (classe III et IV). L'atteinte épithéliale est caractérisée par une défaillance podocytaire, non exsudative sans prolifération caractéristique de la GEM lupique (classe V). Enfin lors de prises en charge tardives on peut retrouver des lésions de sclérose définissant la classe VI.

La classification des glomérulonéphrites lupiques a été remise à jour en 2004 (Weening et al., 2004). La GEM lupique ou néphropathie lupique de classe V, est caractérisée par des dépôts granulaires subépithéliaux plus ou moins associés à des dépôts mésangiaux.

On peut également retrouver un certain degré de prolifération mésangiale et de dépôts subendothéliaux associés. Il faut également déterminer le pourcentage de lésions actives (nécrose fibrinoïde, croissants) ou chroniques. Enfin on peut retrouver associé à ces lésions glomérulaires un certain degré d'atteinte vasculaire (dépôts, thrombi, sclérose, vascularite), et tubulo-interstitielle (atrophie tubulaire, inflammation interstitielle) qui doivent être gradées. L'ensemble de ces atteintes rentre dans le cadre d'une atteinte systémique.

L'analyse des sous-classes d'IgG au niveau des dépôts subépithéliaux retrouve également une prépondérance d'IgG1 (Kuroki et al., 2002). Plus récemment, Song et al. ont montré que des dépôts mésangiaux d'IgG1 et de C1 étaient fréquemment associés à la GEM lupique (Song et al., 2012) et rarement retrouvés dans les GEM primaires.

La présence d'anticorps anti-PLA2R1 dans les GEM lupiques est discutée. Dans une cohorte chinoise un cas a été décrit sur 20 sera testés en western blot. Une autre étude sur 25 GEM lupiques n'a retrouvé aucun sérum positif pour les anticorps anti-PLA2R1 testés en immunofluorescence (Gunnarsson et al., 2012).

iii. GEM post-médicament

La GEM peut également être associée à différents médicaments et toxiques tels que les AINS, les sels d'or, la pénicillamine et le mercure.

En 2010, Li et al. ont repris 11 cas de GEM secondaire à une exposition chronique au mercure. Il s'agit de 10 femmes et un homme âgé de 15 à 45 ans. L'exposition au mercure a duré entre 2 et 16 mois. Elle provient pour 5 cas de médicaments contenant du mercure (3 patients prenaient ce traitement pour de l'arthrite rhumatoïde, un pour une maladie de Still et un pour une tuberculose pulmonaire); 4 patients utilisaient des crèmes éclaircissant la peau contenant du mercure ; un patient utilisait une teinture pour cheveux contenant du mercure et

un dernier était exposé à des vapeurs de mercure. Tous ces patients se sont présentés avec une protéinurie, trois avaient un syndrome néphrotique et aucun ne présentait d'insuffisance rénale. Les concentrations urinaires de mercure étaient de 1.5 à 50 fois supérieures à la normale. Quatre patients avaient des anticorps anti-nucléaires dont 2 dans un contexte d'arthrite (traités par mercure) et deux étaient asymptomatiques. L'analyse histologique des 11 biopsies retrouve une prolifération mésangiale modérée, une infiltration cellulaire glomérulaire et interstitielle dans 4 cas associée à une défaillance tubulaire focale. Les dépôts le long de la membrane basale glomérulaire étaient constitués majoritairement d'IgG1 avec du C3, C4 et C1q. Neuf patients sont rentrés en rémission à l'arrêt de l'exposition au mercure et 2 patients sont perdus de vue après une baisse significative de leur protéinurie après 6 mois d'arrêt d'exposition (Li et al., 2010). La recherche d'anticorps anti-PLA2R1 n'a pas pu être effectuée dans cette cohorte.

Nawaz et al. ont décrit un cas de syndrome néphrotique suite à la prise d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens. La ponction biopsie rénale a mis en évidence une GEM avec une prédominance d'IgG1 et un marquage positif de PLA2R1 (Nawaz et al., 2013).

iv. GEM et cancer

Il existe également une association avec différents types de tumeurs solides. De nombreux cas cliniques associant GEM et cancer ont été décrits (Couser et al., 1974). Des dépôts d'antigènes tumoraux ont été retrouvés dans des GEM associées à des cancers (Costanza et al., 1973).

En 2006 Lefaucheur et al. ont repris une série de 240 cas de GEM suivis en France et mis en évidence une prévalence de 10% de cancer (24 cas) avec plus fréquemment des cancers du poumon et de la prostate avec un risque qui augmente avec l'âge et le tabagisme (Lefaucheur et al., 2006).

L'incidence des cancers dans cette population est statistiquement supérieure à celle de la population générale (le rapport entre l'incidence de cancer de cette population porteuse d'une GEM sur l'incidence attendue de ce groupe est de 9.8 pour les hommes et 12.3 pour les femmes). Vu l'augmentation de fréquence des diagnostics de cancers à des stades précoces, un débat émerge sur la réalité des formes secondaires de GEM où certains considèrent que la survenue d'un cancer chez un patient qui présente une GEM peut être un événement indépendant vu que la GEM et les cancers touche la même population c'est-à-dire des hommes d'âge murs (après 50 ans). Dans l'étude GN-PROGRESS où l'on retrouve 24 cas de cancers sur une cohorte de 240 GEM, 22 patients ont bénéficié d'un traitement spécifique de

leur tumeur dont 12 avec une rémission carcinologique complète. Dans seulement 3 cas, le traitement complet du cancer n'a pas induit de rémission du syndrome néphrotique. Dans les 10 autres cas, le traitement carcinologique n'a pas induit de rémission tumorale avec la persistance d'un syndrome néphrotique. Les 3 cas discordants correspondent à un cas de cancer de l'estomac, un cas de cancer du col de l'utérus et un cas de cancer du sein. Si l'on se tient à la définition des formes secondaires le taux de formes secondaires liées aux cancers est ici de 8,75%.

Un autre résultat important de cette étude est d'avoir montré que l'on retrouvait de façon significative un nombre important de cellules inflammatoires infiltrant les glomérules (8 par glomérule) permettant de distinguer avec une sensibilité de 92% et une spécificité de 92% les formes idiopathiques des formes secondaires à un cancer.

Dans l'étude de Qin, trois patients sur dix testés avec une GEM associée à un cancer ont des anticorps anti-PLA2R1 positifs en western blot. Sur ces 3 patients la résection de la tumeur n'a pas entraîné de rémission du syndrome néphrotique, ce qui les rapproche plutôt de formes primaires avec un cancer associé (Qin et al., 2011).

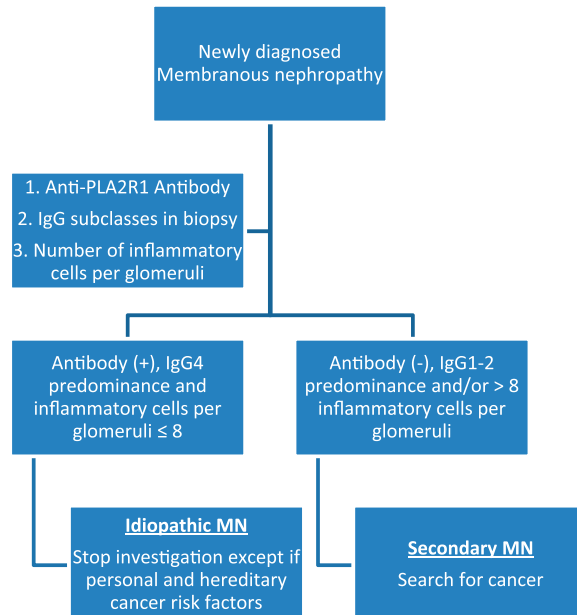


Illustration 3 : Orientation diagnostique devant une GEM. D'après (Cambier and Ronco, 2012)

v. *GEM et thyroïdites*

L'association entre GEM et thyroïdites est décrite à travers des cas cliniques depuis 1976 (O'Regan et al., 1976). La GEM est l'atteinte rénale la plus fréquemment retrouvée au cours des thyroïdites (Horikoshi et al., 1993). Des cas de rémission de GEM avec hypothyroïdie secondaire à une maladie de Hashimoto après substitution par un traitement hormonal substitutif ont été décrits (Illies et al., 2004). Des dépôts de thyroglobuline, de thyroperoxidase ont été retrouvés dans les biopsies rénales de patients associant GEM et thyroïdites (Shima et al., 2009).

Dans notre cohorte constituée de 102 patients porteurs d'une GEM dont 72 ont des anticorps anti-PLA2R1 (70.5%), nous avons recherché de façon systématique des anticorps anti-TPO et anti-thyroglobuline et comparer la fréquence de positivité de ces tests à une groupe de maladies auto-immunes (n=111 présentant lupus, vascularites à ANCA, polyarthrite rhumatoïde).

Nous avons retrouvé de façon significative plus de patients porteurs d'anticorps anti-TPO et d'anti-thyroglobuline dans le sous-groupe de GEM sans anticorps anti-PLA2R1 par rapport au sous-groupe avec anticorps anti-PLA2R1 ($p=0.03$ pour les anti-TPO et $p=0.02$ pour les anti-thyroglobuline). De plus, le groupe GEM sans anticorps anti-PLA2R1 présente également plus d'anticorps anti-thyroglobuline que le groupe avec maladie auto-immune ($p=0.04$) (Lochouarn et al., en préparation).

Les thyroïdites semblent donc associées aux formes secondaires de GEM (avec anticorps anti-PLA2R1-) pouvant même définir des formes secondaires dont la physiopathologie n'est pas connue.

L'analyse histologique de la biopsie rénale permet donc de poser le diagnostic de GEM et d'orienter vers une forme primaire ou secondaire par la caractérisation du sous-type d'IgG prédominante, par la recherche des protéines glomérulaires impliquées dans la formation de complexes immuns in situ (PLA2R1, THSD7A) et la recherche de signes d'une atteinte systémique (prolifération mésangiale ou endocapillaire, cellules inflammatoires infiltrant le glomérules, dépôts d'antigènes non glomérulaires...).

Le diagnostic d'une forme secondaire reste difficile à poser et nécessite une amélioration de nos connaissances sur les mécanismes de cette entité afin de trouver de nouveaux marqueurs performants. La présence d'anticorps anti-PLA2R1 est très spécifique des formes primaires mais ne suffit pas encore à poser un diagnostic de GEM idiopathique, l'association

notamment avec des cancers doit être recherchée. Une nouvelle définition basée sur la physiopathologie des GEM à l'aide de nouveaux marqueurs doit permettre de mieux caractériser ces différentes formes.

1.1.2. Données épidémiologiques

a. En France

La GEM est une maladie rare puisque son incidence annuelle en France est estimée selon le registre REIN 2012 à 1.3 cas pour 100 000 habitants. Elle représente la 3ème cause de glomérulonéphrite primaire après la néphropathie à dépôts d'IgA (ou maladie de Berger) et la glomérulonéphrite avec Hyalinose Segmentaire et Focale (HSF).

En 2004, Simon et al. ont étudié l'épidémiologie des glomérulonéphrites primaires dans le Département des Côtes d'Armor sur une population majoritairement caucasienne (98.7%), âgée entre 10 et 85 ans entre 1976 et 2002. Le diagnostic de glomérulonéphrite primaire est posé s'il n'y a pas au moment du diagnostic de maladie systémique associée, les sérologies pour les hépatites B et C sont négatives, les anticorps anti-nucléaires sont négatifs et s'il n'y a pas d'histoire familiale d'hématurie. Cette étude a analysé l'incidence annuelle de chaque type de glomérulonéphrite primaire sur 3 périodes de temps par classe d'âge.

Le sex ratio dans cette population pour la GEM est de 1.2 en faveur des hommes. L'incidence annuelle dans cette étude est stable sur les 3 périodes de temps et varie entre 1.2 et 1.7 pour 100 000 chez l'homme mais on note une baisse de l'incidence annuelle chez la femme sur la période de 1996 à 2002 que les auteurs attribuent à une diminution d'exposition à des facteurs environnementaux favorisant les GEM (agents infectieux, médicaments, solvants organiques) (Simon et al., 1994; Simon et al., 2004).

Dans cette étude, la GEM est la cause de glomérulonéphrite primaire la moins fréquente de mise en dialyse avec une incidence de 0.18 pour 100 000. L'incidence de mise en dialyse est trois fois plus élevée chez l'homme (0.3 pour 100 000) que chez la femme (0.1 pour 100 000). Le risque d'évoluer vers une insuffisance rénale chronique terminale est de 1/5 chez l'homme et 1/12 chez la femme. Un homme chez qui l'on pose un diagnostic de GEM a 15% de risque après 10 ans d'avoir recours à la dialyse.

b. Aux Etats-Unis

Aux Etats-Unis, une étude menée sur une période de temps comparable (1974-2003) a repris l'ensemble des biopsies rénales effectuées à la Mayo Clinic (Rochester) ayant conduit à un diagnostic de glomérulonéphrite non diabétique (Swaminathan et al., 2006).

La population est caucasienne à 98% en 1980 et à 90% en 2000. La GEM représente dans cette cohorte la 3^{ème} cause de biopsie rénale après la néphropathie à IgA et le Hyalinose Segmentaire et Focale. On note une augmentation significative globale d'un facteur de 2.3 de l'incidence des glomérulonéphrites non diabétiques entre 1974-1983 et 1994-2003. L'urbanisation est l'une des hypothèses avancées par les auteurs pour expliquer cette augmentation, ainsi que l'augmentation de l'obésité qui induit une augmentation des Hyalinoses Segmentaires et Focales. On note dans cette étude une augmentation (d'un facteur de 2.5), non significative ($p=0.13$) de l'incidence des GEM : 0.4 pour 100 000 (1974-83), 0.7 pour 100 000 (1984-93) et de 1.0 pour 100 000 (1994-2003), qui est légèrement inférieure à celle observée en France et comparable à celle observée en Australie (Briganti et al., 2001).

c. En Asie

En Chine, une étude portant sur 11 618 biopsies rénales révèle que la GEM est la 2ème cause de glomérulonéphrite avec une légère mais significative augmentation de son incidence entre 1987 et 2012 que les auteurs attribuent à l'exposition de la population à certains agents notamment le mercure (Zhang et al., 2014).

Une étude à Singapour a révélé des modifications au cours des trente dernières années de la répartition des différentes glomérulonéphrites en fonction du mode de vie. Dans la première décennie on retrouve principalement des glomérulonéphrites prolifératives mésangiales comme dans le reste de l'Asie secondaires à des infections. Dans la deuxième décennie on note une baisse de l'incidence des glomérulonéphrites prolifératives mésangiales et une augmentation des GEM comme en Chine et en Thaïlande. Et dans la troisième décennie une forte augmentation des Hyalinoses Segmentaires et Focales liées à la forte augmentation de l'incidence de l'obésité comme dans d'autres pays développés (en Australie et aux Etats-Unis) (Woo et al., 2010).

d. Répartition des formes primaires et secondaires

Comme nous l'avons vu le niveau de vaccination contre l'Hépatite B a un impact sur l'incidence des GEM secondaires (Liao et al., 2011). La répartition des différents types de glomérulonéphrites nous montre bien que dans les pays en voie de développement les glomérulonéphrites post-infectieuses sont prépondérantes alors que dans les pays développés, les glomérulonéphrites primaires « auto-immunes » type néphropathies à IgA, glomérulonéphrites à Lésions Glomérulaires Minimales et GEM idiopathiques ou les glomérulonéphrites liées à l'obésité (HSF) sont prépondérantes.

Pour certains auteurs, l'augmentation de l'incidence des glomérulonéphrites observées dans les pays développés peut-être expliquée par la théorie de l'hygiène (Hurtado and Johnson, 2005). La faible exposition dans l'enfance du système immunitaire à des agents infectieux induit un déséquilibre de nos lymphocytes Th1 au profit des lymphocytes Th2 à l'origine de l'émergence de maladies allergiques et auto-immunes. Les auteurs de cette revue ont montré la prédominance des glomérulonéphrites post-infectieuses dans les pays ayant un faible Produit Intérieur Brut (PIB) et inversement la prédominance de glomérulonéphrites auto-immunes dans les pays à fort PIB.

L'incidence des GEM post-infectieuses est en baisse dans les pays industrialisés alors que sa forme auto-immune est stable voir en augmentation.

1.1.3. Présentation clinique et biologique

La GEM se présente dans 80% des cas avec un syndrome néphrotique. Comme nous l'avons vu, elle touche préférentiellement l'homme après 50 ans (Schieppati et al., 1993). Elle n'est accompagnée que dans seulement 41% des cas d'œdèmes, ce qui fait que beaucoup de poussées peuvent passer inaperçues. On retrouve une hypertension artérielle dans 55% des cas.

La maladie se complique dans 7% des cas d'une thrombose veineuse profonde, plus fréquemment dans les deux premières années qui suivent le diagnostic avec un risque statistiquement augmenté lorsque le taux d'albumine sérique est inférieur à 28g/L (Lionaki et al., 2012).

1.1.4. Histoire naturelle de la GEM idiopathique

La GEM idiopathique comme beaucoup de maladies auto-immunes évolue par poussées et peut rentrer spontanément en rémission.

En 1993, Schieppati et al. ont étudié l'histoire naturelle de 100 patients porteurs d'une GEM idiopathique pris en charge entre 1974 et 1992 avec un suivi minimum de 6 mois ne recevant qu'un traitement symptomatique (Schieppati et al., 1993). L'âge moyen est de 51 ans avec 68 hommes pour 32 femmes. Le traitement symptomatique comprend : un traitement anti-hypertenseur par bloqueurs du système rénine angiotensine, inhibiteurs calciques ou beta-bloquants, ainsi qu'un régime à 1g de protéines par kilogramme de poids sec pour les patients sans insuffisance rénale et entre 0.6 et 0.8 g de protéines par kilogramme de poids sec en cas d'insuffisance rénale.

Les auteurs ont rapporté pour cette cohorte un suivi moyen de 52 mois (6-208 mois). A la fin du suivi, 14 patients ont évolué vers une insuffisance rénale chronique terminale avec recours à la dialyse, 3 ont une insuffisance rénale sévère (créatininémie $>265 \mu\text{mol/L}$), 15 ont une insuffisance rénale modérée à sévère (créatininémie comprise entre 132 et $265 \mu\text{mol/L}$), soit 32% des patients qui ont une dégradation de leur fonction rénale. Six patients sont décédés, 4 dans les suites de complications cardio-vasculaires, un patient suite à une infection et un patient suite à une embolie pulmonaire. La probabilité de maintenir une fonction rénale normale est de 88% à 5 ans et de 73% à 8 ans.

Dans le groupe des patients qui ont un suivi total de 60 mois, 13 sur 37 (35%) ont un syndrome néphrotique persistant dont 7 après une rémission partielle.

La présence d'un syndrome néphrotique, d'une hypertension, d'une protéinurie élevée ou d'un taux de cholestérol élevé au moment de la prise en charge n'était pas prédictive de la survie rénale. Les patients de moins de 50 ans ont un meilleur pronostic ainsi que les femmes (62% des femmes et 59% des hommes ont une rémission partielle ou complète).

L'évolution de la maladie sans traitement immunosuppresseur semble relativement bénigne mais un tiers des patients ont une insuffisance rénale après 5 ans et à la fin du suivi un tiers ont un syndrome néphrotique persistante. Ces données nous montre bien que le traitement symptomatique doit rester la première ligne de prise en charge des patients présentant une GEM idiopathique, mais également l'importance de mettre en évidence de nouveaux marqueurs de gravité de la maladie afin d'identifier les patients qui vont développer une insuffisance rénale et nécessiteraient le recours à un traitement immunosuppresseur avant l'installation de lésions rénales irréversibles.

1.1.5. Terrain génétique

L'identification de familles porteuses de GEM idiopathiques suggère une part génétique au développement de la maladie bien que ces cas restent très marginaux (Bockenbauer et al., 2008).

Les études de recherche d'associations à l'échelle du génome (GWAS) menées dans trois populations caucasiennes différentes porteuses de GEM idiopathiques: 75 Français, 146 Hollandais et 335 Anglais appariées à une population caucasienne contrôle ont pu identifier 2 loci associés aux GEM idiopathiques. Au niveau du chromosome 2q24 contenant le gène codant pour PLA2R1 ; le SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) rs4664308 est significativement associé au risque de développer une GEM idiopathique. Au niveau du chromosome 6p21 contenant le gène codant pour la chaîne alpha du complexe HLA-DQA1, le snp rs2187668 est également significativement associé à la GEM. La présence à l'état homozygote des 2 allèles à risque augmente par 78.5 fois le risque de développer la maladie (Stanescu et al., 2011).

Saeed et al. ont mené une autre étude dans une population caucasienne et afro-américaine présentant une GEM idiopathique avec ou sans anticorps anti-PLA2R1. Les variants génétiques de PLA2R1 influencent la positivité des anticorps anti-PLA2R1 chez les caucasiens. L'association avec le SNP rs 2187668 du complexe HLA DQA1 est très fortement associée au groupe GEM caucasien. L'association est faible ou absente dans le groupe GEM afro-américain. Aucune association génomique n'a été retrouvée dans la population sans anticorps anti-PLA2R1 (Saeed et al., 2014).

Coenen et al. ont analysé le séquençage de PLA2R1 chez 95 patients caucasiens dont 60 patients sont porteurs d'anticorps anti-PLA2R1 ou des dépôts de PLA2R1 détectables dans la biopsie rénale. Ils ont ainsi identifié 18 variants ou SNP de PLA2R1 comprenant 2 variants déjà décrits, 7 variants rares (<1%) et 9 variants communs. Ils ont confirmé une association entre 6 variants communs et la GEM (Coenen et al., 2013).

Trois de ces variants communs significativement associés à la GEM présentent des variations de séquences dans les domaines où nous avons identifié des épitopes reconnus par les anticorps anti-PLA2R1 : le domaine CysR, le domaine CTLD1 et entre le domaine CTLD6 et 7.

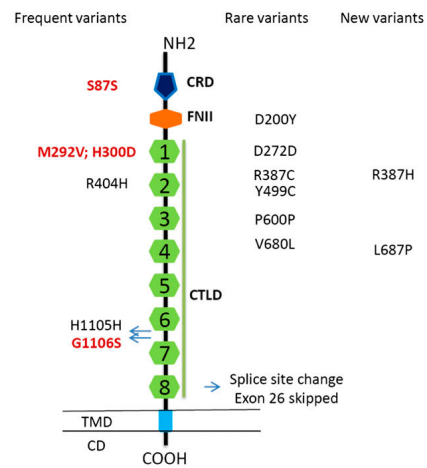


Illustration 4 : Variants identifiés de PLA2R1 (en rouge variants communs significativement associés à la GEM). D'après(Coenen et al., 2013)

1.2. Physiopathologie de la GEM

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la formation des dépôts d'IgG le long de la membrane basale glomérulaire :

- des complexes immuns circulants formés en amont viendraient se déposer dans la membrane basale glomérulaire du fait de sa fonction de filtre (Panel A)
- des anticorps pré-formés viendraient se fixer in situ sur des protéines podocytaires (Panel B)
- un antigène viendrait se « planter » dans la membrane basale glomérulaire avec formation de complexes immuns in situ Panel (C).

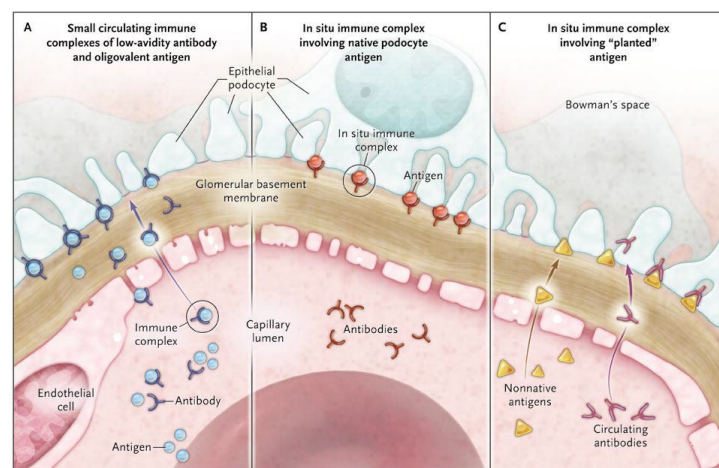


Illustration 5 : Les trois mécanismes supposés impliqués dans la formation des complexes immuns subépithéliaux à l'origine de la GEM d'après (Glasscock, 2009)

Nous verrons que chacune de ces 3 hypothèses a été vérifiée chez l'homme.

1.2.1. Néphrite de Heymann

De grands progrès dans la compréhension de la pathogénie de la GEM proviennent du modèle de GEM expérimentale chez le rat ou Néphrite de Heymann. Ce modèle a été décrit il y a 50 ans par le Docteur Walter Heymann qui a induit une GEM chez des rats en les immunisant avec un extrait de cortex rénal de rat (Heymann et al., 1959). Les rats ainsi immunisés développent une protéinurie après 6 à 8 semaines et une glomérulonéphrite à complexes immuns comparable à la GEM humaine ainsi qu'une protéinurie. Le transfert passif des

anticorps ainsi formés induit l'apparition d'une protéinurie chez le rat 5 jours après l'injection.

Il a été démontré par la suite que les complexes immuns sous-épithéliaux n'étaient pas dus à la séquestration de complexes immuns circulants mais se formaient in situ suite à la liaison d'un anticorps circulant à un antigène glomérulaire intrinsèque en perfusant des reins isolés de rat (Couser and Salant, 1980) .

Il a été découvert plus tard en 1985 que « l'immunogène » était situé dans une fraction de la bordure en brosse des tubules contournés proximaux contenant une protéine la mégaline qui constitue la cible antigénique dans ce modèle et est également présente au niveau des podocytes (Makker and Singh, 1984; Raychowdhury et al., 1989; Saito et al., 1994).

Le complément intervient dans la pathogénie des lésions tissulaires par un processus inflammatoire impliquant les leucocytes attirés par chimiotactisme via le C5a. De plus, il a été montré dans le modèle de Néphrite de Heymann que des rats déficitaires en complément ne développaient pas de protéinurie alors qu'une déplétion leucocytaire n'a pas d'effet (Salant et al., 1980). Dans des modèles de reins de rats isolés, la perfusion avec des anticorps anti-mégaline et de sérum déficient en C6 ou C8 n'induit pas de lésion (Cybulsky et al., 1986b). Ces résultats sont confirmés dans des modèles de rats déficients en C6 et C8 (Cybulsky et al., 1986a), la restauration des déficits en complément induit la formation du C5b9 et entraîne une albuminurie massive.

Le C5b9 induit sur le podocyte la dissociation de son cytosquelette d'actine, la disparition des complexes d'adhésion focaux et la synthèse de protéines matricielles extra-cellulaires. On retrouve également une dissociation de la liaison de la néphrine au cytosquelette d'actine et la rupture des diaphragmes de fente (Baker et al., 1989). L'activation de la voie commune finale intervient donc également dans la pathogénie de la Néphrite de Heymann.

La mégaline est une protéine transmembranaire de 600 kDa de la famille du LDL qui est fortement exprimée dans la bordure en brosse des tubes proximaux et dans les glomérules de rats. Elle est composée de 4 domaines appelés « ligand-binding domains » (LBD I-IV).

Des anticorps générés contre chaque domaine ont été transférés au rat induisant des dépôts glomérulaires sans protéinurie. Par contre, l'immunisation du rat contre un peptide contenant les résidus 1 à 236 (peptide L6) de la mégaline (domaine LBD I en N-terminal) obtenu par protéolyse de la mégaline ou par production dans baculovirus est capable d'induire la production d'anticorps pathogéniques, des dépôts glomérulaires et une protéinurie. Ce peptide contient donc l'épitope pathogénique (Oleinikov et al., 2000; Tramontano and Makker, 2004). Shah et al. ont injecté ce peptide L6 à des rats et ont montré 4 semaines après, alors que les

rats ne sont pas encore protéinuriques, qu'ils ne présentent des anticorps que contre le peptide L6 alors qu'au bout de 8 semaines ils ont des anticorps dirigés contre le domaine LBD II, III et IV au moment où les rats deviennent protéinuriques. De plus, les anticorps dirigés contre les domaines LBD II, III et IV sont mieux corrélés avec le niveau de protéinurie que contre le peptide L6. L'immunisation avec un peptide plus court L3 (résidu 1 à 120) induit des anticorps anti-mégaline mais une protéinurie faible et peu de dépôts. Le niveau d'anticorps anti-LBD mesuré en ELISA est alors de 60 à 80% et de 10 à 20% inférieur à celui obtenu après immunisation avec le peptide L6. Il y a donc une première immunisation contre ce peptide L6 en N-terminal qui n'induit pas encore la maladie et une seconde phase de « spreading » épitopique ou d'étalement intra-moléculaire des épitopes qui conduit aux symptômes (Shah et al., 2007).

Ce phénomène d'étalement intra-moléculaire des épitopes est décrit dans de nombreuses maladies auto-immunes où il est également associé à une aggravation de la maladie. Notamment chez l'homme dans une maladie auto-immune cutanée médiée par les IgG4 qui partage quelques similitudes avec la GEM : le pemphigus vulgaris. Dans cette maladie, les IgG4 sont dirigées contre une protéine la desmoglérine qui lie deux kératinocytes. Il a été montré comme dans la GEM que le changement de sous-classe IgG1 vers IgG4 est associé à une plus forte activité de la maladie (Warren et al., 2003).

De plus, à partir d'une population vivant au Brésil avec une forte incidence de la maladie il a pu être identifié des sujets porteurs d'anticorps, qui n'ont pas encore développé la maladie. Grâce à des constructions chimériques intégrant différents domaines de la desmoglérine, ils ont pu montrer que ces anticorps, non pathogènes reconnaissent un domaine en C-terminal et qu'au moment où les patients rentrent en phase active de la maladie le système immunitaire effectue un étalement intra-moléculaire des épitopes et l'apparition d'anticorps dirigés contre des domaines en N-terminal. Ces résultats ont été confirmés chez l'animal (Li et al., 2003).

Ce phénomène de « spreading » intra-moléculaire correspond à une aggravation de la maladie par un emballement du système immunitaire suite à une activation des lymphocytes B et T qui s'immunisent contre de nouveaux domaines d'une même molécule ou une molécule qui interagit (on parle alors de spreading inter-moléculaire). Dans un modèle d'encéphalite auto-immune chez la souris, le blocage de la co-stimulation B-T par un anticorps anti-CD154 qui bloque l'interaction CD40-CD154 peut spécifiquement bloquer ce phénomène de spreading et bloquer l'aggravation de la maladie (Howard et al., 1999).

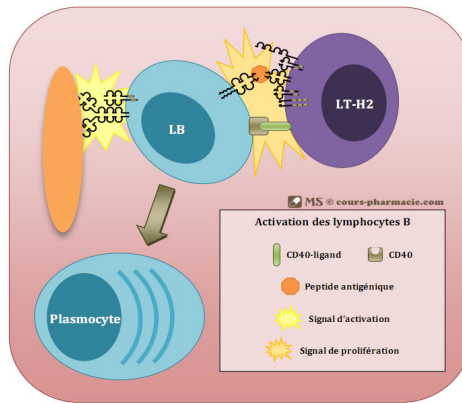


Illustration 6 : Co-stimulation B-T par l'activation du CD40-CD154

Nos résultats sur l'analyse des épitopes reconnus par les anticorps anti-PLA2R1 montrent qu'un phénomène similaire est probablement responsable des différentes poussées de la maladie dans les GEM.

1.2.2. Endopeptidase neutre (NEP)

Malgré les progrès réalisés dans la compréhension de la pathogénie de la GEM grâce au modèle de la néphrite de Heymann, aucun antigène podocytaire humain n'a été identifié avant 2002 puisque la mégaline n'est pas présente dans le glomérule humain. De plus les IgG4 qui prédominent dans la GEM humaine sont incapables d'activer le complément.

En 2002, l'équipe du Pr Ronco a identifié le premier antigène podocytaire impliqué dans la GEM humaine. Il s'agit d'un cas de GEM antenatale allo-immune sur une deuxième grossesse où une mère déficiente en endopeptidase neutre s'est immunisée contre cette protéine podocytaire lors de sa première grossesse et a transféré les anticorps anti-NEP à son deuxième enfant qui a présenté une GEM dès 34 semaines d'aménorrhée.

D'autres cas ont pu confirmer ces résultats et il a été montré que le développement de la protéinurie dépendait d'IgG fixant le complément plutôt que des IgG4 anti-NEP.

Seulement quelques familles ont été identifiées où les anticorps anti-NEP étaient à l'origine d'une GEM allo-immune mais aucun cas de GEM idiopathique n'a pu être identifié impliquant des anticorps anti-NEP (Debiec et al., 2002).

Ce résultat a permis d'apporter la preuve du concept qu'un antigène intra-podocytaire pouvait comme dans la néphrite de Heymann être à l'origine de la formation de complexes immuns in situ chez l'homme mais n'a pas apporté d'intérêt clinique en pratique.

1.2.3. PLA2R1

C'est en 2009 que l'équipe du Pr Salant en collaboration avec notre équipe a pu mettre en évidence que 70% des patients porteurs d'une GEM idiopathique étaient porteurs d'anticorps dirigés contre le récepteur de type M des phospholipases A2 (PLA2R1) (Beck et al., 2009).

Ils ont montré à partir d'extraits glomérulaires humains de rein sain que les patients porteurs d'une GEM idiopathique reconnaissent une protéine de 185 kDa en conditions non réductrices.

L'analyse protéomique de la protéine glycosylée et déglycosylée a révélé plusieurs protéines candidates exprimées sur le podocyte dont PLA2R1. Les analyses en western blot avec la forme recombinante de PLA2R1 ont confirmé que les patients porteurs d'une GEM idiopathique ont bien des anticorps dirigés contre PLA2R1 et que l'épitope reconnu est conformationnel puisque l'on perd la reconnaissance après réduction des ponts disulfures. L'immunoprécipitation des extraits glomérulaires avec un anticorps spécifique dirigé contre PLA2R1 a confirmé qu'il s'agit bien de la cible antigénique recherchée.

Enfin, ils ont montré une co-localisation des dépôts d'IgG4 et de PLA2R1 sur des coupes de reins de patients atteints d'une GEM idiopathique mais pas dans celles de reins de patients porteurs d'une GEM lupique.

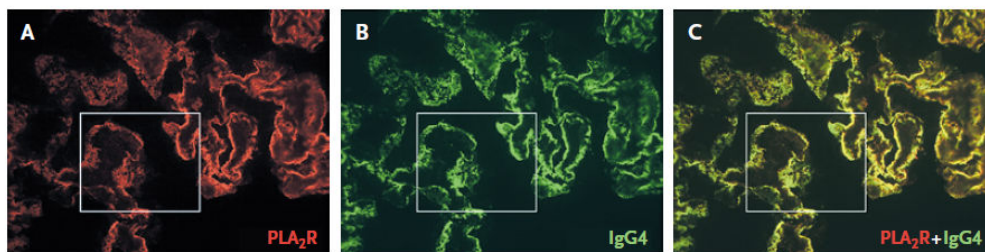


Illustration 7 : Co-localisation des dépôts d'IgG4 et du marquage de PLA2R1 en microscopie confocale d'après (Beck et al., 2009)

Ils ont de plus démontré que les IgG4 sont la sous-classe prédominante mais non exclusive.

Depuis, de nombreuses études ont confirmé ce résultat et montré que PLA2R1 est l'antigène majeur reconnu dans les GEM idiopathiques. Il existe une bonne corrélation entre le titre d'anticorps anti-PLA2R1 et l'activité de la maladie et plusieurs cas de récurrence de GEM après transplantation associés à une augmentation du titre d'anticorps anti-PLA2R1 ont été décrits

suggérant un rôle pathogène des anticorps anti-PLA2R1 mais aucune preuve *in vivo* ou *in vitro* n'a été apportée.

La plupart des études confirment que les anticorps anti-PLA2R1 sont impliqués dans 70 à 80% des GEM idiopathiques, il reste donc environ 20% des GEM idiopathiques où aucun anticorps n'est caractérisé.

1.2.4. Autres antigènes intra-podocytaires associés à la GEM

D'autres antigènes podocytaires ont été identifiés. Prunotto et al. décrivent en 2010 la présence d'anticorps circulants dirigés contre l'aldose réductase (AR) et contre la manganèse superoxide dismutase (SOD2) chez 24 patients porteurs d'une GEM idiopathique.

Comme pour PLA2R1, des dépôts d'AR et de SOD2 sont retrouvés dans les biopsies des patients porteurs d'une GEM et non sur du rein sain (on retrouve également des dépôts d'AR sur des biopsies de patients porteurs de néphropathie à IgA, de formes secondaires de GEM ou de diabète de type II). En microscopie électronique, AR et SOD2 sont localisés au niveau du cytoplasme des podocytes et le long de la membrane plasmique. La microscopie confocale montre que les dépôts d'AR et de SOD2 co-localisent avec les dépôts d'IgG4 et de C5b9 le long de la membrane basale glomérulaire. De plus l'élution des IgG à partir de biopsies de patients porteurs de GEM avec anticorps anti-AR et anti-SOD2 reconnaissent en condition réductrice 8 protéines différentes issues d'un lysat podocytaire dont AR, SOD2 et la vimentine. En conditions non réductrices, 3 nouvelles bandes apparaissent à 200, 170 et 155 kDa.

AR et SOD2 sont des protéines podocytaires cytoplasmiques qui sont exprimées sur la membrane plasmique dans des lignées de podocytes humains immortalisés. L'expression sur la membrane plasmique de SOD2 est augmentée *in vitro* en réponse à l'exposition de peroxide d'hydrogène (H₂O₂) (Prunotto et al., 2010).

Un autre antigène cytoplasmique avait déjà été identifié dans les GEM il s'agit de l' α -énolase, mais les anticorps anti- α -énolase ne sont pas spécifiques de la GEM, on en retrouve également dans les vascularites à ANCA (Moodie et al., 1993) et au cours d'infection (Terrier et al., 2007).

En 2012, Murtas et al. ont recherché dans une cohorte de 186 patients porteurs d'une GEM la présence d'anticorps dirigés contre les cibles décrites : PLA2R1, NEP, AR, SOD2 et α -énolase. Des anticorps anti-PLA2R1 sont retrouvés chez 60% des patients de cette cohorte, aucun anticorps anti-NEP n'est retrouvé et 43% ont des anticorps anti-AR, 28% des anti-

SOD2 et 43% des anti- α -énolase. Dix-neuf patients étaient porteurs des 4 anticorps dirigés contre les 4 antigènes cités, 25 contre 3 antigènes, 55 contre 2, 50 contre un antigène et pour 37 patients aucun anticorps n'a pu être identifié. Chez ces patients qui n'ont aucun auto-anticorps caractérisé, la protéinurie à un an est inférieure à celle du groupe de patients avec des auto-anticorps caractérisés (Murtas et al., 2012).

La co-existence chez un même patient de plusieurs anticorps dirigés contre des protéines podocytaires suggère un mécanisme physiopathologique en plusieurs étapes dirigé contre différentes cibles podocytaires induisant sa défaillance.

1.2.5. THSD7A

En 2010, Beck et al. identifient en western blot un patient présentant un cancer de la prostate deux ans avant l'apparition d'un syndrome néphrotique lié à une GEM, et porteur d'anticorps dirigés contre une protéine d'environ 250 kDa contenue dans un extrait glomérulaire humain qui n'est pas PLA2R1 (Beck, 2010).

Nous avons également pu identifier un patient co-infecté VIH/VHC avec une charge virale positive pour le VHC qui présentait des anticorps dirigés contre une protéine de 250 kDa contenue dans un extrait glomérulaire humain qui n'est pas PLA2R1.

Nous avons alors testé une nouvelle cohorte de Hambourg et identifié 5 nouveaux patients GEM capables de reconnaître cette protéine de 250 kDa et 9 nouveaux patients dans une cohorte américaine.

Nous avons dans un premier temps testé la reconnaissance de ce sérum contre les paralogues de PLA2R1 : le récepteur mannose du macrophage (1), le récepteur Endo-180 (MRC2) et le récepteur des cellules dendritiques (DEC-205, LY75) mais sans réactivité. Nous avons alors protéolysé l'extrait glomérulaire à la trypsine avec et sans N-glycopeptidase F. Les fragments ainsi obtenus ont été analysés en spectrométrie de masse et nous avons pu définir une liste de protéines candidates. Les protéines ont alors été sélectionnées en fonction de leur taille et leur présence supposée dans le glomérule. Ainsi, comme pour PLA2R1, la Trombospondine de type 1 (THSD7A) ???? comme étant la cible antigénique de ces anticorps.

Comme pour PLA2R1 la sous-classe IgG4 est la sous-classe prédominante. Le titre d'anticorps semble bien corrélé à l'activité de la maladie et THSD7A co-localise avec les dépôts d'IgG dans la biopsie rénale des ces patients. Les IgG éluées de la biopsie rénale reconnaissent THSD7A.

Aucun patient testé ne présente les deux types d'anticorps (anti-PLA2R1 et anti-THSD7A) et les caractéristiques cliniques semblent comparables entre les deux groupes.

Au total, 6 patients GEM de la cohorte européenne sur 44 n'ayant pas d'anticorps anti-PLA2R1 ont été identifiés avec des anticorps anti-THSD7A et aucun patient sur les 74 testés avec anticorps anti-PLA2R1. Sur la cohorte américaine : 9 patients GEM sur 110 testés sans anticorps anti-PLA2R1 ont des anticorps anti-THSD7A et aucun sur les 255 patients testés avec des anticorps anti-PLA2R1. Soit entre 2 à 5% des GEM ont des anticorps anti-THSD7A. (Tomas et al. NEJM 2014 accepté).

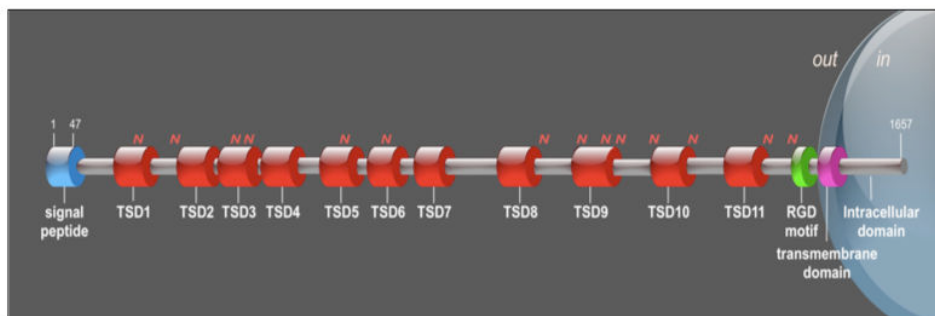


Illustration 8 : Structure de THSD7A d'après (Thomas et al., NEJM accepté)

1.2.6. Formes secondaires

Alors que des cibles antigéniques glomérulaires ont été décrites dans les formes primaires, le mécanisme associé aux formes secondaires semble être lié à des dépôts subépithéliaux de complexes immuns circulants bien que des antigènes glomérulaires ont été identifiés notamment dans le lupus.

a. Bovine Serum Albumin cationique

En 2011, l'équipe du Pr Ronco a montré chez 11 patients porteurs d'une GEM idiopathique dont 4 enfants, des anticorps anti-Bovine Serum Albumin (BSA) circulants associés à de la BSA circulante. La BSA purifiée à partir du sérum des patients migre dans la gamme basique de pH pour les enfants, alors que pour les adultes elle migre dans la gamme neutre comme la BSA native. Ils retrouvent également des dépôts de BSA cationique (cBSA) dans la biopsie des 4 enfants atteints de GEM (alors que les dépôts de PLA2R1 sont absents) qui co-localisent avec les dépôts d'IgG. L'élution des IgG montre qu'elles reconnaissent spécifiquement la BSA.

LA BSA cationique pourrait être trappée dans la membrane basale glomérulaire (anionique) de ces enfants et induire la formation de complexes immuns in situ. L'éviction de la BSA du régime alimentaire de ces enfants a permis une rémission du syndrome néphrotique associé pour un des patients qui a été suivi à une baisse du titre d'anticorps anti-BSA (Debiec et al., 2011a).

Ces observations ont été reproduites dans un modèle de souris BALB/c immunisées avec 0.2 mg de BSA cationique associée à de l'adjuvant de Freund. Un autre groupe est constitué de souris SCID immunisées avec la cBSA selon le même protocole. Quatre semaines après l'immunisation les souris BALB/c présentent des dépôts d'IgG le long de la membrane basale glomérulaire ainsi qu'une protéinurie et une élévation des IgG1 significativement supérieure aux IgG2a (suggérant une réponse immunitaire de type Th2). Ces résultats ne sont pas reproduits dans le groupe de souris SCID.

Afin de déterminer le rôle des anticorps circulant anti-BSA, le sérum des souris BALB/c et SCID immunisées avec la cBSA est transféré à des souris SCID. Les souris SCID ayant reçu le sérum des souris BALB/c immunisées par de la cBSA présentent une protéinurie persistante 120h après le transfert, associé à des dépôts d'IgG (à un niveau plus faible que les souris BALB/c immunisées avec la cBSA). Elles présentent également des dépôts de C3, C4 et de C1q, une augmentation de la production de superoxyde anionique associée à une augmentation du nombre de cellules apoptotiques et une activation de la voie NF- κ B. Alors que les souris transférées avec le sérum de souris SCID immunisées avec de la cBSA ne présentent aucun dépôt.

De plus le transfert des splénocytes de souris BALB/c et SCID immunisées avec de la cBSA n'induit aucun dépôt. Ces résultats de transfert montre que les IgG ont un rôle pathogène direct dans la GEM secondaire à l'immunisation par la cBSA.

La formation des lésions passe donc ici par une activation du complément, la production de superoxydes, l'apoptose des cellules glomérulaires et l'activation d'une réponse inflammatoire (Wu et al., 2012).

Mannik et al. ont décrit la cinétique de la formation des dépôts dans un modèle de rats immunisés à la BSA cationique radiomarkée. En microscopie électronique, des dépôts de BSA marquée sont retrouvés rapidement après l'injection en subendothélial et subépithélial, à un point plus tardif, seuls les dépôts subépithéliaux persistent. Après plusieurs injections, de la BSA marquée séquestrée dans d'autres tissus est relarguée contribuant à la persistance des dépôts glomérulaires (Mannik et al., 1991).

La GEM associée à la BSA cationique constitue un modèle d'antigène «planté» dans la membrane basale glomérulaire.

b. GEM secondaires aux médicaments

Récemment, Debiec et al. ont décrit un cas de GEM secondaire à un mécanisme d'allo-immunisation chez un enfant de 5 ans porteur d'une mucopolysaccharidose de type VI due à un déficit en aryl sulfatase B (ASB). Le traitement par la protéine recombinante déficiente a induit 16 mois après son introduction un syndrome néphrotique avec une GEM à la biopsie rénale (avec une prédominance d'IgG4). Le double marquage en immunofluorescence a révélé que les dépôts contenaient la protéine ASB recombinante qui co-localise avec les dépôts d'IgG. L'élution de ces IgG a montré qu'elles étaient dirigées contre la protéine ASB. L'arrêt du traitement a induit la rémission du syndrome néphrotique. Ce traitement a pu être repris en co-administration avec des corticoïdes, du rituximab, des IVIg et du méthotrexate. Ce cas illustre comment un antigène exogène (médicament) peut induire une GEM secondaire à un mécanisme d'allo-immunisation (Debiec et al., 2014).

Le mécanisme qui induit une GEM secondaire à l'exposition au mercure reste incertain. La maladie auto-immune induite par le mercure chez la souris est caractérisée par une activation polyclonale des lymphocytes B et T, par une augmentation des IgG et des IgE sériques, par la production d'anticorps anti-nucléaires et par la formation et les dépôts de complexes immuns dans le rein (Abedi-Valugerdi et al., 1997; Haggqvist and Hultman, 2003; Hua et al., 1993).

c. GEM Lupique

Comme nous l'avons vu, le lupus est en partie lié à une dérégulation de l'apoptose avec l'exposition au système immunitaire d'antigènes cryptiques.

Deux hypothèses sont avancées pour expliquer les glomérulonéphrites lupiques : l'atteinte rénale peut-être secondaire à la toxicité cellulaire de complexes immuns circulants ou à la fixation d'anticorps à des antigènes glomérulaires. L'inflammation intrarénale est provoquée par le recrutement des protéines du complément ainsi que de cellules inflammatoires, reconnaissant la partie Fc des immunoglobulines déposées dans le parenchyme rénal.

La caractérisation de certaines cibles antigéniques des autoanticorps impliqués dans la néphropathie lupique a permis de mettre en évidence des autoanticorps pathogènes ayant une réactivité croisée avec des constituants glomérulaires tels que la laminine ou les héparanes

sulfates (Sabbaga et al., 1990) ou reconnaissant des nucléosomes fixés sur la membrane glomérulaire (Kramers et al., 1994) (nucléosome et double brin d'ADN) (Berden, 1997).

Certains auteurs considèrent que la charge du complexe antigène-anticorps pourrait expliquer la localisation subendothéliale ou subépithéliale des dépôts ce qui expliquerait pourquoi certains patients font des formes prolifératives ou extra-membraneuses (Beck, 2010).

Kalaaji et al. ont démontré chez la souris (NZBxNZW)F1 en combinant la microscopie électronique de transmission et la microscopie électronique couplée à un immunomarquage, que les anticorps néphritogènes de la souris reconnaissent au sein du glomérule des particules de chromatine relarguées par les cellules apoptotiques (Kalaaji et al., 2006). A partir du sérum de 3 patients lupiques porteurs d'anticorps anti-DNA et présentant une glomérulonéphrite lupique l'un de classe V et les deux autres patients de classe IV, ils ont montré chez l'homme que de la chromatine extra-cellulaire est présente dans les glomérules de ces patients et que cette chromatine colocalise avec les anticorps présents dans les dépôts denses au sein de la membrane basale. Les anticorps anti-DNA seraient donc dirigés contre les nucléosomes relargués par les cellules apoptotiques glomérulaires et induiraient ainsi la glomérulonéphrite lupique observé (Kalaaji et al., 2007).

d. GEM secondaire à l'hépatite B

D'autres antigènes cationiques ont été décrits comme pouvant être des antigènes plantés dans la membrane basale glomérulaire comme l'antigène « e » du virus l'hépatite B avec une fixation secondaire des anticorps in situ d'antigènes non « natifs » (Beck, 2010).

e. GEM secondaire au cancer

De nombreux cas cliniques de traitement d'une tumeur avec résolution d'un syndrome néphrotique lié à une GEM ont été décrits. La physiopathologie de la GEM dans ce contexte n'est pas connue. Costanza et al. ont décrit des dépôts d'antigènes tumoraux type ACE (Antigène Carcino-Embryonnaire) dans des biopsies rénales de patients porteurs d'une GEM associée à des cancers colo-rectaux (Costanza et al., 1973).

Couser et al. ont décrit en 1974 le cas d'un patient âgé de 60 ans présentant un syndrome néphrotique secondaire à une GEM associée à un carcinome du colon et des titres élevés d'ACE. Aucun dépôt d'ACE n'a pu être mis en évidence dans sa biopsie rénale. Par contre, ils ont pu mettre en évidence que son sérum prélevé une semaine après la résection de sa

tumeur était capable de fixer sur sa biopsie rénale après élution, un antigène déposé le long de la membrane basale glomérulaire. Cette fixation est perdue si l'on pré-incube le sérum avec un lysat de la tumeur du patient. Par contre, la fixation persiste après incubation avec un lysat issu de colon normal, d'un polype colique, du foie ou de la rate. Malgré la résection de la tumeur, le patient est resté néphrotique, il a bénéficié d'une nouvelle ponction biopsie rénale 4 mois après l'intervention qui ne retrouve plus de dépôt. Ce cas illustre le fait qu'un néo-antigène tumoral peut être à l'origine de complexes immuns capables de se déposer dans la membrane basale glomérulaire (Couser et al., 1974).

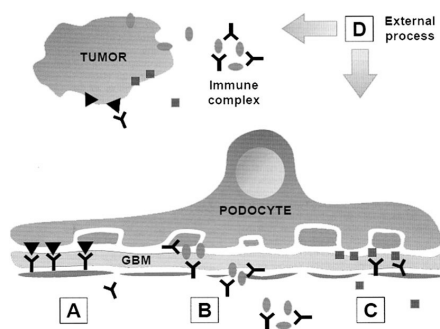


Illustration 9 : Mécanismes pouvant être impliqués dans les GEM secondaires aux cancers. (A) Mimétisme moléculaire entre un antigène tumoral et un antigène podocytaire. (B) Complexes immuns se forment sur le versant endothéliale, se dissocient et se reforment dans la membrane basale glomérulaire. (C) Antigène tumoral « planté » selon sa taille et sa charge dans la membrane basale glomérulaire. (D) Processus extérieur type infection ou oncogène viral qui modifie le système immunitaire. D'après (Cambier and Ronco, 2012)

Le rôle de PLA2R1 dans l'induction de la sénescence pourrait expliquer le lien entre GEM et cancer. En effet, nous verrons plus loin que PLA2R1 joue un rôle clé dans la sénescence induite par un oncogène suppresseur de tumeur. La déplétion de PLA2R1 permet l'échappement à l'Oncogen Induced Senescence (OIS) ainsi que la transformation de kératinocytes et des HMEC exposés à l'oncogène Ras (Vindrieux et al., 2013). In vivo, cela se traduit par l'apparition plus rapide de papillomes chez la souris PLA2R1 ^{-/-} dans un modèle de tumorigénèse induite chimiquement (Vindrieux et al., 2013). Ainsi il pourrait y avoir au cours de stades pré-cancéreux une surexpression de PLA2R1 qui pourrait induire dans un contexte inflammatoire l'activation du système immunitaire et la formation d'anticorps anti-PLA2R1. Cette hypothèse ne semble malheureusement pas vérifiée. En effet, Timmermans et al. ont repris une cohorte de 91 patients présentant une GEM prouvée par

biopsie rénale recrutés entre 1980 et 2011. Dans cette cohorte, 64 patients (70%) ont des anticorps anti-PLA2R1 dosés en western blot. Seize patients (18% de la cohorte) ont présenté au moment de leur prise en charge ou au cours de leur suivi un cancer dont 15 présentaient un carcinome. L'incidence des cancers dans le groupe avec anticorps anti-PLA2R1 est de 9% contre 37% dans le groupe PLA2R1-, avec un « Hazard Ratio » pour le cancer de 9.7 (95% CI 2.3-40.5) dans le groupe PLA2R1- contre 0.1 (95% CI 0.025-0.430) dans le groupe PLA2R1+. La survie sans cancer est de 26 ans dans le groupe PLA2R1+ contre 15 ans dans le groupe PLA2R1-, cette survie est statistiquement différente (Timmermans et al., 2013). Il n'y a donc pas d'association entre PLA2R1 et les GEM secondaires à un cancer.

Les formes secondaires liées au cancer semblent donc bien être comme pour le lupus et les thyroïdites un groupe indépendant des GEM avec anticorps anti-PLA2R1.

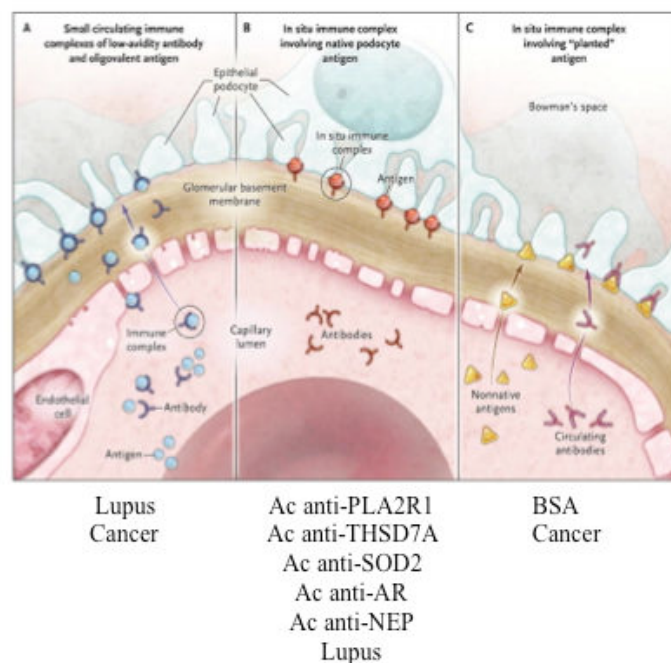


Illustration 10 : Mécanismes identifiés chez l'homme à l'origine des GEM

1.3. Récepteur PLA2R1 et Anticorps anti-PLA2R1

1.3.1. Structure et expression de PLA2R1

PLA2R1 est une glycoprotéine transmembranaire de 180 kDa appartenant à la superfamille des lectines de type C. Il a été cloné dans notre laboratoire en 1993 (Lambeau et al., 1994). PLA2R1 a été initialement purifié à partir du muscle squelettique de lapin d'où son nom récepteur de type M grâce à son affinité pour une phospholipase sécrétée de serpent appelée OS2 (*Oxyuranus scutellatus scutellatus* toxins). Il présente une structure composée de 10 domaines extracellulaires, d'un segment transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique d'une quarantaine d'acides aminés contenant un motif d'endocytose (Ancian et al., 1995b; Zvaritch et al., 1996). Depuis son extrémité N-terminale on distingue une région riche en cystéine (CysR), un domaine fibronectine de type II (FNII) et huit domaines distincts lectine de type C (CTLD).

PLA2R1 existe sous deux formes, une forme transmembranaire et une forme soluble. La forme soluble est clivée après le CTLD8, elle ne présente pas le domaine transmembranaire ni le domaine cytoplasmique. Elle peut être générée par épissage alternatif ou par protéolyse de la forme membranaire (Ancian et al., 1995b; Higashino Ki et al., 2002). Après transfection de la forme membranaire de PLA2R1 dans des cellules HEK 293 on retrouve la forme protéolysée dans le milieu de culture en grande quantité.

Trois autres récepteurs ont la même structure (avec un domaine CysR en N-terminal, un domaine FNII et 8 à 10 domaines CTDL) et forment un sous-groupe au sein de la superfamille des lectines de type C : le récepteur mannose du macrophage (MRC1), le récepteur Endo-180 (MRC2) et le récepteur des cellules dendritiques (DEC-205, LY75). Chez l'homme PLA2R1 est constitutivement exprimé dans le rein, le poumon, la rate, et le colon et dans certaines cellules fibroblastiques et immunitaires (East and Isacke, 2002). Cette expression tissulaire varie d'une espèce à l'autre, en effet la souris n'exprime pas PLA2R1 dans le rein ce qui est une limite du modèle animal. De plus, nous avons montré qu'environ un patient sur deux reconnaît le récepteur de souris en western blot alors que tous les patients reconnaissent le récepteur de lapin, ce qui ferait du lapin un bon modèle. Malheureusement, PLA2R1 n'est exprimé que dans le rein de lapin nouveau-né et l'expression du récepteur est perdue après quelques jours de vie ce qui limite également l'intérêt du lapin pour un modèle animal de GEM. Le récepteur humain et le récepteur de lapin ont une homologie de séquence de 85% alors que le récepteur humain et le récepteur de souris ont une homologie de séquence

de 74%.

1.3.2. Ligands de PLA2R1

Les PLA2 de venin de serpent et les PLA2 sécrétées (sPLA2) de mammifères sont des enzymes stables de 13 à 18 kDa qui hydrolysent spécifiquement les phospholipides pour libérer des acides gras et des lysophospholipides, deux précurseurs de la synthèse de nombreux médiateurs lipidiques (Lambeau et al., 1994). Ces enzymes ont été purifiées à partir de nombreux organes, pancréas, rate, poumon, plaquettes, sérum et liquide synovial de mammifère et à partir du venin d'insecte et de reptiles. Les PLA2 de venin de serpent jouent un rôle dans les mécanismes toxiques de défense, notamment la neurotoxicité, la myotoxicité ainsi que les effets pro-coagulants et pro-inflammatoires du venin (Kini and Evans, 1989; Vadas et al., 1989; Vadas et al., 1981). Ces différents effets apparaissent liés au niveau d'affinité de ces enzymes pour leurs récepteurs (Lambeau et al., 1991a; Lambeau et al., 1989; Lambeau et al., 1991b; Lambeau et al., 1990). Les sPLA2 de mammifères sont impliquées dans différentes fonctions biologiques comme la digestion, la respiration, la contraction du muscle strié, la fertilisation et la prolifération cellulaire (Nakajima et al., 1992; Sommers et al., 1992). On retrouve également une activité élevée sPLA2 dans le liquide synovial, le sérum et les lavages broncho-alvéolaires de patients présentant une arthrite, un choc toxique, une péritonite, dans le psoriasis, la pancréatite aiguë et certains tableaux de détresse respiratoire et la paludisme (Glaser et al., 1993; Mukherjee et al., 1992; Pruzanski and Vadas, 1991; Vadas et al., 1992; Vadas and Pruzanski, 1986). Ce niveau élevé de sPLA2 est souvent associé à une augmentation de TNF (tumor necrosis factor) et/ou d'IL1 (Glaser et al., 1993; Mukherjee et al., 1992; Pruzanski and Vadas, 1991).

Les propriétés de liaison des sPLA2 pour PLA2R1 sont variables selon les espèces. Il existe une douzaine de sPLA2 humaines ou de souris (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIB et otoconin-95) (Lambeau and Gelb, 2008; Murakami et al., 2010). Chez la souris, notre équipe a montré que sept de ces douze sPLA2 se lient à PLA2R1, ce qui renforce l'idée que les sPLA2 sont des ligands naturels de PLA2R1 (Rouault et al., 2007). Les propriétés de liaison des sPLA2 sur PLA2R1 restent à caractériser dans les autres espèces de mammifères, notamment chez l'homme.

On sait que PLA2R1, au moins dans certaines espèces, peut lier le collagène et certains sucres, suggérant que PLA2R1 pourrait avoir d'autres types de ligands endogènes, associés à différentes fonctions de type adhésion ou lectine (Ancian et al., 1995a; Rouault et al., 2007).

Les expériences de mutagenèse dirigée ont montré que le domaine fibronectine de type II lie le collagène de type IV (Ancian et al., 1995a), tandis que les domaines CTLD4-6 de PLA2R1 lient les sPLA2 et certains sucres, comme le mannose ou le glucose (Nicolas et al., 1995). La liaison des sPLA2 sur les domaines CTLD4-6 de PLA2R1 se fait cependant par interaction protéine-protéine (Rouault et al., 2007).

L'interaction sPLA2-PLA2R1 pourrait avoir des rôles opposés. La liaison sPLA2-PLA2R1 pourrait être un moyen efficace de stopper leur activité biologique, en inhibant leur activité enzymatique et en favorisant leur élimination du milieu extracellulaire. Il a été montré, *in vitro* que la liaison des sPLA2 au récepteur PLA2R1 soluble entraîne une inhibition de leur activité enzymatique, et leur liaison au récepteur conduit à leur inhibition et à leur internalisation et leur dégradation dans les lysosomes (Ancian et al., 1995a; Rouault et al., 2007; Zvaritch et al., 1996). Inversement, PLA2R1 pourrait relayer la transduction de certaines fonctions biologiques des sPLA2 en activant diverses voies de signalisation (Hanasaki and Arita, 2002).

1.3.3. Rôle de PLA2R1 dans l'inflammation

Plusieurs sPLA2 (IIA, V et X) ainsi que PLA2R1 sont exprimées dans les poumons (Lambeau and Gelb, 2008). Les sPLA2 IIA et X sont présentes dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) de patients souffrant d'asthme. Henderson et al. ont montré dans un modèle d'asthme induit par l'ovalbumine que les souris invalidées pour la sPLA2-X produisent moins d'icosanoïdes pro-inflammatoires et ont moins d'asthme (Henderson et al., 2007). Dans ce même modèle des souris invalidées pour PLA2R1 présentent une réponse inflammatoire plus intense. Les LBA des souris PLA2R1 *-/-* contiennent davantage de sPLA2 IIA et X et des concentrations plus élevées d'icosanoïdes et de cytokines Th2. L'augmentation de sPLA2 résulte d'une clairance et d'une dégradation réduite de ces sPLA2 (Tamaru et al., 2013). PLA2R1 a donc dans ce modèle un rôle anti-inflammatoire en inhibant l'activité des sPLA2 et en les éliminant du milieu extracellulaire.

L'administration de LPS à des souris sauvages induit un choc septique qui provoque la mort des animaux en 24 heures. Chez ces souris, d'importantes quantités de TNF α sont produites dans les poumons, la rate, le rein et l'utérus des tissus qui expriment la sPLA2 IIA. L'expression de PLA2R1 est également augmentée dans les cellules épithéliales des alvéoles pulmonaires et dans les lymphocytes spléniques des souris sauvages exposées au LPS (Yokota et al., 2000). Hanasaki et al. ont étudié le rôle du complexe sPLA2 IIA/PLA2R1 dans

la pathogenèse du choc septique. Ils ont montré que comme le LPS, la sPLA2 IB induit un choc septique lorsqu'elle est administrée à des souris préalablement sensibilisées à des doses subléthales de LPS. En revanche, les souris PLA2R1 -/- sont plus résistantes que les souris sauvages au choc septique, induit par le LPS ou par la sPLA2 IB (Hanasaki et al., 1997). Chez ces souris PLA2R1 -/- les concentrations plasmatiques de TNF α et d'IL-1 β induites par le LPS sont sensiblement réduites. PLA2R1 pourrait dans ce modèle relayer certains effets pro-inflammatoires des sPLA2 et participer via la production de cytokines pro-inflammatoires, à la progression du choc septique.

1.3.4. Rôle de PLA2R1 dans le cancer

L'équipe du Pr Bernard en collaboration avec notre équipe, a suggéré un rôle anti-tumoral de PLA2R1 lors du criblage génétique fonctionnel destiné à identifier les gènes contrôlant la sénescence cellulaire.

La sénescence est un arrêt irréversible de la prolifération cellulaire et constitue comme l'apoptose un mécanisme de défense anti-tumoral. Plusieurs mécanismes induisent l'entrée en sénescence d'une cellule : l'épuisement du pouvoir réplicatif des cellules par érosion des télomères (on parle de sénescence répllicative) ou suite à l'exposition à un stress oncogénique (on parle alors d'oncogene-induced senescence ou OIS).

Dans des cultures primaires de fibroblastes (WI38) et des cellules épithéliales mammaires (HMEC), Augert et al. ont montré une surexpression de PLA2R1 lorsque ces cellules rentrent en sénescence. La diminution d'expression de PLA2R1 par ARN interférence retarde l'entrée en sénescence, tandis que la surexpression de PLA2R1 induit la sénescence prématurée (Augert et al., 2009). L'effet pro-sénescence de PLA2R1 dépend de la production de radicaux oxygénés, de l'induction de dommages à l'ADN et de l'activation du gène suppresseur de tumeurs p53. Cet effet est perdu en délétant le domaine CTLD1 de PLA2R1 (Augert et al., 2013). Cet effet de la forme humaine de PLA2R1 pourrait expliquer pourquoi nous n'avons jamais pu obtenir de clone stable de cellule HEK transfectées par PLA2R1 alors que la transfection avec le récepteur de lapin n'est pas toxique pour la cellule.

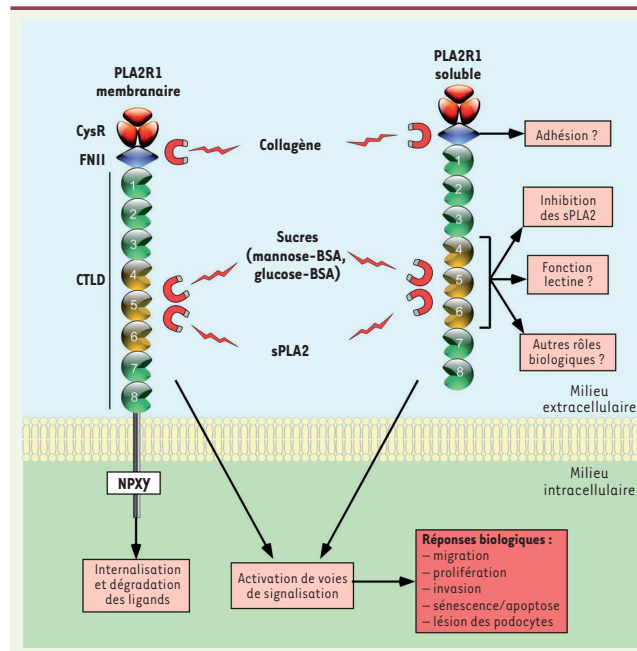


Illustration 11 : Structure schématique et fonctions possibles de PLA2R1.

1.3.5. Rôle de PLA2R1 dans le rein

Le rôle de PLA2R1 dans le rein n'est pas connu. PLA2R1 est présent dans les podocytes humains (Seitz-Polski et al., 2014). Il pourrait jouer un rôle de liaison au collagène IV de la membrane basale glomérulaire via son domaine FNII afin de maintenir la structure en liant les pieds des podocytes à la membrane basale glomérulaire ce qui expliquerait l'effacement des pieds des podocytes et la perte de perméabilité de la membrane basale glomérulaire lorsqu'un anticorps se lie à PLA2R1.

Skoberne et al. ont montré que des cellules HEK transfectées avec PLA2R1 fixaient mieux une matrice de collagène que ces mêmes cellules transfectées avec un vecteur vide. Alors que ces mêmes cellules transfectées avec PLA2R1 ou un vecteur vide fixent de la même façon une plaque sans collagène.

Ils ont ensuite étudié la fixation à une matrice de collagène de lignées de podocytes humains avec du sérum de patients contenant ou non des anticorps anti-PLA2R1. Ils ont montré que les podocytes incubés avec du sérum de donneur sain fixaient mieux la matrice de collagène que ceux incubés avec du sérum de patients porteurs d'anticorps anti-PLA2R1. La diminution de l'adhésion des podocytes est majorée avec du sérum de patient fortement protéinurique contenant un titre plus élevé d'anticorps anti-PLA2R1 (Skoberne et al., 2014).

une glomérulopathie. La spécificité du test est de 100% avec une sensibilité de 52% (Hoxha et al., 2011).

c. Tests ELISA

Hofstra et al. ont décrit le premier test ELISA validé sur une cohorte de 117 patients porteurs d'une GEM utilisant la forme soluble de PLA2R1. Ils comparent les performances du test ELISA qui a une sensibilité de 72% et du kit d'immunofluorescence qui a une sensibilité de 74% sur cette cohorte (Hofstra et al., 2012).

Nous avons participé à la validation du test ELISA commercial Euroimmun en fournissant des sérums de patients (Dahnrich et al., 2013). Ce test a montré sur une cohorte de 200 patients avec des anticorps anti-PLA2R1 mesuré par immunofluorescence indirecte que l'ELISA avec un anti-IgG4 et un anti-IgG totales avaient des sensibilités respectives de 98.5% et de 96.5% et une spécificité de 99.9%.

1.3.7. Anticorps et activité de la maladie

Plusieurs études ont montré que le titre d'anticorps anti-PLA2R1 est corrélé à l'activité de la maladie. Hofstra et al. ont montré sur 18 patients avec différents sera collectés à différents moment de la maladie (n=54) une très bonne corrélation entre les phases actives et les phases de rémission de la maladie et le titre d'anticorps. Dans la description de leur test ELISA, ils ont également montré une bonne corrélation entre le titre d'anticorps anti-PLA2R1 et la protéinurie après ajustement de la fraction excrétée d'IgG. Cette corrélation est encore meilleure si l'on dose les IgG4 spécifiques dirigées contre PLA2R1 (Hofstra et al., 2012).

Dans notre cohorte, nous avons également montré une corrélation des IgG4 avec le statut de la maladie. Ce résultat s'explique probablement par un changement de sous-classe des IgG1 vers les IgG4 au cours de la maladie comme décrit sur l'analyse histologique des sous-classes d'IgG (Huang et al., 2013). Nous avons dosé en ELISA les différentes sous-classes d'IgG dirigées contre PLA2R1. Dans le groupe de maladie active les patients avec une activité IgG4 sont prédominants alors que les patients en rémission ont un titre persistant d'IgG1 et peu d'IgG4 dosables.

Cette corrélation entre le titre d'anticorps et l'activité de la maladie est en faveur d'un rôle pathogène des anticorps anti-PLA2R1.

1.3.8. Epitopes reconnus par les anticorps anti-PLA2R1 dans les GEM idiopathiques

Beck et al. avaient montré que les anticorps anti-PLA2R1 reconnaissaient au sein de PLA2R1 un épitope conformationnel puisque la reconnaissance de la molécule est perdue en conditions réductrices (Beck et al., 2009).

Behnert et al. ont décrit plusieurs épitopes reconnus par les anticorps anti-PLA2R1 définissant un « spreading » ou étalement intra-moléculaire des épitopes. Ils ont pour cela synthétisé des peptides séquentiels de PLA2R1 se chevauchant de 5 acides aminés déposés sur une membrane de cellulose utilisant la technologie SPOT. Les membranes étaient ensuite bloquées et incubées avec du sérum de patients porteurs d'anticorps anti-PLA2R1 dilué au 1:100 et révélé avec un anti-IgG total. Ils ont ainsi pu identifier 7 peptides contenu dans les domaines : CysR, CTLD1, CTLD2, CTLD6, entre le CTLD6 et 7, CTLD8 et entre le CTLD8 et le segment transmembranaire en utilisant 10 sera différents de patients porteurs d'anticorps anti-PLA2R1. Mais l'utilisation de ces peptides dans un test ELISA ne montre pas de signal différent entre les patients avec anticorps anti-PLA2R1, sans anticorps anti-PLA2R1 et avec les contrôles.

L'ensemble des peptides est capable de faire compétition à la fixation d'un sérum de patient sur la molécule PLA2R1 avec une réponse dose-dépendante. Individuellement seuls les peptides 3 et 4 (contenus respectivement dans le CTLD2 et le CTLD6) sont capables de faire compétition (Behnert et al., 2013).

Kao et al. ont montré en utilisant 14 sera de patients avec des anticorps anti-PLA2R1 un épitope immunodominant à cheval sur 3 domaines : CysR, FNII et CTLD1. Ils ont pour cela transfectés des cellules HEK 293 avec 10 constructions de PLA2R1 comprenant : le domaine CyR, les domaines Cys-FNII, les domaines CysR-FNII-CTLD1, les domaines CysR-FNII-CILD1 à 2, les domaines CysR-FNII-CILD1 à 3, les domaines CysR-FNII-CILD1 à 4, les domaines CysR-FNII-CILD1 à 5, les domaines CysR-FNII-CILD1 à 6, les domaines CysR-FNII-CILD1 à 7 et les domaines CysR-FNII-CILD1 à 8.

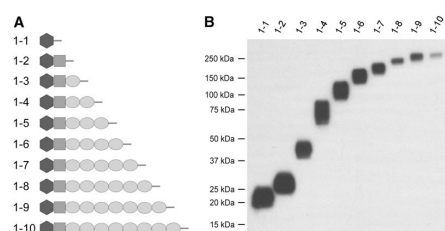


Illustration 13 : Constructions et expression des mutants de PLA2R1 utilisés d'après (Kao et al., 2014)

L'expression de ces 10 mutants est bonne et ils ont montré que les sera de patients avec anticorps anti-PLA2R1 testés reconnaissent tous les mutants seul le domaine CysR isolé et la mutant CysR-FNII ne sont pas reconnus.

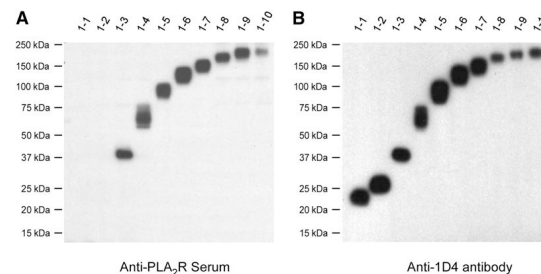


Illustration 14 : Reconnaissance par un sérum de patient porteur d'anticorps anti-PLA2R1 des mutants de PLA2R1.

Ils montrent également que tous les sera (n=10) reconnaissent la construction CysR-FNII-CTLD1. Ils introduisent ensuite un site de digestion par la thrombine dans la construction CysR-FNII-CTLD1 entre les domaines CysR-FNII et FNII-CTLD1 afin d'obtenir des domaines isolés, la reconnaissance est alors perdue après coupure à la thrombine. Ils concluent donc que l'épitope immunodominant se situe à cheval sur ces 3 domaines (Kao et al., 2014).

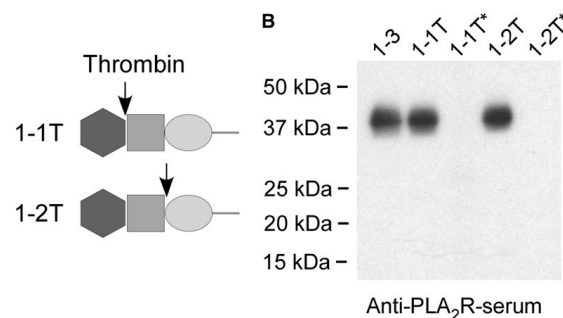


Illustration 15 : Site de coupure à la thrombine et perte de la reconnaissance sur domaine isolé.

Quelques semaines plus tard, Fresquet et al. montrent à partir de 5 sera de patients porteurs d'anticorps anti-PLA2R1 et de 3 constructions de PLA2R1 contenant le domaine CysR, du domaine CysR au CTLD1 et du domaine CysR au CTLD2 que le domaine CysR contient les épitopes majeurs reconnus par les anticorps anti-PLA2R1.

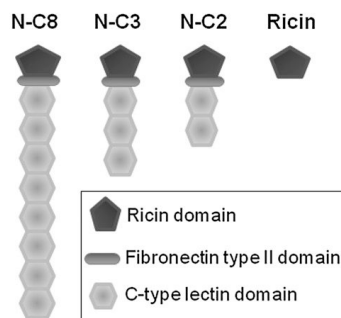


Illustration 16 : Schéma des constructions utilisées par Fresquet et al. pour caractériser les domaines reconnus de PLA2R1 à partir d'un pool de 5 sera de patients (Fresquet et al., 2014).

Ils identifient en spectrométrie de masse 2 peptides contenus dans le domaine CysR suite à des coupures à la trypsine, capables de faire compétition avec la fixation des anticorps sur PLA2R1 et sur un fragment contenant les domaines CysR-FNII-CTLD1.

Un de ces peptides aurait une homologie de séquence avec une enzyme la D-alanin-D alanine carboxypeptidase présente chez de nombreuses bactéries notamment le clostridium. Un mécanisme de mimétisme moléculaire pourrait alors expliquer l'immunisation contre le domaine CysR de PLA2R1. Ils signalent également que 10% de patients reconnaissent un autre épitope présent dans les domaines CTLD4 à 8 (Fresquet et al., 2014).

Grâce à une série de 9 mutants de délétions de PLA2R1, nous avons pu cribler le sérum de 50 patients porteurs d'anticorps anti-PLA2R1 et identifier 3 domaines reconnus par les anticorps anti-PLA2R1 : le domaine CysR, CTLD1 et CTLD7.

Nous avons également pu montrer que l'étalement intra-moléculaire des épitopes au cours du temps par le passage d'un profil CysR à un profil CTLD7 était associé à une aggravation de la maladie et inversement (cf Résultats).

Nos résultats permettent donc de compléter les résultats obtenus sur la caractérisation des domaines de PLA2R1 reconnus par les anticorps anti-PLA2R1.

1.4. Prise en charge de la GEM

1.4.1. Facteurs pronostics

a. Données cliniques et biologiques

Avant la découverte des anticorps anti-PLA2R1 des facteurs pronostics tels que l'âge, le sexe masculin étaient décrits. En 1993, Schieppati et al. ont montré sur 100 patients porteurs d'une GEM pris en charge entre 1974 et 1992 avec un suivi minimum de 6 mois ne recevant qu'un traitement symptomatique, que les patients de moins de 50 ans ont un meilleur pronostic ainsi que les femmes (62% des femmes et 59% des hommes ont une rémission partielle ou complète) (Schieppati et al., 1993).

Cattran et al. ont montré que l'évolution de la protéinurie et de la créatininémie dans les six premiers mois de la prise en charge était un élément important pour prédire l'évolution à long terme de la maladie. Il ont analysé une cohorte de 184 patients canadiens et confirmé sur une cohorte de 101 patients italiens et 78 patients finlandais, un modèle prédictif permettant de prédire le risque d'insuffisance rénale chronique à partir de la protéinurie persistante et de la pente de la clairance de la créatininémie dans les 6 premiers mois de la prise en charge, le Tronto Risk score :

Ce risque : $R = e^x / 1 + e^x$

$x = K1 + K2 \times PP + K3 \times (\text{pente de la clairance}) + K4 \times \text{Clairance créatininémie initiale}$

K1 : 1.26

K2 : 0.3

PP : Protéinurie Persistante g/j

Pente de clairance (Cl): (Cl de la créatininémie finale - Cl de la créatininémie initiale) / 6 mois : ml/min/mois

K3 : -0.3

K4 : -0.05

Un patient avec une protéinurie persistante à 3.5 g/j avec une clairance qui ne baisse pas a 6% de risque de progresser vers une insuffisance rénale chronique, un patient qui a une protéinurie persistante à 12g/j avec une baisse de 18 points de clairance a un risque de progression de 72%.

Ce modèle a une sensibilité de 83%, une spécificité de 86% une valeur prédictive positive de 67% et une valeur prédictive négative de 94%. La précision de ce modèle de prédiction est de 85% (Cattran et al., 1997).

b. Marqueurs urinaires

D'autres études ont identifié des marqueurs urinaires pouvant prédire une évolution péjorative de la maladie : le C5b9 urinaire, qui témoignerait d'une activation locale du complément (Brenchley et al., 1992), ainsi que la β 2-microglobuline et l' α 1-microglobuline (Branten et al., 2005). Van den Brand et al. ont comparé la valeur pronostique du dosage de la β 2-microglobuline et de l' α 1-microglobuline sur une cohorte de 104 patients présentant une GEM idiopathique suivis entre 1995 et 2008 sur la progression vers l'insuffisance rénale définie par une augmentation de la créatinémie de 50% ou de 25% pour une créatininémie $>135 \mu\text{mol/L}$. Quarante-quatre patients ont progressé. La comparaison de la valeur prédictive du Toronto Risk et du dosage des marqueurs urinaires est comparable pour prédire le risque de progression (van den Brand et al., 2012).

c. Le titre d'anticorps anti-PLA2R1

Le titre d'anticorps anti-PLA2R1 semble un facteur pronostic important à prendre en compte dans la prise en charge des patients.

Hofstra et al. sont les premiers à montrer sur une cohorte de 79 patients qu'un titre faible d'anticorps (correspondant au premier tercile de leur cohorte) est plus fréquemment associé à une rémission spontanée de la maladie qu'un titre modéré à fort (correspondant au 2^{ème} et au 3^{ème} tercile de leur cohorte) (Hofstra et al., 2012).

Ensuite, Kanigicherla et al. ont montré sur une cohorte de 82 patients que les patients qui présentaient un titre élevé d'anticorps (correspondant au 3^{ème} tercile de leur cohorte) avaient une moins bonne survie rénale avec une incidence statistiquement plus élevée de doublement de la créatininémie. Ils ont également montré dans cette cohorte que le titre d'anticorps anti-PLA2R1 était statistiquement lié au HLA DQA1*0501 et au HLA DQB1*0201. Le défaut de cette étude était que le premier sérum testé était en moyenne obtenu 30 mois après le diagnostic de la maladie (Kanigicherla et al., 2013).

Hoxha et al. ont montré sur une cohorte de 133 patients suivis au maximum pendant 2 ans, que les patients qui rentraient en rémission après plus 12 mois de suivi avaient de façon

significative un taux d'anticorps anti-PLA2R1 plus faible et l'analyse multivariée tenant compte de l'âge, du sexe masculin, d'un taux de créatinémie plasmatique élevé, d'une protéinurie élevée et de la mise en route d'un traitement immunosuppresseur, confirme qu'un titre élevé d'anticorps anti-PLA2R1 est un facteur de risque indépendant de la persistance d'une maladie active (Hoxha et al., 2014).

Cet effet des anticorps anti-PLA2R1 au moment de la prise en charge sur le pronostic n'est pas retrouvé dans toutes les cohortes qui l'ont mesuré.

et al. ont analysé l'impact du titre d'anticorps anti-PLA2R1 avant et après la mise en route d'un traitement immunosuppresseur chez 48 patients dont 22 sont traités par mycophénolate mofétil (MMF) et 26 sont traités par cyclophosphamide. Trente-quatre de ces patients ont des anticorps anti-PLA2R1 au moment de la prise en charge. Le titre d'anticorps initial n'est pas prédictif de la réponse au traitement immunosuppresseur, mais le titre en fin de traitement est prédictif de l'évolution à long terme. La survie en rémission des patients qui ont négativé leur titre d'anticorps anti-PLA2R1 à la fin du traitement est statistiquement meilleure que celle des patients qui ont un titre d'anticorps positif en fin de traitement. Il n'y a pas de différence significative entre le groupe des patients traités par MMF ou cyclophosphamide pour la négativation des anticorps anti-PLA2R1 à M2 et M6 par contre à M12 il y a plus de patients qui ont obtenu un titre négatif d'anticorps anti-PLA2R1 dans le groupe traité par cyclophosphamide que dans le groupe traité par MMF ($p=0.02$ $n=33$) (Bech et al., 2014).

d. La nature des anticorps anti-PLA2R1

Bien que le titre d'anticorps anti-PLA2R1 soit bien corrélé à l'activité de la maladie et que ce titre est un bon marqueur prédictif de l'évolution de la maladie, nous avons identifié dans notre cohorte plusieurs cas de patients présentant un titre d'anticorps élevé en rémission (Seitz-Polski et al., 2014). Nous verrons dans les résultats que la nature des anticorps définie par leur spécificité antigénique ainsi que leur sous-classe est associée à l'activité de la maladie. Les IgG4 sont prépondérantes en phase active de la maladie ainsi que le domaine reconnu par ces IgG4 est également associé à l'activité et à l'évolution de la maladie.

Nous avons également montré au cours du temps une modification du profil épitopique en fonction de l'évolution de la maladie et notamment un étalement intra-moléculaire des épitopes lors de l'aggravation de la maladie comme décrit dans de nombreuses maladies auto-immunes (cf résultats).

1.4.2. Prise en charge de la GEM idiopathique (KDIGO 2012) Recommandations actuelles (Radhakrishnan and Cattran, 2012)

a. Sélection des patients qui nécessitent un traitement immunosuppresseur

Selon les KDIGO établies en 2012, seuls les patients présentant un syndrome néphrotique et l'un de ces critères doivent bénéficier d'un traitement immunosuppresseur :

- Une protéinurie supérieure à 4 g/j et qui reste supérieure à 50% de la valeur de base et qui ne diminue pas après la mise en place d'un traitement anti-hypertenseur et anti-protéinurique pendant une période d'observation d'au moins 6 mois (recommandation de niveau 1B).
- La présence d'une complication sévère liée au syndrome néphrotique (recommandation de niveau 1C)
- Une élévation du taux de créatininémie sérique de plus de 30% de la valeur de base dans les 6 à 12 mois qui suivent le diagnostic non expliquée par complication surajoutée mais une clairance estimée supérieure à 25-30 ml/min/1.73m² (recommandation de niveau 2C).

Par contre, les patients qui présentent un taux de créatininémie sérique persistant supérieur à 3.5 mg/dl (309 µmol/L) (ou un DFG estimé <30 ml/min/1.73 m²) et une taille des reins mesurée à l'échographie inférieure à 8 cm ou une infection menaçant le pronostic vital, ne doivent pas recevoir de traitement immunosuppresseur.

b. Traitement immunosuppresseur initial

Le traitement immunosuppresseur initial consiste en une alternance tous les mois de corticoïdes intra-veineux ou oraux et d'agents alkylants oraux (Recommandation de niveau 1B).

L'utilisation du cyclophosphamide doit être préféré au chlorambucil (Recommandation de niveau 2B).

Il est recommandé de suivre les patients 6 mois après la fin du traitement avant de conclure que le patient est en échec thérapeutique en absence de rémission (Recommandation de niveau 1C).

On ne répètera une biopsie rénale qu'en cas de dégradation rapide de la fonction rénale (doublement de la créatininémie sur 1 à 2 mois) en absence de protéinurie massive (>15g/j) (Recommandation non gradée).

Il faudra ajuster la dose de cyclophosphamide ou de chlorambucil à l'âge et au débit de filtration glomérulaire estimé (Recommandation non gradée).

L'administration journalière d'agent alkylant oral peut être effectué avec un risque plus grand de toxicité surtout après 6 mois (Recommandation 2C).

c. Alternatives au traitement initial

Il est recommandé d'utiliser de la cyclosporine ou du tacrolimus pendant 6 mois pour des patients qui présentent les critères de traitement mais qui ont choisi de ne pas recevoir ce type de traitement (corticoïdes/agents alkylants) ou qui ont des contre-indications pour ces traitements (Recommandation de niveau 1C).

Il est suggéré d'arrêter les anti-calcineurines chez les patients en rémission partielle ou complète après 6 mois de traitement (Recommandation de niveau 2C).

Le traitement par anti-calcineurines peut être réduit de moitié après 4 à 8 semaines quand une rémission est obtenue et qu'il n'y a pas d'effet toxique du médicament qui limiterait son usage et continué pendant 12 mois (Recommandation de niveau 2C).

Les dosages sériques d'anti-calcineurines peuvent être effectués régulièrement pendant la période initiale de traitement puis devant une augmentation du taux de créatinémie de plus de 20% pendant le traitement (Recommandation non gradée).

Il n'est pas recommandé de traiter les patients pas corticoïdes en monothérapie pour le traitement initial (Recommandation de niveau 1B).

Le mycophénolate mofétil en monothérapie n'est pas recommandé en traitement initial (Recommandation de niveau 2C).

d. Traitement des formes résistantes au traitement initial

Il est recommandé de traiter les formes résistantes au traitement initial par corticoïdes/agent alkylant par anti-calcineurines (Recommandation de niveau 2C).

Place du rituximab :

A ce jour, aucune étude contrôlée, randomisée utilisant le rituximab n'a été publiée. Les résultats de l'étude GEMRITUX sont en attente.

Des études pilotes ont montré des résultats intéressants du rituximab dans la GEM idiopathique. Sur 8 patients traités par une perfusion de 375mg/m² pendant 4 semaines et suivis pendant un an, Remuzzi et al. ont montré une baisse significative de la protéinurie et une fonction rénale stable chez tous les patients traités (Remuzzi et al., 2002).

Une étude prospective sur 15 patients avec une GEM idiopathique avec une protéinurie >3g/j malgré un traitement symptomatique a également étudié le rituximab. Six mois après l'injection de Rituximab, les patients avec une protéinurie >3g/j et un compte de CD19 >15 cells/ μ l ont reçu une nouvelle injection de rituximab. La baisse de la protéinurie est significative à 12 mois et le traitement est bien toléré. Le taux de rémission complète ou partielle est de 60%, plus élevé que celui attendu sans traitement (Fervenza et al., 2008).

Plus récemment, une étude prospective observationnelle chez 20 patients présentant une GEM idiopathique avec une protéinurie persistante >5 g/j ont reçu 4 perfusions à une semaine d'intervalle à la dose de 375 mg/m² avec un nouveau traitement en cas de protéinurie persistante 6 mois après la première série de rituximab. Le taux de rémission complète ou partielle à 24 mois est de 80%. Plus de 50% des patients inclus dans cette étude n'avait pas répondu à un traitement immunosuppresseur initial.

Beck et al. ont étudié 35 patients (dont 25 avaient des anticorps anti-PLA2R1) traités par rituximab. Le titre d'anticorps anti-PLA2R1 a baissé voire disparu chez 17 patients (68%) dans l'année qui suit le traitement. Le taux de rémission est de 59% à 12 mois et 88% à 24 mois dans le groupe de patients qui ont une baisse de leur titre d'anticorps contre 0% à 12 mois et 33% à 24 mois dans le groupe de patients qui ont un titre persistant d'anticorps. La baisse du titre d'anticorps précède la baisse de la protéinurie et la récurrence du syndrome néphrotique était associée pour un patient à une ré ascension de son titre d'anticorps (Beck et al., 2011).

Dans notre cohorte, 19 patients ont reçu un traitement par rituximab, les critères de mise en route du traitement étaient la persistance d'une maladie active 6 mois après la mise en route d'un traitement symptomatique. Six mois après l'injection, les patients étaient retraités en cas de protéinurie >3.5 g/j et de titre d'anticorps persistant si un anticorps était dosable. Après un suivi minimum de 6 mois, 16 patients sont rentrés en rémission complète ou partielle (86%).

Le rituximab a donc montré des résultats prometteurs dans cette indication.

Place de l'ACTH :

De l'ACTH de synthèse (Synacthen®) a été administré pendant un an dans une étude observationnelle avec une baisse de la protéinurie chez des patients présentant une GEM idiopathique (Berg and Arnadottir, 2004; Berg et al., 1999). Plus récemment, une étude ouverte a comparé le méthylprednisolone intra-veineux associé à un agent cytotoxique à l'ACTH synthétique (n=16) en traitement initial de GEM idiopathiques et a montré une efficacité similaire sur un suivi court (Ponticelli et al., 2006). Les effets secondaires rapportés sont : des vertiges, une intolérance au glucose, des diarrhées, une coloration bronze de la peau résolutifs à l'arrêt du traitement. Des études randomisées sont actuellement nécessaires pour valider ce traitement.

- e. Traitement des récurrences de syndrome néphrotique de l'adulte présentant une GEM idiopathique

Il est recommandé en cas de récurrence du syndrome néphrotique de reprendre le même traitement qui a induit une rémission initialement (Recommandation de niveau 2D).

En cas de récurrence du syndrome néphrotique après un traitement par corticoïdes/agents alkylants en traitement initial, ce traitement ne peut être re-effectué qu'une fois après la récurrence (Recommandation de niveau 2B).

- f. Traitement des formes de l'enfant

Il est recommandé d'effectuer le même traitement chez l'enfant que chez l'adulte (Recommandation de niveau 2C).

Il ne faudra effectuer qu'une cure de corticoïdes/agents alkylants (Recommandation de niveau 2D).

- g. Prophylaxie des thromboses par traitement anticoagulant

Il est recommandé d'effectuer un traitement anticoagulant oral en cas d'albuminémie < 25 g/l (Recommandation de niveau 2C).

Une étude récente a montré un risque statistiquement augmenté de thrombose dès un taux d'albuminémie < 28 g/l (Lionaki et al., 2012).

1.4.3. Traitement des GEM secondaires

Le traitement des GEM secondaires repose sur le traitement de la maladie initiale à l'origine de la GEM.

a. GEM et Hépatites B

Tang et al. ont suivi 10 cas de GEM associées à une hépatite B active traitée par Lamivudine et comparé leur évolution à 12 cas de GEM secondaires à une hépatite B active non traitée par Lamivudine. Le traitement par Lamivudine est associé à une baisse significative de la protéinurie, une normalisation du taux d'ASAT et une négativation de la charge virale VHB à un an. La survie rénale est statistiquement meilleure dans le groupe traité à 3 ans ($p=0.024$) (Tang and Lai, 2006).

b. GEM et Lupus

Les différentes études sur le traitement de la GEM lupique montrent des résultats variables, probablement du fait de l'inclusion de formes de GEM non pures avec des lésions prolifératives associées. De plus les GEM lupiques non néphrotiques répondent très bien au traitement symptomatique par bloqueur du système rénine-angiotensine.

Les recommandations des KDIGO sont les suivantes :

Il est recommandé de traiter les patients avec une glomérulonéphrite de classe V qui ont une fonction rénale normale et qui ne sont pas néphrotiques par traitement anti-protéinurique et anti-hypertenseur seuls.

Il est recommandé de traiter les patients présentant une glomérulonéphrite lupique de classe V pure par corticothérapie avec un agent immunosuppresseur : cyclophosphamide, anti-calciéurines (2C), MMF ou aziathioprine (2D).

Plusieurs alternatives sont possibles en cas de GEM lupique avec un syndrome néphrotique persistant, selon Bombak et al. le mycophénolate mofétil avec ou sans anticalciéurine associé est le traitement à préférer en induction et en entretien en attendant des études randomisées (Bombak and Appel, 2010).

c. GEM et Cancer

Comme l'ont montré Lefaucheur et al., le traitement complet de la tumeur est associé à une rémission complète du syndrome néphrotique (Lefaucheur et al., 2006).

1.4.4. Récidive de GEM après transplantation

a. Diagnostic des récurrences

La récurrence de la maladie initiale sur le greffon est la 3^{ème} cause de perte de greffon rénal (Briganti et al., 2002). La GEM récidive dans 7 à 42% des cas après transplantation rénale selon les séries et selon la pratique de biopsies systématiques (Dabade et al., 2008; Monga et al., 1993).

Le taux le plus important de récurrence (42%) est retrouvé dans la série de Dabade et al. où ils pratiquent des biopsies systématiques à 4, 12, 24 et 60 mois. La réalisation de biopsies systématiques permet de dépister des récurrences infra-cliniques : sur 8 récurrences (à partir d'une cohorte initiale de 19 patients), 5 patients ont une protéinurie inférieure à 0.5 g/jour et 3 patients ont une protéinurie négative. L'analyse histologique de ces récurrences montre quelques différences, notamment en immunofluorescence où l'on retrouve les dépôts d'IgG caractéristiques mais les dépôts de C3 ne sont pas toujours présents. La récurrence survient dans un délai moyen de 13 mois (avec une médiane de 4 mois) (Dabade et al., 2008).

L'intérêt du dosage des anticorps anti-PLA2R1 pour le diagnostic des récurrences de GEM associés aux anticorps anti-PLA2R1 est discuté. Stahl et al. ont décrit le premier cas de récurrence de GEM après une greffe rénale associé à un titre élevé d'Anticorps anti-PLA2R1 au moment de la récurrence avec une baisse de ce titre après traitement par rituximab (Stahl et al., 2010). La controverse est venue d'une étude de Debiec et al. qui ont repris 10 récurrences de GEM après transplantation rénale, 5 patients ont des anticorps anti-PLA2R1 au moment de la greffe rénale, les 5 autres patients n'ont pas de sérum disponible au moment de la greffe ni au cours du suivi. La recherche d'anticorps anti-PLA2R1 se fait ici par immunofluorescence indirecte à partir de cellules transfectées avec PLA2R1.

Sur les 5 patients qui ont des anticorps au moment de la greffe, un patient a des anticorps au moment de la greffe mais la recherche est négative au moment de la récurrence et un patient n'a pas de sérum disponible au moment de la récurrence, les trois autres ont des anticorps positifs au

moment de la récurrence. De plus ils rapportent 3 cas de patients porteurs d'anticorps anti-PLA2R1 au moment de la greffe qui n'ont pas récidivé après plus de 2 ans de suivi. Ils ont également recherché des anticorps anti-PLA2R1 dans 9 GEM de novo et n'en ont pas mis en évidence (Debiec et al., 2011b).

Nous avons montré dans une cohorte de 15 patients greffés dans les suites d'une GEM que le risque de récurrence était associé à un titre persistant après 6 mois de greffe d'anticorps anti-PLA2R1. De plus, les patients qui ont présenté une récurrence (n=4) avaient un traitement immunosuppresseur plus faible (c'est-à-dire un traitement qui ne combine pas induction, anti-calcineurine et mycophénolate mofétil). Nous avons également décrit une récurrence infra-clinique diagnostiquée par le dosage des anticorps anti-PLA2R1. Nous avons décrit une récurrence sans anticorps anti-PLA2R1 et sans anticorps anti-THSD7A au moment de la greffe et au cours du suivi, probablement lié à une autre cible antigénique. Le sérum de cette patiente ne présentait aucune réaction contre un extrait glomérulaire humain en western blot ni contre un lysat podocytaire (Seitz-Polski et al., 2014).

Les récurrences infra-cliniques semblent évoluer vers des formes actives puisque 5 des 7 patients qui ne reçoivent pas de traitement immunosuppresseur spécifique présentent une augmentation significative de leur protéinurie dont 3 deviennent néphrotiques. El-Zoghby et al. ont comparé l'intérêt de la biopsie systématique pour le diagnostic de récurrence de GEM en transplantation en comparant la prévalence des récurrence de GEM sur une cohorte historique issue du même centre (n=19) suivie de 1990 à 1999 et une cohorte plus récente ayant bénéficié des protocoles de biopsies systématiques (n=21 suivie de 2000 à 2007). Il n'y a pas entre ces cohortes de différence significative dans la survenue des récurrences, par contre dans la cohorte ayant bénéficié de biopsies systématiques, le diagnostic de récurrence est plus précoce 56.9 contre 104 mois dans la cohorte historique (El-Zoghby et al., 2009).

b. Pronostic des récurrences de GEM en transplantation

La récurrence conduit à une perte de fonction du greffon comme le montre l'étude de Moroni et al. sur une cohorte de 35 patients greffés dans les suites d'une GEM idiopathique appariés sur l'âge, le sexe et l'origine du greffon à une cohorte de 70 patients greffés contrôles. Douze patients ont présentés une récurrence de GEM soit 34% de la cohorte. Cette récurrence a un impact sur la survie du greffon : pour 6 patients la récurrence induit une insuffisance rénale. Si l'on prend le taux de greffons fonctionnels après 15 ans de suivi, il est de 40% dans le groupe

GEM contre 69% dans le groupe contrôle avec une différence de survie qui est statistiquement significative entre les deux groupes (Moroni et al., 2010).

Le choix du traitement immunosuppresseur de la greffe ne semble pas avoir d'impact sur le risque de récurrence. Mulay et al. ont analysé le risque de récurrence de 6 types de glomérulonéphrites (Hyalinose segmentaire et focale, la néphropathie à IgA, la GEM, la glomérulonéphrite membrano-proliférative, et les glomérulonéphrites lupiques) et mesuré l'impact du choix du traitement immunosuppresseur en analyse multi-variée sur le risque de récurrence. L'impact du traitement inducteur de la greffe n'est pas mesuré, mais aucun traitement immunosuppresseur de la greffe n'a montré une baisse significative du risque de récurrence des glomérulonéphrites sur le greffon (Mulay et al., 2009).

c. Traitement des récurrences de GEM en transplantation

Il n'y a pas actuellement de recommandation spécifique sur le traitement des récurrences de GEM après transplantation rénale selon les KDIGO.

Dabade et al. ont montré dans leur série de récurrences de GEM diagnostiquées sur des biopsies systématiques que le traitement immunosuppresseur de la greffe associé à un contrôle étroit de la tension artérielle sous traitement bloqueur du système rénine-angiotensine était insuffisant pour contrôler la progression de la récurrence de la GEM même dans ses formes infra-cliniques (Dabade et al., 2008).

Plusieurs séries non contrôlées ont étudié l'intérêt du rituximab dans cette indication. Sprangers et al. ont rapporté 4 cas de récurrence de GEM traités par rituximab : un patient a reçu une dose par semaine pendant 4 semaines de 375 mg/m², deux patients ont reçu 1g à 2 semaines d'intervalle et le 4^{ème} patient n'a reçu qu'1 g en raison de symptômes type malaise et gastroentérite développés une semaine après l'injection bien que ces symptômes n'aient finalement pas été reliés au traitement par rituximab. Les 4 patients ont présenté une baisse de leur protéinurie. Deux patients ont reçu une nouvelle injection de rituximab. Trois patients sont rentrés en rémission partielle, le 4^{ème} patient a présenté une baisse de 30% de sa protéinurie sans rémission (Sprangers et al., 2010).

El-Zoghby et al. ont rapporté 8 cas de récurrence de GEM en transplantation diagnostiquées sur des biopsies systématiques traitées par rituximab. Douze mois après le traitement par rituximab, 6 patients (75%) sont soit en rémission partielle soit en rémission complète. Après 24 mois de suivi 6/7 sont en rémission partielle ou complète et le 8^{ème} patient a présenté une récurrence de son syndrome néphrotique (El-Zoghby et al., 2009). Les auteurs insistent sur

l'importance d'un traitement immunosuppresseur précoce dans les formes récidivantes de GEM qui rentrent rarement en rémission spontanée d'après Cravedi et al. ce qu'ils expliquent par le fait que ces patients présentent une forme sévère puisqu'ils ont déjà perdu leur rein natif (Cravedi et al., 2010).

Dans notre cohorte, nous avons traité 2 patients sur 5 ayant présenté une récurrence de GEM sur leur greffon avec du rituximab après un traitement symptomatique insuffisant. Ces 2 patients sont rentrés en rémission complète de leur syndrome néphrotique dans les 6 mois qui ont suivi la dernière injection. Par contre, 3 patients n'ont reçu qu'un traitement symptomatique avec pour 2 patients une rémission complète de leur syndrome néphrotique et la dernière a perdu son greffon dans les suites de la récurrence avec des lésions trop avancées pour un traitement immunosuppresseur.

1.5. Objectifs

Le premier objectif de mon travail de thèse était de valider un test quantitatif permettant le suivi des anticorps anti-PLA2R1, notamment dans une cohorte de patients greffés dans les suites d'une GEM. Nous avons donc voulu purifier PLA2R1 en s'assurant de conserver sa structure tridimensionnelle pour permettre une bonne reconnaissance des anticorps pour l'antigène. Devant la mauvaise affinité du récepteur humain pour les sPLA2 (notamment OS2) et l'impossibilité d'obtenir un clone stable transfecté par la forme humaine de PLA2R1, nous avons étudié la reconnaissance de la forme humaine, de lapin et de souris de PLA2R1 par les anticorps anti-PLA2R1 de patients présentant une GEM (n=53). Nous avons alors montré que l'ensemble des patients reconnaissent le récepteur de lapin et que seulement la moitié reconnaissent le récepteur de souris.

Nous avons alors produit et purifié le récepteur soluble de lapin et mis au point un test ELISA. Afin de valider ce test, nous nous sommes rapprochés de la société Euroimmun et avons comparé les performances de notre test avec le test ELISA utilisant un antigène humain qui devait être validé avant commercialisation et du test d'immunofluorescence indirecte (Article 3). Les résultats de cette comparaison ont été reproduits en Allemagne et dans notre laboratoire. Cette collaboration nous a permis d'apporter des sera à la cohorte de validation du test ELISA commercial (Article 1).

Nous avons ensuite utilisé ces différents tests (ELISA humain, lapin et immunofluorescence indirecte) sur une cohorte de 15 patients greffés dans les suites d'une GEM. Au moment de ce travail, l'intérêt du suivi des anticorps anti-PLA2R1 était discuté par la publication de Debiec et al. qui retrouvait des résultats discordants entre le titre d'anticorps au moment de la greffe. Nous avons montré qu'un titre d'anticorps persistant après la greffe était associé à la récurrence. Nous avons également montré que ces patients qui présentaient une récurrence avaient un traitement immunosuppresseur plus faible qui n'associait pas la triade (induction, anti-calcineurines et mycophénolate mofétil) qui a montré un bénéfice dans la réduction des rejets. Nous avons décrit un cas de récurrence infra-clinique avec anticorps anti-PLA2R1 positifs et un cas de récurrence sur le greffon sans antigène identifié (ni PLA2R1 ni THSD7A ni SOD2 ni AR) (Article 2).

Nous nous sommes ensuite intéressés au pronostic des patients qui avaient des anticorps anti-PLA2R1 qui ne reconnaissaient pas le récepteur de souris. Nous avons montré que malgré un titre d'anticorps contre le récepteur humain comparable, ils présentaient une meilleure survie

rénale (Article 3). Nous en avons conclu qu'il existait entre l'homme et la souris des épitopes conservés associés à un mauvais pronostic.

Nous avons voulu confirmer ces différences d'épitopes reconnus grâce à des mutants de délétion de PLA2R1 en délétant séquentiellement chaque domaine à partir du domaine N-terminal. Nous avons confirmé l'hypothèse qu'il existe plusieurs épitopes différents reconnus et que certains épitopes sont associés à un meilleur pronostic. Nous avons défini 3 profils épitopiques et montré que l'étalement intra-moléculaire des épitopes était associé à une aggravation de la maladie (Article 4).

Enfin dès le début de ce travail de thèse, nous avons pu identifier des patients qui reconnaissaient une nouvelle cible antigénique de 250 kDa contenu dans un extrait glomérulaire humain. J'ai pu participer à l'identification de cet antigène THSD7A (Article 5).

L'ensemble de ces nouveaux marqueurs doit maintenant être validé pour confirmer leur intérêt en routine dans l'amélioration de la prise en charge des patients présentant une GEM et la compréhension de leur pathogénicité.

2. Résultats

2.1. Article 1 : Mise au point d'un test ELISA permettant le suivi des anticorps anti-PLA2R1

A travers cette publication, nous avons participé à la validation du seul test ELISA actuellement commercialisé utilisant le récepteur humain soluble marqué avec une séquence histidine purifié par chromatographie d'affinité sur colonne de métal. Cette publication vient après la première publication d'un test ELISA par Hofstra et al. qui retrouve des résultats comparables sur la performance des tests ELISA par rapport à la technique disponible à ce moment là qui est l'immunofluorescence indirecte (Hofstra et al., 2012).

La validation du test ELISA repose sur une cohorte de 200 patients porteurs d'une GEM idiopathique dont le sérum est prélevé dans les 8 semaines qui suivent le diagnostic histologique, 27 avec une GEM secondaire, 316 patients porteurs de glomérulopathies (HSF, néphropathie à IgA, glomérulonéphrite à lésions glomérulaires minimes, Syndrome d'Alport...) d'autres maladies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde, rhumatisme psoriasique, Lupus systémique, connectivites mixtes, Syndrome de Sjögren, polymyosites, collagénose et des thyroïdites auto-immunes). La définition d'une forme idiopathique repose sur la positivité du test d'immunofluorescence indirecte, les formes secondaires sont définies par l'absence de maladie associée et un test d'immunofluorescence indirecte négatif.

Deux tests ELISA sont réalisés sur cette cohorte, un test recherchant les IgG4 dirigées contre PLA2R1 et un deuxième test recherchant les IgG totales. La détermination du seuil de positivité s'effectue pour les 2 tests grâce à des courbes ROC où la positivité est définie d'après les résultats de l'immunofluorescence.

La standardisation des tests d'effectue grâce à un sérum contenant un titre élevé d'anticorps anti-PLA2R1 déterminant une courbe de calibration à l'aide de 5 points représentant 5 dilutions.

Ces deux tests ont confirmé les bonnes performances décrites par Hofstra et al. Avec une spécificité de 99.9% et une sensibilité de 96.5% pour le test IgG totales et de 98.5% pour le test IgG4. Le test est très stable dans le temps avec une variabilité inter-plaque de : 4,2 à 10% et intra-plaque de : 1,7 à 5,7%.

La corrélation des titres par rapport au test d'immunofluorescence est de 75%.



Development of a standardized ELISA for the determination of autoantibodies against human M-type phospholipase A2 receptor in primary membranous nephropathy

Cornelia Dähnrich^a, Lars Komorowski^a, Christian Probst^a, Barbara Seitz-Polski^{b,c}, Vincent Esnault^d, Jack F. Wetzels^e, Julia M. Hofstra^e, Elion Hoxha^f, Rolf A. Stahl^f, Gérard Lambeau^{b,c}, Winfried Stöcker^a, Wolfgang Schlumberger^{a,*}

^a EUROIMMUN AG, Lübeck, Germany

^b Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR7275, CNRS, Valbonne, France

^c Université de Nice Sophia Antipolis, Valbonne, France

^d Department of Nephrology, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Hôpital Pasteur, Nice, France

^e Department of Nephrology, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands

^f III. Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 March 2013

Received in revised form 13 March 2013

Accepted 13 March 2013

Available online 27 March 2013

Keywords:

PLA₂R

iMN

pMN

Diagnosis

Theranostics

ABSTRACT

Background: Autoantibodies against the M-type phospholipase A2 receptor (PLA₂R1) are specific markers for primary membranous nephropathy (pMN) and anti-PLA₂R1 serum levels may be useful to monitor disease activity. So far, a recombinant cell-based indirect immunofluorescence assay (RC-IFA) using recombinant PLA₂R1 as a substrate has been widely available but lacks a finely graduated assessment of antibody concentrations.

Methods: In order to setup a standardized ELISA, the extracellular domain of human PLA₂R1 was expressed in HEK293. The purified protein was used to form the solid-phase in an ELISA which was then employed to analyze sera from 200 patients with primary MN, 27 patients with secondary MN, 230 patients with other glomerular diseases, 316 patients with systemic autoimmune diseases, and from 291 healthy blood donors.

Results: At a set specificity of 99.9% the sensitivity of the anti-PLA₂R1 IgG ELISA was found to be 96.5%. A similar sensitivity (98.5%) was obtained when binding of only subclass IgG₄ was analyzed. The calibrated assay showed a good class correlation with the results of the RC-IFA, was robust and could be stored for several months without any loss of quality.

Conclusion: The results demonstrate that the new test system is qualified for routine use and that it has an almost perfect agreement with both, the clinical characterization of the patients and the results generated with RC-IFA.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Membranous nephropathy (MN) is a leading cause of nephrotic syndrome in adults with varying natural history and course [1]. Whereas primary MN (pMN) is considered to be an organ-specific autoimmune disease, secondary forms are associated with malignant tumors, bacterial or viral infections, systemic autoimmune diseases

and toxic drugs. Whereas secondary MN mostly responds to underlying diseases pMN may range from end stage renal disease to spontaneous remission [2,3]. Even though there have been risk assessments based on clinical and laboratory data for the eventual outcome [4,5], it remains uncertain which patient should solely receive supportive care or eventually needs to undergo an immunosuppressive therapy. The discovery of the M-type phospholipase A2 receptor (PLA₂R1) as the major target antigen of autoantibodies in about 70% of patients with MN [6,7] has led to the hypothesis that circulating autoantibodies bind to PLA₂R1 on podocytes leading to destruction of the glomerular filtration barrier and the onset of proteinuria [8]. Several independent retrospective follow-up studies have confirmed this specific association between anti-PLA₂R1 and pMN [9–12]. The autoantibodies can be considered as pathognomonic markers [8,12,13].

Increases of anti-PLA₂R1 levels precede the exacerbation of symptoms whereas decreases are associated with amelioration or remission

Abbreviations: MALDI-TOF, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight mass spectrometry; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; FITC, fluorescein isothiocyanate; IFA, indirect immunofluorescence assay; RC-IFA, recombinant cell-based indirect immunofluorescence assay; HRP, horse radish peroxidase; AP, alkaline phosphatase; PLA₂R1, M-type phospholipase A2 receptor; MN, membranous nephropathy; pMN, primary membranous nephropathy.

* Corresponding author at: Euroimmun AG, Seekamp 31, D-23560 Lübeck, Germany. Tel.: +49 451 585523151; fax: +49 451 5855391.

E-mail address: w.schlumberger@euroimmun.de (W. Schlumberger).

[12,13]. This relationship between these autoantibodies and the disease activity paves the road for the integration of quantitative antibody determination in the monitoring of treatment in patients with chronic MN or after kidney transplantation [13]. Moreover, the magnitude of anti-PLA₂R1 titer itself has been proposed as a predictive marker for disease outcome and, in turn, as a valuable tool for the decision on treatment strategies [8].

In order to use PLA₂R1 autoantibodies as clinical markers for disease activity validated test systems with high sensitivity and specificity are necessary. In the initial publication, Beck et al. used a Western blot after non-reducing SDS-PAGE [6]. Despite unconfirmed descriptions about an improved variant of the method with a sensitivity of >90% [14], it is difficult to use Western blotting outside of an expert laboratory and the method is not suited for the evaluation of large sample numbers. These limitations led to the development of a recombinant cell-based indirect immunofluorescence assay (RC-IFA) that uses the human cell line HEK293 over-expressing the full-length human PLA₂R1 as substrate [9]. The assay can be used both as a diagnostic tool and for the approximation of antibody concentrations during monitoring of patients. More recently, an ELISA protocol was published that uses a recombinantly produced extracellular domain of PLA₂R1 to form the solid-phase [12]. The report indicated a superior grading of antibody titers following this approach but the study did neither evaluate the robustness of the method nor its specificity on a large number of disease controls.

The aim of the current study was to develop a standardized ELISA for the determination of autoantibodies against PLA₂R1 that can be made widely available and used in a routine setting for clinical applications. To this end, the extracellular domain of human PLA₂R1 was purified to homogeneity and used to build a robust solid-phase in an ELISA that was then evaluated in a large cohort of clinically well-characterized patients with primary and secondary MN from three different centers. The findings were compared to a cohort of disease controls and healthy blood donors. Our data show a very high sensitivity and specificity of the ELISA as well as a very close correlation with the RC-IFA making the ELISA a very good tool for accurate PLA₂R1 antibody assessment.

2. Materials & methods

2.1. Human sera

Sera of patients with biopsy-proven primary and secondary membranous nephropathy were collected from three centers. One cohort consisted of 122 patients with primary MN and 15 secondary MN from the University Hospital Hamburg-Eppendorf, Germany. A second cohort consisted of 66 primary MN and 7 secondary MN patients from the Radboud University Nijmegen, The Netherlands. The third cohort consisted of 12 primary MN and 5 secondary MN patients from the CNRS, Nice, France. This resulted in a total of 200 sera from patients with primary MN and 27 with secondary MN, respectively. All patients with primary and secondary MN were prospectively or retrospectively identified and were only included if the time between diagnosis by renal biopsy and blood withdrawal was less than 8 weeks. The definition of primary MN also included a serological pre-characterization and positivity in the anti-PLA₂R1 RC-IFA (see below). The definition of secondary MN was fulfilled if another underlying disease was identified and anti-PLA₂R1 RC-IFA was negative.

Disease controls included samples from patients with Rheumatoid Arthritis, psoriatic arthritis, systemic lupus erythematosus without renal involvement, mixed connective tissue disease, systemic sclerosis, Sjogren's syndrome, polymyositis, undifferentiated collagenosis, autoimmune thyroiditis, and other glomerular diseases (see further details in Table 1). Finally, 291 serum samples from healthy blood donors were included. These samples were obtained from the University Hospital of Lübeck, Germany.

Table 1

Characteristics of the patients enrolled in this study. The diagnosis of MN was based on an unequivocal biopsy within 8 weeks prior to the blood sampling. Primary MN was defined as positive determination of anti-PLA₂R1 by RC-IFA. Secondary MN was defined as biopsy proven MN with a clinical underlying disease known to be associated with MN and a negative test for PLA₂R1 antibodies by RC-IFA. FSGS, Focal Segmental Glomerular Sclerosis; IgAN, IgA nephropathy; MCD, Minimal Change Disease; Membranoproliferative Glomerulonephritis, MPGN; GN-nos, other glomerular diseases.

Group	n	Female/male	Median age (range)
Primary MN	200	67/133	54 (16–86)
Secondary MN	27	12/15	57 (25–79)
Other renal diseases	230		
FSGS	20	8/12	52 (16–68)
IgAN	9	5/4	50 (23–58)
MCD	16	9/7	39 (20–62)
MPGN	2	1/1	45, 54
Alport's syndrome	1	0/1	19
GN-nos	182	57/125	55 (18–83)
Other autoimmune diseases	316		
Rheumatoid arthritis	39	36/3	50 (29–86)
Psoriatic arthritis	30	14/16	51 (19–73)
Systemic lupus erythematosus	55	45/10	52 (34–86)
Mixed connective tissue disease	15	15/0	52 (23–77)
Systemic sclerosis	86	74/12	62 (1–93)
Sjogren's syndrome	27	24/3	65 (13–83)
Polymyositis	8	6/2	63 (50–85)
Undifferentiated collagenosis	6	6/0	52 (26–73)
Autoimmune thyroiditis	50	42/8	49 (22–90)
Healthy individuals	291	112/179	38 (18–68)

All serum samples were collected within the standard diagnostic patient work-up in the respective centers. In adherence to the Helsinki principles, informed consent from all patients, whose material was used in this study, was obtained.

2.2. Detection of anti-PLA₂R1 antibodies by indirect immunofluorescence

Anti-PLA₂R1 antibodies were determined using a recombinant cell-based indirect immunofluorescence test (RC-IFA, Euroimmun, Germany) containing a BIOCHIP mosaic of formalin-fixed HEK293 cells over-expressing PLA₂R1 and mock-transfected HEK293 cells as negative control. To achieve a semi-quantitative measurement of PLA₂R1 autoantibody levels, different dilutions of serum samples were prepared in phosphate-buffered saline, 0.2% Tween-20 and incubated for 30 min. A fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-human IgG polyclonal antibody (Euroimmun) was used to detect bound IgG antibodies. All slides were evaluated by two-independent observers using a microscope with 460–490 nm LED excitation (EUROStar; Euroimmun). In all cases, the incubated slides were evaluated independently by two experts. A specific fluorescence of the transfected cells at a dilution of 1:10 or higher was considered to be as positive (Supplementary Fig. 1).

2.3. Purification of recombinant human PLA₂R1 from HEK293 cells

The extracellular domain of the human PLA₂R1 isoform 1 (Acc No. NP_031392.3, amino acid residues 1–1397 [15]) was expressed in HEK293 cells essentially as described for the full-length protein [16]. The cell culture supernatant was harvested after expression for 5 days. The recombinant protein was purified by immobilized metal affinity chromatography as described for the extracellular domains of desmogleins 1 and 3 [17]. All steps were carried out at 4 °C. The fractionation of PLA₂R1 was monitored by non-reducing Western blot described by Beck et al. [6] using a human sample containing high-titer autoantibodies against PLA₂R1 as determined by RC-IFA. The purified antigen was characterized by SDS-PAGE, Western blot and PNGase F digestion (Supplementary Fig. 2).

2.4. SDS-PAGE and MALDI-TOF

Proteins were analyzed following SDS-PAGE using the NuPAGE system (Invitrogen, Germany) according to the manufacturer's instructions but without reducing agents. Preparations were also analyzed by MALDI-TOF fingerprinting and MALDI-ToF tandem mass spectrometry after SDS-PAGE and tryptic cleavage [18].

2.5. ELISA for the detection of human autoantibodies against PLA₂R1

Microplates (Nunc, Germany) were coated with 0.7 µg/mL PLA₂R1 in PBS over-night at 4 °C, washed three times with washing buffer (0.05% (w/v) Tween-20 in PBS), and blocked with 0.1% (w/v) casein in PBS for 1 h. For long-term storage, the microplates were air-dried and stored in blistered aluminum foil bags with desiccant at 4 °C. Human sera were diluted 1:100 in sample buffer (0.05% (w/v) Tween-20, 1% (w/v) casein in PBS) and incubated for 30 min followed by three washing steps with washing buffer. Bound antibodies were detected by incubation with anti-human-IgG HRP conjugate (Euroimmun, Germany) or anti-human-IgG4 HRP conjugate (Biomol, Germany) diluted 1:1000 in sample buffer for 30 min, subsequent washing as described above and addition of TMB substrate (Euroimmun) for 15 min. All incubation steps were carried out at room temperature. The optical density (OD) was read at 450 nm using an automated spectrophotometer (Spectra Mini, Tecan, Crailsheim, Germany). The cut-off was optimized either by receiver operating characteristics (ROC) curve analysis (maximal sum of sensitivity plus specificity) or by pre-defined specificities. A highly positive index patient serum was used to generate a standard curve consisting of five calibrators (2, 20, 100, 500, and 1500 relative units [RU/mL]). To determine the coefficients of variation, 5 samples covering the measuring range were measured 20-fold in one set (intra-assay) or threefold in ten sets (inter-assay).

2.6. Miscellaneous

All reagents were obtained from Merck, Germany or Sigma, Germany if not specified otherwise. Protein concentrations were determined by bicinchoninic acid assay (Sigma). All statistical analyses were performed using MedCalc V9.6.2.0 and SigmaPlot V10.0. A p-value of 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Characterization of the patient cohort

The combined cohort included 227 patients with MN. To prevent misleading results due to spontaneous remission, the definition of MN was based on renal biopsies and the measurement of anti-PLA₂R1 autoantibodies within 8 weeks from renal biopsy. Primary MN was defined as anti-PLA₂R1 positive by RC-IFA, whereas secondary MN needed a clinical diagnosis of an underlying disease suggestive of a cause of MN and the absence of anti-PLA₂R1 by RC-IFA. Patients with a broad spectrum of other biopsy proven glomerular injuries (Focal Segmental Glomerular Sclerosis (FSGS), IgA nephropathy (IgAN), Minimal Change Disease (MCD), Membranoproliferative Glomerulonephritis (MPGN)), Alport's syndrome or patients with other glomerular diseases (GN-nos) served as disease controls. Patients with other systemic autoimmune diseases, that are frequently associated with late-stage renal involvement, were also included. The characteristics of all patients and healthy subjects are presented in Table 1.

3.2. Comparison of ELISA for the determination of anti-PLA₂R1 IgG₄ and pan-IgG

Autoantibodies against PLA₂R1 were initially determined by ELISA using either a secondary antibody specific for human IgG₄ or pan-IgG.

In comparison, the detection of IgG₄ resulted in a broader distribution of the readings with a very high mean ($\mu_{E450} = 3.5206$; $\sigma_{E450} = 1.0312$) compared to the detection of pan-IgG ($\mu_{E450} = 0.9973$; $\sigma_{E450} = 0.5541$) in the pMN group. The data are summarized in Fig. 1. To determine the optimal cut-off values of the ELISA, ROC curve analyses were performed based on anti-PLA₂R1 RC-IFA positive sera from pMN patients (n = 200) and all controls irrespective of IFA results (n = 836; disease controls and healthy blood donors). Two different evaluations at defined specificities with respect to RC-IFA were performed (Table 2). At 99% specificity the cut-offs were $E_{450} = 0.022$ (IgG₄) and $E_{450} = 0.086$ (pan-IgG) resulting in sensitivities of 100% (IgG₄) and 98.0% (pan-IgG), respectively. At 99.9% specificity the cut-offs were $E_{450} = 0.149$ (IgG₄) and $E_{450} = 0.156$ (pan-IgG) producing sensitivities of 98.5% (IgG₄) and 96.5% (pan-IgG), respectively. Three samples that were negative by the ELISA protocol with IgG₄ detection at 99.9% specificity produced results well above the cut-off values in both pan-IgG ELISA and RC-IFA (0.408–1:100, 0.559–1:320, 0.717–1:1000, Fig. 2).

3.3. Standardization of the ELISA test system

Using an index sample with a very high concentration of anti-PLA₂R1 a 5-point calibration curve was established in the ELISA in order to allow a precise quantification (Supplementary Fig. 3). Applying the calibration, all samples from patients with primary MN produced results within the

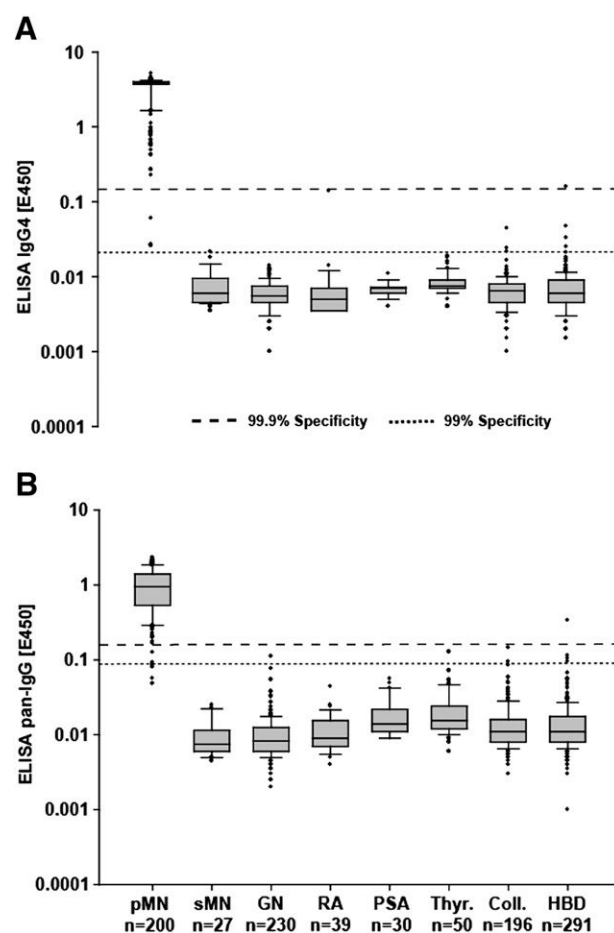


Fig. 1. Comparative analysis of IgG₄ and pan-IgG reactivities against PLA₂R1 in ELISA. A) IgG₄ and B) pan-IgG reactivities against PLA₂R1 were determined in 837 human sera using the two ELISA protocols. The dotted lines represent the cut-off values at a defined specificity of 99.9% with respect to RC-IFA ($E_{450} = 0.156$ for pan-IgG and $E_{450} = 0.149$ for IgG₄). pMN, primary MN; sMN, secondary MN; GN, other renal diseases; RA, rheumatoid arthritis; PSA, psoriatic arthritis; Thyr., autoimmune thyroiditis; Coll., undifferentiated collagenosis; HBD, healthy blood donors.

Table 2

Prevalences of anti-PLA₂R1 IgG₄ and anti-PLA₂R1 pan-IgG as determined by ELISA. IgG₄ and pan-IgG reactivities against PLA₂R1 were determined in 837 human sera using the two ELISA protocols. The data were analyzed for receiver-operating characteristics (ROC) and the cut-off values for a positive readout were adjusted for specificity with respect to RC-IFA. Thus, the cut-off values were set to A) $E_{450} = 0.022$ for IgG₄ and $E_{450} = 0.086$ for pan-IgG detection (99% specificity) or B) $E_{450} = 0.149$ for IgG₄ and $E_{450} = 0.156$ for pan-IgG detection (99.9% specificity). Values in brackets are the 95% confidence intervals.

	n	Specificity set to 99%		Specificity set to 99.9%	
		Pan-IgG	IgG ₄	Pan-IgG	IgG ₄
Primary MN	200	196	200	193	197
Sensitivity [%]		98.0 (94.96–99.45)	100 (98.17–100)	96.5 (92.92–98.58)	98.5 (95.68–99.69)
Secondary MN	27	0	1	0	0
Other glomerulonephritides	230	1	0	0	0
Other autoimmune diseases	316	3	4	0	0
Healthy individuals	291	4	4	1	1

measurement range of 2 to 1500 RU/mL. Thus, quantification was possible using the initial sample dilution without the need of further titration. The intra-assay coefficients of variation for positive samples and negative samples with elevated readings were calculated as $CV = 1.7$ – 5.7% whereas the inter-assay coefficient of variation was calculated as $CV = 4.2$ – 11% (Table 3). We observed no interference with the assay for citrate or EDTA plasma, hemolyzed sera or sera with high concentration of triglycerides and no error of quantitative antibody determination (decrease or increase of calibrated results) after long-term storage of desiccated PLA₂R1-coated microplates at 4 °C for up to 12 months.

3.4. Correlation of anti-PLA₂R1 data obtained by ELISA and RC-IFA

For all pMN patients titers measured by RC-IFA and the calibrated data of the ELISA were correlated (Fig. 3). With a value of 0.7491 ($CI_{95\%} = 0.7231$ – 0.7632), the overall correlation coefficient was good but the overlap of ELISA results between different RC-IFA titers was significant. The seven samples that produced negative results by ELISA had titers of 1:10 to 1:100 by RC-IFA whereas titers of up to 1:10,000 were reached in the positive samples (median = 1:1000, $CI_{95\%} = 1:100$ – $1:3200$).

4. Discussion

In this study, we established a robust ELISA for the quantitative detection of anti-PLA₂R1 antibodies in patients with pMN. Autoantibodies

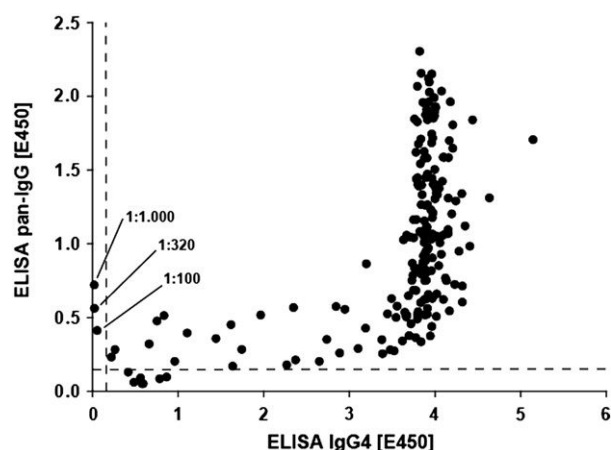


Fig. 2. Correlation of anti-PLA₂R1 pan-IgG and IgG₄ anti-PLA₂R1 as determined by ELISA. Data of the anti-PLA₂R1 determination in serum samples of patients with primary MN with both ELISA protocols (IgG₄, pan-IgG) were correlated. The dotted lines display the cut-off values at 99.9% specificity with respect to RC-IFA ($E_{450} = 0.149$ for IgG₄ and $E_{450} = 0.156$). When detecting IgG₄ most sera produced results at (or above) the upper measuring range whereas the detection of pan-IgG generated a uniform distribution over the full range. Moreover, three sera with 1:100 to 1:1000 anti-PLA₂R1 titers as determined by RC-IFA could only be recognized as positive with pan-IgG detection.

against PLA₂R1 have been identified as very specific biomarkers for pMN [6,14]. The sole presence of anti-PLA₂R1 antibodies is indicative of pMN such that they can be considered pathognomonic [8]. Thus, qualitative test results seem to be sufficient for the initial diagnosis. Interestingly, though, previous studies indicated that antibody titers respond to treatment [12,13,19] and/or might even be related to disease outcome rendering them theranostic markers [12]. Thus, anti-PLA₂R1 autoantibodies are becoming of major importance for the differential diagnosis of patients with nephrotic syndrome and likely for the monitoring and adjustment of their treatment.

Until now, RC-IFA using the human cell line HEK293 over-expressing the full-length receptor as a membrane protein on its surface has been considered the most suitable approach for routine testing [20]. However, even though RC-IFA can be considered as the reference method for the determination of several autoantibodies against integral membrane proteins of the outer cell surface, like NMDAR in autoimmune encephalitis [21], aquaporin 4 in neuromyelitis optica [22], CUZD1/GP2 in Crohn's disease [23], it has some practical limitations. It requires specialized equipment, including a fluorescence microscope, is not easy to automatize, is prone to human interpretation errors and delivers only semi-quantitative data, even when multiple incubations with different sample dilutions are performed. Therefore, the development of a standardized robust ELISA overcoming these limitations as well as offering an identical diagnostic accuracy and a better clinical usefulness was urgently warranted when we initiated this project.

In the initial experiments, we used two different secondary reagents in the anti-PLA₂R1 ELISA protocol, either detecting bound IgG₄ or total IgG indiscriminate of the subclass (pan-IgG). Whereas the former conduct followed the data of the initial publication of Beck et al. [6] which suggested the unique association of anti-PLA₂R1 IgG₄ and pMN, the latter tried to simulate the RC-IFA that also uses a secondary antibody directed against all human IgG subclasses. Our results demonstrate that

Table 3

Intra- and inter-assay coefficients of variations for the anti-PLA₂R1 ELISA. Five representative samples with target values covering the full measuring range were used to determine anti-PLA₂R1 levels using the newly developed and calibrated ELISA. For the intra-assay calculation, each serum was incubated 20-fold in one set. For the inter-assay calculation, each serum was incubated in triplicate in ten different sets. μ , mean; σ , standard deviation; CV, coefficient of variation = σ / μ expressed as a percentage.

Intra-assay	Positive range			Negative range	
	Sample	1	2	3	4
μ [RU/mL]	861	97	26	18	2
	σ [RU/mL]	48.7	1.6	0.9	0.5
	CV [%]	5.7	1.7	3.4	2.6
Inter-assay	Positive range			Negative range	
	Sample	1	2	3	4
μ [RU/mL]	848	99	28	14	2
	σ [RU/mL]	90.55	6.35	1.15	1.58
	CV [%]	10	6.4	4.2	11

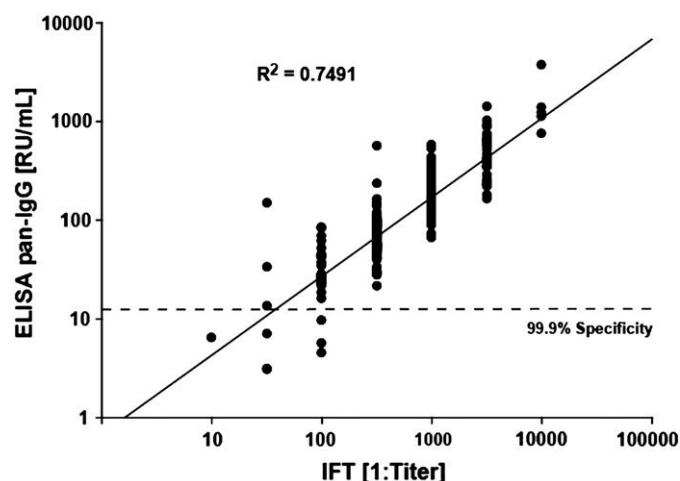


Fig. 3. Scatter plot of anti-PLA₂R1 RC-IFA versus the calibrated anti-PLA₂R1 ELISA. Titers of anti-PLA₂R1 in serum samples of patients with primary MN determined by RC-IFA and results of the anti-PLA₂R1 ELISA after calibration were correlated. Both axes are presented in logarithmic scale. The logarithmic data was also used for the calculation of the correlation coefficient.

the qualitative outcome, i.e. the discrimination of patients with primary MN from the disease controls, of both methods is very similar. In fact, no statistically significant difference exists between them. However, when using the protocol involving the detection of pan-IgG the optical densities (E_{450} values) of the positive samples lay in an optimal range of $0.1 \leq E_{450} \leq 2.5$ compared to very large values higher than 3.5 for most samples in parallel to results near the cut-off value when bound IgG₄ was reported. The latter distribution did not allow a further dilution of the IgG₄-specific conjugate without losing a considerable proportion of pMN cases. Furthermore, applying more stringent and at the same time more practical cut-off values producing 99.9% specificity with respect to RC-IFA, three samples were negative for anti-PLA₂R1 of subclass IgG₄ whereas they produced clear-cut positive results with the secondary antibody binding to all IgG subclasses indicating a restriction to other subclasses than IgG₄, possibly IgG₁ based on a former study [19]. Therefore, it seemed better to use only the secondary reagent for the detection pan-IgG in further experiments.

An almost perfect agreement was found when data obtained with the pan-IgG ELISA using the extracellular domain of PLA₂R1 were compared with those obtained with the RC-IFA using formalin-fixed HEK293 over-expressing full-length PLA₂R1 (Fig. 3). In the ELISA data presented in Fig. 1 a discriminative gap between the readings for the samples from patients with primary and secondary MN can be made out such that, based on this comparison alone and using impractically low cut-off values, the concordance of ELISA and RC-IFA is indeed 100%. Additionally taking into account that only a few samples from patients with other autoimmune diseases, e.g. thyroiditis, arthritis, and mixed collagenoses, often considered as “problematic” samples in auto-antibody testing, produced readings similar to samples of only low RC-IFA titers from patients with pMN, the overall qualitative agreement between ELISA and RC-IFA was still 96.9% for the MN samples.

In total, seven samples exhibited discrepant qualitative results between anti-PLA₂R1 pan-IgG ELISA and RC-IFA. All of these samples had low RC-IFA titers of 1:10 and 1:100. One may speculate that the samples derived from patients undergoing spontaneous remission and that titers measured in ELISA and RC-IFA follow different time courses because all MN samples used in this study were collected within a time frame of 8 weeks after initial diagnosis by biopsy. Unfortunately, samples taken earlier in the disease course of these patients were generally not available. This hypothesis remains to be tested in prospective studies using both test systems and large cohorts of follow-up patients.

For the standardization of the ELISA, a 5-point calibration curve for the calculation of arbitrary units could be established resulting in a

broad linear measuring range. In fact, all samples produced readings within this window without the need for additional titration. The calibrated data showed a good correlation to the RC-IFA titers. However, there was a significant overlap of ELISA results between the titer classes which can be attributed to a systematic characteristic of RC-IFA. It has to be taken into account that the RC-IFA cell substrate is more complex than the purified PLA₂R1 in the ELISA giving rise to PLA₂R1-irrelevant, inter-sample variable staining which bias titer estimation.

Further characterization of the robustness of the assay showed that the dried and desiccated antigen-coated microplates could be stored at 4 °C for up to 12 months without any loss of quality and that blood samples irrespective of any interfering substances can be analyzed. Moreover, intra- and inter-assay coefficients of variation of 4.7% and 13%, respectively, indicated applicability of the ELISA for monitoring.

In parallel to our development, a second group of researchers established an ELISA using a nearly identical extracellular domain of PLA₂R1 [12]. Their findings, though restricted to a smaller number of disease controls, are in good agreement with the results of our study thereby confirming the validity of our data and, at the same time, underlining an almost identical quality of RC-IFA and ELISA. The minor differences between the two methods cannot be interpreted based on the current study because the results of RC-IFA were a prominent criterion for the pre-characterization of MN patients and because of the fact that a considerable proportion of patients undergo spontaneous remission. An unbiased comparison of RC-IFA and ELISA must be addressed with a prospective study design.

We conclude that the ELISA developed in this study is a robust test system that can be used in a routine environment to determine auto-antibodies against PLA₂R1. An on-going prospective study using this assay is currently addressing the value of the autoantibodies for disease monitoring.

Conflicts of interest

WSt and WSch are board members, CD, CP, WSt and WSch are shareholders, and CD, CP, LK are employees of EUROIMMUN AG.

Acknowledgments

We thank Beatrice Schneider, Sabrina Voigt, Beatrice Ziegler, Denise Kast, Maria Engel, and Yasmin Rooks for their excellent technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2013.03.015>.

References

- [1] Glasscock RJ. The pathogenesis of idiopathic membranous nephropathy: a 50-year odyssey. *Am J Kidney Dis* 2010;56:157–67.
- [2] Polanco N, Gutierrez E, Covarsi A, et al. Spontaneous remission of nephrotic syndrome in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:697–704.
- [3] Glasscock RJ. Diagnosis and natural course of membranous nephropathy. *Semin Nephrol* 2003;23:324–32.
- [4] Cattran DC, Pei Y, Greenwood CM, Ponticelli C, Passerini P, Honkanen E. Validation of a predictive model of idiopathic membranous nephropathy: its clinical and research implications. *Kidney Int* 1997;51:901–7.
- [5] van den Brand JA, Hofstra JM, Wetzels JF. Prognostic value of risk score and urinary markers in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012;7:1242–8.
- [6] Beck Jr LH, Bonegio RG, Lambeau G, et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2009;361:11–21.
- [7] Glasscock RJ. The pathogenesis of membranous nephropathy: evolution and revolution. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012;21:235–42.
- [8] Hofstra JM, Wetzels JF. Anti-PLA 2R antibodies in membranous nephropathy: ready for routine clinical practice? *Neth J Med* 2012;70:109–13.

- [9] Hoxha E, Blöcker IM, Probst C, et al. Detection of PLA2R specific autoantibodies in patients with idiopathic membranous nephropathy using PLA2R producing HEK293 cells. Report on the 7th Congress on Autoimmunity, Ljubljana, Slovenia; 2010.
- [10] Debiec H, Ronco P. PLA2R autoantibodies and PLA2R glomerular deposits in membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2011;364:689–90.
- [11] Debiec H, Martin L, Jouanneau C, et al. Autoantibodies specific for the phospholipase A(2) receptor in recurrent and de novo membranous nephropathy. *Am J Transplant* 2011;10:2144–52.
- [12] Hofstra JM, Debiec H, Short CD, et al. Antiphospholipase A2 receptor antibody titer and subclass in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2012;23(10):1735–43.
- [13] Stahl R, Hoxha E, Fechner K. PLA2R autoantibodies and recurrent membranous nephropathy after transplantation. *N Engl J Med* 2010;363:496–8.
- [14] Qin W, Beck Jr LH, Zeng C, et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:1137–43.
- [15] Ancian P, Lambeau G, Mattei MG, Lazdunski M. The human 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2. Molecular cloning, identification of a secreted soluble form, expression, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 1995;270:8963–70.
- [16] Hoxha E, Harendza S, Zahner G, et al. An immunofluorescence test for phospholipase-A(2)-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:2526–32.
- [17] Schmidt E, Dähnrich C, Rosemann A, et al. Novel ELISA systems for antibodies to desmoglein 1 and 3: correlation of disease activity with serum autoantibody levels in individual pemphigus patients. *Exp Dermatol* 2010;19:458–63.
- [18] Koy C, Mikkat S, Raptakis E, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization-quadrupole ion trap-time of flight mass spectrometry sequencing resolves structures of unidentified peptides obtained by in-gel tryptic digestion of haptoglobin derivatives from human plasma proteomes. *Proteomics* 2003;3:851–8.
- [19] Hoxha E, Kneissler U, Stege G, et al. Enhanced expression of the M-type phospholipase A2 receptor in glomeruli correlates with serum receptor antibodies in primary membranous nephropathy. *Kidney Int* 2012;82(7):797–804.
- [20] Debiec H, Ronco P. Nephrotic syndrome: a new specific test for idiopathic membranous nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2011;7:496–8.
- [21] Wandinger KP, Saschenbrecker S, Stoecker W, Dalmau J. Anti-NMDA-receptor encephalitis: a severe, multistage, treatable disorder presenting with psychosis. *J Neuroimmunol* 2011;231:86–91.
- [22] Waters PJ, McKeon A, Leite MI, et al. Serologic diagnosis of NMO: a multicenter comparison of aquaporin-4-IgG assays. *Neurology* 2012;78:665–71.
- [23] Komorowski L, Teegen B, Probst C, et al. Autoantibodies against exocrine pancreas in Crohn's disease are directed against two antigens: the glycoproteins CUZD1 and GP2. *J Crohns Colitis* 2012 [in press].

2.2. Article 2 : Le suivi des Ac anti-PLA2R1 après la transplantation rénale permet de prédire la récurrence de GEM sur le greffon

Depuis l'identification de PLA2R1 comme principale cible antigénique dans les GEM idiopathiques, deux études ont recherché des anticorps anti-PLA2R1 au cours de la greffe rénale dans les suites d'une GEM afin de rechercher si le dosage des anticorps anti-PLA2R1 peut permettre un diagnostic précoce de récurrence de GEM sur le greffon. En effet, nous avons vu que la récurrence de la néphropathie initiale est la 3^{ème} cause de perte de greffon en transplantation rénale après la mort du patient avec un greffon fonctionnel et les rejets (Briganti et al., 2002). La récurrence survient selon les études dans 7 à 42% des cas (Dabade et al., 2008; Monga et al., 1993).

L'intérêt du dosage des anticorps anti-PLA2R1 pour prédire le risque de récurrence en transplantation rénale est débattu. Stahl et al. avaient montré à travers un cas clinique une bonne corrélation entre le titre d'anticorps anti-PLA2R1 mesuré en immunofluorescence indirecte sur cellules HEK 293 transfectées avec PLA2R1 et la récurrence puis avec la rémission du patient après traitement immunosuppresseur par rituximab (Stahl et al., 2010).

La controverse est venue d'une étude de Debiec et al. qui ont repris 10 récurrences de GEM après transplantation rénale, 5 patients ont des anticorps anti-PLA2R1 au moment de la greffe rénale, les 5 autres patients n'ont pas de sérum disponible au moment de la greffe ni au cours du suivi. La recherche d'anticorps anti-PLA2R1 se fait également par immunofluorescence indirecte.

Sur les 5 patients qui ont des anticorps au moment de la greffe, 3 patients ont des anticorps au moment de la récurrence, un patient n'a pas de sérum disponible au moment de la récurrence et le 5^{ème} n'a pas d'anticorps au moment de la récurrence. De plus ils rapportent 3 cas de patients porteurs d'anticorps anti-PLA2R1 au moment de la greffe qui n'ont pas récidivé après plus de 2 ans de suivi. Ils ont également recherché des anticorps anti-PLA2R1 dans 9 GEM de novo et n'en ont pas mis en évidence (Debiec et al., 2011b). Ils concluent qu'il existe une hétérogénéité de la cinétique des anticorps anti-PLA2R1 après la greffe rénale et donc à l'utilisation prudente de ce marqueur.

Nous avons repris le sérum au moment de la greffe et au cours du suivi de 15 patients greffés entre 1997 et 2012 au CHU de Nice dans les suites d'une GEM (Table 1). Au moment de la greffe 10 patients ont des anticorps anti-PLA2R1 mesurés en ELISA avec un anti-IgG total et un anti-IgG4 et en immunofluorescence indirecte. Sur ces 10 patients, 6 ont présenté une baisse de leur titre d'anticorps sous l'effet du traitement immunosuppresseur de la greffe sans

récidive, les 4 autres ont un titre d'anticorps persistant et ont récidivé, dont un patient avec une forme infra-clinique (Fig.3). Ces 4 patients ont un traitement immunosuppresseur plus faible que l'autre groupe, n'associant pas : traitement inducteur de la greffe, anti-calcineurines et mycophénolate mofétil (Table 2).

Dans le groupe des patients sans anticorps anti-PLA2R1 au moment de la greffe (n=5), un patient présente une récurrence avec perte de son greffon. Nous avons recherché d'autres cibles antigéniques notamment THSD7A, et les antigènes intra-podocytaires (SOD2, AR) sans succès.

Dans le groupe des récurrences avec anticorps anti-PLA2R1, tous ont actuellement un greffon fonctionnel, deux patients ont bénéficié d'un traitement immunosuppresseur par rituximab et deux patients ont reçu un traitement symptomatique.

Nous allons maintenant pouvoir poursuivre ce travail grâce à un projet hospitalier de recherche clinique national afin de confirmer l'intérêt des dosages d'anticorps anti-PLA2R1 dans le diagnostic des récurrences de GEM en transplantation et également rechercher des anticorps anti-THSD7A.

Original Article

Prediction of membranous nephropathy recurrence after transplantation by monitoring of anti-PLA2R1 (M-type phospholipase A2 receptor) autoantibodies: a case series of 15 patients

Barbara Seitz-Polski^{1,2,3}, Christine Payré², Damien Ambrosetti⁴, Laetitia Albano¹, Elisabeth Cassuto-Viguié^{1,4}, Marine Berguignat¹, Ahmed Jeribi¹, Marie-Christine Thouret⁵, Ghislaine Bernard³, Sylvia Benzaken³, Gérard Lambeau^{2,*} and Vincent L.M. Esnault^{1,*}

¹Service de Néphrologie, Hôpital Pasteur, Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice, France, ²Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275 CNRS et Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne, France, ³Laboratoire d'Immunologie, Hôpital l'Archet, Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice, France, ⁴Service d'anatomopathologie, Hôpital Pasteur, Université Nice-Sophia Antipolis, Nice, France and ⁵Service de Néphro-pédiatrie, Hôpital l'Archet, Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice, France

Correspondence and offprint requests to: Barbara Seitz-Polski; E-mail: seitz-polski.b@chu-nice.fr

*G.L. and V.L.M.E. contributed equally to the leadership of this study and are co-last authors.

ABSTRACT

Background. The predictive value of anti-M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R1) autoantibodies for membranous nephropathy (MN) recurrence after renal transplantation remains controversial.

Methods. Our aim was to monitor anti-PLA2R1 IgG4 activity using a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay in 15 kidney transplant recipients with MN, and to test the correlation between antibody titres and MN recurrence.

Results. Five patients never exhibited anti-PLA2R1 antibodies, and one of them relapsed. Ten patients (67%) had IgG4 anti-PLA2R1 antibodies at the time of transplantation and during follow-up. The presence of IgG4 anti-PLA2R1 antibodies at the time of kidney transplantation does not imply MN recurrence ($P = 0.600$, $n = 15$). However, a positive IgG4 anti-PLA2R1 activity during follow-up ($> \text{Month } 6$) was a significant risk factor for MN relapse ($P = 0.0048$, $n = 10$). Indeed, four patients had persistent IgG4 anti-PLA2R1 activity after transplantation and relapsed. Among them, one was successfully treated with rituximab. Another had persistently high IgG4 anti-PLA2R1 activity and exhibited a histological relapse but no proteinuria while on treatment with renin-angiotensin system inhibitors. In contrast, the six other patients who did

not relapse exhibited a decrease of their IgG4 anti-PLA2R1 activity following transplant immunosuppression, including two with proteinuria due to biopsy-proven differential diagnoses. A weak transplant immunosuppressive regimen was also a risk factor of MN recurrence ($P = 0.0048$, $n = 10$). Indeed, the six patients who received both an induction therapy and a combined treatment with calcineurin inhibitors/mycophenolate exhibited a decrease of IgG4 anti-PLA2R1 activity and did not relapse, while the four patients who did not receive this strong immunosuppressive treatment association had persistently high IgG4 anti-PLA2R1 activity and relapsed.

Conclusion. The monitoring of IgG4 anti-PLA2R1 titres during follow-up helps to predict MN recurrence, and a strong immunosuppressive treatment of anti-PLA2R1 positive patients may prevent recurrence.

Keywords: membranous nephropathy, PLA2R1 autoantibodies, prognosis, recurrence, transplantation

INTRODUCTION

Membranous nephropathy (MN) is a common cause of nephrotic syndrome in adults and leads, in 40–50% of cases, to end-stage kidney disease (ESKD) [1–4]. MN represents 2% of

patients on the waiting list for a kidney graft [5, 6]. Recurrence of MN after renal transplantation occurs in 7–42% of patients [5, 7], resulting in reduced allograft survival [6, 8]. However, the true proportion of MN recurrence is difficult to assess because graft biopsy policies are extremely variable among transplant centres. The highest MN recurrence rate is found in series of systematic protocol biopsies [5]. Furthermore, the type of immunosuppressive treatment is not yet recognized as a determinant of MN recurrence [9].

MN is defined by subepithelial immune deposits containing IgG (mainly of the IgG4 subclass) and complement fractions with alteration of the basement membrane structure. The M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R1) is the major autoantigen involved in MN [10]. This has been widely confirmed in patients with idiopathic or secondary MN using different assays including western blot, indirect immunofluorescence transmission (IIFT) on human embryonic kidney (HEK) cells transfected with PLA2R1 and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [11–14]. The pathogenic role of anti-PLA2R1 autoantibodies is not yet proven, but their serum titres measured by western blot [12], IIFT [15] or ELISA with recombinant human PLA2R1 [13, 14] appear to be associated with MN disease activity in native kidneys. Indeed, the autoantibody titres were found to correlate with baseline proteinuria and the rate of remission [13, 15]. Furthermore, the disappearance of anti-PLA2R1 antibodies precedes proteinuria decrease and disease remission upon treatment with rituximab [16]. Moreover, the antibody titre may also predict long-term outcome in MN patients [17, 18]. However, only partial or no correlation between anti-PLA2R1 activity and clinical parameters were observed in some studies [13, 19, 20]. Whether these discrepancies are due to the detection methods used and/or the series of MN patients analysed remains to be clarified.

The relevance of anti-PLA2R1 antibody monitoring for the prediction of MN recurrence in kidney transplant recipients also remains controversial. Stahl *et al.* [21] first reported a case of MN recurrence after renal transplantation. Anti-PLA2R1 antibody titres on IIFT increased before proteinuria and decreased after four boluses of rituximab that induced remission [21]. Controversy arises from a study of 10 patients with recurrent MN, suggesting that anti-PLA2R1 antibodies were implicated in only 5 of 10 patients, with no correlation between the presence of the autoantibodies detected by IIFT and disease recurrence [22]. However, several patients had no sera available at the time of either renal transplantation and/or MN recurrence. Furthermore, MN did not recur in three patients who had high titres of anti-PLA2R1 antibodies at the time of renal transplantation, but subsequent testing during follow-up was not reported [22].

The aim of this study was to monitor anti-PLA2R1 antibody titres during the follow-up of 15 kidney transplant recipients with MN and to correlate the autoantibody titres with disease activity on kidney graft using an anti-PLA2R1-specific ELISA.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Fifteen consecutive MN patients, who received a kidney transplant between 1997 and 2012 at the University Hospital

of Nice, with at least a 1-year follow-up, were included in this study. All patients had MN diagnosis on native kidney established by renal biopsy. Patients gave informed consent to participate in this study, which was approved by our local research ethical committee. Primary MN was defined for patients, where no secondary cause was apparent. Secondary MN was suggested by the presence of anti-nuclear antibodies, hepatitis B or C serologies or cancers, but a clear classification into secondary MN was made only when the secondary cause or its treatment was associated with an increase or decrease of MN disease (see the 'Results' section for Patients 7, 10, 11 and 14 who were classified as I or II MN based on their clinical data). MN recurrence was established on protocol biopsies at Month 3 and/or Year 1, or on biopsies performed because of clinical or biological events. MN recurrence was established by immunofluorescence showing typical IgG subepithelial deposits in a granular pattern. Sera were analysed at the time of renal transplantation and during follow-up.

Detection of anti-PLA2R1 antibodies by ELISA

We developed a novel ELISA to specifically and quantitatively measure anti-PLA2R1 antibody titres in MN patients (Seitz-Polski *et al.*, manuscript in preparation). Briefly, a recombinant soluble form of PLA2R1 encompassing the entire extracellular region of the receptor was produced and purified from transfected HEK 293 cells as described previously [23–25]. The purified antigen (1 µg/mL) was then used to coat ELISA plates at 4°C overnight. Plates were blocked for 2 h with SeramunBlock (Seramun Diagnostica, Germany). Patients' sera were diluted at 1:100 in phosphate-buffered saline (PBS) plus 0.1% low-fat dry milk. After 2 h of incubation at room temperature on a plate shaker, the plates were washed four times with PBS plus 0.02% Tween 20. Anti-human IgG4-horseradish peroxidase conjugate (Southern Biotech) diluted at 1:7500 in SeramunStab ST plus (Seramun Diagnostica), or anti-human total IgG-horseradish peroxidase conjugate [14] was added (100 µL per well) and incubated for 1 h at room temperature on a plate shaker. After four washes, the tetramethylbenzidine peroxidase substrate was added for 15 min, after which the reaction was stopped with HCl 1.2 N. The plates were read at 450 nm.

The anti-PLA2R1 ELISA was set to detect either total IgG or IgG4 and was validated on a cohort of 153 MN patients (130 idiopathic MN and 23 secondary MN) versus 134 control subjects (67 healthy donors and 67 disease controls). The specificity of the ELISA was 100% and was also confirmed by western blot and IIFT assays (Euroimmun kit) as described [10, 12]. The IgG4 ELISA was found to be the most sensitive test for patients with active MN with an average positivity in MN patients (both idiopathic and secondary forms) of 64% versus only 58% for IIFT and 57% for total IgG ELISA (Table 1). All human sera used in this retrospective study were assayed in duplicates at a working dilution of 1:100 for both IgG4 and total IgG anti-PLA2R1 activity. Because IgG4 was the dominant subclass in the majority of patients and IgG4 titres were found to significantly correlate with disease activity ([11–14] and Seitz-Polski *et al.*, manuscript in preparation), IgG4 anti-PLA2R1 titres are presented during the patient's follow-up. A positive index patient serum was used to generate a standard IgG4 anti-PLA2R1

Table 1. Patient's baseline clinical characteristics, immunosuppressive treatment and anti-PLA2R1 titres before and after kidney transplantation

Patients	Age ^a	Sex	MN	Day of transplantation				MN recurrence				Last observation carried forward						
				Anti-PLA2R1 levels			Immunosuppressive treatment	Yes/ no	Time from Tx to recurrence (months)	Anti-PLA2R1 levels			Follow- up	UPCR (g/g)	sCreat (μmol/L)	Anti-PLA2R1 levels		
				ELISA IgG4 ^b	ELISA Tot IgG ^b	IIFT Tot IgG				ELISA IgG4 ^b	ELISA Tot IgG ^b	IIFT Tot IgG				ELISA IgG4 ^b	ELISA totIgG ^b	IIFT Tot IgG
1	32	M	I	1321	918	1/100	Cyclo, MMF	Yes	12	NA	NA	NA	192	0.21	143	305	N	1/32
2	48	F	I	166	787	1/10	Cyclo, Rapa	Yes	156	5023	3000	1/320	162	7.06	117	217	137	1/10
3	54	M	I	7364	1561	1/1000	Thymoglobulin (Thymo), Tacro, MMF	No ^c	–	N	N	N	186	0.62	277	N	N	N
4	59	M	I	5084	1282	1/320	Basiliximab, Tacro, Evero	Yes	8	307	N	1/32	84	0.22	201	N	N	N
5	57	M	I	1261	1195	1/100	Tacro, MMF	Yes	60	633	605	1/32	60	3.69	114	633	605	1/32
6	62	F	I	137	N	N	Basiliximab, Tacro, MMF	No ^c		N	N	N	54	1.13	247	N	N	N
7	64	F	I (HBV) ^d	187	140	1/10	Basiliximab, Tacro, MMF	No ^e		N	N	N	42	0.04	93	N	N	N
8	52	F	I	5014	1190	1/10	Basiliximab, Tacro, mycophenolate acid	No ^c		N	N	N	36	0.50	90	N	N	N
9	42	M	I	1129	772	1/100	Basiliximab, Tacro, MMF	No ^f		N	N	N	24	0.09	96	N	N	N
10	58	M	I (HBV, HCV) ^d	3160	1557	1/320	Basiliximab, Tacro, MMF	No ^f		N	N	N	24	0.50	90	N	N	N
11	35	F	II (SLE) ^d	N	N	N	Tacro, MMF	No ^f		N	N	N	168	0.06	130	N	N	N
12	39	M	I	N	N	N	Tacro, MMF	No ^c		N	N	N	54	0.08	140	N	N	N
13	60	F	I	N	N	N	Thymo, Tacro, MMF	Yes	3	N	N	N	12	HD	HD	N	N	N
14	58	M	II (HCV) ^d	N	N	N	Thymo, Tacro, MMF	No ^c		N	N	N	18	0.37	187	N	N	N
15	70	H	I	N	N	N	Basiliximab, Tacro, MMF	No ^f		N	N	N	10	0.20	138	N	N	N

M, male; F, female; MN, membranous nephropathy (I, primary or II, secondary); totIgG, total IgG; HCV/HBV, hepatitis C/B virus; SLE, systemic lupus erythematosus; ESKD, end-stage kidney disease; NA, non-available; N, negative during follow-up; Tx, transplantation; IIFT, indirect immunofluorescence transmission; Cyclo, Cyclosporine; Tacro, tacrolimus; Evero, everolimus; MMF, mycophenolate mofetil; sCreat, serum creatinine; HD, haemodialysis.

^aAt the time of renal transplantation.

^bRU/mL.

^cPatients 3, 6, and 14 had kidney graft biopsy that showed no MN recurrence but differential diagnosis.

^dPatients 7 and 10 have I MN with incidental HBV and/or HCV infection while Patients 11 and 14 have II MN (see the main text).

^ePatients 7, 8 and 12 had protocol biopsies that showed no MN recurrence.

^fPatients 9, 10, 11 and 15 never had kidney graft biopsy because their UPCR remained <0.5 g/g during follow-up without RAS blockade.

calibration curve and to convert OD_{450 nm} values into relative units/mL (RU/mL). Sixty-seven serum samples from healthy donors were used to define the normal range, below the mean value + 3 SDs; values >128 RU/mL were considered as positive in the IgG4 anti-PLA2R1 ELISA.

Detection of anti-PLA2R1 antibodies by IIFT

We used a recombinant cell-based indirect immunofluorescence test (RC-IFA; Euroimmun, Germany) containing a BIOCHIP mosaic of formalin-fixed HEK 293 cell over-expressing human PLA2R1 and mock-transfected HEK 293 cells as negative control [15]. To achieve a semi-quantitative measurement of PLA2R1 autoantibody levels, different dilutions of serum were prepared in PBS, 0.2% Tween 20 and incubated for 30 min. A fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-human IgG antibody (Euroimmun) was used to detect bound IgG antibodies. All slides were evaluated by two independent observers using a microscope with 460–490 nm LED excitation (EUROStar; Euroimmun). A specific fluorescence of the transfected cells at a dilution of 1:10 or higher was considered positive.

Statistical analyses

For descriptive statistics, data are presented as mean ± SD. Qualitative criteria were compared using Fisher's exact test. Quantitative variables were compared using the Student *t*-test. All statistics were performed using the Prism6 software. *P*-values of <0.05 were considered as statistically significant.

RESULTS

Patients

The 15 patients included in this study are described in Table 1. They were nine males and six females. Their mean age was 53 years (32–64 years) at the time of renal transplantation. Eleven patients presented idiopathic MN with no apparent secondary cause. Patients 7, 10, 11 and 14 had features of a secondary form: one to systemic lupus erythematosus (SLE), one to hepatitis B virus (HBV) infection, one to hepatitis C virus (HCV) infection and one to both HBV and HCV infection. However, Patients 7 and 10 had likely idiopathic MN with incidental HBV and/or HCV infection and not secondary MN. Indeed, no therapeutic association was found between HBV/HCV infection and MN disease activity. Clinically, Patient 7 was successfully treated for HBV infection but developed kidney failure while on HBV treatment. Patient 10 had both HBV and HCV infection that clinically improved spontaneously while MN disease became more severe and progressed to ESKD. These clinical data support the view of two independent diseases, i.e. idiopathic MN and HBV/HCV infection. This view is reinforced by the fact that the sole presence of anti-PLA2R1 autoantibodies in MN patients is a sufficient criterion to classify these latter as primary MN [19]. Because both Patients 7 and 10 were positive for anti-PLA2R1 (see below), we have classified these patients as idiopathic MN with incidental HBV/HCV infection. Patient 11 had MN and active SLE. She was clearly positive for anti-DNA antibody and was treated with corticosteroids and antimalarial drugs

over 10 years without remission while she developed ESKD and underwent renal transplantation. Patient 14 had MN and chronic HCV infection before and after the first kidney transplantation. Seventeen years later, he lost the kidney graft (without MN recurrence) and was successfully treated for HCV before the second kidney transplantation. Furthermore, Patients 11 and 14 were negative for anti-PLA2R1 antibodies (see below). For both patients, it is thus unclear whether they have primary MN (here with an unknown antigen–antibody pair, distinct from PLA2R1) together with incidental SLE or HCV infection or a true secondary MN. In the absence of more clinical evidence, we have maintained the classification of Patients 11 and 14 as secondary MN. Seven patients received a specific treatment for MN on their native kidney: one was treated with cyclosporine and mycophenolate mofetil (MMF), one with cyclosporine and steroids, one with steroids alone, one for SLE with steroids and hydroxychloroquine and two for HBV or HCV infection by baraclud or combined interferon and ribavirin. The mean time from diagnosis of MN to ESKD was 7 years (7 months to 17 years). All but one patient was on dialysis before kidney transplantation for a mean time of 26 months (0–11 years).

All patients received a deceased donor kidney. Ten of them had an induction of immunosuppression with thymoglobulins (three cases) or anti-CD25 monoclonal antibodies (seven cases). Subsequent immunosuppressive treatments are detailed in Table 1. The mean follow-up was 74 months (12 months–16 years). Four patients (9, 10, 11 and 15) never had kidney graft biopsy since urinary protein–creatinine ratio (UPCR) remained <0.5 g/g during follow-up without renin–angiotensin system (RAS) blockade. Three patients (7, 8 and 12) had protocol biopsies at Month 3 (*n* = 1) or at Month 3 and Year 1 (*n* = 2). The last eight patients (1–6, 13 and 14) had biopsies because of serum creatinine increase or nephrotic range proteinuria (Table 1). Five patients (33%) presented a biopsy-proven MN recurrence on their renal transplant either early before Year 1 in three cases (Patient 1 at Year 1, Patient 4 at Month 8 and Patient 13 at Month 3) or lately after Year 5 in two other cases (Patient 2 at Year 13 and Patient 5 at Year 5). Only Patient 13 reached ESKD.

Detection of anti-PLA2R1 antibodies in patients

We used a validated ELISA to monitor both IgG4 and total IgG anti-PLA2R1 autoantibody titres (see Materials and Methods). Ten of the 15 patients (67%) had IgG4 anti-PLA2R1 activity at the time of renal transplantation and/or during follow-up (Table 1). Nine of them were also positive for total IgG anti-PLA2R1 activity. Patient 6 had only a borderline IgG4 but no total IgG anti-PLA2R1 activity. The 10 patients positive by ELISA were also positive by IIFT (Table 1). Because Patients 7 and 10 were classified as idiopathic MN but with incidental HBV/HCV infection and because Patient 7 had a low anti-PLA2R1 titre by ELISA and IIFT at the time of transplantation, we confirmed that these patients were also positive for anti-PLA2R1 by western blot [10] using purified recombinant human PLA2R1 antigen (Supplementary data, Figure S1). Finally, five patients had no anti-PLA2R1 antibodies at the time of renal transplantation and during follow-up.

Overall, 67% of all patients were positive for anti-PLA2R1. Among the idiopathic cases, 77% were positive. All patients positive for anti-PLA2R1 had idiopathic MN, with two of them having incidental HBV/HCV infection. The two cases of secondary MN were negative.

Monitoring of anti-PLA2R1 autoantibodies after kidney transplantation

Four patients (1, 2, 4 and 5) exhibited MN recurrence on their kidney graft and had persistent IgG4 anti-PLA2R1 activity at Month 6 or later (Table 1 and Figure 1 for Patients 1 and

4). For Patients 1 and 2, we performed PLA2R1 antigen staining on the biopsy [19] at the time of MN recurrence and found an enhanced staining for Patient 2, but only a faint staining for Patient 1 (Supplementary data, Figure S2). Enhanced PLA2R1 staining has been observed in most cases of primary MN [19], but discrepant results were obtained by Debiec *et al.* [22] in kidney transplant recipients with MN. Patient 1 had a sub-clinical MN recurrence with high IgG4 anti-PLA2R1 titre. Patients 2 and 5 had MN recurrence with increased proteinuria and persistent IgG4 anti-PLA2R1 titre. Patient 4 had positive IgG4, but no total IgG anti-PLA2R1 activity measured by

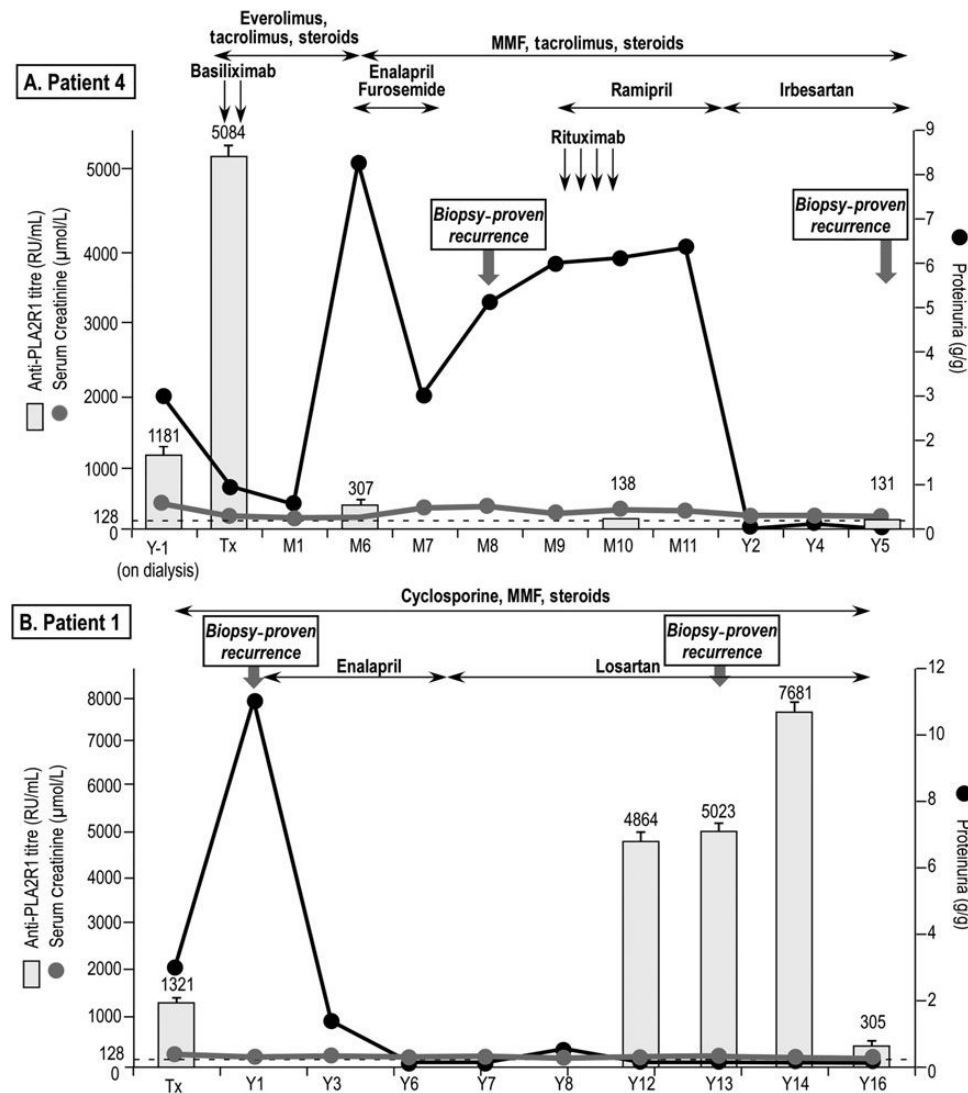


FIGURE 1: Clinical follow-up of two patients with recurrent MN. (A) Patient 4 had high IgG4 anti-PLA2R1 antibody titres on the day of renal transplantation. Anti-PLA2R1 activity remained significant at Month 6 (307 RU/mL), while he developed a nephrotic syndrome complicated by an intestinal ischaemia secondary to mesenteric thrombosis requiring anticoagulant. A kidney biopsy could only be performed after anticoagulant discontinuation at Month 8 and confirmed MN recurrence. He received four boluses of rituximab (375 mg/m²/week) with a complete disappearance of anti-PLA2R1 antibodies (138 RU/mL). Five years later, anti-PLA2R1 antibodies remain undetectable (131 RU/mL) with no proteinuria, but renal function has only marginally recovered [Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) 26 mL/min/1.73 m²] despite the total disappearance of subepithelial IgG deposits. (B) Patient 1 presented high titres of IgG4 anti-PLA2R1 antibodies on the day of renal transplantation and during follow-up and exhibited a nephrotic syndrome and MN recurrence 1 year after transplantation. RAS blockade combined with increased dosage of steroids and high doses of cyclosporine and MMF allowed a complete clinical remission with a sequel of chronic renal failure (MDRD 45 mL/min/1.73 m²). However, 13 years later, he still has high titres of anti-PLA2R1 antibodies with IgG deposits on kidney biopsy.

ELISA at the time of MN recurrence with increased proteinuria. Patient 4 was successfully treated with rituximab and exhibited no anti-PLA2R1 activity at last observation with clinical and histological remission.

Six patients (3 and 6–10) did not relapse and experienced a decrease of their IgG4 anti-PLA2R1 activity during follow-up (Table 1 and Figure 2 for Patients 8 and 9). The minimum follow-up for these six patients was 24 months. Patients 3 and 6 exhibited an increase of proteinuria during follow-up without any associated anti-PLA2R1 activity. Kidney biopsy showed a differential diagnosis: BK nephropathy for Patient 3 and nephrosclerosis of an extended criteria kidney graft for Patient 6 (i.e. without evidence of MN recurrence).

The patients' cases reported in this study can be recapitulated in a working diagnostic tree using IgG4 anti-PLA2R1 activity and changes in proteinuria levels at the time of renal transplantation and during follow-up (Figure 3). Among the 10 patients with anti-PLA2R1 activity at the time of renal transplantation, the persistence of anti-PLA2R1 antibodies with high proteinuria levels is associated with overt MN recurrence ($n = 3$) while the persistence of anti-PLA2R1 activity with low proteinuria levels

under RAS blockade is associated with sub-clinical MN recurrence ($n = 1$). A decrease of IgG4 anti-PLA2R1 antibody titres with an increase of proteinuria levels is associated with a differential diagnosis ($n = 2$), and there is no MN recurrence when anti-PLA2R1 activity disappears and proteinuria decreases during follow-up ($n = 4$). Among the five patients who never presented any anti-PLA2R1 activity, Patient 13 had MN recurrence, possibly due to another antigen target. We carefully tested the sera of this patient by western blot for its reactivity against possible antigens which might be present in protein lysates from human kidney glomerular extract [10] and cultured human podocytes [20, 26, 27]. We tested three different sera of Patient 13 at high concentration (1/50) under both reducing and non-reducing conditions. The three sera were collected at the time of transplantation, at recurrence and during ESKD. In all conditions, no specific signal was obtained on human glomerular extracts (data not shown), even after detection with an ultra-sensitive enhanced chemiluminescence detection system. Using protein extract from human cultured podocytes, no specific signal was also observed when compared with results obtained with control sera either from MN patients positive for

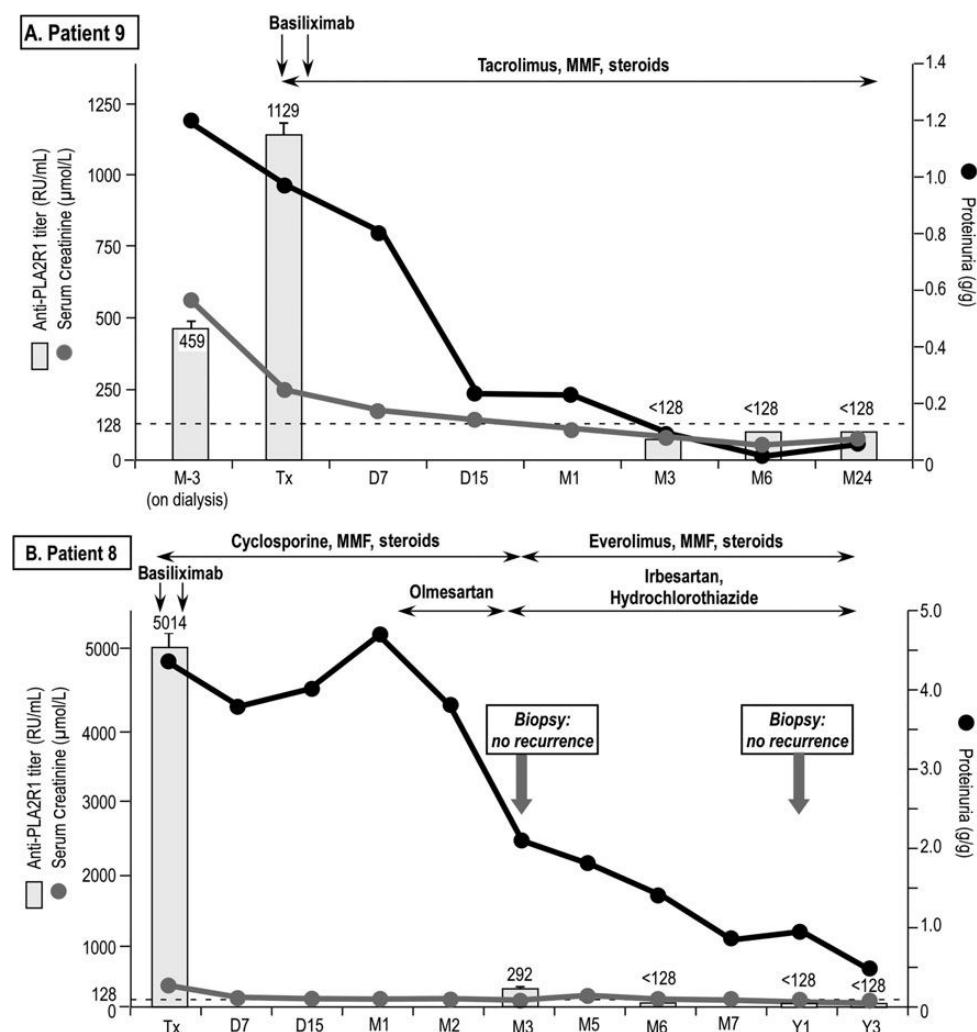


FIGURE 2: Clinical follow-up of two patients without MN recurrence. (A) Patient 9 exhibited a rapid disappearance of IgG4 anti-PLA2R1 activity followed by a decrease of proteinuria. (B) Patient 8 had a relatively slower decrease of IgG4 anti-PLA2R1 antibodies and proteinuria. Kidney biopsies ruled out MN recurrence at Months 3 and 12.

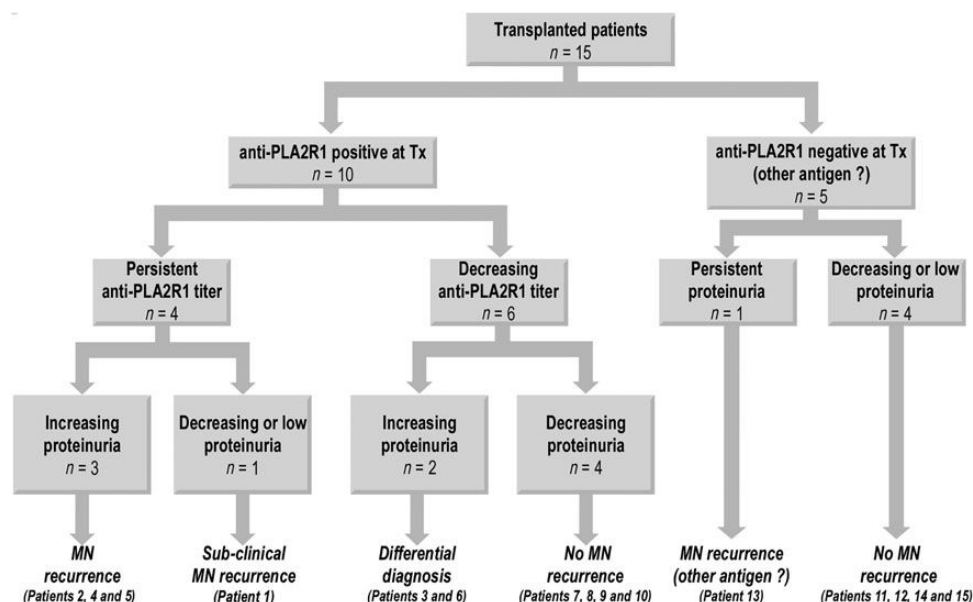


FIGURE 3: Working diagnostic tree using IgG4 anti-PLA2R1 activity at the time of renal transplantation and during follow-up, and proteinuria changes after renal transplantation.

PLA2R1 (which were indeed positive for PLA2R1 on this podocyte protein extract, see Supplementary data, Figure S3) or from a patient with focal segmental glomerulosclerosis or from a healthy donor (Supplementary data, Figure S3). Of interest, no specific signal was observed at molecular masses corresponding to those of aldose reductase, superoxide dismutase 2 and alpha-enolase, which have been proposed as autoantigens in MN [20, 27]. These results suggest that the serum of this patient has no or very limited amount of autoantibodies directed against an antigen present in human kidney glomeruli or cultured podocytes. Alternatively, the antigen of this patient might be a planted one that cannot be detected with these western blot assays. The identification of the putative antigen for Patient 13 should thus deserve future work.

Together, our results indicate that the presence of anti-PLA2R1 autoantibodies at the time of renal transplantation did not imply MN recurrence ($P = 0.600$, $n = 15$) (Table 1). However, a persistent IgG4 anti-PLA2R1 activity after 6 months of follow-up or more was significantly associated with MN recurrence ($P = 0.0048$, $n = 10$) and the mean IgG4 anti-PLA2R1 antibody titre after 6 months of follow-up was significantly higher in the group of patients with MN recurrence ($P < 0.0001$, $n = 10$) (Table 2). Moreover, none of the six patients who received both an induction therapy and combined calcineurin inhibitor (CNI) and mycophenolate relapsed, but all four patients who did not receive such strong immunosuppressive association relapsed ($P = 0.0048$) (Tables 1 and 2).

DISCUSSION

The relevance of monitoring anti-PLA2R1 antibody to predict MN recurrence in kidney transplant recipients has remained unclear [21, 22]. Therefore, the primary aim of this study was to further assess whether the monitoring of anti-PLA2R1

Table 2. Immunosuppressive treatment and anti-PLA2R1 activity in patients with and without MN recurrence

Patients	Recurrent MN		Non-recurrent MN	
	n	Anti-PLA2R1 activity during follow-up (RU/mL) ^a	n	Anti-PLA2R1 activity during follow-up (RU/mL)
Induction therapy and combined CNI and MMF	0*	–	6*	<128
No induction therapy or no CNI or no MMF	4*	1544 ± 2326	0*	–
Total population	4	1544 ± 2326**	6	<128**

^aMean anti-PLA2R1 titre at MN recurrence. The mean value was calculated from individual titres of Patients 1, 2, 4 and 5.

* $P = 0.0048$ for MN recurrence in patients who received both an induction therapy and combined CNI and MMF versus those who did not receive this strong immunosuppressive regimen.

** $P < 0.0001$ for anti-PLA2R1 levels during follow-up between patients with and without MN recurrence.

autoantibody may help or not to predict MN recurrence after transplantation. Similar to previous studies [21, 22], our study was retrospective and included a relatively small number of patients (15 cases). Interestingly enough, we found a comparable percentage of patients with anti-PLA2R1 activity (67%) and MN recurrence (33%). One major strength of our study is, however, that it is the first series of sequential analysis of anti-PLA2R1 antibody titres measured on sera available not only at the time of renal transplantation but also during follow-up and by measuring both total and IgG4 anti-PLA2R1 activity using a sensitive and quantitative ELISA.

Despite the relatively small number of patients of our study, we had at least one case to re-evaluate the previously reported discrepancies between anti-PLA2R1 activity and MN

recurrence [22]. First, patients with anti-PLA2R1 antibody at the time of renal transplantation may not present MN recurrence because of a rapid decrease of anti-PLA2R1 activity before Month 6 following transplant immunosuppression. Second, proteinuria may be masked by combined RAS blockade and high doses of CNI as shown previously [5]. Therefore, persistently high anti-PLA2R1 antibody titres with no proteinuria should lead to suspect sub-clinical recurrent MN. In this regard, we cannot rule out a higher rate of sub-clinical MN recurrence in our patients, as renal biopsies were not always performed in the absence of overt proteinuria. Third, MN recurrence with apparently no anti-PLA2R1 activity may be due to the lower sensitivity of total IgG assays that were used in previous studies including IIFT [22]. Indeed, we found that measuring IgG4 anti-PLA2R1 activity by ELISA is more sensitive than measuring total IgG, either by ELISA or by IIFT (see Table 1 and Materials and Methods). Importantly, the monitoring of IgG4 anti-PLA2R1 activity was better associated with MN disease activity than total IgG [5]. Fourth, the increase of proteinuria in a patient who exhibited a total disappearance of anti-PLA2R1 antibodies suggests a differential diagnosis. Fifth, in patients without anti-PLA2R1 antibodies, MN may also recur after renal transplantation, suggesting in this case the presence of an unknown antigen target.

Overall, we observed that although the titre of anti-PLA2R1 antibody at the time of renal transplantation was not predictive of MN recurrence ($P = 0.600$, $n = 15$), a persistently positive anti-PLA2R1 activity after 6 months of follow-up was significantly associated with MN recurrence ($P = 0.0048$, $n = 10$). Interestingly, this persistent activity was only observed in patients who did not receive the strongest immunosuppressive regimen with both induction therapy and combined treatment with CNI and mycophenolate. These results seem to contradict the study of Mulay *et al.* [9] that measured the impact of maintaining immunosuppressive treatments on the rate of recurrence of various primary glomerulonephritides. However, Mulay *et al.* did not analyse the impact of induction therapies and studied a large number of different types of glomerulonephritides including MN but without measuring anti-PLA2R1 activity.

We conclude from our study that patients with anti-PLA2R1 activity at the time of renal transplantation should benefit, in addition to the measurements of biological parameters such as proteinuria and serum creatinine, from the subsequent monitoring of this auto-reactivity (especially IgG4) by a sensitive ELISA to predict MN recurrence and distinguish MN from differential diagnoses. Furthermore, baseline anti-PLA2R1 antibody titres, immunosuppressive regimen and persistent IgG4 anti-PLA2R1 activity after Month 6 would likely help to predict MN recurrence. Our suggestion that both IgG4 anti-PLA2R1 antibody titres and mild immunosuppressive regimens may be involved in MN recurrence should now be confirmed in an ongoing large prospective French collaborative study (NCT01897961).

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at <http://ndt.oxfordjournals.org>.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

B.S.P., G.L. and V.L.M.E. participated in the research design, in the analysis of the data and in drafting and revising the article. B.S.P. and C.P. performed the anti-PLA2R1-specific assays under the supervision of S.B., G.B. and G.L. B.S.P., E.C., M.B., L.A., M.C.T. and A.J. collected the clinical data. D.A. performed the pathological studies. All authors revised and gave final approval of the last version of this article.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr Wolfgang Schlumberger and Colleagues at Euroimmun (Lübeck, Germany) for their help in measuring anti-PLA2R1 by IIFT. This work was supported in part by CNRS, the French Government (National Research Agency, ANR) through the 'Investments for the Future' LABEX SIGNALIFE: programme reference #ANR-11-LABX-0028-01, the Fondation ARC pour la recherche sur le Cancer, the Centre Hospitalier Universitaire de Nice and the Direction générale de l'offre de soins of the French Ministry of Health.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None declared.

REFERENCES

1. Glassock RJ. Diagnosis and natural course of membranous nephropathy. *Semin Nephrol* 2003; 23: 324–332
2. Ronco P, Debiec H. Pathogenesis of membranous nephropathy: recent advances and future challenges. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8: 203–213
3. Ponticelli C, Glassock RJ. Glomerular diseases: membranous nephropathy — a modern view. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014; 9: 609–616
4. Hofstra JM, Fervenza FC, Wetzels JF. Treatment of idiopathic membranous nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2013; 9: 443–458
5. Dabade TS, Grande JP, Norby SM *et al.* Recurrent idiopathic membranous nephropathy after kidney transplantation: a surveillance biopsy study. *Am J Transplant* 2008; 8: 1318–1322
6. Moroni G, Gallelli B, Quaglini S *et al.* Long-term outcome of renal transplantation in patients with idiopathic membranous glomerulonephritis (MN). *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 3408–3415
7. Monga G, Mazzucco G, Basolo B *et al.* Membranous glomerulonephritis (MGN) in transplanted kidneys: morphologic investigation on 256 renal allografts. *Mod Pathol* 1993; 6: 249–258
8. Poduval RD, Josephson MA, Javaid B. Treatment of de novo and recurrent membranous nephropathy in renal transplant patients. *Semin Nephrol* 2003; 23: 392–399
9. Mulay AV, van Walraven C, Knoll GA. Impact of immunosuppressive medication on the risk of renal allograft failure due to recurrent glomerulonephritis. *Am J Transplant* 2009; 9: 804–811
10. Beck LH, Jr, Bonegio RG, Lambeau G *et al.* M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2009; 361: 11–21
11. Qin W, Beck LH, Jr, Zeng C *et al.* Anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 1137–1143
12. Hofstra JM, Beck LH, Jr, Beck DM *et al.* Anti-phospholipase A2 receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 1286–1291

13. Hofstra JM, Debiec H, Short CD *et al.* Antiphospholipase A2 receptor antibody titer and subclass in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23: 1735–1743
14. Dahnrich C, Komorowski L, Probst C *et al.* Development of a standardized ELISA for the determination of autoantibodies against human M-type phospholipase A2 receptor in primary membranous nephropathy. *Clin Chim Acta* 2013; 421C:213–218
15. Hoxha E, Harendza S, Zahner G *et al.* An immunofluorescence test for phospholipase-A2-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 2526–2532
16. Beck LH, Jr, Fervenza FC, Beck DM *et al.* Rituximab-induced depletion of anti-PLA2R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 1543–1550
17. Kanigicherla D, Gummadova J, McKenzie EA *et al.* Anti-PLA2R antibodies measured by ELISA predict long-term outcome in a prevalent population of patients with idiopathic membranous nephropathy. *Kidney Int* 2013; 83: 940–948
18. Hoxha E, Thiele I, Zahner G *et al.* Phospholipase A2 receptor autoantibodies and clinical outcome in patients with primary membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25: 1357–1366.
19. Hoxha E, Kneissler U, Stege G *et al.* Enhanced expression of the M-type phospholipase A2 receptor in glomeruli correlates with serum receptor antibodies in primary membranous nephropathy. *Kidney Int* 2012; 82: 797–804
20. Murtas C, Bruschi M, Candiano G *et al.* Coexistence of different circulating anti-podocyte antibodies in membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; 7: 1394–1400
21. Stahl R, Hoxha E, Fechner K. PLA2R autoantibodies and recurrent membranous nephropathy after transplantation. *N Engl J Med* 2010; 363: 496–498
22. Debiec H, Martin L, Jouanneau C *et al.* Autoantibodies specific for the phospholipase A2 receptor in recurrent and de novo membranous nephropathy. *Am J Transplant* 2011; 11: 2144–2152
23. Ancian P, Lambeau G, Mattéi MG *et al.* The human 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2. Molecular cloning, identification of a secreted soluble form, expression, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 1995; 270: 8963–8970
24. Lambeau G, Ancian P, Barhanin J *et al.* Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipases A2. *J Biol Chem* 1994; 269: 1575–1578
25. Rouault M, Le Calvez C, Boilard E *et al.* Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor. *Biochemistry* 2007; 46: 1647–1662
26. Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J *et al.* A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 630–638
27. Prunotto M, Carnevali ML, Candiano G *et al.* Autoimmunity in membranous nephropathy targets aldose reductase and SOD2. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 507–519

Received for publication: 3.12.2013; Accepted in revised form: 25.6.2014

2.3. Article 3 : Cross-réactivité des anticorps anti-PLA2R1 contre le récepteur de lapin et le récepteur de souris et mise au point de deux nouveaux tests ELISA avec différentes performances diagnostiques dans la Glomérulonéphrite Extra-Membraneuse idiopathique

Nous avons analysé la réactivité croisée des anticorps anti-PLA2R1 de 53 sera de patients présentant une GEM idiopathique contre 3 orthologues de PLA2R1 : le récepteur humain, le récepteur de lapin et le récepteur de souris.

Pour cela, nous avons transfecté des cellules HEK avec les cDNA des différents orthologues. Nous avons pu récupérer et comparer l'expression de chaque récepteur dans 4 fractions différentes : la fraction cytosolique qui contient la protéine soluble et la fraction microsomale qui contient les protéines membranaires et les agrégats cellulaires qui est ensuite séparée en deux fractions après solubilisation par des détergents : une fraction solubilisée contenant les protéines membranaires solubilisées et une fraction insoluble contenant des agrégats. Nous avons mesuré l'expression de chaque orthologue avec des anticorps spécifiques et grâce à un marquage par une étiquette HA dans chacune de ces fractions. Nous avons ainsi pu montrer que les cellules transfectées avec le cDNA du récepteur de lapin produisent un niveau plus élevé de protéines membranaires solubilisées donc ayant une structure native conservée alors que les cellules transfectées avec le cDNA du récepteur humain et de souris produisent plus d'agrégats (Fig.1).

Nous avons alors testé la réactivité croisée de 53 sera de patients porteurs d'anticorps anti-PLA2R1 contre la fraction cytosolique et montré que seulement un sera sur deux réagit contre le récepteur de souris alors que l'ensemble des sera réagissent contre le récepteur de lapin.

Devant la bonne qualité de l'antigène de lapin et sa bonne reconnaissance par les anticorps anti-PLA2R1, nous avons purifié le récepteur soluble de lapin grâce à une sPLA2 ayant une bonne affinité pour le récepteur (OS2) sur colonne et mis au point un test ELISA (Fig.S1). Ces résultats ont été réalisés une première fois en Allemagne et reproduit dans notre laboratoire. Nous avons montré une bonne concordance des titres mesurés entre l'ELISA humain et l'ELISA de lapin en IgG4 et en IgG totales (Fig.3). Nous avons confirmé que le titre des anticorps est corrélé à l'activité de la maladie (Fig.4) et que le suivi des anticorps chez un patient traité pouvait permettre d'anticiper les récives sur rein natif (Fig.S2).

Nous avons ensuite comparé l'ensemble des tests disponibles (ELISA humain et lapin avec IgG4 et IgG totales, immunofluorescence indirecte) et montré une meilleure sensibilité des tests mesurant les IgG4 avec une équivalence des tests contre le récepteur humain et le récepteur de lapin (Table S2).

Le récepteur de souris ayant une homologie de séquence de 74% contre 85% pour le lapin avec le récepteur humain. Nous nous sommes demandé si des épitopes n'étaient pas perdu au cours de l'évolution expliquant les différences de reconnaissance entre le récepteur humain et le récepteur de souris.

Nous nous sommes ensuite demandé si l'évolution des patients ne pouvait pas être liée à un épitope reconnu comme décrit dans de nombreuses maladies auto-immunes.

Nous avons alors validé 3 tests ELISA utilisant le récepteur humain de lapin et de souris sur une cohorte de 41 patients porteurs d'une GEM idiopathiques et 31 contrôles.

Nous avons analysé l'évolution de ces 41 patients après un suivi moyen de 36 mois. Vingt patients sont rentrés en rémission et vingt et un patients ont à l'issue de ce suivi un mauvais pronostic défini par une protéinurie supérieure à 3.5 g/g ou une dégradation de la fonction rénale définie par une clairance estimée de la créatininémie inférieure à 60 ml/mn/1.73m².

Nous avons alors montré que seul le titre d'anticorps mesuré avec l'ELISA souris était prédictif d'une évolution vers un mauvais pronostic en analyse univariée. Nous avons poursuivi en analyse multi-variée suivant l'analyse Blackward stepwise regression en analysant tous les paramètres ayant un $p < 0.25$: l'âge, la créatininémie au moment du diagnostic, et au moment du test, le titre d'anticorps anti-lapin PLA2R1 et anti-souris PLA2R1. Seuls l'âge et le titre d'anticorps anti-souris PLA2R1 sont significativement associés à un mauvais pronostic.

Nous avons défini à l'aide de courbe ROC un seuil de 605 RU/ml au-delà duquel 100% des patients évoluent vers un mauvais pronostic.

En analysant les courbes de survie rénale nous avons également montré que seul les patients ayant un titre élevé mesuré avec l'ELISA souris avaient une mauvaise évolution de leur fonction rénale.

Nous concluons de ce travail qu'il existe un épitope conservé entre l'homme et la souris associé à un mauvais pronostic.

C'est ce que nous confirmons à travers le 4^{ème} article.



Cross-reactivity of anti-PLA2R1 antibodies to rabbit and mouse PLA2R1 antigens and development of two novel ELISAs with different diagnostic performances in idiopathic membranous nephropathy

Journal:	<i>Kidney International</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Clinical Investigation
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Seitz-Polski, Barbara; Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275 CNRS and Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne Sophia-Antipolis; Service de Néphrologie, Hôpital Pasteur; Laboratoire d'Immunologie, Hôpital l'Archet, Hôpital l'Archet Dolla, Guillaume; Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275 CNRS and Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne Sophia-Antipolis Payré, Christine; Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275 CNRS and Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne Sophia-Antipolis Tomas, Nicola; aInstitut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275 CNRS and Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne Sophia-Antipolis; dUniversity Medical Center Hamburg-Eppendorf, Loehouarn, Marine; aInstitut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275 CNRS and Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne Sophia-Antipolis; bService de Néphrologie, Hôpital Pasteur, Université de Nice-Sophia Antipolis; cLaboratoire d'Immunologie, Hôpital l'Archet, Université de Nice-Sophia Antipolis Jeammet, Louise; Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275 CNRS and Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne Sophia-Antipolis Mariat, Christophe; University Jean Monnet, Nephrology, Dialysis, Hypertension, Transplantation Krummel, Thierry; Service de Néphrologie, CHU de Strasbourg Burtey, Stephane; INSERM U608, Université de la Méditerranée, Physiopathologie de l'endothelium Couriveaud, Cécile; Service de Néphrologie Dialyse Transplantation Rénale, CHU Saint-Jacques Schlumberger, Wolfgang; EUROIMMUN AG, Bensaken, Silvia; Laboratoire d'Immunologie, Hôpital l'Archet, Université de Nice-Sophia Antipolis Bernard, Ghislaine; Laboratoire d'Immunologie, Hôpital l'Archet, Université de Nice-Sophia Antipolis Esnault, Vincent; Nice University Hospital, Nephrology

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

	Lambeau, Gérard; Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR7275 CNRS and Université de Nice Sophia Antipolis
Keywords:	membranous nephropathy, glomerulonephritis
Subject Area:	Clinical Nephrology

SCHOLARONE™
Manuscripts

For Peer Review Only

Cross-reactivity of anti-PLA2R1 antibodies to rabbit and mouse PLA2R1 antigens and development of two novel ELISAs with different diagnostic performances in idiopathic membranous nephropathy

Barbara Seitz-Polski^{a,b,c,*}, Guillaume Dolla^{a#}, Christine Payré^{a#}, Nicola M. Tomas^{a,d}, Marine Lochouarn^{a,b,c}, Louise Jeammet^a, Christophe Mariat^e, Thierry Krummel^f, Stéphane Burtey^g, Cécile Couriveaud^h, Wolfgang Schlumbergerⁱ, Sylvia Benzaken^c, Ghislaine Bernard^c, Vincent L.M. Esnault^{b§} and Gérard Lambeau^{a*§}

^aInstitut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275 CNRS and Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne Sophia-Antipolis, France;

^bService de Néphrologie, Hôpital Pasteur, Université de Nice-Sophia Antipolis, France;

^cLaboratoire d'Immunologie, Hôpital l'Archet, Université de Nice-Sophia Antipolis, France;

^dUniversity Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

^eService de Néphrologie Dialyse Transplantation Rénale, CHU Hôpital Nord, Saint-Etienne, and Université de Saint-Etienne PRES Université de Lyon, Saint-Etienne, France;

^fService de Néphrologie, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France;

^gService de Néphrologie Dialyse Transplantation Rénale, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Hôpital de la Conception, Marseille, France et UMR S1076, Université Aix-Marseille

^hService de Néphrologie Dialyse Transplantation Rénale, CHU Saint-Jacques, Besançon, France.

ⁱEUROIMMUN AG, Lübeck, Germany;

[#]These authors contributed equally to this work.

[§]Co-last authors.

Running headline: Rabbit and mouse PLA2R1 ELISAs in membranous nephropathy

Address correspondence

*Dr Gérard Lambeau, Ph.D., Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275 CNRS et Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne Sophia-Antipolis, France. Tel : +33 49 395 7733; Fax +33 49 395 7708; E-mail: lambeau@ipmc.cnrs.fr

*Barbara Seitz-Polski, M. D., Service de Néphrologie, Hôpital Pasteur, Université de Nice Sophia Antipolis, 30 Voie Romaine, 06002 Nice, France. Tel: +33 49 203 8876; Fax: +33 49 203 8632; E-mail: seitz-polski.b@chu-nice.fr

Funding

This work was supported in part by CNRS, the French Government (National Research Agency, ANR) through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE: program reference #ANR-11-LABX-0028-01, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM ING20140129210), the Centre Hospitalier Universitaire de Nice and the Direction générale de l'offre de soins of the French Ministry of Health (PHRC 2011-A01302-39, NCT01897961).

Abbreviations

ESKD, end-stage kidney disease; IIFT, indirect immunofluorescence test; iMN, idiopathic MN; MN, membranous nephropathy; PLA2R1, M-type phospholipase A2 receptor 1; hPLA2R1, human PLA2R1; rbPLA2R1, rabbit PLA2R1; mPLA2R1, mouse PLA2R1; UPCR, urinary protein to creatinine ratio, WB, western blot.

Word counts

Abstract: 237 words

Main body manuscript: 4,170 words

For Peer Review Only

ABSTRACT

About 70% of patients with idiopathic membranous nephropathy (iMN) have antibodies to the phospholipase A2 receptor PLA2R1. We screened iMN patients for their cross-reactivity to human (h), rabbit (rb) and mouse (m) PLA2R1 by western blot (WB) and antigen-specific ELISAs. All iMN patients recognized hPLA2R1 and rbPLA2R1 by WB, and a rbPLA2R1 ELISA was as performant as the standardized hPLA2R1 ELISA to monitor anti-PLA2R1 in patients with active disease or in drug-induced remission. In contrast, only 51% of patients were reactive to mPLA2R1 by WB, and a maximum of 78% were positive in the mPLA2R1 ELISA, indicating that iMN patients exhibit different subsets of anti-PLA2R1 antibodies against epitopes that are shared or not among the PLA2R1 orthologs. In a cohort of 41 patients with a mean follow-up of 42 months from anti-PLA2R1 assay, the detection of anti-mPLA2R1 antibodies was an independent predictor of clinical outcome in multivariate analysis ($p=0.03$), and ROC curve analysis identified a threshold of 605 RU/mL above which 100% of patients (12 patients) had a poor renal outcome ($p=0.002$). A similar threshold could not be defined in hPLA2R1 and rbPLA2R1 ELISAs. We conclude that rbPLA2R1 is an alternative antigen to hPLA2R1 to measure anti-PLA2R1 in active disease while mPLA2R1 is a unique antigen that can detects a subset of anti-PLA2R1 antibodies present at high levels (>605 RU/mL) only in iMN patients at risk of poor prognosis, and thus is useful to predict iMN outcome.

Keywords:

Autoimmunity, conformational epitope, ELISA, membranous nephropathy, PLA2R1 autoantibodies, mouse PLA2R1, rabbit PLA2R1.

INTRODUCTION

Idiopathic membranous nephropathy (iMN) is a common cause of nephrotic syndrome in adults^{1,2,3,4,5}. Clinically, iMN is associated with high proteinuria, with about 80% of patients losing more than 3.5 g of protein per day. During follow-up, spontaneous remission occurs in about one third of patients while end-stage kidney disease (ESKD) with persistent proteinuria develops in another third of cases. The treatment of iMN is controversial^{3,6}. KDIGO guidelines recommend supportive symptomatic treatment with renin-angiotensin system-blockade and diuretics in all patients with iMN, but immunosuppressive therapy is only recommended in the case of renal function deterioration or a worsening nephrotic syndrome⁷. Therefore, immunosuppressive treatment is often started only after significant and potentially irreversible complications. On the other hand, an unnecessary early start of immunosuppressive therapy can be futile in patients who might develop spontaneous remission. For these reasons, there is a need for clinical and diagnostic parameters at disease onset and during follow-up that would allow the identification of patients at risk of poor clinical outcome and who will benefit from immunosuppressive versus supportive treatment. In 2009, Beck et al. identified the M-type phospholipase A2 receptor PLA2R1 as the major podocyte antigen involved in adult iMN⁸, with about 70% of iMN patients having circulating autoantibodies against PLA2R1. The presence of anti-PLA2R1 autoantibodies has been widely confirmed in subsequent studies in 60 to 80% of patients with iMN, as well as in a few cases of apparent secondary MN^{9,10,11,12,13,14,15,16}. The pathogenic role of anti-PLA2R1 autoantibodies is not yet proven, but antibody titers, especially IgG4 anti-PLA2R1, have been associated with clinically active disease and response to immunosuppressive therapy^{10,13,17}. High titers at early presentation of disease also appear to be predictive of poor clinical outcome^{16,18}. However, anti-PLA2R1 activity seems to persist in some patients with apparent clinical remission or low proteinuria^{11, 12, 13, 19} or under renin-angiotensin system-blockade²⁰.

PLA2R1 is a large transmembrane receptor of 180 kDa with an extracellular region comprising 10 distinct globular domains, each harboring 2 to 3 disulfide bridges²¹. Anti-PLA2R1 autoantibodies in iMN patients were initially detected by western blot (WB) using recombinant human PLA2R1 (hPLA2R1) expressed in HEK293 cells^{8,17}. The study also revealed that patients' autoantibodies only recognize hPLA2R1 under non-reducing conditions, indicating that the autoantibodies bind exclusively to the folded protein on one or more conformational epitopes⁸. Anti-PLA2R1 autoantibodies were then measured by indirect immunofluorescence test (IIFT) using HEK293 cells overexpressing hPLA2R1 at the cell surface^{10, 22}, a laser bead immunoassay²³ and ELISA using a recombinant soluble form of hPLA2R1^{13, 14}. When compared, the different methods of detection were in good concordance, but with different sensitivities, which might be explained by the fact that the methods are either only semi-quantitative, or use preparations of hPLA2R1 antigen with various levels of folded and reactive protein. Importantly, all the above methods have used hPLA2R1 as antigen. Hence, no study has evaluated the cross-reactivity of anti-PLA2R1 autoantibodies to other mammalian species of PLA2R1. In this study, we compared the cross-reactivity of anti-PLA2R1 autoantibodies from a cohort of iMN patients to human (h), rabbit (rb) and mouse (m) PLA2R1 orthologs and observed different cross-reactivities, especially for mPLA2R1. We then established species-specific ELISAs using recombinant, purified and folded PLA2R1 antigens and compared their diagnostic and prognostic performances in a cohort of iMN patients with clinical follow-up.

RESULTS

Expression of PLA2R1 orthologs as folded proteins

The anti-PLA2R1 autoantibodies from iMN patients are strictly conformational and only react against folded hPLA2R1⁸. It was thus essential to obtain preparations of recombinant

1
2
3 PLA2R1 orthologs enriched in folded proteins. Toward this goal, we transiently transfected
4
5 HEK293 cells with cDNAs coding for full-length, membrane-bound HA-tagged PLA2R1
6
7 from human (h), rabbit (rb) and mouse (m) species. After transfection, we prepared a
8
9 cytosolic fraction containing soluble proteins and a microsomal fraction containing membrane
10
11 proteins and cellular aggregates. The microsomal fraction was then solubilized with detergent
12
13 and centrifuged to prepare a detergent-soluble fraction (containing solubilized membrane
14
15 proteins) and a detergent-insoluble fraction (containing mostly protein aggregates). The
16
17 presence of PLA2R1 orthologs was analyzed in the 4 fractions by WB using anti-HA and
18
19 three different PLA2R1 antibodies under both reducing and non-reducing conditions (Fig. 1).
20
21 The specific PLA2R1 antibodies were raised against each of the three orthologs (see
22
23 methods). They have different reactivities against the orthologs under reducing and non-
24
25 reducing conditions (Fig. 1C and D and Fig. 2A). All three PLA2R1 orthologs were expressed
26
27 as membrane proteins, as indicated by the strong signal detected with the different antibodies
28
29 in the microsomal fraction before and/or after solubilization. However, a careful comparison
30
31 of the signals obtained with the microsomal fraction before and after detergent solubilization
32
33 and under reducing and non-reducing conditions indicated that the detergent-soluble fraction
34
35 was clearly enriched in folded PLA2R1 while the microsomal and detergent-insoluble
36
37 fractions contained folded PLA2R1 mixed with different amounts of PLA2R1 aggregates
38
39 (Fig. 1). This was true for all three PLA2R1 proteins in which only the detergent-soluble
40
41 fraction provided a strong signal under both reducing and non-reducing conditions, while the
42
43 two other fractions showed signals only under reducing conditions. hPLA2R1 and mPLA2R1
44
45 were clearly expressed in HEK293 cells as folded proteins but with relatively large amounts
46
47 of unfolded proteins forming aggregates. These latters could only be dissolved with reducing
48
49 agents, but not with urea or strong detergents (not shown). In contrast, rbPLA2R1 was
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

essentially expressed as a folded receptor with small amounts of unfolded protein (Fig. 1B and 1C).

Cross-reactivity of sera from 53 iMN patients to hPLA2R1, rbPLA2R1 and mPLA2R1

We used the above detergent-soluble fraction containing folded hPLA2R1, rbPLA2R1 and mPLA2R1 to test the cross-reactivity of 53 sera of iMN patients known to be positive to hPLA2R1 (selected from patients listed in Table S1 and with sufficient serum available). To rule out false negative results, we set up WB conditions in which sufficient amounts of folded PLA2R1 orthologs were loaded. The amounts of PLA2R1 antigens from the detergent-soluble fractions were calibrated using the anti-HA antibody and the PLA2R1 specific antibodies (Fig. 2A). Under non-reducing conditions, anti-HA or at least one PLA2R1 specific antibody was giving a strong signal, validating the WB conditions. WBs performed in the same conditions revealed that all 53 sera reacting with hPLA2R1 also recognized rbPLA2R1, with similar or slightly weaker intensities (Fig. 2B). Conversely, only 27 (51%) sera recognized mPLA2R1, of which 14 (26%) showed the same signal intensity as for hPLA2R1 (illustrated by MN1, Fig. 2B) while 13 (25%) exhibited a reduced reactivity with mPLA2R1 (MN2, Fig. 2B). The other 26 sera (49%) with high anti-hPLA2R1 activity completely failed to cross-react to mPLA2R1 (MN3 and MN4, Fig. 2B).

Development of a rbPLA2R1 ELISA and comparison with the standardized hPLA2R1 ELISA

Based on the above results, we set up a rbPLA2R1 ELISA as an alternative of the recently described hPLA2R1 ELISAs^{13,14}. For this purpose, we produced a soluble form of rbPLA2R1 comprising the full-length extracellular domain of the receptor in HEK293 cells (see supplementary data and Fig. S1). The purified recombinant rbPLA2R1 was highly reactive

against PLA2R1 specific antibody and iMN sera (Fig. S1) and was used to develop a rbPLA2R1 ELISA for detection of both total IgG and IgG4 anti-PLA2R1 (see methods).

We validated the rbPLA2R1 ELISA using a cohort of 130 patients with iMN (93 males and 37 females) and different levels of disease activity (62 in active disease, 38 in partial remission and 23 in complete remission), 23 patients with secondary MN (11 males and 12 females), 67 patients with other diseases and 67 healthy donors. The baseline characteristics are presented in Table S1. IgG4 anti-rbPLA2R1 antibodies were found in 78 out of 130 (60%) patients with iMN and in 6 out of 23 (26%) patients with secondary MN (Fig. 3A). No reactivity was seen in sera from patients with other kidney diseases or healthy donors (Fig. 3A and C).

We then compared the results obtained with the rbPLA2R1 ELISA with the recently established standardized hPLA2R1 ELISA¹⁴. Within our cohort, sufficient serum was available from 84 patients with iMN, 18 with secondary MN, 33 controls with other diseases and 18 healthy subjects to further compare the performance of the anti-rbPLA2R1 with that of the anti-hPLA2R1 ELISA (for both IgG4 and total IgG) and IIFT (Table S2). There was a good correlation between titers of anti-rbPLA2R1 and anti-hPLA2R1 for both IgG4 anti-PLA2R1 ($r^2=0.72$) (Fig. 3B) and total IgG anti-PLA2R1 ($r^2=0.82$) (Fig. 3D). IgG4 anti-hPLA2R1 ELISA was positive in 50/84 (60%) sera from iMN patients, all of which were also positive in the IgG4 anti-rbPLA2R1 ELISA (Table S2). The IgG4 anti-rbPLA2R1 ELISA detected 4 more positive patients (54/84, 64%), which were also weakly positive by IIFT (Table S2). RbPLA2R1 and hPLA2R1 IgG4 ELISAs were as sensitive ($p=0.99$). When measuring total IgG, both assays were identical but less sensitive than the corresponding IgG4 assays. They were both in high concordance with IIFT detecting also total IgG (Table S2). An excellent concordance was also found between all assays when detecting anti-PLA2R1 in

patients diagnosed with secondary MN (Table S2). Finally, all PLA2R1 ELISA assays were highly specific (100%) with no positivity in other disease and healthy controls.

Association of anti-PLA2R1 antibody levels with disease activity and immunosuppressive treatment measured with the rbPLA2R1 ELISA

Several studies have shown an association between anti-PLA2R1 antibody levels and clinically active iMN disease, first by comparing the levels of anti-PLA2R1 in active disease versus spontaneous remission and relapse, second by comparing the levels of anti-PLA2R1 before and after immunosuppressive treatment with rituximab or tacrolimus^{8,9,10,12,13,15,17,19,22,25,26}.

In accordance with those studies, we found high levels of anti-rbPLA2R1 autoantibodies in iMN patients with active disease and significantly lower levels in patients in partial or complete remission, particularly when measuring IgG4 anti-PLA2R1 (Fig. 4). Among iMN patients, 7 of them were on dialysis at the time of anti-PLA2R1 assay (Table S1), and 5 had high levels of anti-rbPLA2R1 autoantibodies, indicating that these patients still had a persistent autoimmune disease activity while in ESKD.

We also tested 6 iMN patients for anti-PLA2R1 serum levels during follow-up and treatment with rituximab (Fig. S2). In all cases, rituximab induced a decline or disappearance of anti-PLA2R1 autoantibodies. Changes in antibody levels preceded changes in proteinuria, confirming that a decrease of anti-PLA2R1 antibodies predicted response to immunosuppressive treatment with a better clinical outcome. Two subjects who relapsed during follow-up had a concomitant return of anti-PLA2R1, which was overcome by a second treatment with rituximab. These results are in line with previous data^{17,19,26} and confirm that measuring anti-PLA2R1 levels helps to follow and predict response to treatment with rituximab in iMN patients.

High levels of anti-PLA2R1 antibody measured with mPLA2R1, but not hPLA2R1 and rbPLA2R1 ELISAs can predict clinical outcome

Another important area of interest is the evaluation of anti-PLA2R1 levels at the time of first serum sampling in iMN patients to predict clinical outcome. Several studies have evaluated the association between levels of anti-PLA2R1 and patient outcome over several months of follow-up, but different conclusions have been drawn^{13,15,16,18}. Of note, these studies were performed by IIFT or ELISA using hPLA2R1 as antigen.

Since sera from iMN patients exhibited different cross-reactivities to hPLA2R1, rbPLA2R1 and mPLA2R1 antigens, we explored the prognostic values of anti-PLA2R1 activity measured with each of the three antigens in a retrospective cohort of 41 iMN patients with a mean follow-up of 42 months from anti-PLA2R1 assay (Table 1). Most patients were male (68%), with a mean ($\pm$ SD) age of 56 years. Most patients did not receive immunosuppressive treatment before serum sampling (34/41, 83%) and presented with severe nephrotic syndrome with a mean proteinuria of 5.3 ± 3.1 g/g and a mean serum creatinine level of 117 ± 81 μ mol/L. Patients were categorized into two groups at the end of follow-up (Table 2). Group A included those with active disease throughout follow-up, defined as a urinary protein to creatinine ratio (UPCR) >3.5 g/g or an estimated GFR (eGFR) <60 mL/min/1.73m², and group R included patients who entered into remission, defined as a UPCR <3.5 g/g and eGFR >60 mL/min/1.73m². After follow-up, 21 patients were in group A (14 had progressed to ESKD) and 20 patients were in group R (7 had remitted spontaneously and 13 after various immunosuppressive treatments).

We tested the cross-reactivity of all 41 iMN sera at the time of first serum sampling towards the three PLA2R1 orthologs first by WB (Table 1), then using antigen-specific ELISAs (Fig. 5 and Table 2). All sera that recognized hPLA2R1 in WB analysis also recognized

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

rbPLA2R1, but only 26 out of 41 patients reacted to mPLA2R1 (Table 1). To confirm these results and quantitatively determine the levels of anti-PLA2R1 autoantibodies, we measured the same sera with the antigen-specific ELISAs. Toward this goal, we set up an ELISA for mPLA2R1 using a recombinant soluble form of mPLA2R1 comprising the full-length extracellular domain, as for rbPLA2R1 and hPLA2R1 (Fig. S1C). This recombinant form of mPLA2R1 was validated by WB and sPLA2 inhibition assays as previously described²⁷. As for hPLA2R1 and rbPLA2R1, the mPLA2R1 ELISA was specific for iMN patients and did not recognize any other disease or healthy controls (Fig. 5A). All 41 iMN sera reacted in hPLA2R1 and rbPLA2R1 ELISAs, but only 32 of them (78%) had activity in the mPLA2R1 ELISA (Fig. 5A). Furthermore, in contrast to hPLA2R1 and rbPLA2R1 ELISAs, only a few iMN sera gave a high titer in the mPLA2R1 ELISA. We then analyzed the association between age, gender, proteinuria, serum creatinine, immunosuppressive treatment as well as human, rabbit and mouse PLA2R1 antibody titers at first serum sampling and the clinical outcome of the patients, ie those with persistent active disease (group A) versus those in remission (group R). Only the mean anti-mPLA2R1 activity was significantly associated with persistent active disease in both univariate ($p=0.006$, Fig. 5B) and multivariate analyses ($p=0.03$, Table 2). A ROC curve analysis of the mPLA2R1 ELISA titers defined a threshold of 605 RU/mL above which 100% of patients (12 patients) had a poor prognosis (100% specificity, 57% sensitivity, AUC 0.76, $p=0.004$, 95% IC 0.60-0.91). Accordingly, analysis of renal outcome by the Kaplan-Meier method showed that patients with high titers of anti-mPLA2R1 antibodies had poor renal outcome (Fig. 5C). Indeed, patients with anti-mPLA2R1 antibody titers above 605 RU/mL ($n=12$) had a higher rate of doubling of serum creatinine ($p=0.002$ using the log-rank test) than patients with anti-mPLA2R1 antibody titer below 605 RU/mL ($n=29$) (Fig. 5C). ROC curves could not identify such a threshold for hPLA2R1 and rbPLA2R1 antibody titers and the corresponding subgroups of 12 patients with highest anti-

hPLA2R1 or anti-rbPLA2R1 titers (Fig. 5A) did not have a statistically significant poor renal outcome compared to the remaining patients ($p=0.07$ and $p=0.5$, respectively) (Fig. 5C).

DISCUSSION

The identification of circulating autoantibodies directed towards PLA2R1 has been a major advance in the serological diagnosis of iMN. Anti-PLA2R1 autoantibodies were successively measured by WB, IIFT, ELISA and laser bead immunoassay to monitor iMN disease activity and predict clinical outcome^{10,13,14,22,23}. All of these assays used hPLA2R1 as antigen. Here, we tested for the first time the cross-reactivity of anti-PLA2R1 autoantibodies to rbPLA2R1 and mPLA2R1 orthologs and developed two corresponding ELISAs which turned out to have different performances in diagnosis and prognosis of iMN. As discussed below, this is also the first report to evidence, yet indirectly, the presence of several autoantibodies in iMN patients, each of these targeting different PLA2R1 epitopes which are conserved or not among human, rabbit and mouse species.

We first tested the cross-reactivity by WB on a large series of serum samples from 53 iMN patients positive to hPLA2R1. All patients positive to hPLA2R1 were also positive to rbPLA2R1 while only about 50% were positive to mPLA2R1 in the same WB conditions (Fig. 2). To rule out false-negative results due to poor antigen quality, we carefully prepared folded antigens for the three PLA2R1 orthologs and validated the preparations with a panel of specific antibodies in WBs run under reducing and non-reducing conditions (Fig. 1). As for mPLA2R1, we also used a commercially available preparation of recombinant receptor and obtained similar results (not shown). When over-expressed in HEK293 cells, we observed that the expression level of rbPLA2R1 is higher than that of hPLA2R1 and mPLA2R1. Furthermore, the ratio of folded versus unfolded protein is higher for rbPLA2R1. Finally, we could establish HEK293 cells stably expressing rbPLA2R1, constitutively and at high level

(giving a yield of about 1 mg of folded and purified protein per liter of cell medium) while we could not do it for hPLA2R1 (unpublished data), and hardly for mPLA2R1²⁷. These observations might be reminiscent of the pro-senescent/apoptotic role of hPLA2R1 and mPLA2R1 observed in various normal and cancer cells^{28,29}. Together, our data indicate that rbPLA2R1 is a valuable antigen that can be produced at high level as a folded protein and that can replace hPLA2R1 to detect anti-PLA2R1 autoantibodies. On the other hand, the mPLA2R1 antigen is expressed at lower levels, but might be useful in iMN as it detects only a subgroup of patients.

We then developed, validated and tested the diagnostic performances of two distinct ELISAs respectively using purified rbPLA2R1 and mPLA2R1 as antigens. The rbPLA2R1 ELISA was as sensitive as the standardized hPLA2R1 ELISA and appears to be useful to monitor anti-PLA2R1 in iMN diagnosis and clinical follow-up. For instance, titers of anti-rbPLA2R1 antibodies showed a good correlation with disease activity (Fig. 4), and with clinical response to treatment with rituximab (Fig. S2), as previously described for the hPLA2R1 ELISA^{10,13,16}. High titers of anti-rbPLA2R1 autoantibodies were also measured in ESKD patients, and the monitoring of anti-PLA2R1 in these patients would help to predict the risk of recurrence after kidney graft²⁰. In contrast, the mPLA2R1 ELISA would not be useful for similar clinical investigations as it detects only a subset of iMN patients. However, this latter property likely explains why the mPLA2R1 ELISA turned out to perform better than hPLA2R1 and rbPLA2R1 ELISAs at identifying iMN patients at risk of poor clinical outcome. Former studies using two similar hPLA2R1 ELISAs have suggested that high levels of anti-PLA2R1 antibodies are linked with a higher risk of renal function decline during follow-up^{16,18}. Using our retrospective cohort of 41 iMN patients with serum samples available at disease onset and a subsequent clinical follow-up of 42 months, we did not find a significant association between high anti-PLA2R1 titers and clinical outcome using hPLA2R1 and rbPLA2R1

ELISAs (Fig. 5B and C). This might be because of the small size of the cohort. In contrast, the mPLA2R1 ELISA performed much better than hPLA2R1 and rbPLA2R1 ELISAs at identifying patients at risk of poor clinical outcome. Indeed, patients with high titers of anti-mPLA2R1 antibodies (>605 U/mL) always have a poor renal outcome with a specificity of 100%. If confirmed in independent cohorts, this test may prove useful to identify a subgroup of iMN patients that should benefit from early immunosuppressive treatments.

All our tests were more sensitive with IgG4 detection as compared to total IgG, and none of the sera had total IgG anti-PLA2R1 antibodies without IgG4 antibodies. Since IgG4 anti-PLA2R1 antibodies are more specifically associated with disease activity^{8,13}, we suggest that IgG4 specific assays may be used to monitor anti-PLA2R1 activity.

We also described in our cohort several cases of secondary MN with anti-PLA2R1 antibodies (6/26, Table S1), especially with HBV or HCV infections. As discussed in previous studies, the presence of anti-PLA2R1 antibodies in patients with secondary MN might in fact result from the co-incidental development of iMN with another unrelated systemic disease rather than true cases of secondary MN positive for anti-PLA2R1. For all cases, we did not find clear clinical evidence for an impact of the other disease on MN activity, supporting iMN cases with a co-incidental other disease. There is more and more evidence that the presence of anti-PLA2R1 is in fact specific for iMN, and used to differentiate iMN from secondary forms^{5,12,30,31}.

Cross-reactivity studies indicate the presence of several epitopes in PLA2R1 which are differentially conserved between human, rabbit and mouse orthologs. In turn, this indicates that iMN sera should contain several corresponding autoantibodies targeting each of these epitopes, with different titers between patients. Thus, sera that recognize human, rabbit and mouse PLA2R1 should have one or more autoantibodies directed against one or more conserved epitopes between the three species while sera that recognize human and rabbit but

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

not mouse PLA2R1 should have one or more autoantibodies directed against one or more additional epitopes conserved between the two species but lost in the mouse species. We found that all of the cross-reacting autoantibodies recognize only conformation-dependent epitopes. Indeed, as previously observed for hPLA2R1⁸, iMN sera recognized rbPLA2R1 and mPLA2R1 only under non-reducing conditions (not shown). In addition, pretreatment of the 3 PLA2R1 orthologs with chaotropes such as urea (8M) or high temperature (95°C/10 min) had no effect on detection by several iMN sera (not shown). This indicates that all of the conformational epitopes present in the three orthologs are stable and that their tridimensional structure is essentially maintained by disulfide bonding. All patients positive to hPLA2R1 were positive to rbPLA2R1, but the signal ratio measured on rbPLA2R1 versus hPLA2R1 was different among iMN patients, as illustrated by WBs (Fig. 2) and the imperfect match in the correlation between rbPLA2R1 and hPLA2R1 titers (Fig. 3). This suggests that iMN patients always share at least one autoantibody targeting a conserved epitope between hPLA2R1 and rbPLA2R1 but also other autoantibodies targeting identical, similar or different epitopes. The different titers of the corresponding antibodies among patients will further explain the different signal ratios. As for mPLA2R1, only about 50% of patients positive to hPLA2R1 recognized mPLA2R1 by WB, and this value was maximally increased to 78% when using the more sensitive mPLA2R1 ELISA. The absence of cross-reactivity of the remaining 22% of patients was not due to low sensitivities of the assays because of misfolding of mPLA2R1. Indeed, this was ruled out by using two independent preparations of recombinant mPLA2R1, one from HEK293 cells and another from a commercially available source. In both cases, we validated that the preparations were folded using specific antibodies in WBs as well as using sPLA2 inhibition assays with the purified mPLA2R1 (Fig. 1 and ²⁷). Compared to rbPLA2R1, the absence of cross-reactivity for some patients to mPLA2R1

1
2
3 suggests that this latter receptor has a lower number of shared epitopes with hPLA2R1 and
4
5 that patients' sera have different titers of the corresponding autoantibodies.
6
7

8 The nature and location of the PLA2R1 epitopes recognized by the patients' autoantibodies is
9
10 currently unknown. One study has suggested the presence of several epitopes in PLA2R1, but
11
12 the identification of these molecular epitopes should be considered with caution, as the
13
14 conformational property of the epitopes was not considered in this work and none of the
15
16 epitopes was validated when introduced in the context of the tertiary structure of folded
17
18 PLA2R1³². The level of protein sequence identity between hPLA2R1 and rbPLA2R1 is 85%,
19
20 and falls to 75% with mPLA2R1. This fits with the better cross-reactivity of anti-PLA2R1
21
22 autoantibodies to rbPLA2R1 than mPLA2R1. However, among the 10 domains of PLA2R1
23
24 constituting its large extracellular region, we could not identify any obvious domain or region
25
26 more highly conserved than another between the orthologs, thereby precluding easy
27
28 information on the location of the possible epitopes. The identification of the different
29
30 epitopes targeted by the different anti-PLA2R1 autoantibodies in the three receptors should
31
32 thus await future studies.
33
34
35
36
37

38 Regardless of the aforementioned scenarios on diversity and titers of autoantibodies for each
39
40 patient and the corresponding PLA2R1 epitopes, the clinically important finding inferred
41
42 from our study is that iMN patients exhibit different subsets of anti-PLA2R1 antibodies, with
43
44 some of them more preferentially associated with clinically active disease and likely
45
46 pathogenicity. This view would explain some of the discrepancies between anti-PLA2R1
47
48 titers measured with the hPLA2R1 antigen and proteinuria^{11,12,13,19}. Based on their cross-
49
50 reactivity and ELISA titers towards the three orthologs, patients can be classified into
51
52 subgroups, with an impact on their clinical outcome and treatment. More specifically, the
53
54 subgroup of patients having high titers in the mPLA2R1 ELISA would have a bad renal
55
56 prognosis and should be treated with immunosuppressors. This would also suggest that only a
57
58
59
60

few epitopes conserved from humans to mouse are pathogenic. Finally, it will be also important to consider our results on the cross-reactivity of anti-PLA2R1 autoantibodies when developing animal models of iMN disease.

We conclude and summarize our findings as follows: rbPLA2R1 likely shares with hPLA2R1 most of the PLA2R1 epitopes and thus rbPLA2R1 is a suitable alternative antigen to develop a general anti-PLA2R1 ELISA. On the other hand, mPLA2R1 likely shares with hPLA2R1 only a few epitopes and mPLA2R1 is a unique antigen to develop a more specific anti-PLA2R1 ELISA that would notably help to identify patients at risk of poor renal prognosis. We infer that these patients would specifically exhibit one or more autoantibodies directed against one or more epitope(s) conserved between the three orthologs. These autoantibodies might be the pathogenic ones. The prognostic and diagnostic performance of the mPLA2R1 epitope specific assays should now be confirmed in larger cohorts. This would also allow designing a prospective randomized trial to test whether patients with specific anti-mPLA2R1 autoantibodies detected prospectively should receive an early immunosuppressive treatment.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Sera of patients with biopsy-proven iMN and secondary MN were collected from five French nephrology centers. iMN was defined by the absence of secondary MN features, such as positivity for anti-nuclear antibodies, history of hepatitis B or C, cancer or other immune pathologies (cryoglobulinaemia, sarcoidosis, graft versus host disease,...). Sera from a total of 153 patients were collected: 130 with iMN and 23 with secondary MN. In the latter group, two had lupus nephritis, one had cryoglobulinaemia, one had HBV infection, one had HCV infection, and one was co-infected with both HBC and HCV. We also collected 67 sera from disease controls: 34 patients without renal involvement including rheumatoid arthritis,

psoriatic arthritis, systemic sclerosis, Sjogren's syndrome and 33 patients with other glomerular diseases such as IgA nephropathy, ANCA-positive systemic vasculitis, lupus nephritis (type V), focal segmental glomerulosclerosis, membranoproliferative glomerulonephritis, minimal change disease and Henoch Schoenlein purpura. Finally, we collected 67 sera from healthy blood donors. Consents were obtained from all patients. Proteinuria levels were classified in three stages: nephrotic range proteinuria when UPCR was >3.5 g/g, residual non nephrotic proteinuria when UPCR was between 0.5 and 3.5 g/g, and low proteinuria when UPCR was <0.5 g/g. Active disease was defined as a UPCR >3.5 g/g or eGFR <60 mL/min/1.73m² and remission was defined as a UPCR <3.5 g/g and eGFR >60 mL/min/1.73m².

Expression of PLA2R1 orthologs as folded antigens

The cDNAs coding for full-length transmembrane hPLA2R1, rbPLA2R1 and mPLA2R1 with a HA tag added to the C-terminal end were transiently transfected into HEK293 cells as described previously^{24, 27, 33}. Three days after transfection, cells were lysed and centrifuged to prepare the cytosolic and microsomal fractions. The microsomal fraction was then solubilized with detergents and centrifuged to obtain the detergent-soluble and detergent-insoluble fractions. The presence of the different PLA2R1 orthologs was validated in the 4 fractions by WB using specific antibodies (Fig. 1 and 2A). See supplementary information online for more details.

Western blot analyses

The different forms of recombinant PLA2R1 were analyzed by SDS-PAGE gels under reducing and non-reducing conditions and western blotting according to the detailed methods described in the online supplementary information. The primary antibodies used to identify

folded PLA2R1 in the four fractions of PLA2R1-transfected HEK293 cells were a mouse monoclonal anti-HA (Sigma, St. Louis, USA, working dilution 1:5,000), a rabbit polyclonal anti-hPLA2R1 (Atlas Antibodies, working dilution 1:1,000), a guinea-pig polyclonal anti-rbPLA2R1 (homemade as described³⁴, working dilution 1:5,000) and a rabbit polyclonal anti-mPLA2R1 (homemade as described²⁷, working dilution 1:2,000). HRP-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit IgG (SouthernBiotech, Birmingham, USA) and goat anti-guinea-pig IgG (Cappel, Organon Teknika) were used as secondary antibody at a dilution of 1:5,000. For detection of cross-reacting anti-PLA2R1 antibodies in iMN sera, the three folded PLA2R1 orthologs were run on SDS-PAGE gels under non-reducing conditions and mini WBs were prepared in replicates. iMN sera were tested at a working dilution of 1:50 to 1:500 depending on anti-PLA2R1 titers. Secondary antibodies were HRP-conjugated mouse anti-human IgG4 (SouthernBiotech, Birmingham, USA) diluted at 1:30,000.

Preparation of recombinant soluble rbPLA2R1, hPLA2R1 and mPLA2R1

The recombinant soluble form of rbPLA2R1 comprising its full extracellular region (NP_001075803.1, amino acid residues 24-1393)²⁴ was produced in stably transfected HEK293 cells and purified from cell medium by sPLA2 affinity chromatography as described in the online supplementary information. Large scale production in roller bottles produced about 3 mg of rbPLA2R1 per liter per week. The concentrated purified recombinant rbPLA2R1 protein was pure and folded as indicated by SDS-PAGE gel analysis and western blotting with anti-rbPLA2R1 antibodies and iMN sera (Fig. S1), as well as inhibition of sPLA2 enzymatic activity²⁷ (not shown). The recombinant soluble form of hPLA2R1 (NP_031392.3, amino acid residues 20–1397) and mPLA2R1 (NP_032893, amino acid residues 27-1392) comprising their full extracellular region was obtained from transfected HEK293¹⁴ and NS0 mouse myeloma cells (R&D systems #5367-PL, Minneapolis, USA),

1
2
3 respectively. The two proteins were judged pure based on gel electrophoresis in both reducing
4
5 and non-reducing conditions (Fig. S1C), and the folded native forms were validated by WB
6
7 and sPLA2 inhibition assays as previously described²⁷.
8
9

10 11 12 ***Detection of IgG4 and total IgG anti-PLA2R1 antibodies by ELISA***

13
14 Pure recombinant PLA2R1 proteins containing the full extracellular domain (approx.
15
16 180 kDa, Fig. S1C) were used to coat ELISA plates with a solution of 20 mM Tris pH 8.0
17
18 (100 µL/well) at a concentration of 1 µg/mL (rbPLA2R1), 0.7 µg/mL (hPLA2R1) and 0.5
19
20 µg/mL (mPLA2R1) at 4°C/overnight. Plates were blocked for 2 h with SeramunBlock
21
22 (Seramun Diagnostica, Germany). Plates were kept at 4°C until use (within 5 days). For long-
23
24 term storage, plates were lyophilized and stored dried at -80°C. Patient sera were diluted at
25
26 1:100 in PBS 0,1% milk and added in duplicate 100-µL aliquots to the ELISA plate, which
27
28 also contained in duplicate a iMN standard dilution series (to convert results in RU/mL) and a
29
30 quality control calibrator (between plates). After 2 h of incubation at room temperature on a
31
32 plate shaker, the plates were washed 4 times with PBS plus 0.02% Tween 20. Anti-human
33
34 IgG4-horseradish peroxidase conjugate (Southern Biotech) diluted 1:7,500 for rabbit and
35
36 mouse ELISA and 1:40,000 for human ELISA in SeramunStab ST plus was added (100 µl per
37
38 well, (Seramun Diagnostica, Germany) and incubated for 1 h at room temperature on a plate
39
40 shaker. After four washings, enzyme substrate tetramethylbenzidine (TMB) was added,
41
42 developed for 15 min, and the reaction was stopped with HCl 1.2 N. The plates were read at
43
44 450 nm. Detection of total IgG anti-PLA2R1 were performed as above using a slightly
45
46 different protocol as described in the online supplementary information. Sixty-seven sera
47
48 from healthy donors were used to define the normal range, using mean + 3 SD. The cut-off
49
50 was optimized by receiver operating characteristics (ROC) curve analysis. A highly positive
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

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

index patient serum was used in each plate to generate a standard curve consisting of five calibrators: 3,000; 1,000; 333; 111; 37 relative units per mL (RU/mL).

Detection of anti-PLA2R1 antibodies by IIFT

Anti-PLA2R1 antibodies were detected using the recombinant cell-based indirect immunofluorescence test (RC-IFA, Euroimmun, Germany) containing a BIOCHIP mosaic of formalin-fixed HEK 293 cell over-expressing PLA2R1 and mock-transfected HEK 293 cells as negative control as described²². See supplementary information online for more details.

Statistical Analyses

For descriptive statistics, data are presented as mean±SD. Qualitative criteria were compared using Fisher’s exact test. Quantitative variables were compared using the Student t test. Outcome data were analyzed with Cox regression analysis. Doubling of serum creatinine was used as the primary end point. All statistics were performed using the Prism6 software. p-values <0.05 were considered as statistically significant. Multivariate analysis was done using the SAS software.

DISCLOSURE

The authors declare no conflicts of interest.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is provided in a separate pdf file.

For Peer Review Only

REFERENCES

1. Beck LH, Jr., Salant DJ. Membranous nephropathy: recent travels and new roads ahead. *Kidney Int* 2010; **77**: 765-770.
2. Ronco P, Debiec H. Pathogenesis of membranous nephropathy: recent advances and future challenges. *Nat Rev Nephrol* 2012; **8**: 203-213.
3. Hofstra JM, Fervenza FC, Wetzels JF. Treatment of idiopathic membranous nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2013; **9**: 443-458.
4. Ponticelli C, Glassock RJ. Glomerular diseases: membranous nephropathy--a modern view. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014; **9**: 609-616.
5. Beck LH, Jr., Salant DJ. Membranous nephropathy: from models to man. *J Clin Invest* 2014; **124**: 2307-2314.
6. Remuzzi G, Chiurciu C, Abbate M, *et al.* Rituximab for idiopathic membranous nephropathy. *Lancet* 2002; **360**: 923-924.
7. Radhakrishnan J, Cattran DC. The KDIGO practice guideline on glomerulonephritis: reading between the (guide)lines--application to the individual patient. *Kidney Int* 2012; **82**: 840-856.
8. Beck LH, Jr., Bonegio RG, Lambeau G, *et al.* M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2009; **361**: 11-21.
9. Qin W, Beck LH, Jr., Zeng C, *et al.* Anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2011; **22**: 1137-1143.
10. Hofstra JM, Beck LH, Jr., Beck DM, *et al.* Anti-phospholipase A2 receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; **6**: 1286-1291.
11. Murtas C, Bruschi M, Candiano G, *et al.* Coexistence of different circulating anti-podocyte antibodies in membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; **7**: 1394-1400.
12. Hoxha E, Kneissler U, Stege G, *et al.* Enhanced expression of the M-type phospholipase A2 receptor in glomeruli correlates with serum receptor antibodies in primary membranous nephropathy. *Kidney Int* 2012; **82**: 797-804.
13. Hofstra JM, Debiec H, Short CD, *et al.* Antiphospholipase A2 receptor antibody titer and subclass in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2012; **23**: 1735-1743.
14. Dahnrich C, Komorowski L, Probst C, *et al.* Development of a standardized ELISA for the determination of autoantibodies against human M-type phospholipase A2 receptor in primary membranous nephropathy. *Clin Chim Acta* 2013; **421C**: 213-218.

15. Oh YJ, Yang SH, Kim DK, *et al.* Autoantibodies against phospholipase A2 receptor in Korean patients with membranous nephropathy. *PloS one* 2013; **8**: e62151.
16. Kanigicherla D, Gummadoova J, McKenzie EA, *et al.* Anti-PLA2R antibodies measured by ELISA predict long-term outcome in a prevalent population of patients with idiopathic membranous nephropathy. *Kidney Int* 2013; **83**: 940-948.
17. Beck LH, Jr., Fervenza FC, Beck DM, *et al.* Rituximab-induced depletion of anti-PLA2R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2011; **22**: 1543-1550.
18. Hoxha E, Thiele I, Zahner G, *et al.* Phospholipase A2 receptor autoantibodies and clinical outcome in patients with primary membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2014; **25**: 1357-1366.
19. Bech AP, Hofstra JM, Brenchley PE, *et al.* Association of Anti-PLA2R Antibodies with Outcomes after Immunosuppressive Therapy in Idiopathic Membranous Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014; **9**: 1386-1392.
20. Seitz-Polski B, Payre C, Ambrosetti D, *et al.* Prediction of membranous nephropathy recurrence after transplantation by monitoring of anti-PLA2R1 (M-type phospholipase A2 receptor) autoantibodies: a case series of 15 patients. *Nephrol Dial Transplant* 2014; **in press**.
21. Lambeau G, Lazdunski M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. *Trends Pharmacol Sci* 1999; **20**: 162-170.
22. Hoxha E, Harendza S, Zahner G, *et al.* An immunofluorescence test for phospholipase-A2-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2011; **26**: 2526-2532.
23. Behnert A, Schiffer M, Muller-Deile J, *et al.* Antiphospholipase A(2) receptor autoantibodies: a comparison of three different immunoassays for the diagnosis of idiopathic membranous nephropathy. *J Immunol Res* 2014; **2014**: 143274.
24. Lambeau G, Ancian P, Barhanin J, *et al.* Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipases A2. *J Biol Chem* 1994; **269**: 1575-1578.
25. Michel PA, Dahan K, Ancel PY, *et al.* Rituximab treatment for membranous nephropathy: a French clinical and serological retrospective study of 28 patients. *Nephron Extra* 2011; **1**: 251-261.
26. Segarra-Medrano A, Jatem-Escalante E, Carnicer-Caceres C, *et al.* Evolution of antibody titre against the M-type phospholipase A2 receptor and clinical response in idiopathic membranous nephropathy patients treated with tacrolimus. *Nefrologia* 2014; **34**: 491-497.

27. Rouault M, Le Calvez C, Boilard E, *et al.* Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor. *Biochemistry* 2007; **46**: 1647-1662.
28. Augert A, Vindrieux D, Girard CA, *et al.* PLA2R1 kills cancer cells by inducing mitochondrial stress. *Free radical biology & medicine* 2013; **65C**: 969-977.
29. Augert A, Payré C, de Launoit Y, *et al.* The M-type receptor PLA2R regulates senescence through the p53 pathway. *EMBO Rep* 2009; **10**: 271-277.
30. Murtas C, Allegri L, Ghiggeri GM. Circulating antipodocyte antibodies in membranous nephropathy: new findings. *Am J Kidney Dis* 2013; **62**: 12-15.
31. Larsen CP, Messias NC, Silva FG, *et al.* Determination of primary versus secondary membranous glomerulopathy utilizing phospholipase A2 receptor staining in renal biopsies. *Mod Pathol* 2013; **26**: 709-715.
32. Behnert A, Fritzler MJ, Teng B, *et al.* An anti-phospholipase A2 receptor quantitative immunoassay and epitope analysis in membranous nephropathy reveals different antigenic domains of the receptor. *PloS one* 2013; **8**: e61669.
33. Ancian P, Lambeau G, Mattéi MG, *et al.* The human 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2. Molecular cloning, identification of a secreted soluble form, expression, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 1995; **270**: 8963-8970.
34. Zvaritch E, Lambeau G, Lazdunski M. Endocytic properties of the M-type 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2. *J Biol Chem* 1996; **271**: 250-257.
35. Ancian P, Lambeau G, Lazdunski M. Multifunctional activity of the extracellular domain of the M-type (180 kDa) membrane receptor for secretory phospholipases A2. *Biochemistry* 1995; **34**: 13146-13151.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Kevin Zorzi (Centre de Recherche Clinique de Nice) for help in statistical analyses.

For Peer Review Only

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

Table 1: Characteristics of the 41 iMN patients with 42 months of follow-up from anti-PLA2R1 assay and their WB cross-reactivity to PLA2R1 orthologs.

Characteristic	Result*
No. of cases	41
Gender : Female/Male	13F/28M (32/68%)
Age at onset (year)	56 (23-87)
Total follow-up (months)	72 (36-264)
Patients with nephrotic proteinuria at onset	38 (86%)
Proteinuria at onset (g/g)	5.3 ±3.1
Creatinine at onset (μmol/L)	117 ±81
Anti-PLA2R1 assay from onset (months)	30 (0-240)
Follow-up from anti-PLA2R1 assay (months)	42 (12-216)
Patients with WB hPLA2R1 cross-reactivity	41 (100%)
Patients with WB rbPLA2R1 cross-ractivity	41 (100%)
Patients with WB mPLA2R1 cross-reactivity	26 (63%)
Treatment naïve at anti-PLA2R1 assay	34 (83%)
Patients treated after anti-PLA2R1 assay	24 (59%)
Patients with active disease (A) at the end of follow-up: Proteinuria >3.5 g/g or eGFR <60 mL/min/1.73m ²	21
ESKD at the end of follow-up	14 (67%)
Patients in remission (R) at the end of follow-up: Proteinuria <3.5 g/g and eGFR >60 mL/min/1.73m ²	20
ESKD at the end of follow-up	0

* Values are median (interquartile range) or number (%).

Table 2: Characteristics of patients in active disease (group A) and remission (group R) at the end of follow-up.

Characteristic*	Active disease (A)	Remission (R)	p value (univariate)	p value (multivariate)
Cases	21	20		
Age	61	52	0.15	0.09
Gender : F/M	8F/13M	5F/15M	0.50	0.10
Total follow-up (months)	81 (36-264)	63 (36-216)	0.3	0.04
Proteinuria at onset (g/g)	6.1 ±0.8	5.1 ±0.7	0.34	0.11
Creatinine level at onset (μmol/L)	127 ±17	95 ±7.5	0.09	0.60
Immunosuppressive treatment	11 treated 10 untreated	13 treated 7 untreated	0.53	0.68
Follow-up from anti-PLA2R1 assay (months)	43 (12-138)	46 (12-216)	0.54	0.67
Proteinuria at anti-PLA2R1 assay (g/g)	9.3 ±3.0	4.4 ±0.7	0.11	0.17
Creatinine level at anti-PLA2R1 assay (μmol/L)	144 ±111	97 ±33	0.07	0.39
Anti-hPLA2R1 titer (RU/ml)	3365±396	2270±370	0.39	0.37
Anti-rbPLA2R1 titer (RU/ml)	4716±557	3083±613	0.055	0.13
Anti-mPLA2R1 titer (RU/ml)	1878±545	256±43	0.006	0.03
Patients with anti-mPLA2R1 titer >605 RU/ml	12	0	0.0001	-

* Values are median (interquartile range) or number (%).

LEGEND TO FIGURES

Fig. 1: Expression of membrane-bound human, rabbit and mouse PLA2R1-HA in cytosolic, microsomal, detergent-soluble and detergent-insoluble fractions of transiently transfected HEK293 cells. Proteins from each fraction (30 µg of total protein) were loaded on SDS-PAGE gels under reducing and non-reducing conditions and WBs were prepared in parallel. Panel A, signal with anti-HA antibody under reducing conditions showing the total level of PLA2R1 expression (folded plus aggregated protein). Panel B, signal with anti-HA under non-reducing conditions showing the level of folded PLA2R1 detectable with this antibody. Panels C and D, same as panels A and B but using specific anti-PLA2R1 antibodies (different antibodies were used for each PLA2R1 orthologs, see methods). Note the anti-hPLA2R1 recognizes hPLA2R1 only under reducing conditions while the anti-mPLA2R1 antibody is conformational and only recognizes the antigen under non-reducing conditions. The detergent-soluble fraction is enriched in folded PLA2R1 protein for all three species.

Fig. 2: Cross-reactivity of representative sera from iMN patients to human, rabbit and mouse PLA2R1-HA. Folded PLA2R1 orthologs from the detergent-soluble fraction (30 µg of total protein) were loaded on SDS-PAGE gels under reducing or non-reducing conditions and WBs were prepared in parallel. Panel A, signals with anti-HA and the three different specific anti-PLA2R1 antibodies under reducing and non-reducing conditions showing the loaded amount of folded PLA2R1 orthologs. Note that each of the three anti-PLA2R1 antibodies have different cross-reactivities. Panel B, signals obtained with 4 representative sera out of 53 sera from iMN patients illustrating the cross-reactivity. All 4 iMN sera cross-reacted to rbPLA2R1 (100% of iMN sera) while only iMN1 and iMN2 (about 50% of iMN sera) cross-reacted to mPLA2R1.

Fig. 3: Specificity of the rbPLA2R1 ELISA for iMN patients and comparison with the standardized hPLA2R1 ELISA. Panel A, IgG4 anti-rbPLA2R1 titers for the cohort of 130 iMN patients, 23 secondary MN, 67 other diseases and 67 healthy controls. Panel B, correlation between IgG4 anti-rbPLA2R1 titers and IgG4 anti-hPLA2R1 titers measured by ELISA. Panel C and D, same as panels A and B, but for total IgG anti-PLA2R1 titers.

Fig. 4: Anti-rbPLA2R1 titers for IgG4 and total IgG correlate with clinical status in iMN patients. Anti-rbPLA2R1 titers for IgG4 and total IgG were measured in sera from iMN patients with active disease (62 nephrotic patients with a mean proteinuria of 8.05 g/g), in partial remission (38 non-nephrotic patients with a mean proteinuria of 1.93 g/g) or in complete remission (23 patients with a mean proteinuria of 0.16 g/g). The prevalence of anti-rbPLA2R1 antibodies was higher in patients with nephrotic proteinuria (71%) than in patients with proteinuria (52%, $p < 0.005^*$) and without proteinuria (39%, $p < 0.005^*$), particularly when measuring IgG4 anti-PLA2R1.

Fig. 5: The specific detection of a subset of anti-PLA2R1 autoantibodies using the mPLA2R1 ELISA can predict long-term clinical outcome in a cohort of 41 iMN patients.

Panel A, IgG4 anti-PLA2R1 titers measured in the 41 iMN patients at the time of first serum sample analysis versus controls with the hPLA2R1, rbPLA2R1 and mPLA2R1 ELISAs. None of the 31 other disease control patients showed activity in the three ELISAs. All 41 iMN patients showed anti-PLA2R1 activity in the hPLA2R1 and rbPLA2R1 ELISAs (titers > 126 and > 120 RU/mL, respectively), but only 32 of them (78%) in the mPLA2R1 ELISA (titers > 126 RU/mL). Panel B, comparison of IgG4 anti-PLA2R1 titers between iMN patients in remission (group R) and active disease (group A) at the end of the clinical follow-up (mean follow-up of 42 months from anti-PLA2R1 serum sample analysis, see Table 1). Group R

(n=20) had preserved renal function (MDRD >60 mL/min) and remission of nephrotic syndrome (UPCR <3.5 g/g). Group A (n=21) had active disease (nephrotic syndrome with urinary protein creatinine ratio (UPCR) >3.5 g/g) and/or impaired kidney function (MDRD <60 mL/min). There was a large overlap between anti-PLA2R1 activity in group A and R in the hPLA2R1 and rbPLA2R1 ELISAs, but not in the mPLA2R1 ELISA. Hundred % of patients (n=12) with an mPLA2R1 ELISA titer >605 RU/mL had active disease. Multivariate analyses including all available parameters (age, sex, proteinuria, serum creatinine levels at diagnosis, immunosuppressive treatments and anti-PLA2R1 titers measured with the three ELISAs) showed that the anti-mPLA2R1 titer is independently associated with the risk of doubling serum creatinine levels or ESKD (p =0.03). Panel C, survival analysis for doubling of serum creatinine in relation to mild/low versus high (>605 RU/mL; values within the hatched rectangle) mPLA2R1 ELISA titers at serum sampling showed a striking increase in the risk of progression in patients with high titers of anti-mPLA2R1 antibodies (p=0.002 using the log-rank test, Table 2). No significant difference was observed between the subgroups of 12 patients with highest anti-hPLA2R1 or anti-rbPLA2R1 titers (values within the hatched rectangles) versus patients with mild/low titers for their clinical outcome (p=0.07 and p=0.5, respectively).

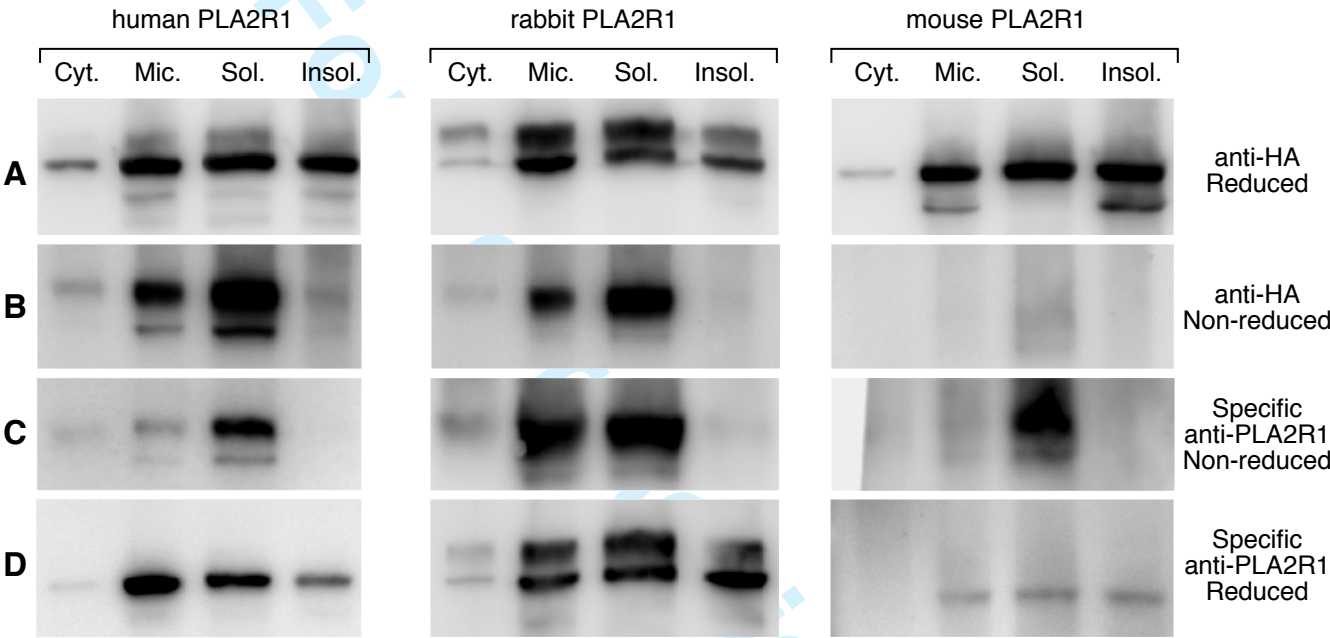


Figure 1

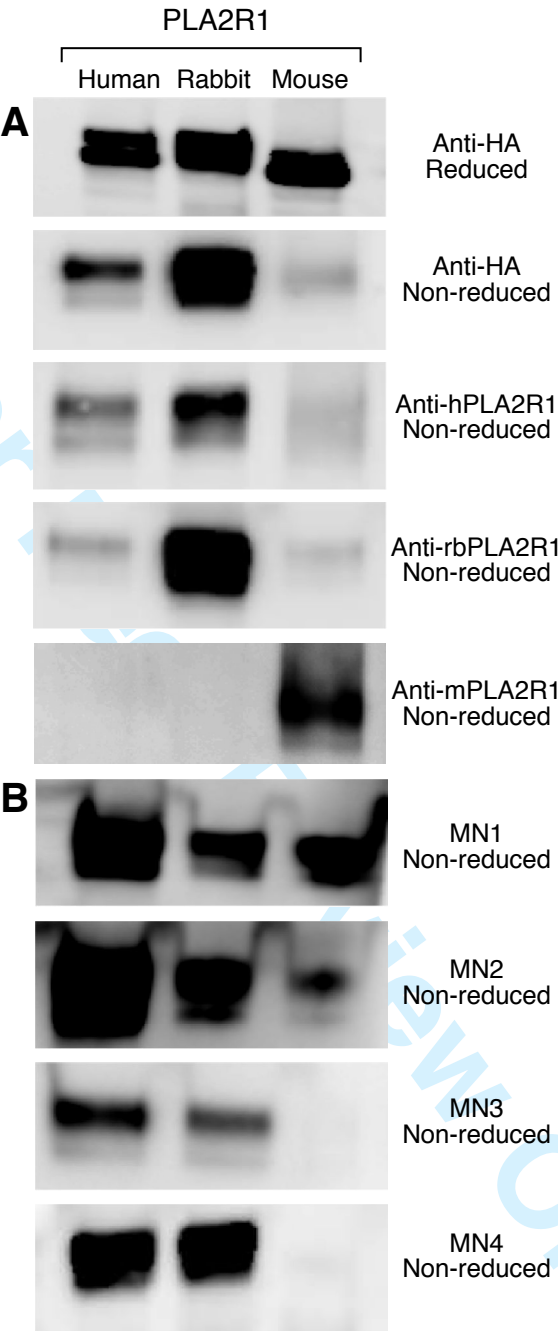


Figure 2

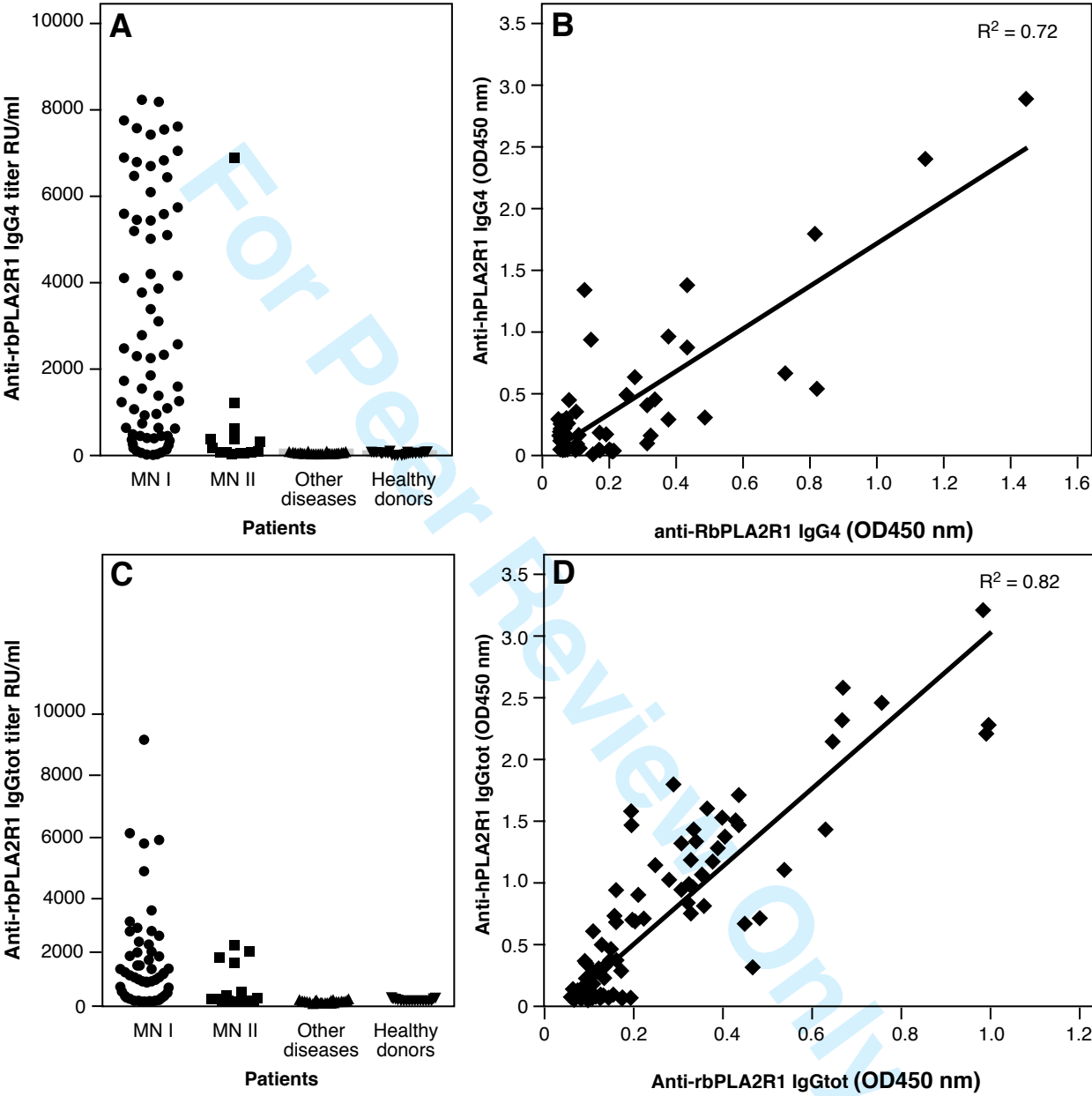


Figure 3

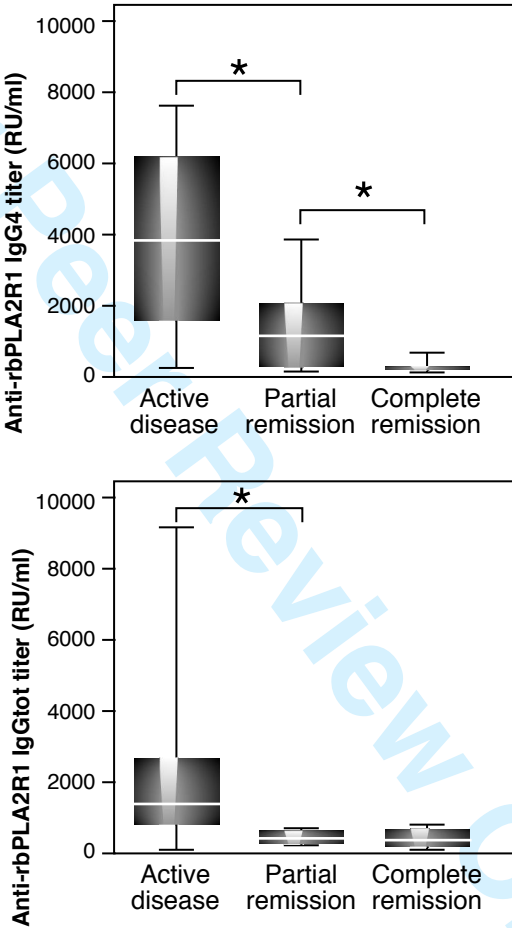


Figure 4

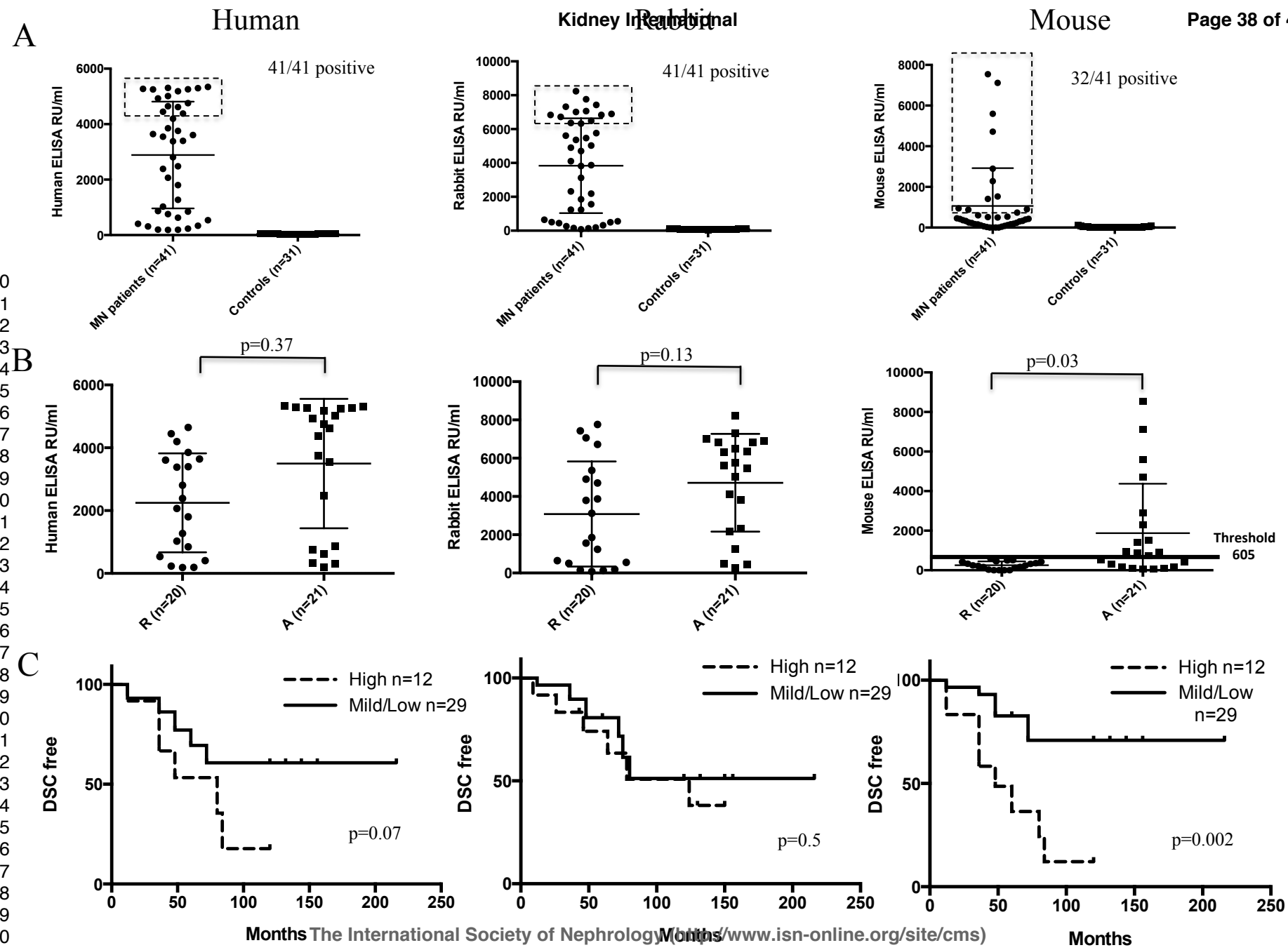


Figure 5

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Cross-reactivity of anti-PLA2R1 antibodies to rabbit and mouse PLA2R1 antigens and development of two novel ELISAs with different diagnostic performances in idiopathic membranous nephropathy

Barbara Seitz-Polski^{a,b,c*}, Guillaume Dolla^b, Christine Payré^b, Nicola M. Tomas^b, Marine Lochouarn^{abc}, Louise Jeammet^b, Christophe Mariat^d, Thierry Krummel^g, Stéphane Burtey^f, Cécile Couriveaud^h, Wolfgang Schlumberger^e, Sylvia Benzaken^e, Ghislaine Bernard^e, Vincent L.M. Esnault^{a§} and Gérard Lambeau^{b*§}

^aService de Néphrologie, Hôpital Pasteur, Université de Nice-Sophia Antipolis, France;
^bInstitut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275 CNRS and Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne Sophia-Antipolis, France;
^cLaboratoire d’Immunologie, Hôpital l’Archet, Université de Nice-Sophia Antipolis, France;
^dService de Néphrologie Dialyse Transplantation Rénale, CHU Hôpital Nord, Saint-Etienne, and Université de Saint-Etienne PRES Université de Lyon, Saint-Etienne, France;
^eEUROIMMUN AG, Lübeck, Germany;
^fService de Néphrologie Dialyse Transplantation Rénale, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Hôpital de la Conception, Marseille, France;
^gService de Néphrologie, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France;
^hService de Néphrologie Dialyse Transplantation Rénale, CHU Saint-Jacques, Besançon, France.

SUPPLEMENTARY METHODS

Expression of PLA2R1 orthologs as folded antigens

The cDNA coding for the full-length transmembrane PLA2R1 orthologs with a HA tag attached to the C-terminal end (hPLA2R1, rbPLA2R1 and mPLA2R1^{1,2,3}) were subcloned in CMV promoter-driven plasmid expression vectors and transiently transfected into HEK293 cells using a Ca/PO₄ homemade transfection kit. HEK293 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies, Grand Island, USA) with addition of 10% fetal bovine serum (Thermo Scientific, Cramlington, United Kingdom) and 1% Penicillin/Streptomycin (Life Technologies). For each 10-cm dish of cultured HEK cells, we used 15 µg of plasmid DNA mixed with 36 µL of 2 M CaCl₂ and diluted with sterile water up to a volume of 300 µL. This solution was gently mixed with an equal volume of 2x HEPES/Na⁺ buffered saline (HBS, 275 mM NaCl, 55 mM HEPES, pH 7.0) and incubated for 30 min at room temperature. The resulting solution was added dropwise to cells. Medium was changed 24 h after transfection. Three days after transfection, cells were scraped, centrifuged at 1,500 rpm for 5 min, washed with PBS, and centrifuged again at 1,500 rpm for 5 min. Cells were then lysed in 20 mM Tris pH 7.4, 2 mM EDTA after addition of a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA), sonicated, and centrifuged at 100,000 x g and 4°C for 1 h. The supernatant corresponded to the *soluble cytosolic fraction*. The pellet was resuspended in 20 mM Tris pH 7.4, 2 mM EDTA to obtain the *microsomal fraction*. This fraction was further solubilized in 50 mM Tris pH 7.4, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate after addition of protease inhibitors, dounced, sonicated again, incubated for 1 h at 4°C, and centrifuged again at 100,000 x g and 4°C for 1 h. The supernatant corresponded to the *detergent-soluble fraction*. The pellet was resuspended in 20 mM Tris pH 7.4, 2 mM EDTA to obtain the *detergent-insoluble fraction*. Protein concentration of each fraction was determined using the Bradford assay and the expression of

the different PLA2R1 orthologs as folded proteins was validated by western blot using specific antibodies (Fig. 1 and 2A).

Western blot analyses

Protein samples were prepared for western blot analysis by addition of 5x Laemmli buffer (1.5 M Tris-HCl pH 6.8, 50% glycerol, 10% SDS, 1% bromophenol blue) and subsequent heating at 95°C for 10 min. For reducing conditions, 20% beta-mercaptoethanol was added to the 5X loading buffer. Proteins (10-50 µg/well) were run on a 7% SDS-PAGE gel in an electrophoresis chamber (Bio-Rad, Hercules, USA) in the presence of a migration buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS; Amresco, Solon, USA). Proteins were then transferred to methanol-soaked PVDF membranes (Millipore, Billerica, USA) under semi-dry conditions in the presence of 25 mM Tris pH 8.5, 192 mM glycine, ethanol 20% using Transblot Turbo (Bio-Rad, Hercules, USA) at 25 V constant for 15 min. Membranes were blocked overnight at 4°C in 5% dry milk with PBS-Tween 0.05% (PBS-T) and then incubated with primary and secondary antibodies for 2 h at room temperature. Primary antibodies were diluted with 0.5% dry milk in PBS-T and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies in PBS-T alone. Membranes were washed three times for 5 min in PBS-T after incubation with primary and secondary antibodies. For the detection of protein bands, membranes were incubated in a chemiluminescent substrate (Millipore, Billerica, USA) for 90 s prior to luminescence detection with a Fujifilm LAS imager 3000. Exposure time was incremental and typically between 20 s and 2 min. When ultrahigh sensitivity detection was desired, Western Lightning Ultra (PerkinElmer, USA) was used.

To identify folded PLA2R1 within the four subcellular fractions of HEK293 cells transfected with human, rabbit and mouse PLA2R1 (Fig. 1 and 2A), the primary antibodies used were : a mouse monoclonal anti-HA (Sigma, St. Louis, USA, working dilution 1:5,000), a rabbit

1
2
3 polyclonal anti-hPLA2R1 (Atlas Antibodies, working dilution 1:1,000), a guinea-pig
4
5 polyclonal anti-rbPLA2R1 (homemade as described⁴, working dilution 1:5,000) and a rabbit
6
7 polyclonal anti-mPLA2R1 (homemade as described³, working dilution 1:2,000). HRP-
8
9 conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit IgG (SouthernBiotech, Birmingham, USA) and goat
10
11 anti-guinea-pig IgG (Cappel, Organon Teknika) were used as secondary antibody at a dilution
12
13 of 1:5,000.
14
15

16
17 For detection of cross-reacting anti-PLA2R1 antibodies in iMN sera (Fig. 2B and Table 1),
18
19 mini western blots containing the three PLA2R1 orthologs were prepared in several
20
21 replicates. Folded PLA2R1 from the detergent-soluble fractions of HEK293 cells transfected
22
23 with human, rabbit and mouse PLA2R1 were run on a 7% SDS-PAGE gel under non-
24
25 reducing conditions. After transfer, each set of the 3 receptor tracks were cut out and placed in
26
27 a multiwell cassette for incubation with the iMN serum at a dilution of 1:50 to 1:500
28
29 depending on anti-PLA2R1 titers. Secondary antibodies were HRP-conjugated mouse anti-
30
31 human IgG4 (SouthernBiotech, Birmingham, USA) diluted at 1:30,000.
32
33
34
35
36
37
38

39 ***Preparation of recombinant soluble rbPLA2R1, mPLA2R1 and hPLA2R1***

40
41 The soluble form of rbPLA2R1 (NP_001075803.1, amino acid residues 24-1393) was
42
43 expressed at high levels in HEK293 cells and purified as follows. The cDNA sequence coding
44
45 for a soluble secreted form of rbPLA2R1 comprising its full extracellular region⁵ was cloned
46
47 in the pRcCMV/neo vector and transfected in HEK293 cells as described above. Cell colonies
48
49 were selected with neomycin (2 mg/mL, Life Technologies, Grand Island, USA) over 4
50
51 weeks. HEK293 subclones expressing highest levels of secreted rbPLA2R1 in the cell
52
53 medium were frozen. The best cell clone was expanded and grown in 2-Liters roller bottle cell
54
55 culture for large scale production. Cells were grown in roller bottles up to 80% confluency in
56
57 200 mL of complete medium, then switched in cell medium (200 mL) with 0.1% fetal calf
58
59
60

serum and grown for up to a week. In these conditions, cells were secreting about 3 mg of rbPLA2R1 per liter per week of growth. The cell medium containing soluble rbPLA2R1 was collected, centrifuged at 1,000 rpm, filtered through a layer of Sephadex G-50 and directly applied to an sPLA2 affinity column (40 mL) as described². The purification could be performed in a single step procedure because the affinity chromatography used as ligand the sPLA2 OS2 which has a pM affinity for rbPLA2R1². The column was washed with 140 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 20 mM Tris pH 7.4, and then with 140 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20 mM Tris pH 7.4. The column was eluted with 140 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM Na⁺-acetate, pH 4.5 and 20-mL fractions were collected. Fractions were adjusted to pH 8.0 with 1 M Tris-HCl and assayed for purity by SDS-PAGE followed by Coomassie staining and western blot with anti-rbPLA2R1 antibodies and iMN sera (Fig. S1A), as well as inhibition of sPLA2 enzymatic activity³. Fractions containing purified rbPLA2R1 were concentrated using a cell concentrator (Amicon Millipore) with a 30 kDa cut-off membrane (YM30) and dialyzed against 50 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA. The concentrated purified rbPLA2R1 protein was reanalyzed as above (Fig. S1B and C), aliquoted, lyophilized and stored at -20°C. About 1 mg of pure protein was obtained per liter of cell medium. The purified rbPLA2R1 antigen had the expected size of 180 kDa (Fig. S1) and was fully folded because cells mostly secrete folded PLA2R1 and furthermore, the affinity ligand purification step only selects the functional folded receptor.

The recombinant soluble form of mPLA2R1 (NP_032893, amino acid residues 27-1392) was produced in NS0 mouse myeloma cells (R&D systems #5367-PL, Minneapolis, USA). The recombinant soluble form of hPLA2R1 (NP_031392.3, amino acid residues 20-1397) was produced in transfected HEK293 cells as described⁶. The proteins were judged as pure based on Coomassie blue staining after gel electrophoresis in both reducing and non-reducing

conditions (Fig. S1C), and the folded native forms were validated by western blot and sPLA2 inhibition assays as previously described ³.

Detection of anti-PLA2R1 antibodies total IgG by ELISA

ELISA plates were coated as described in the main methods with hPLA2R1 and rbPLA2R1, but then blocked for 1 h with 0.1% casein in 1X PBS. Patient sera were diluted at 1:100 in PBS 0.05% Tween 20, 1% casein. After 30 min incubation at room temperature on a plate shaker, the plates were washed 4 times with PBS plus 0.02% Tween 20. Anti-human IgG-horseradish peroxidase conjugate (Euroimmun) diluted 1:1,000 in sample buffer (100 µL/well) and incubated 30 min at room temperature on a plate shaker. After four washings, TMB was added and developed for 15 min, the reaction was stopped with HCl 1.2 N. The plates were read at 450 nm.

Detection of anti-PLA2R1 antibodies by IIFT

Anti-PLA2R1 antibodies were detected using a recombinant cell-based indirect immunofluorescence test (RC-IFA, Euroimmun, Germany) containing a BIOCHIP mosaic of formalin-fixed HEK 293 cell over-expressing PLA2R1 and mock-transfected HEK 293 cells as negative control. To achieve a semi-quantitative measurement of PLA2R1 autoantibody levels, different dilutions of serum were prepared in phosphate buffer saline, 0.2% Tween 20 and incubated for 30 min. A fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-human IgG antibody (Euroimmun) was used to detect bound IgG antibodies. All slides were evaluated by two-independent observers using a microscope with 460-490 nm LED excitation (EUROStar; Euroimmun). A specific fluorescence of the transfected cells at a dilution of 1:10 or higher was considered to be as positive.

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

References

1. Ancian P, Lambeau G, Mattéi MG, *et al.* The human 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2. Molecular cloning, identification of a secreted soluble form, expression, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 1995; **270**: 8963-8970.

2. Lambeau G, Ancian P, Barhanin J, *et al.* Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipases A2. *J Biol Chem* 1994; **269**: 1575-1578.

3. Rouault M, Le Calvez C, Boilard E, *et al.* Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor. *Biochemistry* 2007; **46**: 1647-1662.

4. Zvaritch E, Lambeau G, Lazdunski M. Endocytic properties of the M-type 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2. *J Biol Chem* 1996; **271**: 250-257.

5. Ancian P, Lambeau G, Lazdunski M. Multifunctional activity of the extracellular domain of the M-type (180 kDa) membrane receptor for secretory phospholipases A2. *Biochemistry* 1995; **34**: 13146-13151.

6. Dahnrich C, Komorowski L, Probst C, *et al.* Development of a standardized ELISA for the determination of autoantibodies against human M-type phospholipase A2 receptor in primary membranous nephropathy. *Clin Chim Acta* 2013; **421C**: 213-218.

LEGEND TO SUPPLEMENTARY FIGURES

Figure S1. Purification and characterization of recombinant soluble rabbit, mouse and human PLA2R1 orthologs. Panel A, Coomassie staining of SDS-PAGE gel and western blot analysis of fractions containing purified rbPLA2R1 eluted from the sPLA2 affinity column. Panel B, same as A but with the final preparation of purified and concentrated rbPLA2R1. Panel C, Coomassie staining of SDS-PAGE gel (7%) loaded with 2 µg of recombinant purified soluble rabbit, mouse and human PLA2R1 orthologs under reducing and non-reducing conditions. The preparations are those used for the specific ELISA assays.

Figure S2. Anti-rbPLA2R1 IgG4 titers is temporally associated with the clinical response (proteinuria). Representative plots of anti-rbPLA2R1 (blue dots) and proteinuria (red dots) over time in 6 iMN patients treated with rituximab.

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

Table S1: Baseline characteristics of patients used to validate anti-PLA2R1 ELISAs.

	Disease		Age	Gender	Serum creatininemia μmol/L	Proteinuria g/g
Idiopathic MN n=130	Active disease n=62		57 (29-86)	16F/46M	171 (53-642)	8.05 (3.83-20.3)
	Partial remission n=38		53 (25-89)	15F/23M	120 (57-333)	1.93 (0.6-3.44)
	Complete remission n=23		51 (26-76)	5F/18M	118 (69-290)	0.16 (0-0.37)
	Dialysis n=7		48 (36-67)	1F/4M		
Secondary MN n=23	Lupus n=11		44 (17-74)	10F/1M	97 (50-345)	3.2 (0.56-6.8)
	Hepatitis B-C n=5		61 (52-69)	1F/4M	338 (93-557)	3.7 (1.38-9.4)
	Malignancy n=4		66 (59-79)	4M	163 (90-125)	3.6 (1.26-6.49)
	Other diseases (GVH, cryoglobulinaemia, Leishmania) n=3		52 (40-68)	1F/2M	110 (104-115)	6.62 (3.47-10)
Other diseases n=67	Rheumatoid Arthritis n=34		50 (29-86)	30F/3M	No kidney failure	No glomerular disease
	Other glomerular diseases n=33	ANCA vasculitis n=6	68 (40-86)	2F/4M	487 (228-690)	2.44 (0.73-4.21)
		IgAN n=6	54 (27-79)	2F/4M	483 (90-1271)	4.04 (1.6-8.5)
		FSGS n=5	65 (47-75)	2F/3M	172 (57-253)	2.14 (0.32-3.8)
		MPGN n=3	70 (52-75)	2F/1H	305 (120-590)	2.05 (1.56-2.6)
		MCD n= 3	53 (33-67)	3M	134 (72-203)	4.37 (3.05-4.56)
		Lupus nephritis n=3	35 (22-48)	2F/1M	143 (90-243)	2.45 (1.66-3.05)
		Diabetic n=4	62 (52-73)	2F/2M	148 (100-203)	5.8 (3.5-8.4)
		Other n=3	60 (27-85)	3M	302 (175-487)	2.58 (2.6-3.5)
Healthy donors N=67	Anonymous blood donation					

IgAN : IgA Nephropathy ; FSGS : Focal Segmental Glomerular Sclerosis ; MPGN : Membranoproliferative Glomerulonephritis ; MCD : Minimal Change Disease.

Table S2: Prevalence of anti-PLA2R1 IgG4 and IgGtot as determined by ELISA using rabbit and human PLA2R1 antigens (first 4 columns) or IIFT (hPLA2R1 antigen and detection for total IgG).

Patients	Rabbit IgG4		Human IgG4		Rabbit IgGtot		Human IgGtot		IIFT IgGtot	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Idiopathic MN n=84	54	30	50	34	48	36	48	36	49	34
Prevalence iMN	64%		60%		57%		57%		58%	
Secondary MN n=18	4	14	4	14	3	15	3	15	3	15
Total prevalence (iMN+MNII)	57%		50%		50%		50%		50%	
Other diseases n= 33	0	33	0	33	0	33	0	33	0	33
Healthy donors n=18	0	18	0	18	0	18	0	18	0	18

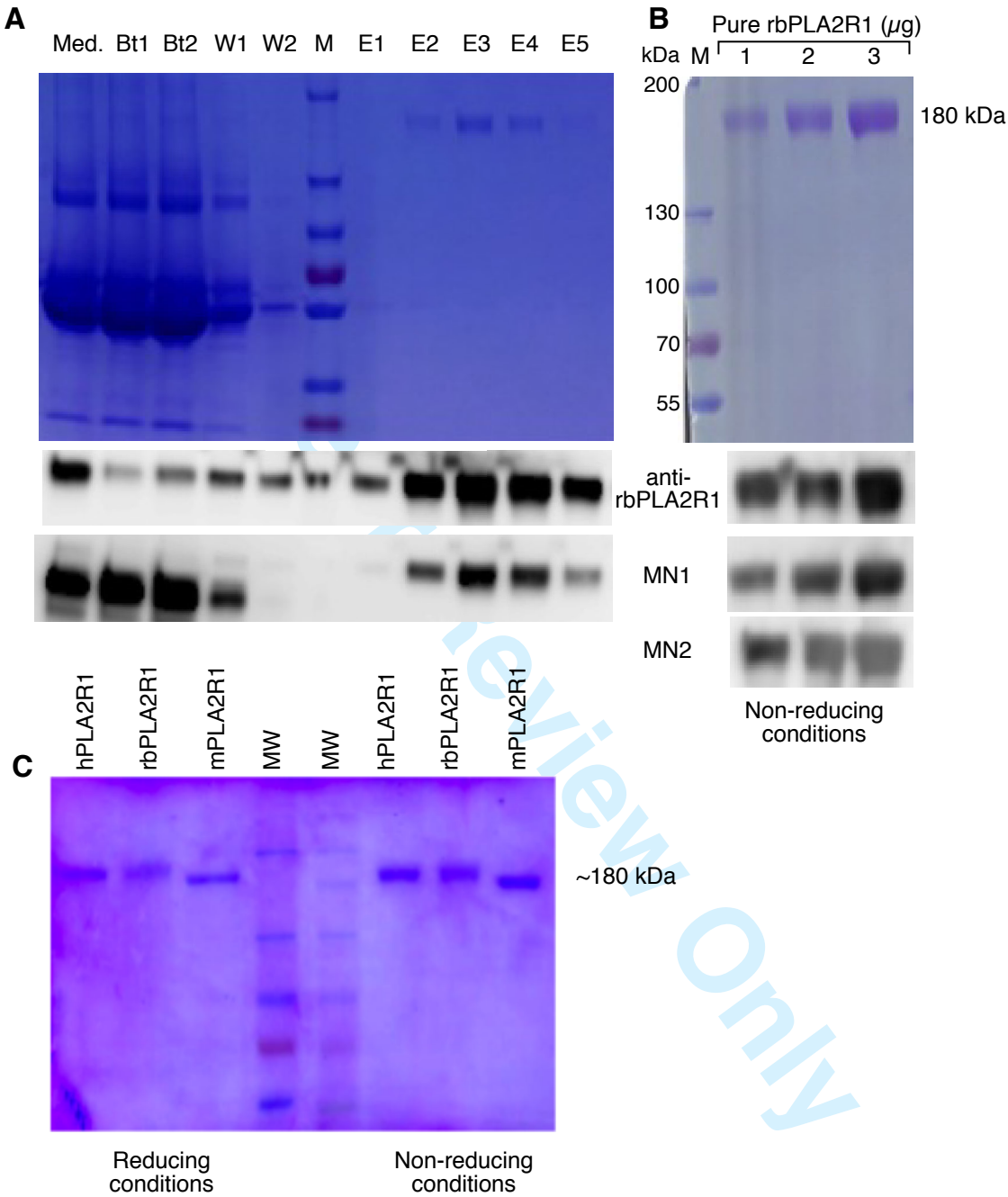


Figure S1

Anti-rbPLA2R1 IgG4 Titer RU/ml (●)

Proteinuria g/g (●)

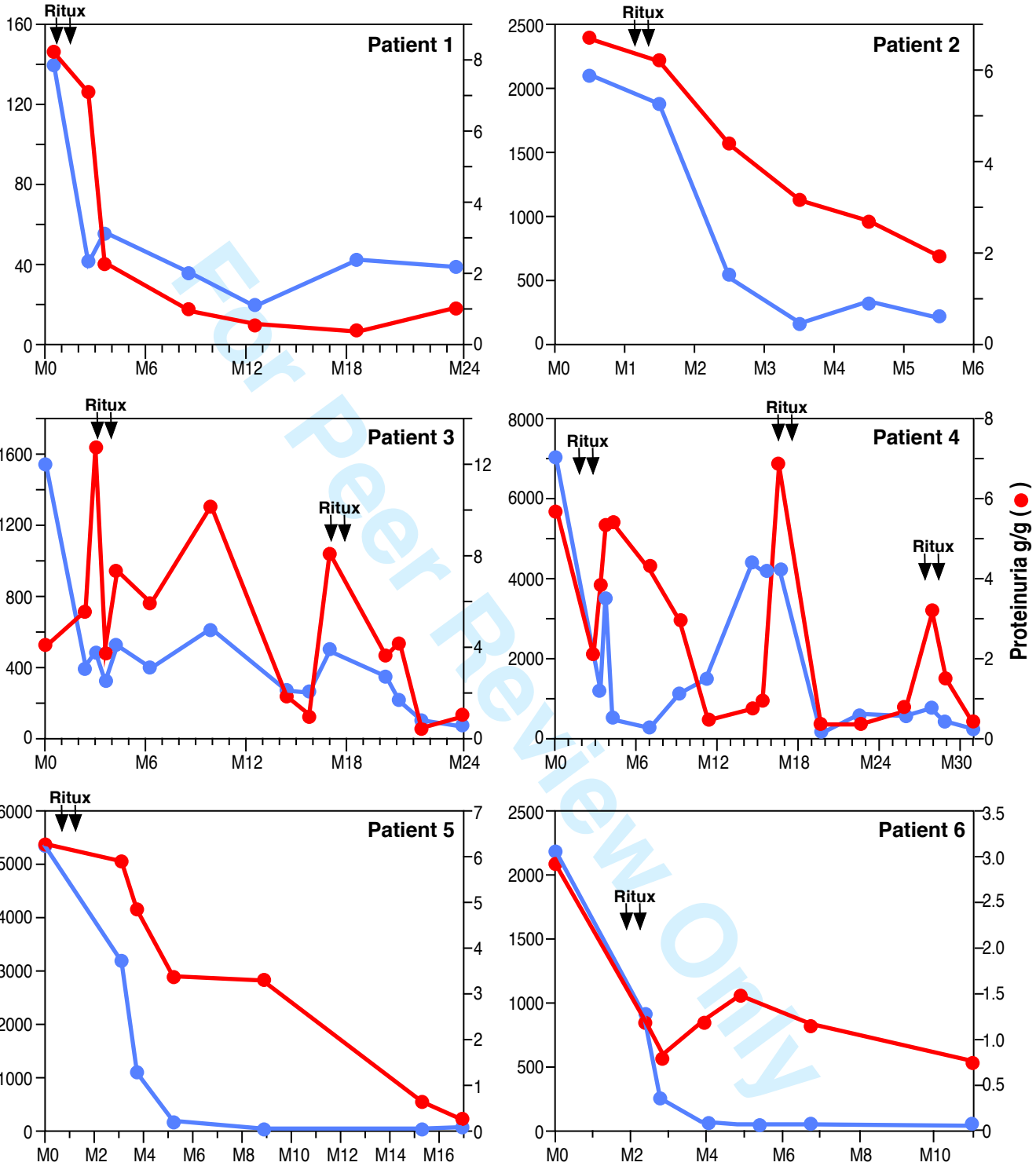


Figure S2

2.4 Article 4 : Un « spreading » intra-moléculaire est associé à des formes actives de mauvais pronostic dans les GEM avec Ac anti-PLA2R1

Les anticorps anti-PLA2R1 reconnaissent au sein de PLA2R1 un épitope conformationnel puisque la reconnaissance de la molécule est perdue en conditions réductrices (Beck NEJM 2009).

Une première équipe a décrit plusieurs épitopes reconnus par les anticorps anti-PLA2R1 définissant un étalement intra-moléculaire des épitopes grâce à la synthèse de peptides séquentiels de PLA2R1 se chevauchant de 5 acides aminés. Sept peptides contenus dans les domaines : CysR, CTLD1, CTLD2, CTLD6, entre le CTLD6 et 7, CTLD8 et entre le CTLD8 et le segment transmembranaire en utilisant 10 sera différents de patients porteurs d'anticorps anti-PLA2R1 ont ainsi pu être identifiés. Mais l'utilisation de ces peptides dans un test ELISA ne montre pas de signal différent entre les patients porteurs d'une GEM avec anticorps anti-PLA2R1, sans anticorps anti-PLA2R1 et le groupe contrôles. L'ensemble des peptides est capable de faire compétition à la fixation d'un sérum de patient sur la molécule PLA2R1 avec une réponse dose-dépendante. Individuellement seuls les peptides 3 et 4 (contenus respectivement dans le CTLD2 et le CTLD6) sont capables de faire compétition.

Une autre équipe a montré en utilisant 14 sera de patients avec des anticorps anti-PLA2R1 un épitope immunodominant à cheval sur 3 domaines : CysR, FNII et CTLD1. Ils ont montré que tous les sera testés (n=10) reconnaissent la construction CysR-FNII-CTLD1. Lorsqu'ils introduisent ensuite une site de digestion par la thrombine dans la construction CysR-FNII-CTLD1 entre les domaines CysR-FNII et FNII-CTLD1 afin d'obtenir des domaines isolés, la reconnaissance est alors perdue après coupure à la thrombine. Ils concluent donc que l'épitope immunodominant se situe à cheval sur ces 3 domaines.

Quelques semaines plus tard, Fresquet et al. montrent à partir de 5 sera de patients porteurs d'une GEM avec anticorps anti-PLA2R1 que le domaine CysR contient les épitopes majeurs reconnus par les anticorps anti-PLA2R1. Ils identifient 2 peptides contenus dans le domaine CysR capables de faire compétition avec la fixation des anticorps sur PLA2R1 et sur un fragment du récepteur contenant les domaines CysR-FNII-CTLD1.

Un de ces peptides aurait une homologie de séquence avec une enzyme la D-alanin-D alanine carboxypeptidase présente chez de nombreuses bactéries notamment le clostridium. Un mécanisme de mimétisme moléculaire pourrait alors expliquer l'immunisation contre le domaine CysR de PLA2R1. Ils signalent également que 10% de patients reconnaissent un autre épitope présent dans les domaines CTLD4 à 8 (Fresquet et al., 2014).

Grâce à une série de mutants de délétions de PLA2R1, nous avons pu cribler le sérum de 50 patients porteurs d'anticorps anti-PLA2R1 et définir au moins trois domaines différents reconnus par les anticorps anti-PLA2R1 définissant un étalement intra-moléculaire des épitopes.

En effet, lorsque l'on délète le récepteur de son domaine CysR, on perd la reconnaissance du récepteur pour 12 des 50 patients testés (24%), ce qui suggère que ces patients ont des anticorps dirigés uniquement contre le domaine CysR. Lorsque l'on délète la molécule jusqu'à son domaine CTLD1 (comprenant le domaine CysR, FNII et CTLD1), on perd la reconnaissance pour 11 des 50 patients testés (22%). Et enfin lorsque l'on délète la molécule jusqu'au domaine CTLD7 (comprenant le domaine CysR, FNII et CTLD1 à 7), on perd la reconnaissance pour 27 des 50 patients testés (54%) (Fig. 1).

Nous avons ainsi décrit 3 profils épitopiques : le profil CysR, CTLD1 et CTLD7 (Fig.1).

Cette série de mutants nous a permis de corréler la présentation clinique et l'évolution des patients : en effet les patients avec un profil CysR ont statistiquement une protéinurie plus faible au moment du diagnostic et du test que les patients ayant les deux autres profils, avec plus de rémissions spontanées et moins de patients évoluent avec un mauvais pronostic (défini par une protéinurie >4 g/g ou une créatininémie qui augmente de plus de 30% par rapport à sa valeur de base qui définissent les indications de traitement immunosuppresseur selon les KDIGO) (Table1). Nous avons également montré sur des courbes de survie rénale que les patients ayant un profil épitopique de type CysR avaient une meilleure survie rénale à 24 mois (définie par l'absence d'augmentation de plus de 30% de la créatininémie par rapport à la créatininémie de base) (Fig.2).

Nous avons pu montrer à partir de l'analyse au cours du temps de 14 patients ayant au moins 2 sera disponibles à plus de 3 mois d'intervalle, que l'étalement intra-moléculaire des épitopes au cours du temps par le passage d'un profil CysR à un profil CTLD7 était associé à une aggravation de la maladie et inversement (Fig.3) et quand les patients ne modifiaient pas leur profil épitopique, ils conservaient une maladie stable.

Nos résultats permettent donc de compléter les résultats obtenus sur la caractérisation des domaines de PLA2R1 reconnus par les anticorps anti-PLA2R1.

Nos résultats ne sont pas contradictoires avec les précédentes publications mais permettent de compléter ces résultats obtenus à partir de quelques sera. Par contre Kao et al., n'arrivent pas à identifier la persistance d'un signal après coupure à la thrombine entre CysR et FNII et FNII et CTLD1 alors que certains sera sont capables de reconnaître le domaine CTLD1 seul

(Résultats non encore publiés). Il est possible que l'épitope reconnu dans CTLD1 se situe au niveau des sites de coupure à la thrombine de même pour le domaine CysR.

JASN

Epitope Spreading in PLA2R1 is Associated with Active Disease and Bad Prognosis in Idiopathic Membranous Nephropathy

Journal:	<i>Journal of the American Society of Nephrology</i>
Manuscript ID:	JASN-2014-11-1061
Manuscript Type:	Original Article - Brief Communication
Date Submitted by the Author:	02-Nov-2014
Complete List of Authors:	Seitz-Polski, Barbara; Nice University Hospital, Immunology Dolla, Guillaume; Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275 CNRS and Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne Sophia-Antipolis Payré, Christine; Nice Sophia-Antipolis University, UMR 7275 CNRS; Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275 CNRS and Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne Sophia-Antipolis Girard, Christophe; Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275 CNRS and Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne Sophia-Antipolis Zorzi, Kevin; Service de Néphrologie, Hôpital Pasteur Benzaken, Sylvia; Laboratoire d'Immunologie, Hôpital l'Archet, Hôpital l'Archet Bernard, Ghislaine; Nice University Hospital, Immunology Esnault, Vincent; Nice University Hospital, Nephrology; Lambeau, Gérard; Institute of Molecular and Cellular Pharmacology, UMR 7275 CNRS and University of Nice
Keywords:	membranous nephropathy, Epidemiology and outcomes, chronic kidney disease

SCHOLARONE™
Manuscripts

Epitope Spreading in PLA2R1 is Associated with Active Disease and Bad Prognosis in Idiopathic Membranous Nephropathy

Barbara Seitz-Polski^{*,†,‡}, Guillaume Dolla[†], Christine Payré[†], Christophe Girard[†], Kevin Zorzi^{*}, Sylvia Benzaken[‡], Ghislaine Bernard[‡], Vincent L.M. Esnault^{*§} and Gérard Lambeau^{†§}

^{*}Service de Néphrologie, Hôpital Pasteur, Université Nice-Sophia Antipolis, France;

[†]CNRS and Université Nice-Sophia Antipolis, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275, Valbonne Sophia-Antipolis, France;

[‡]Laboratoire d'Immunologie, Hôpital l'Archet, Université Nice-Sophia Antipolis, France;

Centre de Recherche Clinique, Hôpital l'Archet, Université Nice-Sophia Antipolis, France;

[§]Co-last authors

Running title: PLA2R1 epitope spreading in iMN

Word counts:

Abstract: 191

Main body manuscript: 1638

Corresponding authors:

Barbara Seitz-Polski, M. D., Department of Nephrology, Pasteur Hospital, University of Nice Sophia Antipolis, 30 Voie Romaine, 06002 Nice, France. Tel: +33 49 203 8876; Fax: +33 49 203 8632; E-mail: seitz-polski.b@chu-nice.fr

Gérard Lambeau, Ph.D., Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275 CNRS et Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne Sophia-Antipolis, France. Tel : +33 49 395 7733; Fax +33 49 395 7708; E-mail: lambeau@ipmc.cnrs.fr

ABSTRACT

The phospholipase A2 receptor (PLA2R1) is the major autoantigen in idiopathic membranous nephropathy. Two PLA2R1 epitopes have been recently identified, but their link to disease activity is unknown. We screened the reactivity of 50 patients on a series of PLA2R1 deletion mutants covering the ten extracellular domains. We identified epitopes in the CysR, CTLD1 and CTLD7 domains and stratified the cohort into three subgroups of 12, 11 and 27 patients, according to their epitope profiles. When recognition was restricted to CysR, the disease was less active ($p=0.02$) with more spontaneous remission ($p=0.009$) and better renal survival ($p=0.02$). Remarkably, anti-PLA2R1 titers measured by ELISA were not statistically different between the patients' subgroups. We also had 14 patients with serial sera available. A stable epitope profile during follow-up was associated with the same disease activity ($n=9$). Conversely, an epitope profile spreading during follow-up from CysR to CTLD7 was associated with disease worsening whereas a reverse spreading from CTLD1/CTLD7 profiles to CysR was associated with favorable outcome. We conclude that analysis of the PLA2R1 epitope profiles and their spreading during follow-up is a powerful tool to stratify patients into subgroups and monitor disease severity.

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

Idiopathic Membranous Nephropathy (iMN) is an autoimmune disease and a common cause of nephrotic syndrome in adults¹. Disease evolution is highly variable with spontaneous remission, persistent proteinuria or end-stage kidney disease. In 2009, Beck et al. identified the M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R1) as the major podocyte antigen in iMN². The presence of anti-PLA2R1 autoantibodies has been widely confirmed in subsequent studies in 60 to 80% of iMN patients^{3, 4, 5}. The pathogenic role of these autoantibodies is not yet proven, but anti-PLA2R1 antibody titers appear to correlate with disease activity in most study populations. However, individual outcome prediction from anti-PLA2R1 titers is unclear. Indeed, autoantibodies disappear in most patients during remission, either under symptomatic or immunosuppressive treatments⁵⁻⁷, but may persist during apparent clinical remission under renin-angiotensin system (RAS) blockade⁸. Furthermore, high anti-PLA2R1 antibody titers at presentation appears to correlate with subsequent poor renal outcome but some patients with high autoantibody titers at onset exhibit a sharp decrease of anti-PLA2R1 activity and disease remission^{9, 10}.

The treatment of iMN is controversial^{11, 12}. KDIGO guidelines recommend a supportive symptomatic treatment with RAS-blockade and diuretics in all patients with iMN, and immunosuppressive therapy only in case of renal function deterioration or persistent nephrotic syndrome¹³. Therefore, immunosuppressive treatments are often started only after significant and potentially irreversible complications. On the other hand, an unnecessarily early start of immunosuppression can be futile in patients who might develop remission with symptomatic treatments. For these reasons, there is a need for better predictors of renal outcome in iMN.

Evidence for several epitopes in PLA2R1 targeted by anti-PLA2R1 antibodies was recently obtained from two recent studies¹⁴. Kao et al. first identified an immunodominant epitope in PLA2R1 which seems to comprise the cysteine-rich domain (CysR), the fibronectin-type II domain (FNII) and the C-type lectin domain 1 (CTLD1) of PLA2R1¹⁵. Going further,

1
2
3 Fresquet et al. identified the CysR domain alone as a major epitope¹⁶. However, none of these
4
5 studies analyzed the link between the identified epitopes and disease activity.
6
7

8 Here, we screened a cohort of 50 iMN patients for their reactivity against nine PLA2R1
9
10 mutants, successively deleting each of the 10 extracellular domains of the receptor. We
11
12 identified three distinct epitopes that allowed us to stratify the patients into three subgroups
13
14 and analyzed the relationships between their epitope profiles and disease activity.
15
16

17 We established a cohort of 50 iMN patients, all clinically well-characterized and positive for
18
19 anti-PLA2R1 by ELISA (Table 1). Most patients had nephrotic proteinuria at diagnosis (76%)
20
21 and were naive of immunosuppressive treatment (88%) at the time of PLA2R1 assays by
22
23 ELISA and western blot. Patients had a mean follow-up of 36 months from PLA2R1 assay.
24
25 All patients received symptomatic treatment. Ten patients entered into remission under RAS-
26
27 blockade. Thirty-one patients received an immunosuppressive treatment and 19 entered into
28
29 remission. We analyzed their renal outcome and defined a poor renal prognosis according to
30
31 KDIGO as persistence of nephrotic range urinary protein creatinine ratio >4.0 g/g and/or
32
33 serum creatinine increase over 30% and/or eGFR <45 ml/min/1.73m² at last observation
34
35 carried forward (LOCF). Twenty-one patients had a poor renal outcome at the end of the
36
37 follow-up including 9 patients in end-stage kidney disease (ESKD). We also analyzed renal
38
39 survival 24 months after anti-PLA2R1 assay and defined an event by an increase over 30% of
40
41 serum creatinine from baseline.
42
43
44
45
46
47

48 PLA2R1 is a 180 kDa membrane receptor with a large extracellular region comprising 10
49
50 distinct globular domains of 7 to 17 kDa: a cysteine-rich domain (CysR), a fibronectin type II
51
52 domain (FNII) and eight distinct C-type lectin domains (CTL1 to 8)¹⁷. Each domain is
53
54 separated by a small linker sequence of about 10 amino acids. We generated by site-directed
55
56 mutagenesis a series of 9 deletion mutants, in which we successively deleted each domain at
57
58 the linker region and from the N-terminal region of the receptor, thus leaving the receptor
59
60

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

membrane-bound (Fig. 1A). We introduced in the cytoplasmic tail a small HA tag which allowed us to validate the expression of the recombinant proteins in HEK293 cells (Fig. 1B). The $\Delta 6$ construct was poorly detected with anti-HA, but was clearly detected by 27 patients (Fig. 1E). We then screened the 50 iMN patients' sera for their reactivity against the wild-type protein versus deletion mutants. Successive deletion of CysR, CTLD1 and CTLD7 led to the progressive loss of PLA2R1 recognition for 12, then 11 and 27 more patients, identifying three distinct epitopes and corresponding epitope profiles (Fig. 1C-E). We then compared the clinical characteristics of patients based on their epitope profile (Table 1). There was no statistically significant difference between the three profiles for demographic characteristics (gender and age), number of patients with immunosuppressive treatment and titers of anti-PLA2R1 antibodies measured by ELISA using full-length PLA2R1. In contrast, we observed a significant difference for proteinuria on diagnosis and at the time of PLA2R1 testing ($p=0.04$ and 0.02 , respectively; using Kruskal-Wallis test), with lower proteinuria associated with the CysR profile. Patients with a CysR profile also showed more spontaneous remission ($p=0.009$ using Chi-square test) and a lower incidence of renal KDIGO events at LOCF, when compared with patients with a CTLD7 profile ($p=0.02$ using Chi-square test). Overall, most patients with a CysR profile were in partial or complete remission while most patients with a CTLD1 or CTLD7 profiles were in active disease (Fig. S1). Furthermore, a survival curve analysis for increasing over 30% serum creatinine from baseline in relation to epitope profile at sampling date showed a striking increase of progression in patients with CTLD1 and CTLD7 profiles (Fig. 2) ($p=0.02$ using Log-rank test). Renal survival was still significantly better for patients with a CysR profile in the subgroup of patients that received an immunosuppressive treatment ($p=0.03$ using Log-rank test). The epitope profile assay is thus a prognosis factor for the onset of a renal event.

We also had 14 patients with sera available during follow-up. We searched for switches in PLA2R1 epitope profile during the course of the disease (Fig. 3 and Fig. S2 respectively show data and clinical follow-up of 4 representative patients). Nine patients had stable epitope profiles during follow-up with the same disease activity. One had stable anti-CysR restricted activity after immunosuppressive treatment and entered into remission (Fig. 3A and S2). Three patients had a stable CTLD1 profile with active disease. Five patients had a stable CTLD7 epitope profile and all but one were in active disease (Fig. 3B and S2). Five patients switched their epitope profile with a modification of disease activity. Four patients with CTLD1 (n=2) or CTLD7 (n=2) profiles switched to a CysR profile and entered into remission induced by immunosuppressive treatment (Fig. 3C and S2). Inversely, one patient switched from CysR to a CTLD7 profile and relapsed with nephrotic proteinuria (Fig. 3D and S2). Overall, we analyzed 29 sera from the 14 patients with at least a 3 months interval: 8 sera had a CysR profile with 7 patients in remission and only one in active disease; 10 other sera had a CTLD1 profile with all patients in active disease; and the last 11 sera had a CTLD7 profile with 9 patients in active disease and 2 in remission.

In this work, we thus screened 50 patients with iMN disease and identified epitopes in three domains of PLA2R1: Cys-R, CTLD1 and CTLD7. Interestingly, several common genetic variants associated with iMN have been localized in these domains¹⁸. Our results further extend those by Kao et al. and Fresquet et al. who identified epitopes in the CysR-CTLD1 region and CysR alone, respectively^{15, 16}. Our ability to identify CTLD7 as an additional domain and more clearly identify CysR and CTLD1 as two separate epitopes is likely due to the facts that we generated a different and full set of PLA2R1 deletion mutants and also screened a large number of patients. Indeed, the two previous studies only used a very limited number of patients or used a pool of 5 patients' sera, and then performed competition assays

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

with more patients. Furthermore, it was unclear whether sera were collected from patients with active disease or in remission.

We then observed that anti-PLA2R1 reactivity against CysR at serum sampling was associated with favorable outcome while reactivity against CTLD1 and CTLD7 was associated with active disease and poor renal prognosis. Furthermore, we showed that the epitope profiles can change during follow-up. Anti-CTLD1 and anti-CTLD7 antibodies disappeared with disease remission and reappeared with disease relapse while anti-CysR restricted activity was associated with stable and mild disease activity. Importantly, all patients still had anti-PLA2R1 activity when measured by ELISA with full-length PLA2R1 (Table 1). These findings may explain the discrepancies observed between the level of disease activity and the anti-PLA2R1 titers⁸.

Our findings led us to hypothesize that anti-PLA2R1 antibodies may be initially raised against the N-terminal CysR domain with pauci-symptomatic iMN disease. A second immune challenge (allergy, infection...) might then induce intra-molecular spreading in PLA2R1 towards the C-terminal end (CTLD1 or CTLD7) leading to more active disease. Epitope spreading is a phenomenon in which new epitopes, within the same or different molecule, are recognized over time by T or B cells from an original non-cross-reactive antigenic site. As described in many autoimmune diseases such as Goodpasture's disease¹⁹, Pemphigus vulgaris²⁰, rheumatoid arthritis²¹, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)²², multiple sclerosis²³, type 1 diabetes²⁴ and Heymann Nephritis²⁵, intra-molecular epitope spreading is associated with worsening of the disease. Moreover, intra-molecular epitope spreading may also modulate remission and relapse of iMN. As described in EAE, epitope spreading plays a major role in disease progression in mice, and short-term co-stimulation blockade can inhibit the T cell response, preventing epitope spreading and worsening of the disease^{26, 27}.

In conclusion, our results show that three PLA2R1 domains are involved in anti-PLA2R1 binding, with two of them more closely associated with active iMN and likely linked by a mechanism of epitope spreading. These finding should now be confirmed in independent prospective cohorts and prospective randomized trials.

Concise methods

Patients

Sera of patients with biopsy-proven iMN were collected from five French nephrology centers. The research was in compliance with the Declaration of Helsinki and approved by the ethics committees of our hospitals. Informed consent was obtained for sampling tissue and blood. iMN was defined by the absence of secondary MN features such as positivity for anti-nuclear antibodies, history of hepatitis B or C, cancer or other immune pathologies (cryoglobulinaemia, sarcoidosis, graft versus host disease, ...). Sera from a total of 50 patients were collected, with sequential sera samplings for 14 patients. A poor renal prognosis was defined by proteinuria > 4 g/g and/or serum creatinine increase over 30% and/or eGFR < 45 ml/min/1.73m², as defined by the KDIGO recommendations. Active disease was defined by nephrotic proteinuria > 3.5 g/g. Renal survival was analyzed after two years of follow-up and renal endpoint was defined by an increase over 30% of serum creatinine from baseline.

Generation and expression of PLA2R1 deletion mutants

We generated the series of human PLA2R1 deletion mutants by PCR and cloned them into the pLPCX expression vector (Clontech), as previously performed for wild-type human PLA2R1 (GenBank NM 007366)²⁸. Deletion mutants were generated using the Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (Thermo scientific). All mutants comprised the PLA2R1 signal peptide (Met-1 to Ala-20) and the N-terminal linker sequence (Ala-21 to Trp-35) followed by the PLA2R1 sequence with the following domains deleted at the linker regions (Fig. 1):

Deletion of the N-terminal domain CysR (Δ C, deletion from Gln-36 to Asp-165), CysR and FNII domains (Δ F, Gln-36 to Thr-223), CysR to CTLD1 domains (Δ 1, Gln-36 to Tyr-357), CysR to CTLD2 domains (Δ 2, Gln-36 to Ala-504), CysR to CTLD3 domains (Δ 3, Gln-36 to Pro-660), CysR to CTLD4 domains (Δ 4, Gln-36 to Lys-805), CysR to CTLD5 domains (Δ 5, Gln-36 to Lys-947), CysR to CTLD6 domains (Δ 6, Gln-36 to His-1105), and CysR to CTLD7 domains (Δ 7, Gln-36 to Pro-1235). All mutants were generated from a C-terminal HA-tagged (YPYDVDPYA) version of the human full-length PLA2R1 cDNA cloned into the pGEMTeasy vector (Promega) (Fig. 1). After full sequencing, all deletion constructs were subcloned into the pLPCX retroviral vector and transfected into HEK293 cells using a Ca/PO₄ transfection kit (InvitroGen). Mutant expression was confirmed by western blot from transiently transfected HEK293 cell lysates using anti-HA antibodies (see below).

Western-blot analysis

The different deletion mutants of PLA2R1 were analyzed by SDS-PAGE under non-reducing conditions. Total proteins (10-50 μ g/well to adjust for the expression level of each mutant) were run on 4-15% precast TGX SDS-PAGE gels (Bio-Rad) and transferred to methanol-soaked PVDF membranes (Bio-Rad) under semi-dry conditions using Trans-blot Turbo (Bio-Rad) at 25 V constant for 12 min. Membranes were blocked overnight at 4°C in 5% milk with PBS-Tween (PBS-T) 0.05% and then incubated with primary and secondary antibodies for 2 h at room temperature. Primary antibodies were diluted with 0.5% dry milk in PBS-T. Membranes were prepared in multiple replicates and probed with a mouse monoclonal anti-HA antibody (Sigma) at 1:5,000 to validate expression or with the 50 different iMN sera to screen for the epitope profile at a working dilution of 1:25 to 1:500, depending on anti-PLA2R1 titers. Secondary antibody for anti-HA was a goat anti-mouse IgG (Southern Biotech #1030-05,) diluted 1:20,000 in PBS-T. Secondary antibody for iMN sera was HRP-conjugated mouse anti-human IgG (Southern Biotech #9200-05) diluted 1:30,000 in PBS-T.

Membranes were washed three times for 5 min in PBS-T after incubation with primary and secondary antibodies. Detection of protein bands was performed with a chemiluminescent substrate (Millipore) and a Fuji LAS3000 imager.

Anti-PLA2R1 ELISA

The anti-PLA2R1 assay was run essentially as described for the standardized and commercially available ELISA²⁹. Pure recombinant human PLA2R1 protein corresponding to the entire extracellular domain was coated to ELISA plates in 20 mM Tris pH 8.0 (100 μ L/well, 1 μ g/mL) at 4°C/overnight. Plates were blocked for 2 h with SeramunBlock (Seramun Diagnostica). Patients' sera were diluted at 1:100 in PBS/0.1% dry milk and added in duplicate (100 μ L per well) to the ELISA plates, which also contained a serial dilution of an iMN standard serum (to convert data in RU/mL) and a quality control calibrator (between plates). After 2 hours of incubation at room temperature on a plate shaker, plates were washed 4 times with PBS/0.02% Tween 20. Anti-human IgG-horseradish peroxidase conjugate (Southern Biotech #9200-05) diluted 1:40,000 in SeramunStab ST plus was added (100 μ L per well) (Seramun Diagnostica) and incubated for 1 h at room temperature on a plate shaker. After four washes, tetramethylbenzidine was added, and the reactions were developed for 15 min and then stopped with HCl 1.2N. The plates were read at 450 nm. Sixty-seven sera from healthy donors were used to defined the normal range, using mean + 3 SD. The cut-off was optimized by receiver operating characteristics (ROC) curve analysis. A highly positive index patient serum was used in each plate to generate a standard curve consisting of five calibrators: 3,000; 1,000; 333; 111; 37 relative units per mL (RU/mL).

Statistical Analyses

For descriptive statistics, data are presented as mean $\pm$ standard deviation (for variables with Gaussian distribution) or median (ranges) (for variables with non Gaussian distribution). We used the Shapiro-Wilk test to determine if a variable has a Gaussian distribution. Qualitative

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

criteria were compared using Chi-square test or Fisher’s exact test according to the terms of use. Quantitative variables were compared using the Student t-test or Wilcoxon-Mann-Whitney test (for variables with non Gaussian distribution) and for multiple comparisons using the ordinary One-way Anova (for variables with Gaussian distribution), Kruskal-Wallis (for variables with non Gaussian distribution) and Turkey’s test (for comparison two by two). A poor prognosis was defined at LOCF as defined by KDIGO by a proteinuria > 4 g/g and or serum creatinine increased over 30% and/or eGFR < 45 ml/min/1.73m². Survival curves for renal survival were calculated using Kaplan-Meier estimates for survival distribution. The endpoint for renal survival analysis was the time where we measured an increase over 30% of serum creatinine from baseline. Differences between groups based on epitope profile were analyzed with the log-rank test. All statistics were performed using Prism6 and SAS 9.3 softwares. P-values < 0.05 were considered as statistically significant.

Acknowledgements

We would like to thank Dr Stéphane Burtey (CHU de Marseille), Dr Cécile Courivaud (CHU de Besançon), Dr Christophe Mariat (CHU de St-Etienne) and Dr Thierry Krummel (CHU de Strasbourg) for recruitment of patients. Supported by grants from CNRS, the French Government (National Research Agency, ANR) through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE: programme reference #ANR-11-LABX-0028-01, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM ING20140129210), and the Centre Hospitalier Universitaire de Nice and the Direction générale de l'offre de soins of the French Ministry of Health (PHRC 2011-A01302-39, NCT01897961) to GL and BSP.

Patients ²	Epitope profiles ¹				p value ³
	All (n=50)	CysR (n=12)	CTLD1 (n=11)	CTLD7 (n=27)	
Age at diagnosis (years)	56±16	48±14	60±16	57±15	ns
Gender (Male/Female)	40/10	10/2	7/4	23/4	ns
Proteinuria on diagnosis (g/g)	5.5 (2-24)	3.8 ⁴ (2-9.4)	8 ⁴ (3-24)	5.5 (2.3-14)	0.04
Serum creatinine at diagnosis (μmol/L)	100 (54-264)	93 (60-134)	90 (43-150)	106 (60-264)	ns
Months between diagnosis and PLA2R1 assay	8 (0-100)	20 (0-36)	12 (0-84)	0 (0-100)	ns
Anti-PLA2R1 titer (RU/mL) ¹	2208 (130-2507)	1496 (130-2352)	2153 (820-2300)	2258 (179-2507)	ns
Proteinuria at PLA2R1 assay (g/g)	3.8 (0.3-27.0)	2.5 ⁴ (0.3-7.8)	6.0 ⁴ (0.8-12.0)	5.5 ⁴ (1.0-12.0)	0.02
Serum creatinine at PLA2R1 assay (μmol/L)	93 (45-600)	92 (45.0-120.0)	109 (43-329)	106 (59-600)	ns
Patients treated before PLA2R1 assay ⁵	6/50 (12%)	3/12 (25%)	2/11 (18%)	1/27 (4%)	ns
Patients treated during follow-up ⁵	31/50 (62%)	5/12 (42%)	7/11 (64%)	19/27 (70%)	ns
LOCF ⁶ (months)	36 (12-216)	36 (12-190)	36 (18-120)	36 (12-216)	ns
Proteinuria at LOCF (g/g)	1.75 (0-20)	0.6 (0.22-4.0)	2.5 (0-20)	2.5 (0.04-14.5)	ns
Serum creatinine at LOCF (μmol/L)	101 (48-540)	85 (60-150)	130 (57-500)	147 (48-540)	ns
Spontaneous remission ⁷	10/50 (20%)	6/12 ⁴ (50%)	2/11 (18%)	2/27 ⁴ (7%)	0.009
Poor prognosis at LOCF ⁸	21/50 (42%)	1/12 ⁴ (8%)	4/11 (36%)	15/27 ⁴ (55%)	0.02
Hemodialysis ⁸	9/50 (18%)	0/12 (0%)	2/11 (17%)	7/27 (26%)	ns

¹ Epitope profile and anti-PLA2R1 ELISA assays were performed on the same serum sample.
² Normal values are mean ± standard deviation; non normal values are median (ranges); qualitative values are number (%).
³ ANOVA or Kruskal-Wallis tests for continuous (for Gaussian or non Gaussian distribution, respectively) variables and Chi-square or Fisher's exact tests for categorical variables. NS : not significant, p value>0.05.
⁴ p value<0.05 between these epitope profiles.
⁵ Treated with immunosuppressive treatment. All patients received symptomatic treatment.
⁶ LOCF: Last Observation Carried Forward.
⁷ Spontaneous remission is defined by remission induced by symptomatic treatment (RAS blockers and diuretics) without immunosuppressive treatment.
⁸ Poor renal prognosis at LOCF is defined by proteinuria>4 g/g and/or serum creatinine increased over 30% and/or eGFR<45 ml/min/1.73m². Patients with ESKD on hemodialysis.

Table 1: Comparison of clinical characteristics and follow-up of patients stratified according to their epitope profiles.

Legend to figures

Figure 1: Design and expression of a series of 9 PLA2R1 deletion mutants and representative epitope profiles of sera from a cohort of 50 iMN patients with anti-PLA2R1 antibodies. (A) Schematic diagram of C-terminally HA-tagged PLA2R1 deletion mutants. Refer to the method section for the precise location of deletions. (B) Validation of expression of HA-tagged human PLA2R1 deletion mutants in HEK293 cells using anti-HA antibody. (C to E) Representative results from the screening of 50 iMN patients, showing three patients exhibiting distinct epitope profiles: 12 iMN patients did not recognize the Δ C mutant missing the N-terminal CysR domain of PLA2R1, indicating the presence of antibodies targeting CysR (C); 11 patients did not recognize the Δ I mutant missing CTLD1, indicating the presence of antibodies targeting CTLD1 (D), 27 patients did not recognize the Δ 7 mutant missing CTLD7, indicating the presence of antibodies targeting CTLD7.

Figure 2: Renal survival is associated with the different epitope profiles CysR, CTLD1 and CTLD7 in the cohort of iMN patients. Survival without renal event is defined by serum creatinine increase over 30% two years after anti-PLA2R1 epitope profile assay. Patients with the anti-CysR epitope profile had a lower incidence of renal events ($p=0.02$).

Figure 3: Evolution of epitope profile during follow-up. The change (or not) in epitope profile during follow-up are shown for 4 representative patients out of 14 patients. (A) Patient 1 was in remission (R, defined by proteinuria <3.5 g/g) over 6 months and had a stable CysR profile. (B) Patient 2 had active disease (A, defined by proteinuria >3.5 g/g) in July 2011 which remained active 3 months later and had a stable CTLD7 profile. Seven more patients had the same pattern (3 with CTLD1 and 5 with CTLD7 profiles). (C) Patient 3 was in remission in November 2011 and relapsed 2 years later with an associated switch in epitope

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

profile from CysR to CTLD7. (D) Patient 4 had active disease but entered into remission three months later and switched the epitope profile from CTLD7 to CysR. Three more patients had the same pattern. Overall, each patient with an epitope profile switch had a change in disease activity while each patient with the same epitope profile during follow-up had no change in disease activity (p=0.0005 using Chi-square test, data not shown).

For Peer Review

References

1. Ponticelli, C, Glassock, RJ: Treatment of membranous nephropathy in patients with renal insufficiency: what regimen to choose? *J Nephrol*, 26: 427-429, 2013.
2. Beck, LH, Jr., Bonegio, RG, Lambeau, G, Beck, DM, Powell, DW, Cummins, TD, Klein, JB, Salant, DJ: M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med*, 361: 11-21, 2009.
3. Qin, W, Beck, LH, Jr., Zeng, C, Chen, Z, Li, S, Zuo, K, Salant, DJ, Liu, Z: Anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 22: 1137-1143, 2011.
4. Oh, YJ, Yang, SH, Kim, DK, Kang, SW, Kim, YS: Autoantibodies against phospholipase A2 receptor in Korean patients with membranous nephropathy. *PloS one*, 8: e62151, 2013.
5. Hofstra, JM, Beck, LH, Jr., Beck, DM, Wetzels, JF, Salant, DJ: Anti-phospholipase A2 receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*, 6: 1286-1291, 2011.
6. Beck, LH, Jr., Fervenza, FC, Beck, DM, Bonegio, RG, Malik, FA, Erickson, SB, Cosio, FG, Cattran, DC, Salant, DJ: Rituximab-induced depletion of anti-PLA2R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 22: 1543-1550, 2011.
7. Hofstra, JM, Debiec, H, Short, CD, Pelle, T, Kleta, R, Mathieson, PW, Ronco, P, Brenchley, PE, Wetzels, JF: Antiphospholipase A2 receptor antibody titer and subclass in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 23: 1735-1743, 2012.
8. Seitz-Polski, B, Payre, C, Ambrosetti, D, Albano, L, Cassuto-Viguier, E, Berguignat, M, Jeribi, A, Thouret, MC, Bernard, G, Benzaken, S, Lambeau, G, Esnault, VL: Prediction of membranous nephropathy recurrence after transplantation by monitoring of anti-PLA2R1 (M-type phospholipase A2 receptor) autoantibodies: a case series of 15 patients. *Nephrol Dial Transplant*, in press, 2014.
9. Kanigicherla, D, Gummadova, J, McKenzie, EA, Roberts, SA, Harris, S, Nikam, M, Poulton, K, McWilliam, L, Short, CD, Venning, M, Brenchley, PE: Anti-PLA2R antibodies measured by ELISA predict long-term outcome in a prevalent population of patients with idiopathic membranous nephropathy. *Kidney Int*, 83: 940-948, 2013.
10. Hoxha, E, Thiele, I, Zahner, G, Panzer, U, Harendza, S, Stahl, RA: Phospholipase A2 receptor autoantibodies and clinical outcome in patients with primary membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 25: 1357-1366, 2014.
11. Remuzzi, G, Chiurciu, C, Abbate, M, Brusegan, V, Bontempelli, M, Ruggenti, P: Rituximab for idiopathic membranous nephropathy. *Lancet*, 360: 923-924, 2002.
12. Hofstra, JM, Fervenza, FC, Wetzels, JF: Treatment of idiopathic membranous nephropathy. *Nat Rev Nephrol*, 9: 443-458, 2013.
13. Radhakrishnan, J, Cattran, DC: The KDIGO practice guideline on glomerulonephritis: reading between the (guide)lines--application to the individual patient. *Kidney Int*, 82: 840-856, 2012.
14. Beck, LH, Jr.: The Dominant Humoral Epitope in Phospholipase A2 Receptor-1: Presentation Matters When Serving Up a Slice of pi. *J Am Soc Nephrol*, 2014.
15. Kao, L, Lam, V, Waldman, M, Glassock, RJ, Zhu, Q: Identification of the Immunodominant Epitope Region in Phospholipase A2 Receptor-Mediating Autoantibody Binding in Idiopathic Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2014.

16. Fresquet, M, Jowitt, TA, Gummadova, J, Collins, R, O'Cualain, R, McKenzie, EA, Lennon, R, Brechley, PE: Identification of a Major Epitope Recognized by PLA2R Autoantibodies in Primary Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2014.
17. Ancian, P, Lambeau, G, Mattéi, MG, Lazdunski, M: The human 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2. Molecular cloning, identification of a secreted soluble form, expression, and chromosomal localization. *J Biol Chem*, 270: 8963-8970, 1995.
18. Coenen, MJ, Hofstra, JM, Debiec, H, Stanescu, HC, Medlar, AJ, Stengel, B, Boland-Auge, A, Groothuisink, JM, Bockenhauer, D, Powis, SH, Mathieson, PW, Brechley, PE, Kleta, R, Wetzels, JF, Ronco, P: Phospholipase A2 receptor (PLA2R1) sequence variants in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 24: 677-683, 2013.
19. Chen, JL, Hu, SY, Jia, XY, Zhao, J, Yang, R, Cui, Z, Zhao, MH: Association of epitope spreading of antiglomerular basement membrane antibodies and kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol*, 8: 51-58, 2013.
20. Li, N, Aoki, V, Hans-Filho, G, Rivitti, EA, Diaz, LA: The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *J Exp Med*, 197: 1501-1510, 2003.
21. van der Woude, D, Rantapaa-Dahlqvist, S, Ioan-Facsinay, A, Onnekink, C, Schwarte, CM, Verpoort, KN, Drijfhout, JW, Huizinga, TW, Toes, RE, Pruijn, GJ: Epitope spreading of the anti-citrullinated protein antibody response occurs before disease onset and is associated with the disease course of early arthritis. *Ann Rheum Dis*, 69: 1554-1561, 2010.
22. McRae, BL, Vanderlugt, CL, Dal Canto, MC, Miller, SD: Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 182: 75-85, 1995.
23. Goebels, N, Hofstetter, H, Schmidt, S, Brunner, C, Wekerle, H, Hohlfeld, R: Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects: epitope spreading versus clonal persistence. *Brain*, 123 Pt 3: 508-518, 2000.
24. Naserke, HE, Ziegler, AG, Lampasona, V, Bonifacio, E: Early development and spreading of autoantibodies to epitopes of IA-2 and their association with progression to type 1 diabetes. *J Immunol*, 161: 6963-6969, 1998.
25. Shah, P, Tramontano, A, Makker, SP: Intramolecular epitope spreading in Heymann nephritis. *J Am Soc Nephrol*, 18: 3060-3066, 2007.
26. Karandikar, NJ, Eagar, TN, Vanderlugt, CL, Bluestone, JA, Miller, SD: CTLA-4 downregulates epitope spreading and mediates remission in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*, 109: 173-180, 2000.
27. Karandikar, NJ, Vanderlugt, CL, Bluestone, JA, Miller, SD: Targeting the B7/CD28:CTLA-4 costimulatory system in CNS autoimmune disease. *Journal of neuroimmunology*, 89: 10-18, 1998.
28. Augert, A, Vindrieux, D, Girard, CA, Le Calve, B, Gras, B, Ferrand, M, Bouchet, BP, Puisieux, A, de Launoit, Y, Simonnet, H, Lambeau, G, Bernard, D: PLA2R1 kills cancer cells by inducing mitochondrial stress. *Free radical biology & medicine*, 65C: 969-977, 2013.
29. Dahnrich, C, Komorowski, L, Probst, C, Seitz-Polski, B, Esnault, V, Wetzels, JF, Hofstra, JM, Hoxha, E, Stahl, RA, Lambeau, G, Stocker, W, Schlumberger, W: Development of a standardized ELISA for the determination of autoantibodies against human M-type phospholipase A2 receptor in primary membranous nephropathy. *Clin Chim Acta*, 421C: 213-218, 2013.

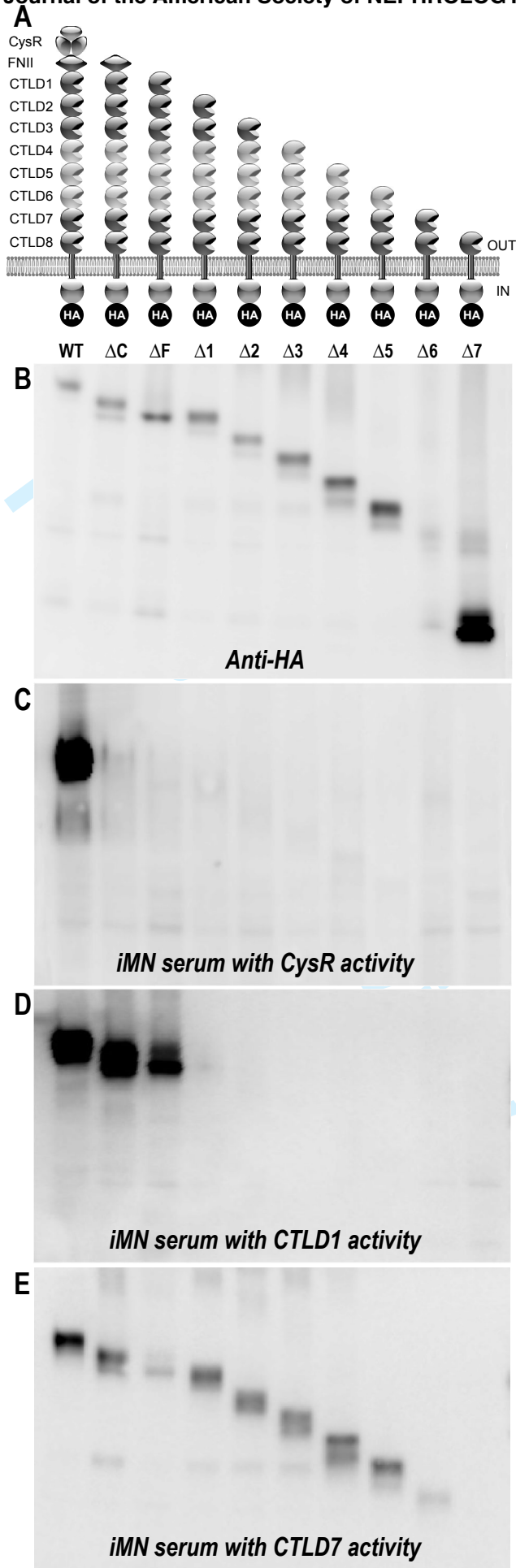


Figure 1

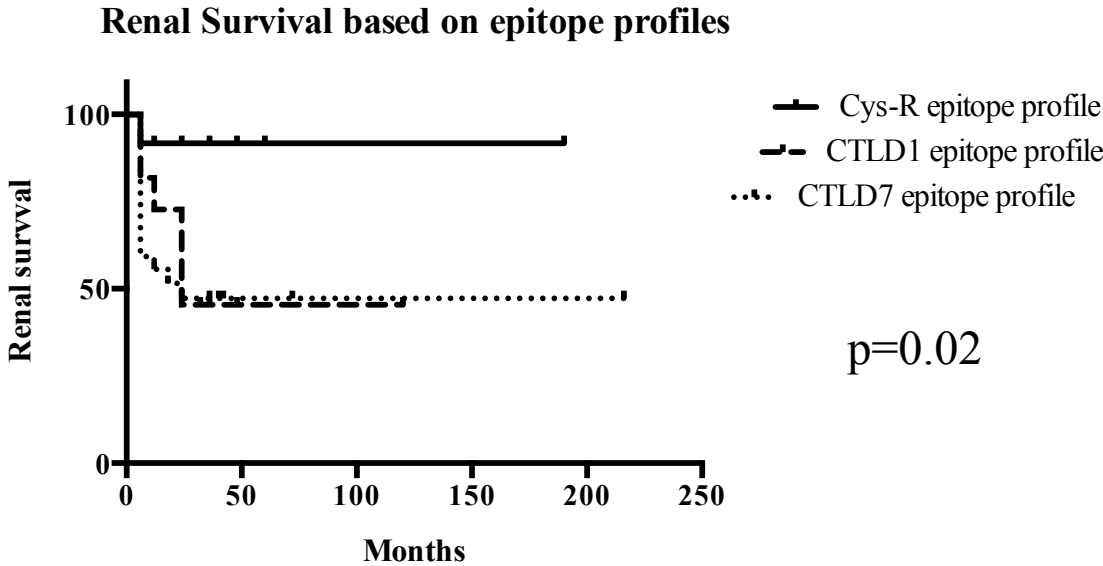


Figure 2

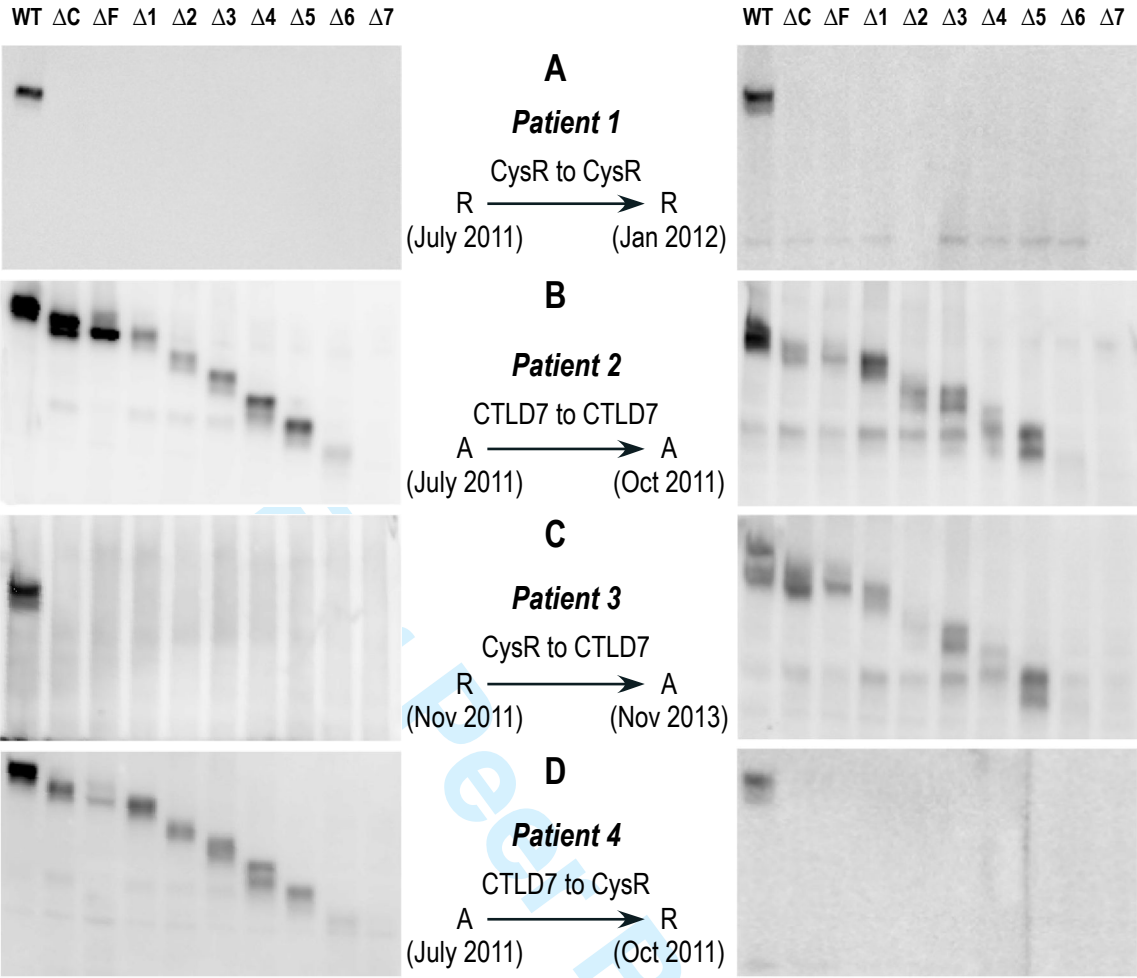


Figure 3

Epitope Spreading in PLA2R1 is Associated with Active Disease and Bad Prognosis in Idiopathic Membranous Nephropathy

Barbara Seitz-Polski^{*,†,‡}, Guillaume Dolla[†], Christine Payré[†], Christophe Girard[†], Kevin Zorzi^{*}, Sylvia Benzaken[‡], Ghislaine Bernard[‡], Vincent L.M. Esnault^{*§} and Gérard Lambeau^{†§}

^{*}Service de Néphrologie, Hôpital Pasteur, Université Nice-Sophia Antipolis, France;

[†]CNRS and Université Nice-Sophia Antipolis, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275, Valbonne Sophia-Antipolis, France;

[‡]Laboratoire d’Immunologie, Hôpital l’Archet, Université Nice-Sophia Antipolis, France;

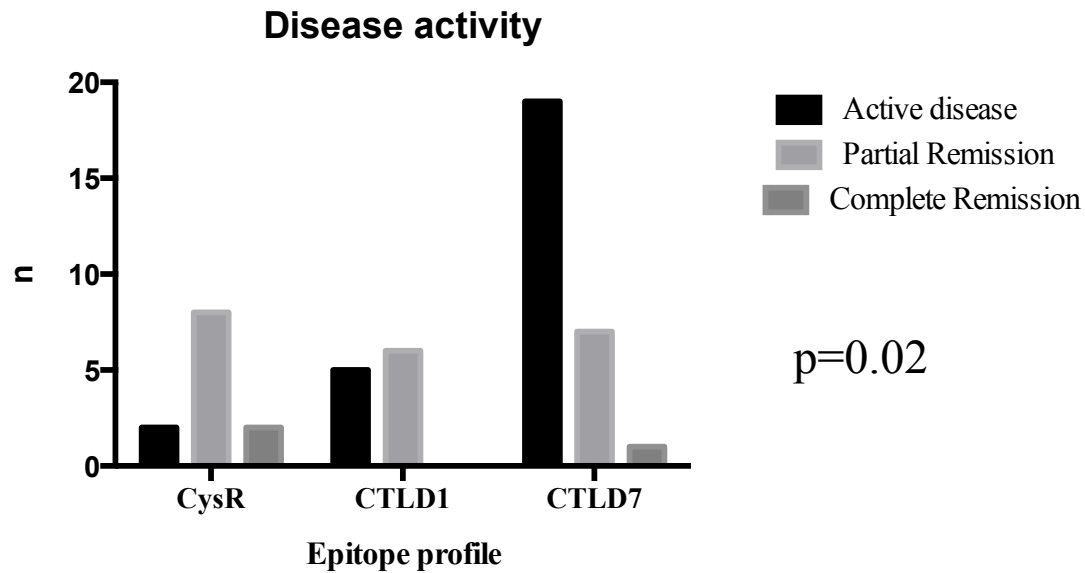
Centre de Recherche Clinique, Hôpital l’Archet, Université Nice-Sophia Antipolis, France;

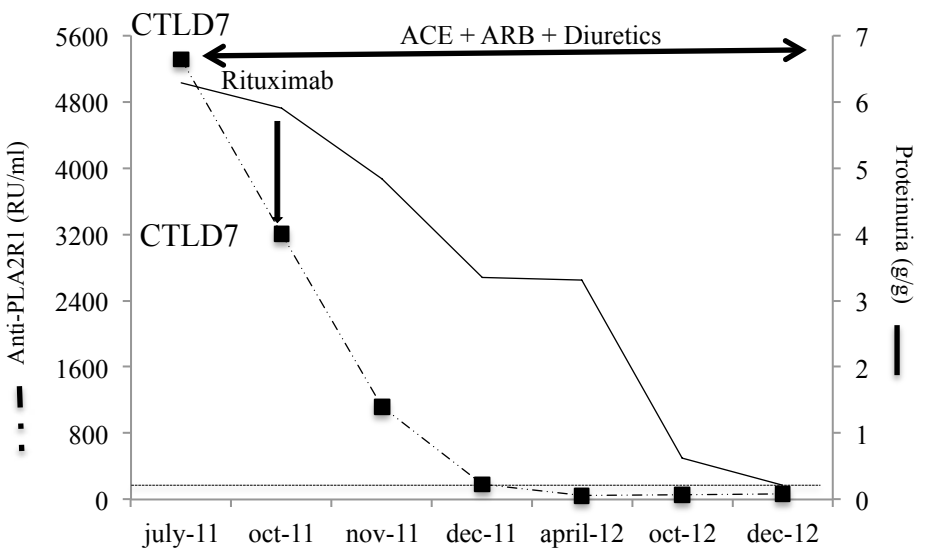
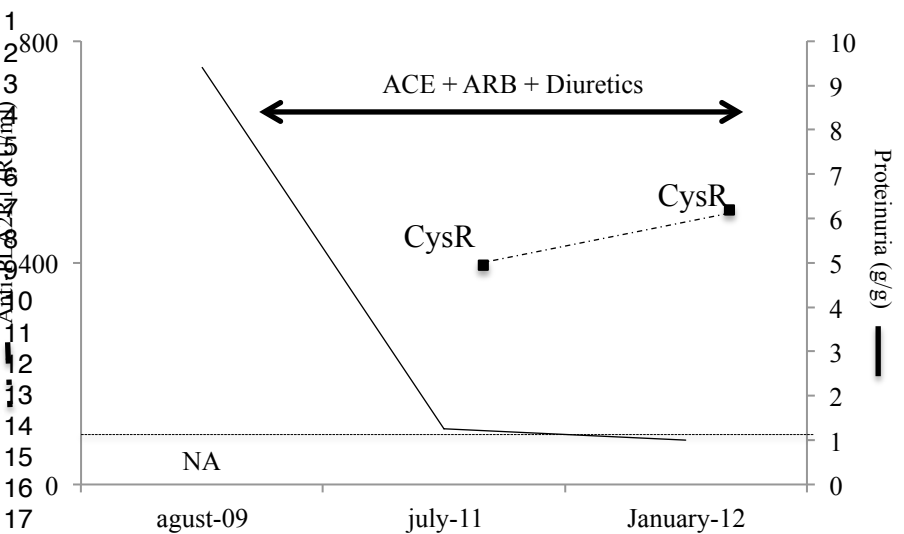
[§]Co-last authors

Legend to supplementary figures

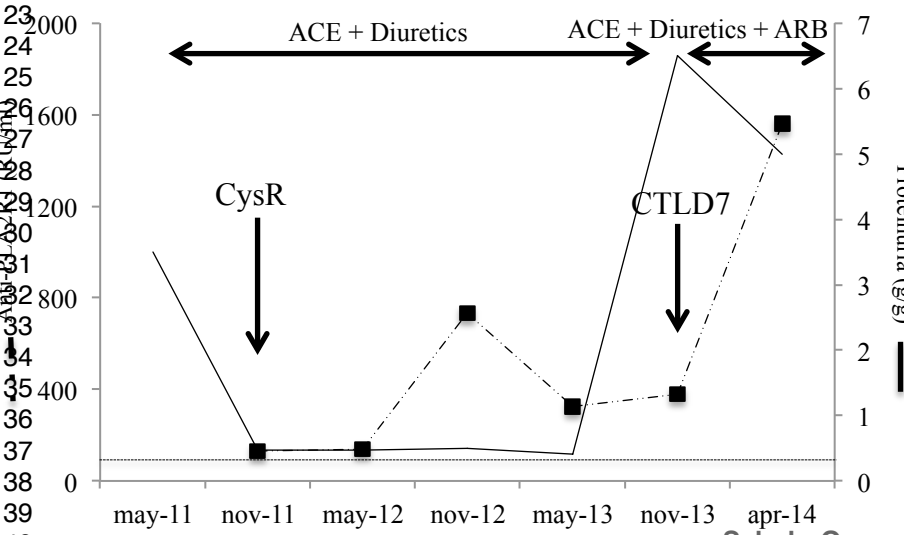
Figure S1: Association between epitope profiles and iMN disease activity in the 50 iMN patients.

Figure S2: Detailed clinical follow-up of the four patients presented in Fig. 3. Proteinuria, anti-PLA2R1 ELISA titer and epitope profile (as shown in Fig. 3) are indicated. (A) Patient 1 had a stable CysR epitope profile with remission under symptomatic treatment. (B) Patient 2 had a stable CTLD7 epitope profile with active disease before remission induced by immunosuppressive treatment (sera were not available during remission). (C) Patient 3 was in remission in November 2011 under symptomatic treatment and relapsed 2 years later with an associated switch in epitope profile from CysR to CTLD7. (D) Patient 4 had active disease but entered into remission after immunosuppressive treatment three months later and switched the epitope profile from CTLD7 to CysR.

**Figure S1**



Patient 3



Patient 4

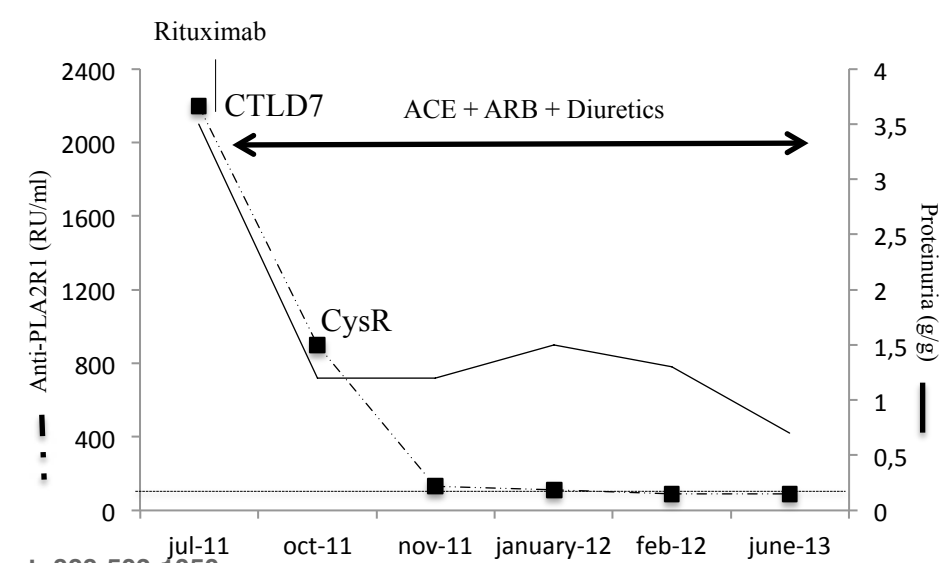


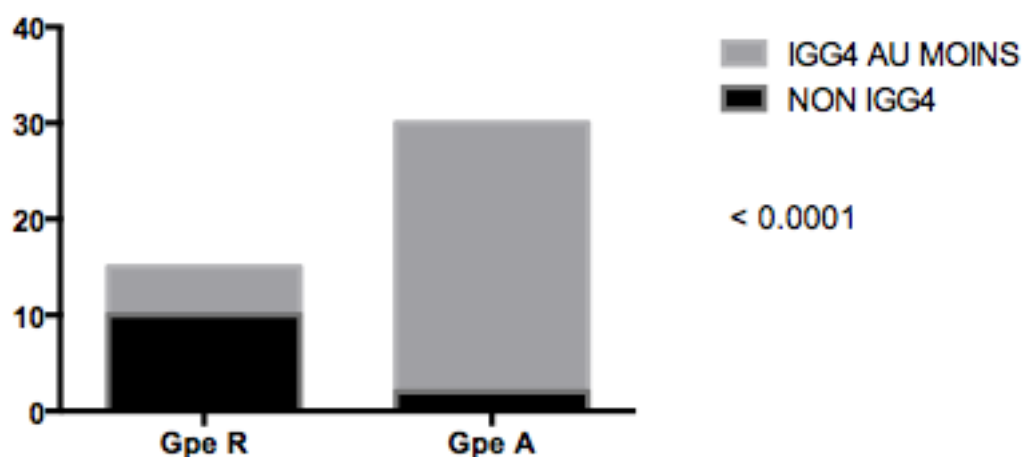
Figure S2

2.5 : Activité et sous-classes d'IgG

Comme nous l'avons vu, plusieurs études ont mis en évidence que les IgG4 anti-PLA2R1 étaient associées à l'activité de la maladie. Huong et al. ont montré sur des biopsies rénales de patients porteurs d'anticorps anti-PLA2R1, qu'à un stade initial de la maladie les IgG1 étaient prédominantes et que dans des stades plus évolués, les IgG4 étaient prédominantes. De plus Hofstra et al. ont montré que les IgG4 spécifiques corrélaient mieux avec la protéinurie que les IgG totales. Les tests commerciaux ne dosent que les IgG totales.

Nous avons souhaité confirmer que les IgG4 sont associées à l'activité de la maladie. Nous avons mis au point 4 tests ELISA dosant spécifiquement les IgG1, 2, 3 et 4 et dosé les anticorps anti-PLA2R1 dans une cohorte de 68 patients porteurs d'une GEM avec anticorps anti-PLA2R1 positifs selon le test d'immunofluorescence indirect. Dans cette cohorte, 32 patients présentaient une maladie active (défini par une protéinurie < 3.5 g/g) et 16 patients étaient en rémission.

Dans le groupe de patients avec une maladie active, 30 patients sur 32 ont des IgG4 positives dirigées contre PLA2R1 alors que dans le groupe de patients en rémission, 10 patients sur 16 n'ont pas d'IgG4 dirigées contre PLA2R1 mais des IgG1 ou des IgG3.



Nous allons maintenant tester quel domaine est reconnu pour chaque sous-classe d'IgG.

2.6. Article 5 : Identification d'une nouvelle cible antigénique dans la GEM idiopathique

En 2010, Beck et al. identifient en western blot le cas d'un patient présentant un cancer de la prostate deux ans avant l'apparition d'un syndrome néphrotique lié à une GEM, présentant des anticorps dirigés contre une protéine d'environ 250 kDa contenue dans un extrait glomérulaire humain qui n'est pas PLA2R1. Ma participation dans ce travail sur l'identification de THSD7A comme nouvelle cible antigénique dans les GEM a été, à partir de cette publication de Beck, d'identifier au sein de notre cohorte le premier patient qui réagit contre une protéine d'environ 250kDa au sein d'un extrait glomérulaire humain. Il s'agit d'un patient co-infecté VIH/VHC avec une charge virale positive pour le VHC.

Après l'identification de ce patient, de nouvelles cohortes ont été testées (Hambourg-Boston) et permettant d'identifier 15 patients GEM capables de reconnaître cette protéine de 250 kDa (Fig.1A). Les premières protéines candidates testées ont été les paralogues de PLA2R1 : le récepteur mannose du macrophage (MRC1), le récepteur Endo-180 (MRC2) et le récepteur des cellules dendritiques (DEC-205, LY75) mais sans succès (Fig. S1).

L'extrait glomérulaire a alors été protéolysé à la trypsine avec et sans N-glycopeptidase F. Les fragments ainsi obtenus ont été analysés en spectrométrie de masse permettant de définir une liste de protéines candidates. Ces protéines candidates ont été sélectionnées en fonction de leur taille et leur présence supposée dans le glomérule dont la Trombospondine de type 1 (THSD7A) qui a pu être identifiée grâce à sa forme recombinante comme étant la cible antigénique de ces anticorps (Fig. 2).

Comme pour PLA2R1 la sous-classe IgG4 est la sous-classe prédominante (Fig.3A). Les anticorps anti-THSD7A reconnaissent un épitope conformationnel puisque la reconnaissance de la molécule est perdue en conditions réductrices (Fig.3B). Le titre d'anticorps semble bien corrélé à l'activité de la maladie (Fig.3C). THSD7A co-localise avec les dépôts d'IgG dans la biopsie rénale de ces patients et les IgG éluées de la biopsie rénale reconnaissent THSD7A (Fig.5). L'expression de THSD7A est augmentée dans les dépôts chez les patients porteurs d'une GEM associée aux anti-THSD7A. Aucun patient testé ne présente les deux types d'anticorps (anti-PLA2R1 et anti-THSD7A) et les caractéristiques cliniques semblent comparables entre les deux groupes.

Au total, 6 patients GEM de la cohorte européenne sur 44 n'ayant pas d'anticorps anti-PLA2R1 ont été identifiés avec des anticorps anti-THSD7A et aucun patient sur les 74 testés avec anticorps anti-PLA2R1. Sur la cohorte américaine : 9 patients GEM sur 110 testés sans

anticorps anti-PLA2R1 ont des anticorps anti-THSD7A et aucun sur les 255 patients testés avec des anticorps anti-PLA2R1 (Fig.1B et C). Soit entre 2 et 5% des GEM ont des anticorps anti-THSD7A. (Tomas et al. NEJM accepté)

Comme pour PLA2R1, nous devons maintenant corréler l'activité de la maladie au titre d'anticorps anti-THSD7A pour cela nous avons mis au point un test ELISA qui pourra nous permettre un suivi quantitatif de ces patients et la recherche de nouveaux patients au sein de différentes cohortes.

ORIGINAL ARTICLE

Thrombospondin Type-1 Domain-Containing 7A in Idiopathic Membranous Nephropathy

Nicola M. Tomas, M.D., Laurence H. Beck, Jr., M.D., Ph.D.,
Catherine Meyer-Schwesinger, M.D., Barbara Seitz-Polski, M.D., Hong Ma, Ph.D.,
Gunther Zahner, Ph.D., Guillaume Dolla, M.S., Elion Hoxha, M.D.,
Udo Helmchen, M.D., Anne-Sophie Dabert-Gay, Ph.D., Delphine Debayle, Ph.D.,
Michael Merchant, Ph.D., Jon Klein, M.D., Ph.D., David J. Salant, M.D.,
Rolf A.K. Stahl, M.D., and Gérard Lambeau, Ph.D.

ABSTRACT

BACKGROUND

Idiopathic membranous nephropathy is an autoimmune disease. In approximately 70% of patients, it is associated with autoantibodies against the phospholipase A2 receptor 1 (PLA2R1). Antigenic targets in the remaining patients are unknown.

METHODS

Using Western blotting, we screened serum samples from patients with idiopathic membranous nephropathy, patients with other glomerular diseases, and healthy controls for antibodies against human native glomerular proteins. We partially purified a putative new antigen, identified this protein by means of mass spectrometry of digested peptides, and validated the results by analysis of recombinant protein expression, immunoprecipitation, and immunohistochemical analysis.

RESULTS

Serum samples from 6 of 44 patients in a European cohort and 9 of 110 patients in a Boston cohort with anti-PLA2R1-negative idiopathic membranous nephropathy recognized a glomerular protein that was 250 kD in size. None of the serum samples from the 74 patients with idiopathic membranous nephropathy who were seropositive for anti-PLA2R1 antibodies, from the 76 patients with other glomerular diseases, and from the 44 healthy controls reacted against this antigen. Although this newly identified antigen is clearly different from PLA2R1, it shares some biochemical features, such as N-glycosylation, membranous location, and reactivity with serum only under nonreducing conditions. Mass spectrometry identified this antigen as thrombospondin type-1 domain-containing 7A (THSD7A). All reactive serum samples recognized recombinant THSD7A and immunoprecipitated THSD7A from glomerular lysates. Moreover, immunohistochemical analyses of biopsy samples from patients revealed localization of THSD7A to podocytes, and IgG eluted from one of these samples was specific for THSD7A.

CONCLUSIONS

In our cohort, 15 of 154 patients with idiopathic membranous nephropathy had circulating autoantibodies to THSD7A but not to PLA2R1, a finding that suggests a distinct subgroup of patients with this condition. (Funded by the French National Center for Scientific Research and others.)

From Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR7275, Centre National de la Recherche Scientifique and Université de Nice Sophia Antipolis, Valbonne, France (N.M.T., B.S.-P., G.D., A.-S.D.-G., D.D., G.L.); University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany (N.M.T., C.M.-S., G.Z., E.H., U.H., R.A.K.S.); Boston University School of Medicine, Boston (L.H.B., H.M., D.J.S.); and the University of Louisville (M.M., J.K.) and Robley Rex Veterans Affairs Medical Center (J.K.) — both in Louisville, KY. Address reprint requests to Dr. Lambeau at Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275, Centre National de la Recherche Scientifique—Université de Nice Sophia Antipolis, 660 rte des Lucioles, Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France, or at lambeau@ipmc.cnrs.fr.

Drs. Tomas and Beck contributed equally to this article.

This article was published on November 13, 2014, at NEJM.org.

DOI: 10.1056/NEJMoa1409354

Copyright © 2014 Massachusetts Medical Society.

IDIOPATHIC MEMBRANOUS NEPHROPATHY is an autoimmune disease and a common cause of the nephrotic syndrome in adults.¹ In 2009, the phospholipase A2 receptor 1 (PLA2R1), a protein that is expressed in glomerular podocytes, was discovered as the major antigen involved in the pathogenesis of adult idiopathic membranous nephropathy.² As confirmed by a number of subsequent studies, about 70% of patients with idiopathic membranous nephropathy have circulating autoantibodies against PLA2R1.²⁻⁶ The remaining patients, approximately 30% of those with idiopathic membranous nephropathy, have no obvious secondary cause of the disease, and it is thought that other endogenous glomerular antigens may be involved in these cases.

In the current study, we analyzed serum samples from patients with idiopathic membranous nephropathy as well as samples from patients with other glomerular diseases and healthy controls, to identify circulating antibodies against glomerular antigens other than PLA2R1.

METHODS

PATIENTS

A diagnosis of membranous nephropathy was made by means of a renal biopsy. Serum samples were obtained from patients with membranous nephropathy and from patients with other glomerular diseases and healthy controls and were examined for anti-PLA2R1 antibodies with the use of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)⁷ and Western blot analysis.² All study participants gave written informed consent, and the study was conducted in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki. A detailed description of the cohorts and the patient characteristics is provided in the Supplementary Appendix, available with the full text of this article at NEJM.org.

HUMAN RENAL TISSUE

Healthy portions of nephrectomized kidneys and kidney cortex from human donor kidneys that had been deemed unsuitable for transplantation were used to prepare a protein extract of glomeruli. Additional details can be found in the Methods section in the Supplementary Appendix.

WESTERN BLOT ANALYSIS

Gel electrophoresis and protein transfer to polyvinylidene difluoride membranes were performed

according to standard protocols. For use as the primary antibody, the serum was diluted at a 1:100 ratio. For specific detection of THSD7A, we used a commercially available rabbit polyclonal antibody at a 1:1000 dilution (Atlas Antibodies).

IMMUNOPRECIPITATION

Human glomerular extracts were incubated overnight with serum samples from patients with membranous nephropathy, from patients with other glomerular diseases, and from healthy controls, and IgG4 affinity matrix (Life Technologies) was added. Immunoprecipitates were collected, electrophoresed, blotted, and examined for the presence of THSD7A protein with the use of anti-THSD7A antibodies (Atlas Antibodies) as described above.

MASS SPECTROMETRY

Gel regions corresponding to visible bands on Western blots were excised and subjected to in-gel tryptic digestion. Digested peptides were identified by mass spectrometry as described in the Supplementary Appendix.

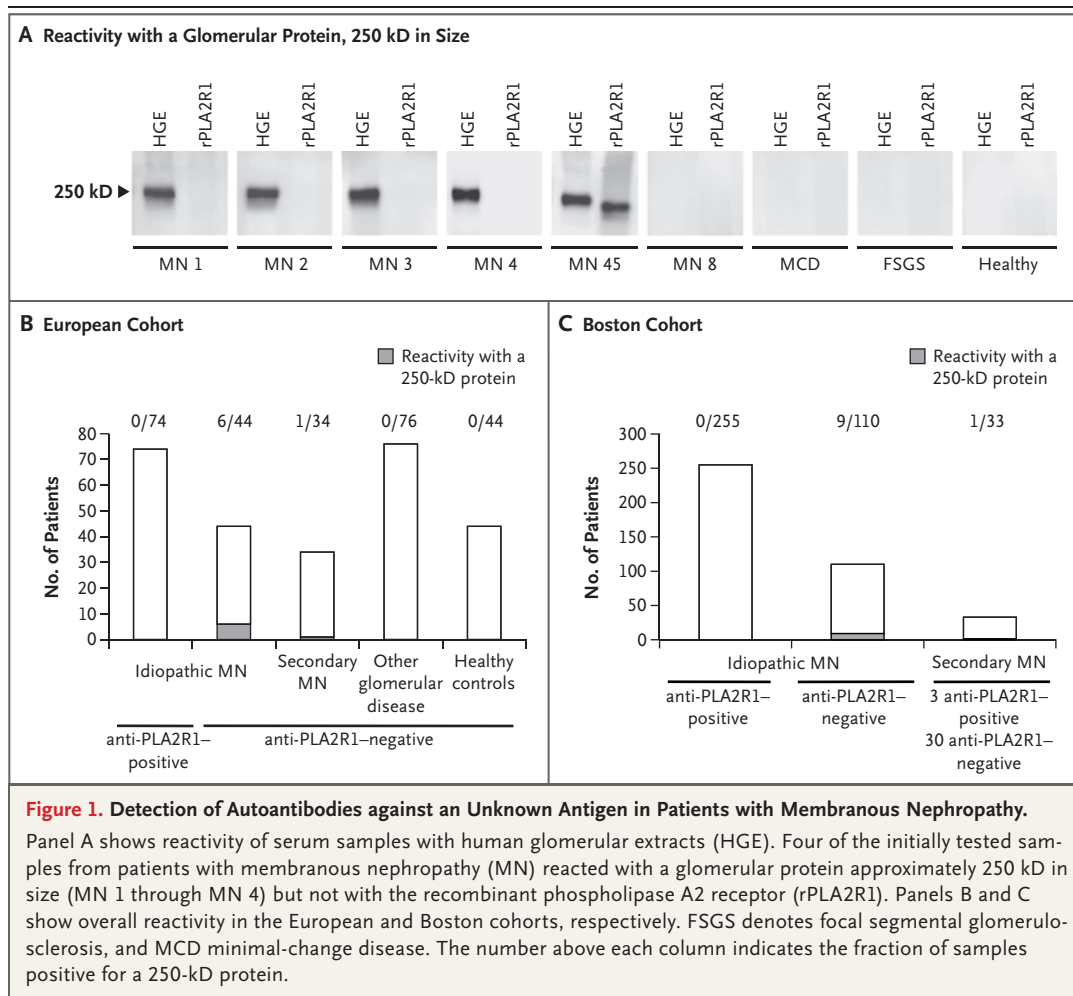
HISTOLOGIC ANALYSIS AND AUTOANTIBODY ELUTION

Immunofluorescence and immunohistochemical analyses of THSD7A expression in healthy and diseased kidneys and autoantibody elution experiments were performed as described in the Supplementary Appendix.

RESULTS

SCREENING OF SERUM SAMPLES WITH A HUMAN GLOMERULAR PROTEIN EXTRACT

We screened serum samples from patients with membranous nephropathy and relevant controls against total proteins in human glomerular extracts. Serum reactivity was initially investigated by Western blotting under nonreducing conditions in serum from 65 patients with membranous nephropathy (of whom 30 were negative for anti-PLA2R1 antibodies), 76 patients with other proteinuric or autoimmune kidney diseases, and 44 healthy controls. All samples that were known to be positive for anti-PLA2R1 antibodies, as tested previously by ELISA, reacted with native and recombinant PLA2R1 by means of Western blotting (MN 45 in Fig. 1A). Samples from 4 patients with idiopathic membranous nephropathy, all of whom were seronegative for anti-PLA2R1 antibodies,



recognized a glomerular protein approximately 250 kD in size (MN 1 to MN 4 in Fig. 1A). Samples from patients with other glomerular diseases or from healthy controls did not show similar reactivity (Fig. 1A, and Fig. S1 in the Supplementary Appendix). Screening was extended to 152 patients with membranous nephropathy (118 with idiopathic and 34 with secondary membranous nephropathy) (Table S1 in the Supplementary Appendix). A total of 7 serum samples, all of which were negative for anti-PLA2R1 antibodies, showed reactivity in the same 250-kD region (Fig. 1B).

In an independent cohort at Boston University comprising 365 patients with idiopathic membranous nephropathy and 33 with secondary membranous nephropathy (Table S2 in the Supplementary Appendix), 10 additional patients who were seronegative for anti-PLA2R1 antibodies, as determined by Western blot analysis and ELISA, were identified; serum samples from these 10 patients showed similar reactivity to a 250-kD pro-

tein present in human glomeruli (Fig. 1C, and Table S3 in the Supplementary Appendix).

The screening thus identified a putative autoantigen of 250 kD that was present in normal human glomeruli. This protein was found to be N-glycosylated to a lesser extent than PLA2R1 and was expressed almost exclusively in cell membranes, suggesting that it was an as-yet unknown antigen that was different from PLA2R1 (Fig. S2 in the Supplementary Appendix). We also screened the serum from patients with idiopathic membranous nephropathy against the three paralogs of PLA2R1 (MRC1, MRC2, and LY75),⁸ but we did not observe any reactivity (Fig. S3 and S4 in the Supplementary Appendix).

IDENTIFICATION OF THE ANTIGEN AS THROMBOSPONDIN TYPE-1 DOMAIN-CONTAINING 7A

We used two independent strategies to identify the antigen. In the first, we performed gel electrophoresis and Western blot analysis of glomerular

proteins, either untreated or treated with N-glycopeptidase F alone or with both N-glycopeptidase F and neuraminidase; these analyses revealed three different bands — at 250 kD, at 225 kD, and at 200 kD (Fig. S2B in the Supplementary Appendix). In the second strategy, glomerular proteins were partially proteolyzed with trypsin, with and without prior treatment with N-glycopeptidase F. All gel regions corresponding to the Western blot signals were excised and analyzed by mass spectrometry, and a list of candidate protein antigens was generated (Table S4 in the Supplementary Appendix). Candidate proteins were ranked according to the expected characteristics of the newly identified antigen with respect to molecular mass, N-glycosylation, membrane location, and expression in human kidney or glomeruli. We used commercially available antibodies and transiently transfected human embryonic kidney (HEK) 293 cells to specifically test for candidate antigens (data not shown) and finally identified thrombospondin type-1 domain-containing 7A (THSD7A) as the protein of interest.

All 17 serum samples previously shown to be reactive with the 250-kD protein (7 samples from the European cohort and 10 from the Boston cohort) — but none of the samples that were positive for anti-PLA2R1 antibodies or the control samples — also recognized recombinant THSD7A (Fig. 2A). Native and recombinant THSD7A proteins showed the same mass shift after deglycosylation, yet the recombinant protein migrated to a slightly lower position, suggesting a minor difference in post-translational modification (Fig. 2A, and Fig. S5 in the Supplementary Appendix). All reactive serum samples, but not control samples, were able to immunoprecipitate THSD7A from glomerular lysates (Fig. 2B). THSD7A is a 250-kD type I transmembrane protein with a large extracellular region, a single transmembrane domain, and a short intracellular tail. The extracellular part contains 11 thrombospondin type-1 repeats and 1 arginine–glycine–aspartic acid (RGD) motif (Fig. 2C).⁹

CHARACTERIZATION OF ANTI-THSD7A AUTOANTIBODIES

To determine the IgG subtypes of anti-THSD7A autoantibodies, we used secondary antibodies against IgG1 to IgG4. IgG4 was the predominant IgG subclass of anti-THSD7A, although other IgG subtypes were weakly present in most serum samples (Fig. 3A). This finding was in accordance

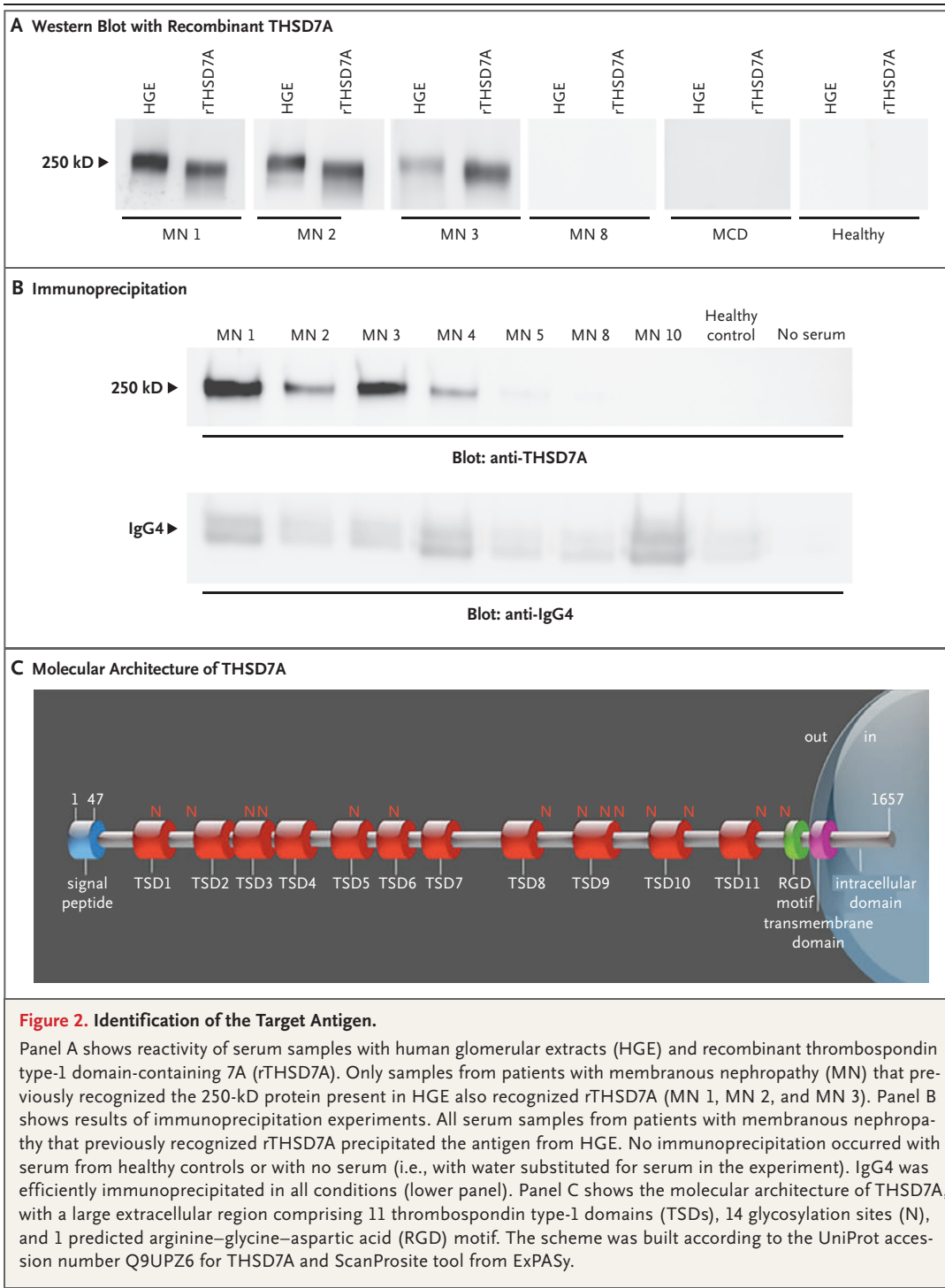
with enhanced staining for IgG4 in all available biopsy samples (data not shown). Moreover, reactivity of all the positive serum samples to both the 250-kD glomerular protein and recombinant THSD7A was lost when gels were run under reducing conditions (Fig. 3B). Thus, the subtype of most anti-THSD7A autoantibodies, like that of most anti-PLA2R1 autoantibodies, is IgG4, and the anti-THSD7A autoantibodies recognize one or more conformation-dependent epitopes in both native and recombinant THSD7A.

ANTI-THSD7A AUTOANTIBODIES AND DISEASE ACTIVITY

Serial serum samples from three patients who were positive for anti-THSD7A antibodies were available for analysis of antibody levels by semi-quantitative Western blot analysis. In one patient, protein levels in the urine were very high at the time of diagnosis; they were decreased with pharmacologic inhibition of the renin–angiotensin system 3 months later but were still in the nephrotic range (Fig. 3C). The protein levels increased 4 months later, and the proteinuria was accompanied by a marked increase in antibody signal. Owing to the development of severe edema, immunosuppressive therapy was started with cyclosporine and low-dose prednisone, which resulted in a decrease in the anti-THSD7A antibody level and in the level of protein in the urine to the subnephrotic range. A second patient had severe proteinuria and was treated with corticotropin analogues, resulting in a decline in the anti-THSD7A antibody level and in the level of protein in the urine (data not shown). In contrast, in a third patient who did not receive immunosuppressive therapy owing to minor clinical problems, the antibody level remained consistently high with sustained proteinuria in the nephrotic range (data not shown). Taken together, these results suggest an association between the antibody level and clinical disease activity.

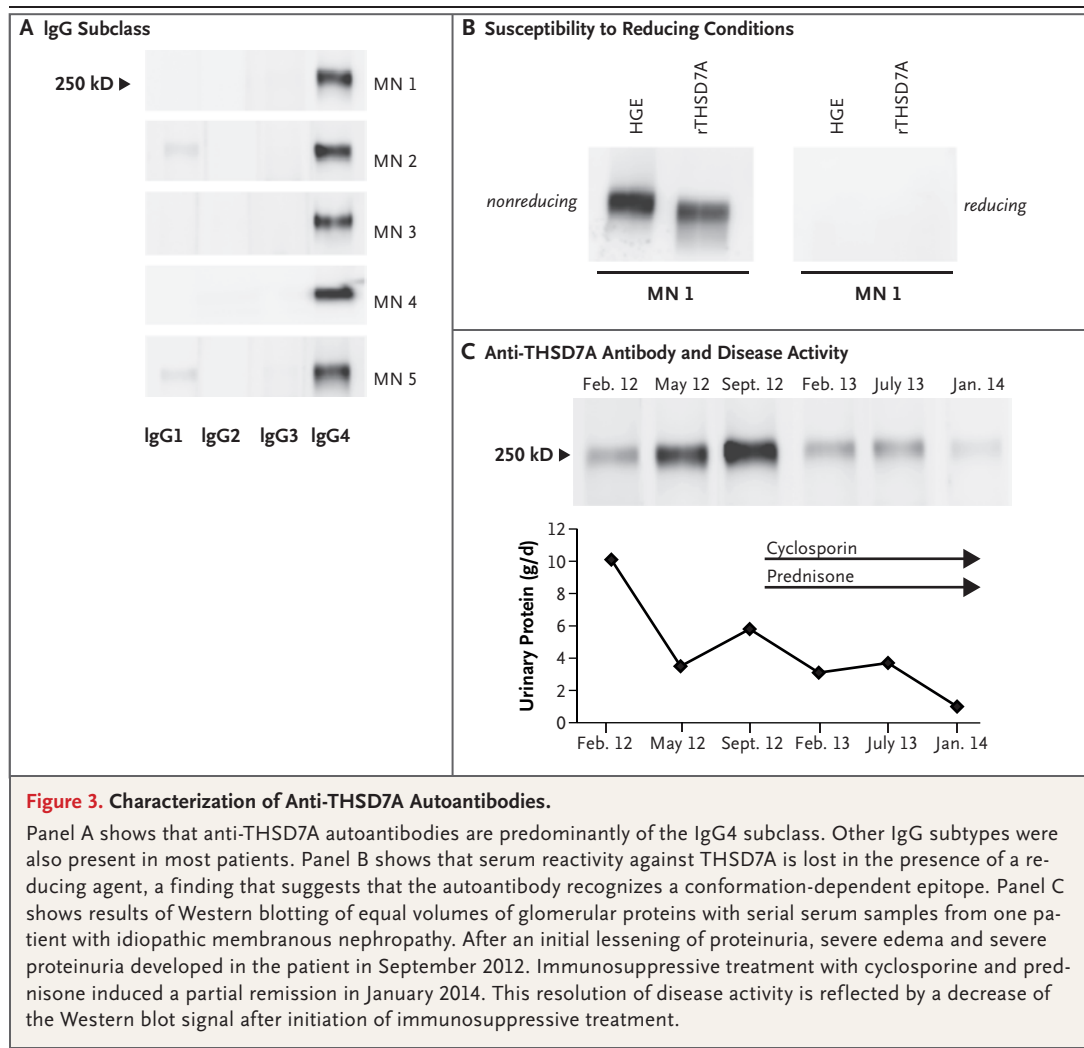
GLOMERULAR THSD7A EXPRESSION IN PATIENTS WITH MEMBRANOUS NEPHROPATHY AND CONTROLS

Immunofluorescence staining of renal-biopsy samples from healthy controls with anti-THSD7A-specific antibodies showed prominent linear glomerular expression of THSD7A (Fig. 4A and 4D). There was no staining when the primary antibody was omitted (data not shown). The staining pattern for nephrin, a transmembrane protein lo-



cated at the intercellular slit diaphragm of podocyte foot processes, was very similar to that of THSD7A (Fig. 4B and 4E). Moreover, both molecules showed strong colocalization, suggesting that THSD7A is located on or within close prox-

imity of podocyte foot processes (Fig. 4C and 4F, and Fig. S6 in the Supplementary Appendix). On the other hand, THSD7A did not colocalize with markers of the glomerular basement membrane, such as collagen type IV (Fig. 4I, and Fig. S6 in the

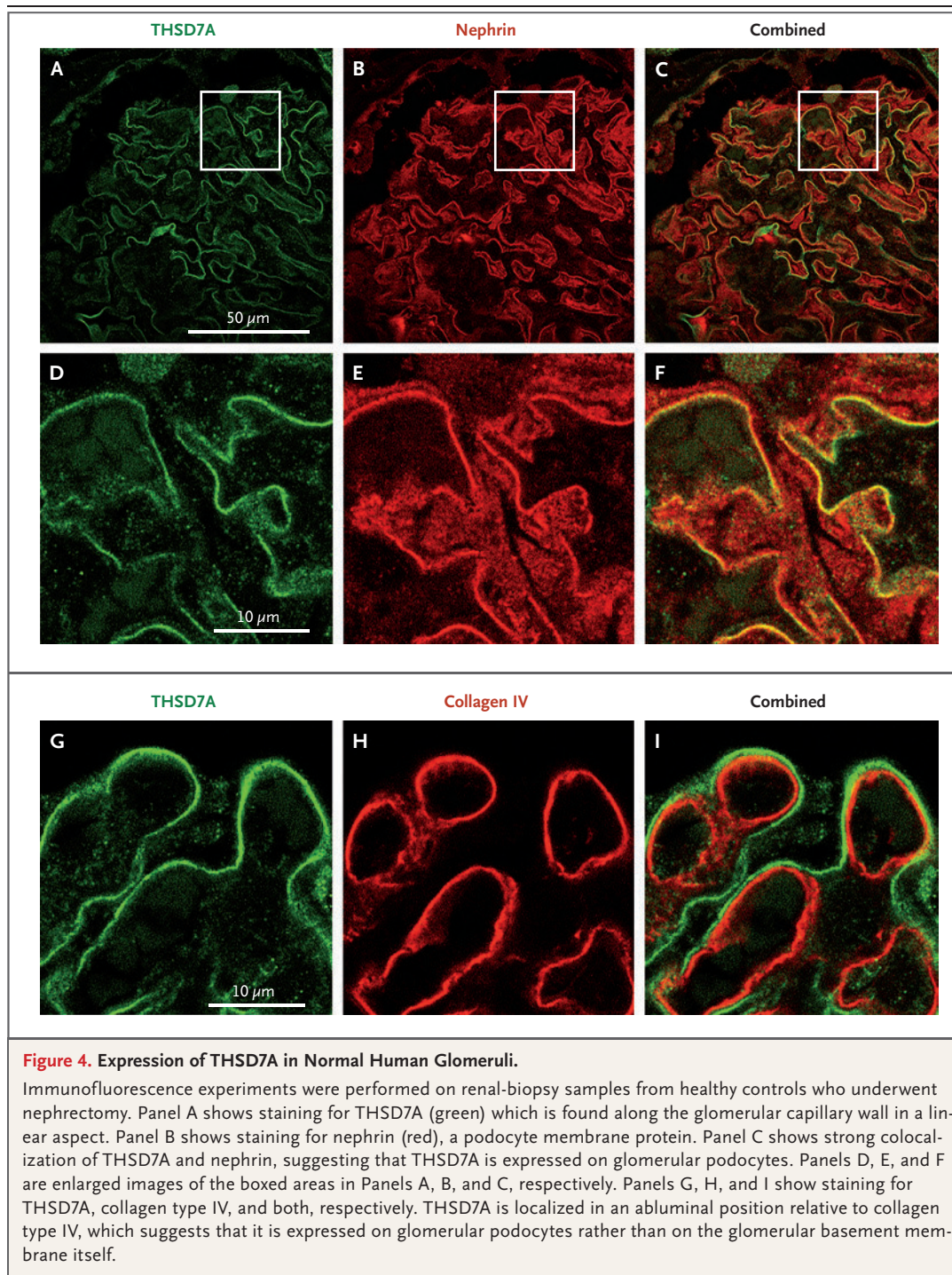


Supplementary Appendix) and fibronectin (Fig. S7 in the Supplementary Appendix), or with CD34, a marker of endothelial cells (Fig. S8 in the Supplementary Appendix). The abluminal position of THSD7A relative to collagen type IV and fibronectin suggests that THSD7A is expressed on podocyte foot processes rather than on the glomerular basement membrane.

Immunohistochemical staining of THSD7A further revealed a linear positivity in the biopsy samples from healthy controls (Fig. 5A); PLA2R1 is less well expressed than is THSD7A (Fig. 5B). In all 5 available biopsy samples from patients with membranous nephropathy who were positive for anti-THSD7A antibodies, immunohistochemical analysis revealed markedly enhanced granular staining for THSD7A (Fig. 5C); PLA2R1 staining was normal in these patients (Fig. 5D).

In contrast, all patients with detectable anti-PLA2R1 serum antibodies had normal staining for THSD7A along the capillary walls (Fig. 5E) but enhanced granular staining for PLA2R1 (Fig. 5F), as described previously.¹⁰⁻¹² Three of these patients had scant and unspecific positivity for THSD7A within proteinaceous material in the capsular space of a few glomeruli (data not shown). All 50 biopsy samples from patients with membranous nephropathy and no detectable autoantibodies had normal staining for both THSD7A and PLA2R1 (Fig. 5G and 5H).

The PLA2R1 antigen is known to colocalize with IgG4 in subepithelial deposits in patients with PLA2R1-associated idiopathic membranous nephropathy.² Similarly, we found colocalization of IgG4 and THSD7A in biopsy samples from THSD7A-seropositive patients (Fig. S9 in the



Supplementary Appendix). Moreover, we found local activation of complement, as shown by strong granular staining for C5b-9 (Fig. S10 in the Supplementary Appendix).

Despite the apparent expression of the target antigen on the basal surface of the podocyte, we

also looked for a circulating soluble form of the antigen, as well as THSD7A-containing circulating immune complexes that might be deposited in a similar subepithelial position. We were not able to identify either a circulating soluble form of THSD7A or THSD7A-anti-THSD7A immune

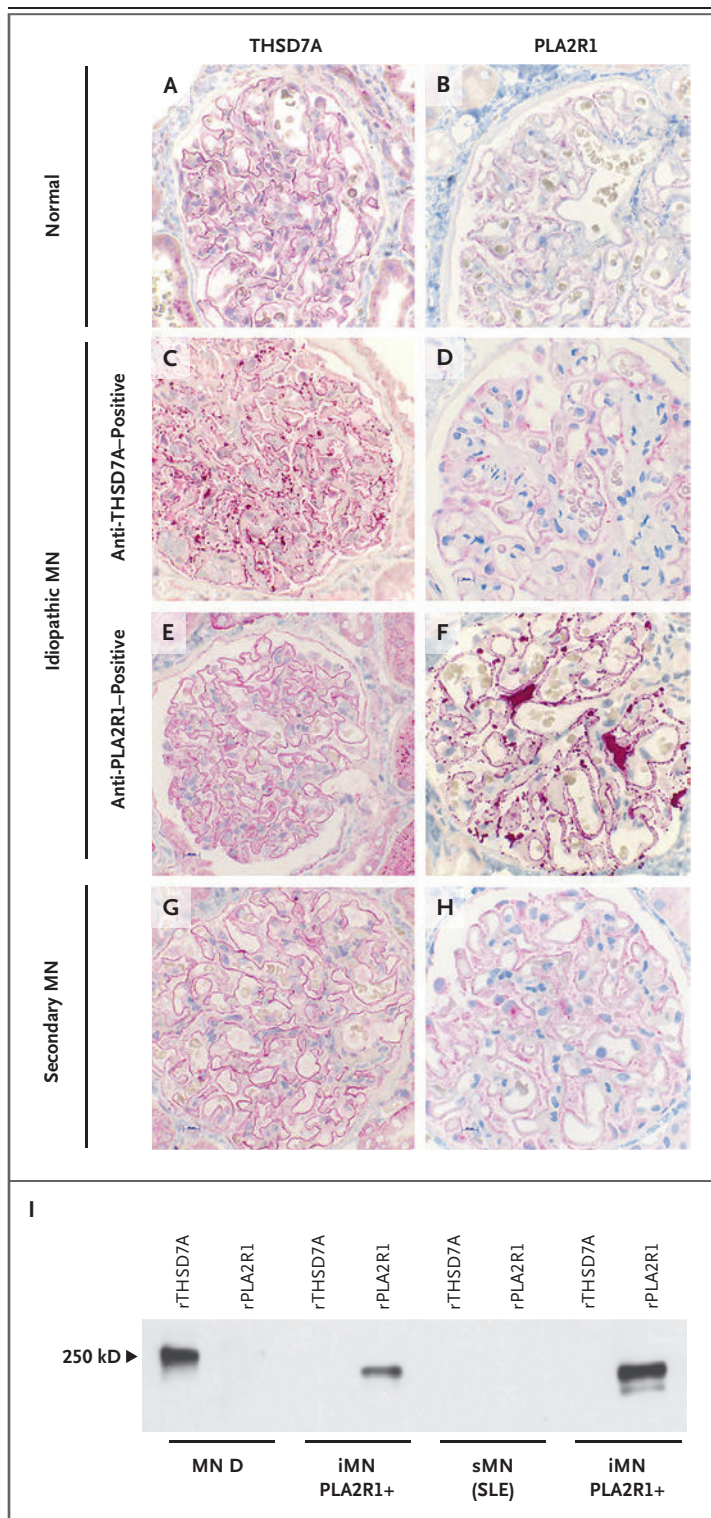


Figure 5. Expression Level of THSD7A and PLA2R1 in Patients with Idiopathic and Secondary Membranous Nephropathy and in a Healthy Control.

Immunohistochemical staining for THSD7A and PLA2R1 was performed in renal-biopsy specimens from healthy controls and from patients with membranous nephropathy. Panels A and B show normal staining for THSD7A and PLA2R1, respectively, in a control biopsy specimen. Panel C shows markedly enhanced staining for THSD7A in a patient with serum anti-THSD7A antibodies, whereas PLA2R1 staining, as shown in Panel D, is normal. Conversely, the biopsy specimen from a patient with serum anti-PLA2R1 antibodies shows that staining for THSD7A was not increased, as shown in Panel E, but staining for PLA2R1 was increased, as shown in Panel F. The biopsy specimen from a patient with secondary membranous nephropathy (sMN) due to systemic lupus erythematosus (SLE) and no detectable serum antibodies against THSD7A or PLA2R1 has normal staining for both antigens, as seen in Panels G and H. Panel I shows the reactivity of IgG eluted from patient biopsy samples with recombinant THSD7A and PLA2R1. Only the IgG eluted from the biopsy sample from a patient with idiopathic membranous nephropathy (iMN) and detectable serum anti-THSD7A antibodies recognized THSD7A (MN D; see also Table S3 in the Supplementary Appendix). The eluates from two biopsy samples from patients with idiopathic membranous nephropathy and serum anti-PLA2R1 autoantibodies recognized PLA2R1 but not THSD7A. IgG eluted from one patient with lupus membranous nephropathy and no detectable serum antibodies against THSD7A or PLA2R1 recognized neither antigen.

core from one patient with anti-THSD7A antibodies specifically recognized recombinant THSD7A on a Western blot, whereas IgG eluted from two PLA2R1-associated cases did not recognize THSD7A but specifically recognized PLA2R1 (Fig. 5I). IgG eluted from a biopsy sample from a patient with class V lupus nephritis recognized neither antigen.

CHARACTERISTICS OF PATIENTS POSITIVE FOR ANTI-THSD7A OR ANTI-PLA2R1 AUTOANTIBODIES

Given the apparent mutual exclusivity of anti-THSD7A and anti-PLA2R1 autoantibodies, we compared the clinical characteristics of the patients with each type of autoantibody. We could not find any significant difference between the two groups with respect to age; levels of urinary protein, serum albumin, and serum creatinine; or status with respect to the receipt of immunosuppressive therapy in the first 6 months after diagnosis (Table S5 and Fig. S12 in the Supplementary Appendix). However, there were significantly more women in the group that was posi-

complexes (Fig. S11 in the Supplementary Appendix).

IgG eluted from the frozen remnant biopsy

tive for anti-THSD7A autoantibodies (65% vs. 27%), a finding that might also represent a sampling error owing to the small number of patients.

DISCUSSION

In the current study, we identified THSD7A as a second autoantigen involved in adult idiopathic membranous nephropathy. Approximately 2.5 to 5% of the patients with idiopathic membranous nephropathy whom we evaluated had autoantibodies against THSD7A, which corresponds to 8 to 14% of the patients who are seronegative for anti-PLA2R1 antibodies. The percentage of patients with anti-THSD7A autoantibodies was higher in the European cohort, which comprised patients who had received no treatment for membranous nephropathy and from whom serum samples were obtained close to the time of the biopsy, than in the Boston cohort, which was more cross-sectional in nature and may have included patients who were already in immunologic remission.

We also found anti-THSD7A antibodies in one woman with membranous nephropathy and systemic lupus erythematosus and in one older man with membranous nephropathy and prostate cancer.¹³ However, the renal-biopsy samples from these patients showed no features typical of lupus nephritis or secondary membranous nephropathy; in addition, their anti-THSD7A serum antibodies were mainly of the IgG4 subclass, and the renal-biopsy samples showed enhanced staining for IgG4, a finding that is similar to that in all other anti-THSD7A-positive patients and that is a feature of idiopathic rather than secondary membranous nephropathy.^{10,11} It is thus possible that these patients have two independent diseases, idiopathic membranous nephropathy and lupus or cancer. Furthermore, we could not find any reactivity against THSD7A among healthy controls and among patients with other proteinuric or renal autoimmune diseases. However, a number of patients were seronegative for both antigens. Anti-PLA2R1 autoantibodies are known to disappear before the full clinical resolution of disease activity,^{6,14} and our finding that anti-THSD7A antibody levels also fell with a decrease in disease activity suggests that the same may be true for THSD7A-associated membranous nephropathy. Staining of the biopsy specimen for the presence of the antigen (THSD7A or PLA2R1) may identify a small additional percentage of

patients whose serum was sampled after immunologic remission had occurred.^{12,15} Taken together, THSD7A- and PLA2R1-associated membranous nephropathy may now account for approximately 75 to 85% of cases, which further helps to distinguish idiopathic from secondary membranous nephropathy. The remaining 15 to 25% of cases may involve as-yet unidentified autoantigens that are distinct from THSD7A and PLA2R1 or may have been wrongly classified as idiopathic owing to an undetected secondary cause of the disease.

THSD7A was initially characterized as an endothelial protein that is expressed in the placental vasculature.⁹ We have shown by immunohistologic analysis that THSD7A is concentrated at the basal aspect of the podocyte, and we did not find any expression in glomerular endothelial cells. This finding is consistent with recent data showing that THSD7A is more highly expressed in podocytes than in glomerular endothelial and mesangial cells.¹⁶ On the basis of these experimental data, our current immunohistologic findings, and previous data from patients with other forms of human membranous nephropathy,^{2,17} we believe that the likely mechanism of THSD7A-associated membranous nephropathy involves in situ immune complex formation with podocyte-associated THSD7A. Our inability to detect circulating soluble THSD7A or THSD7A-anti-THSD7A immune complexes further supports this view. However, we cannot completely rule out the presence of circulating soluble THSD7A or THSD7A-anti-THSD7A immune complexes because of a possible lack of sensitivity of our assays.

THSD7A and PLA2R1 have quite similar structural and biochemical properties. Both proteins are expressed on podocyte membranes and have high molecular masses and a large extracellular region consisting of multiple and repeated disulfide-bonded and N-glycosylated domains. In addition, autoantibodies to both THSD7A and PLA2R1 are predominantly of the IgG4 subclass and recognize their target antigen exclusively under nonreducing conditions, suggesting the presence of one or more conformational epitopes in each protein. Furthermore, renal-biopsy samples from patients who were positive for anti-THSD7A antibodies had increased staining for the antigen within immune deposits, a phenomenon also seen in patients who are positive

for anti-PLA2R1 antibodies,¹⁰⁻¹² and IgG eluted from a biopsy sample from a patient with anti-THSD7A serum autoantibodies recognized recombinant THSD7A but not PLA2R1.

The fact that patients seem to mount an autoimmune response against either THSD7A or PLA2R1, but not both, is of particular interest. A priori, the probability that all patients who were positive for anti-THSD7A autoantibodies would be negative for anti-PLA2R1 autoantibodies owing to chance alone was less than 0.5% among the patients in our European cohort, for whom all samples were assayed against both recombinant molecules. The reasons for this mutual exclusivity of the two antigens remain only speculative at this point. It is known from other autoimmune diseases that a similar histologic and clinical phenotype can arise from disparate antigen-antibody interactions. For example, most patients with myasthenia gravis have autoantibodies to the acetylcholine receptor, whereas some have IgG4 antibodies to muscle-specific kinase, yet all the patients have the same clinical presentation.¹⁸ Whether genetic susceptibility factors such as HLA phenotype, as described for PLA2R1-associated membranous nephropathy,¹⁹ also apply to patients with THSD7A-associated membranous nephropathy can be determined only in studies of much larger cohorts. In fact, it is the observed mutual exclusivity of these two antigens that lends credence to our proposal that THSD7A- and PLA2R1-associated membranous nephropathy represent two separate molecular entities and that the respective antigens are primary targets in this disease. It seems unlikely that these antibodies are epiphenomena resulting from podocyte injury and exposure of cryptic antigens, since one would have expected antibodies to both antigens to be found in sev-

eral cases. At this stage, however, we do not know why antibodies to PLA2R1 develop in some persons with idiopathic membranous nephropathy, antibodies to THSD7A in others, and antibodies to as-yet unidentified antigens in still others.

In conclusion, we have identified a group of patients with idiopathic membranous nephropathy whose circulating autoantibodies are specific for THSD7A and not PLA2R1, suggesting that patients who are positive for anti-THSD7A autoantibodies represent a distinct subgroup with this disease. This finding not only furthers our understanding of the pathophysiological basis of membranous nephropathy but also allows for the potential identification and monitoring of patients who are positive for anti-THSD7A autoantibodies, by both serologic testing and histologic staining for the antigen.

Supported by grants from the French National Center for Scientific Research, the French National Research Agency (ANR-11-LABX-0028-01), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM ING20140129210), Centre Hospitalier Universitaire de Nice and Direction Générale de l'Offre de Soins of the French Ministry of Health (PHRC 2011-A01302-39 and NCT01897961, to Drs. Lambeau and Seitz-Polski), and Deutsche Forschungsgemeinschaft (STA 193/9-1 and STA193/9-2, to Dr. Stahl); by a Gerok fellowship granted by the Deutsche Forschungsgemeinschaft to the University of Hamburg (KFO 228, to Dr. Tomas); and by grants from the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (R01 DK097053, to Dr. Beck; and R01 DK090029, to Dr. Salant).

Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at NEJM.org.

We thank Ursula Kneissler for performing immunohistochemical analyses and confocal microscopy; Christine Payré for help in the initial biochemical characterization of THSD7A-positive patients; Eugen Kinzler for collecting the patient data; Dr. Andreas Gross and personnel at Asklepios Klinik Barmbek for collaborating in the collection of kidney tissue; Dr. Jens Gerth and personnel at Heinrich-Braun-Klinikum Zwickau for collaborating in the collection of serum samples; Sjoerd Timmermans and Jan Willem Cohen Tervaert (for the Limburg Renal Registry); and Anna-Lena Berg, Gerard Appel, Jai Radhakrishnan, Pietro Canetta, and Tanuja Mishra for providing serum samples.

REFERENCES

- Deegens JK, Wetzels JF. Membranous nephropathy in the older adult: epidemiology, diagnosis and management. *Drugs Aging* 2007;24:717-32.
- Beck LH Jr, Bonegio RG, Lambeau G, et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2009; 361:11-21.
- Hoxha E, Harendza S, Zahner G, et al. An immunofluorescence test for phospholipase-A2-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:2526-32.
- Hofstra JM, Beck LH Jr, Beck DM, Wetzels JF, Salant DJ. Anti-phospholipase A2 receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6:1286-91.
- Hofstra JM, Debiec H, Short CD, et al. Antiphospholipase A2 receptor antibody titer and subclass in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:1735-43.
- Hoxha E, Thiele I, Zahner G, Panzer U, Harendza S, Stahl RA. Phospholipase A2 receptor autoantibodies and clinical outcome in patients with primary membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2014;25:1357-66.
- Dähnrich C, Komorowski L, Probst C, et al. Development of a standardized ELISA for the determination of autoantibodies against human M-type phospholipase A2 receptor in primary membranous nephropathy. *Clin Chim Acta* 2013;421:213-8.

8. East L, Isacke CM. The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2002;1572:364-86.
9. Wang CH, Su PT, Du XY, et al. Thrombospondin type I domain containing 7A (THSD7A) mediates endothelial cell migration and tube formation. *J Cell Physiol* 2010;222:685-94.
10. Hoxha E, Kneißler U, Stege G, et al. Enhanced expression of the M-type phospholipase A2 receptor in glomeruli correlates with serum receptor antibodies in primary membranous nephropathy. *Kidney Int* 2012;82:797-804.
11. Larsen CP, Messias NC, Silva FG, Messias E, Walker PD. Determination of primary versus secondary membranous glomerulopathy utilizing phospholipase A2 receptor staining in renal biopsies. *Mod Pathol* 2013;26:709-15.
12. Debiec H, Ronco P. PLA₂R autoantibodies and PLA₂R glomerular deposits in membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2011;364:689-90.
13. Beck LH Jr. Membranous nephropathy and malignancy. *Semin Nephrol* 2010;30:635-44.
14. Seitz-Polski B, Payré C, Ambrosetti D, et al. Prediction of membranous nephropathy recurrence after transplantation by monitoring of anti-PLA2R1 (M-type phospholipase A2 receptor) autoantibodies: a case series of 15 patients. *Nephrol Dial Transplant* 2014 July 25 (Epub ahead of print).
15. Svobodova B, Honsova E, Ronco P, Tesar V, Debiec H. Kidney biopsy is a sensitive tool for retrospective diagnosis of PLA2R-related membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28:1839-44.
16. Ju W, Greene CS, Eichinger F, et al. Defining cell-type specificity at the transcriptional level in human disease. *Genome Res* 2013;23:1862-73.
17. Debiec H, Guignonis V, Mougenot B, et al. Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral endopeptidase antibodies. *N Engl J Med* 2002;346:2053-60.
18. Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, Vincent A. Autoantibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* 2001;7:365-8.
19. Stanescu HC, Arcos-Burgos M, Medlar A, et al. Risk HLA-DQA1 and PLA₂R1 alleles in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2011;364:616-26.

Copyright © 2014 Massachusetts Medical Society.

3. Discussion et perspectives

Pendant mon travail de thèse, j'ai pu valider l'intérêt du suivi des anticorps anti-PLA2R1 en transplantation rénale, montrer que plusieurs épitopes étaient reconnus par les anticorps anti-PLA2R1 et que l'étalement intramoléculaire des épitopes était associé à des formes de mauvais pronostic comme dans d'autres maladies auto-immunes.

J'ai également pu participer à l'identification d'une nouvelle cible antigénique THSD7A impliquée dans environ 5% des GEM idiopathiques.

Nous allons poursuivre le suivi de patients greffés dans les suites d'une GEM afin de confirmer l'intérêt diagnostique et pronostique du suivi des anticorps anti-PLA2R1 ainsi que des anticorps anti-THSD7A grâce à un Projet Hospitalier de Recherche Clinique national PRAM-KT qui vise à évaluer l'intérêt du suivi des anticorps anti-PLA2R1 en transplantation rénale ainsi que le suivi des anticorps dirigés contre de nouvelles cibles antigéniques (dont THSD7A), la caractérisation des épitopes reconnus par les anticorps anti-PLA2R1 et la détermination de facteurs génétiques associés à la récurrence de GEM en transplantation rénale. Actuellement plus de 118 patients sont inclus dont 52 avec un suivi prospectif.

Nous avons depuis la publication de cet article sur les récurrences de GEM en transplantation, identifié une patiente qui présente des anticorps anti-PLA2R1 après sa greffe rénale sans récurrence de GEM, certifiée par l'absence de protéinurie et par deux ponctions biopsies rénales à 6 mois d'intervalle ne montrant pas de dépôt d'IgG. Comment expliquer l'absence de récurrence alors que des anticorps circulants sont bien présents. Est-ce parce qu'en l'absence de phénomène déclenchant inflammatoire le passage des IgG à travers la membrane basale glomérulaire ne peut s'effectuer ou est-ce que l'anticorps de la patiente est incapable de reconnaître l'antigène issu d'un rein de donneur. Une des explications pourrait venir des différents variants de PLA2R1 décrits. Cette patiente présente un profil épitopique de type CysR. Elle a donc des anticorps dirigés contre le seul domaine CysR. Des variants codant ont été décrits dans ce domaine. Nous avons testé la reconnaissance des anticorps dirigés contre le domaine CTLD1 contre 4 variants codants décrits dans le domaine CTLD1, tous les anticorps de patients testés reconnaissent les 4 variants testés (comme décrit par Kao et al. qui a testé deux variants codant pour le domaine CTLD1), mais nous n'avons pas testé le variant pour le domaine CysR. Une façon de montrer cette « non interaction » serait de tester après élution des IgG et concentration des anticorps dans le sérum la reconnaissance in situ du récepteur

PLA2R1 sur son greffon et sur son rein natif comme décrit par Couser et al (Couser et al., 1974).

L'intérêt clinique serait de pouvoir associer un greffon incompatible en terme de récurrence de GEM pour un donneur donné. Le PHRC national que nous coordonnons s'est enrichi d'une partie d'analyse génétique qui permettra d'identifier les déterminants génétiques qui peuvent prédire une évolution vers une insuffisance rénale chronique terminale ainsi que d'étudier le lien entre la récurrence ou de la non récurrence de la GEM avec la structure et la présentation de l'antigène codé par la séquence du gène PLA2R1 du donneur et d'étudier l'interférence entre des variants du locus HLA-DQA1 du donneur et la réponse B-mémoire du receveur.

L'analyse des épitopes reconnus après une première poussée sur rein natif et une récurrence sur greffon peut permettre d'expliquer pourquoi une même maladie sur rein natif peut entraîner une évolution vers une insuffisance rénale chronique terminale et semble bénigne après une récurrence sur greffon (comme décrit dans la néphropathie à IgA). Nous avons aussi vu que le blocage du 2^{ème} signal dans l'activation du lymphocyte T (CD40-CD154) peut permettre dans le modèle d'encéphalite auto-immune expérimentale chez la souris de bloquer le « spreading » épitopique et de moduler l'évolution de la maladie. Dans le contexte de la greffe rénale le traitement immunosuppresseur de la greffe peut modifier l'activation des lymphocytes B et T et bloquer le « spreading ». Deux patients avec une récurrence de GEM sur leur greffon sont rentrés en rémission complète après un traitement symptomatique. Il est intéressant de noter que ces 2 patients porteurs d'anticorps anti-PLA2R1 ont un profil épitopique qui s'est modifié entre la dialyse et la récurrence sur le greffon. En effet, Ils avaient tous deux des anticorps anti-PLA2R1 positifs en dialyse sur liste d'attente de greffe avec un profil épitopique de type CTLD1. Ils ont négativé leur titre d'anticorps juste après la greffe et ont récidivé après un an et deux ans de suivi avec un titre élevé d'anticorps anti-PLA2R1. Ils sont rentrés en rémission complète avec un traitement symptomatique et avaient au moment de la récurrence un profil de type CysR avec un titre élevé et persistant d'anticorps. Ces résultats doivent être confirmés sur une cohorte prospective de patients greffés mais ces modifications de profil pourraient expliquer pourquoi une première poussée peut induire une insuffisance rénale terminale et pourquoi une récurrence après greffe peut répondre à un traitement symptomatique.

La confrontation du profil épitopique entre la dialyse et la récurrence nous apportera certainement des explications.

Le titre d'anticorps anti-PLA2R1 est corrélé à l'activité de la maladie bien que des discordances apparaissent. Nous avons observé chez différents patients de notre cohorte un titre élevé et persistant d'anticorps anti-PLA2R1 sans maladie active.

Comme nous l'avons vu, le titre d'anticorps anti-PLA2R1 est prédictif de l'évolution du patient au moment de la prise en charge mais beaucoup de patients ont un titre d'anticorps persistant sans maladie active. Ce phénomène a été décrit dans d'autres maladies auto-immunes et notamment au cours des vascularites à ANCA où l'on peut également retrouver des anticorps chez le sujet sain. Dans cette maladie, les anticorps reconnaissent un antigène cytoplasmique exprimé à la membrane des polynucléaires neutrophiles suite à un phénomène inflammatoire (on parle de « priming » du polynucléaire). La dégranulation des neutrophiles suite à cette interaction antigène-anticorps induit les lésions de vascularite décrites dans cette pathologie.

Roth et al. ont déterminé après fixation des anticorps sur la myéloperoxydase et digestion à la trypsine, en spectrométrie de masse les différents épitopes reconnus. Ils ont mis en évidence que les épitopes reconnus chez des donneurs sains étaient différents de ceux reconnus par des patients présentant une maladie active. De plus l'identification de nouveaux épitopes a permis d'identifier des patients qui présentaient un tableau de vascularite sans anticorps identifié. Ces épitopes sont situés dans des régions non accessibles de la molécule dans sa configuration sur plaque. Ils ont pu confirmer le caractère plus ou moins pathogène de ces épitopes en mesurant la dégranulation des polynucléaires après incubation avec différents anticorps reconnaissant ces différents épitopes. Ils ont de plus confirmé sur modèle animal qu'en immunisant une souris avec un peptide pathogène et en transférant ses IgG on pouvait reproduire la maladie (Roth et al., 2013).

L'identification des « micro-épitopes » reconnus par les anticorps anti-PLA2R1 est probablement également une étape importante dans la compréhension de la pathogénicité de ces anticorps qui permettrait l'étude de chaque population lymphocytaire. Mais cette étape est difficile du fait du caractère conformationnel des épitopes. Nous avons pu identifier grâce à la production des différents domaines isolés de PLA2R1 trois « macro-épitopes » différents situés dans trois domaines différents : CysR, CTLD1 et CTLD8. Par contre une grande partie des anticorps avec un profil CTLD7 ne reconnaissent aucun domaine isolé : ni le CTLD6, ni le CTLD7. Notre hypothèse est que l'épitope reconnu se situe entre le CTLD6 et le CTLD7.

Nous avons alors produit un nouveau mutant comprenant les deux domaines CTLD6 et 7 ainsi que la zone de lien entre ces deux domaines. Cette construction est bien reconnue par de nombreux patients ayant un profil CTLD7. Il y a donc au moins 4 épitopes différents contenus dans quatre domaines différents. Ces différents épitopes impliqués sont probablement à l'origine des différentes formes de GEM idiopathiques. L'analyse moléculaire des épitopes impliqués dans la reconnaissance antigène-anticorps dans différentes maladies auto-immunes permettra probablement une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les différentes phases des maladies auto-immunes et permettra sûrement, comme elle a permis une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les phénomènes d'allergie croisée, une meilleure prise en charge des patients.

Comme dans d'autres maladies auto-immunes, le phénomène d'« étalement » des épitopes au sein de la même molécule est associé à une aggravation des symptômes. Ce phénomène est lié à une activation des lymphocytes B et T

Notre hypothèse est qu'il existe une première immunisation contre un domaine accessible au système immunitaire en N-terminal. Peut-être par mimétisme moléculaire comme le propose Fresquet et al. (Fresquet et al., 2014) suite à une infection à *Clostridium*. Cette immunisation peut être à l'origine d'une poussée peu symptomatique pouvant passer inaperçue car on sait que seulement 41% ont des oedèmes ce qui représente le seul motif de consultation. L'exposition de nouveaux épitopes cryptiques au système immunitaire peut alors induire le phénomène de « spreading » intra-moléculaire et l'emballement du système immunitaire avec une réponse humorale et cellulaire. Le rôle de l'immunité cellulaire dans la GEM n'est pas connu ainsi que le rôle du complément. Il a été montré chez 14 patients présentant une GEM idiopathique une augmentation de la production d'IL10 et d'IL13. Le niveau de production de chaque sous classe d'IgG par les lymphocytes B est comparable entre un groupe de patients GEM et un groupe contrôle mais en présence de cytokines Th2 les lymphocytes B des patients du groupe GEM produisent plus d'IgG4 que les lymphocytes contrôles et quand on compare la production de chaque sous-classe d'IgG en présence ou non de cytokines on retrouve de façon significative une augmentation de la production d'IgG4 en présence d'IL4 dans le groupe GEM (Kuroki et al., 2005).

Comme nous l'avons vu il existe un changement de sous-classe vers les IgG4 dans les formes actives. Ce phénomène est également décrit dans une autre maladie médiée par les IgG4, le pemphigus vulgaris. Grâce au suivi d'une population vivant au Brésil où le pemphigus est

endémique ils ont pu mettre en évidence que des patients étaient porteurs d'anticorps avant de développer la maladie. L'étude de ces anticorps anti-desmogléine non pathogènes montre qu'ils sont d'isotype IgG1 avec un changement IgG4 lorsqu'ils développent les symptômes (Warren et al., 2003). Le transfert à l'animal (souris nouveau-née) des IgG1 n'induit pas de maladie alors que le transfert des IgG4 reproduit les lésions observés chez les patients porteurs de pemphigus vulgaris (Aoki et al., 2004). La même équipe à partir de cette population porteuse d'anticorps à des stades pré-cliniques a montré que ces IgG1 non pathogènes étaient dirigées contre un épitope situé en C-terminal, le transfert des IgG dirigées contre ce domaine n'induit pas de maladie et lors du passage vers des formes actives, les sera des patients présentent un « spreading » intra-moléculaire des épitopes vers des domaines en N-terminal et le transfert de ces IgG4 dirigés contre ces domaines induisent la maladie. Ils ont également montré un profil cytokinique de type Th2 chez ces patients au moment du passage à des formes actives. Il est intéressant de noter que cette population vivant le long d'une rivière (Lima Verde) présente une forte incidence de morsure par des hématophages qui orientent probablement la réponse immunitaire vers une réponse de type Th2. Comme dans cette pathologie, nous avons vu qu'il existe dans la GEM un changement de sous-classe isotypique entre les phases actives et les phases de rémission de la maladie associé à un changement de profil épitopique.

Bien que beaucoup de progrès dans la connaissance de la GEM sont venus du modèle de la néphrite de Heymann. Il reste encore beaucoup d'éléments à comprendre dans la physiopathologie des GEM associées aux anticorps anti-PLA2R1. Aucun modèle animal n'existe à ce jour et la seule étude qui a montré une toxicité cellulaire des anticorps anti-PLA2R1 a montré une diminution de l'adhésion des podocytes sans effet toxique des anticorps. Dans le pemphigus, la desmogléine permet la liaison de deux kératinocytes et est reliée au cytosquelette d'actine par des plaques de protéines desmosomales. Les souris KO pour la desmogléine présentent une érosion spontanée de la peau et des muqueuses avec des lésions proches de celles observées dans le pemphigus vulgaris (Koch et al., 1997). La desmogléine semble donc permettre l'adhésion et le maintien des kératinocytes. La toxicité des IgG4 anti-desmogléine 1 ou 3 passe par la perte d'adhésion des kératinocytes entre eux. La perte d'adhésion des podocytes à la membrane basale glomérulaire liée aux anticorps anti-PLA2R1 peut expliquer leur pathogénie. Le rôle cytotoxique de PLA2R1 dans des cellules (mis en évidence lorsqu'elles sont soumises à un stress oncogénique) peut aussi peut-être permettre d'expliquer la toxicité podocytaire de l'interaction antigène-anticorps qui pourrait

activer PLA2R1 et faire rentrer le podocyte en sénescence comme cela a été décrit pour les anticorps dirigés contre le récepteur de la TSH capables d'activer une fonction du récepteur cible.

L'effet des différents types d'anticorps IgG1 ou IgG4 dirigés contre les différents domaines de PLA2R1 (CysR, CTLD1, CTLD7 et CTLD8) doit être mesuré sur des lignées humaines podocytaires avec ou sans complément. Dans le modèle de la néphrite de Heymann, la participation du complément dans la genèse des lésions podocytaires a été démontré. Les IgG4 n'activent pas la voie classique du complément (Pumphrey, 1986) et sont associées à l'activité de la maladie, de plus des dépôts de fractions du complément sont retrouvés dans les biopsies rénales de patients GEM, l'activation du complément dans ce modèle et son rôle dans les lésions doit être mieux compris puisque nous disposons actuellement de traitement efficaces capables de bloquer le C5. De même de nouvelles drogues bloquant spécifiquement la co-stimulation CD40-CD154 pourraient avoir un intérêt si le rôle du « spreading » intramoléculaire est confirmé.

Aucun transfert à la souris ne peut être effectué car le récepteur PLA2R1 est absent de leur rein. Le lapin n'exprime le récepteur que lors de ses premiers jours de vie. Il faudra poursuivre le travail sur les orthologues de PLA2R1 en recherchant l'expression de PLA2R1 chez le rat ou le primate ainsi que la reconnaissance par les anticorps de patients de ces différents orthologues de PLA2R1. Une équipe à Hambourg a mis au point une souris transgénique exprimant la forme humaine de PLA2R1 sous promoteur de la néphrine. Cette souris a bien des dépôts glomérulaires d'IgG après injection avec du sérum de patients porteurs d'anticorps anti-PLA2R1 mais n'est pas plus protéinurique que les souris contrôles. Les souris expriment THSD7A au niveau de leurs glomérules, le transfert d'anticorps va pouvoir être effectué et permettre d'améliorer nos connaissances dans la physiopathologie de la GEM. Nous avons vu que dans les GEM associées aux anticorps anti-THSD7A, les IgG4 étaient également la sous-classe prédominante et que la présentation clinique des patients est comparable aux GEM avec anticorps anti-PLA2R1. THSD7A a initialement été caractérisée comme une protéine endothéliale exprimée dans le placenta. La localisation de THSD7A sur biopsie rénale a montré une localisation podocytaire et non endothéliale. THSD7A et PLA2R1 partagent des propriétés biochimiques et ont une structure proche. Le fait que les patients présentent le même tableau clinique avec des anticorps anti-THSD7A et des anticorps anti-PLA2R1 suggère que ces protéines ont des fonctions proches dans le rein humain. Les

résultats obtenus sur l'étude du rôle pathogène des anticorps anti-THSD7A pourront apporter un éclairage sur le rôle des anticorps anti-PLA2R1. L'étude de l'interaction entre THSD7A et PLA2R1 est un élément important pour comprendre la physiopathologie de cette même maladie médiée par différents anticorps.

Conclusion

Beaucoup de progrès ont été accomplis dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la GEM depuis la néphrite de Heymann jusqu'à l'identification de nouveaux antigènes podocytaires permettant d'expliquer environ 80% des GEM idiopathiques chez l'homme. Des progrès restent à faire dans la caractérisation des formes secondaires. La forme idiopathique présentent des similitudes avec d'autres pathologies auto-immunes où le caractère pathogène des auto-anticorps a été démontré.

L'identification des épitopes impliqués dans la reconnaissance antigène-anticorps doit permettre d'améliorer nos connaissances dans la physiopathologie de cette maladie ainsi que la mise au point de modèles cellulaires et animaux qui seront les étapes déterminantes pour mieux comprendre cette maladie et mieux traiter les patients dans les années à venir.

4. Annexes :

Tableau 2 : Causes rapportées de GEM (%) issu KDIGO 2012

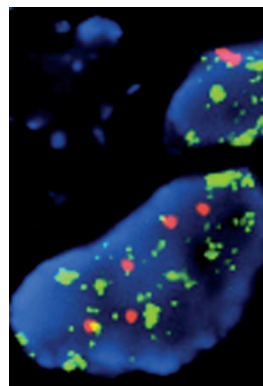
Table 12 | Reported causes of secondary MN (% in adults)

Cause	China Zeng <i>et al.</i> ¹⁹⁶ (n=390)	Japan Abe <i>et al.</i> ¹⁹¹ (n=137)	France Cahen <i>et al.</i> ¹⁹² (n=82)	Finland Honkanen ¹⁹⁷ (n=82)	United States Ehrenreich <i>et al.</i> ¹⁹⁸ (n=167)
IMN	31.8	65.0	79.3	69.8	62.3
Secondary MN	68.2	35.0	20.7	30.2	37.7
Autoimmune diseases	50.0	25.5	6.1	17.7	7.2
Infections	12.0	5.1	2.5		2.4
Tumors	3.1	1.5	4.9	2.1	1.8
Drugs or toxins	3.1	2.2	6.1	10.4	4.2

► PLA2R1 (*phospholipase A2 receptor 1*) est un récepteur membranaire de 180-kDa, membre de la superfamille des lectines de type C. Il doit sa découverte à sa haute affinité pour les phospholipases A2 sécrétées (sPLA2), des enzymes impliquées dans la synthèse de médiateurs lipidiques. Au-delà de son rôle dans certaines pathologies inflammatoires, deux études récentes suggèrent deux nouvelles fonctions pour PLA2R1 : l'une dans le cancer, comme gène suppresseur de tumeurs, et l'autre dans la glomérulonéphrite extramembraneuse idiopathique, comme antigène majeur de cette maladie auto-immune. Ces découvertes pourraient rapidement faire de PLA2R1 une nouvelle cible diagnostique et thérapeutique. ◀

Nouveaux rôles physiopathologiques pour le récepteur PLA2R1 dans le cancer et la glomérulonéphrite extramembraneuse

Christophe A. Girard¹, Barbara Seitz-Polski^{1,2}, Guillaume Dolla¹, Arnaud Augert³, David Vindrieux³, David Bernard³, Gérard Lambeau¹



¹ Institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire, CNRS et université de Nice-Sophia Antipolis UMR 7275, 660 route des lucioles, Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France ;

² Service de néphrologie, CHU hôpital Pasteur, université de Nice-Sophia Antipolis, Nice, France ;

³ Inserm U1052, centre de recherche en cancérologie de Lyon, CNRS et université de Lyon, UMR 5286, centre Léon Bérard, 69373 Lyon, France.

girard@ipmc.cnrs.fr

lambeau@ipmc.cnrs.fr

de domaine cytoplasmique. Elle peut être générée par épissage alternatif ou par protéolyse de la forme membranaire [2, 5]. Chez l'homme, PLA2R1

est constitutivement exprimé dans le rein, le poumon, la rate et le côlon, et dans certaines cellules fibroblastiques, épithéliales et immunitaires. Cette distribution tissulaire varie cependant d'une espèce à l'autre.

Ligands de PLA2R1

Notre équipe a découvert PLA2R1 (initialement appelé récepteur de type M) en 1990 à l'aide d'une phospholipase A2 sécrétée (sPLA2) de venin de serpent (donc exogène) appelée OS2 [6]. Cette dernière se lie à PLA2R1 avec une très haute affinité de 7 pM. On ne connaissait en 1990 que deux sPLA2 de mammifère, IB et IIA, et la question se posait alors de savoir si ces sPLA2 pouvaient être les ligands naturels endogènes de PLA2R1. Suite à une série de résultats en apparence confus car obtenus avec des sPLA2 et du PLA2R1 issus de différentes espèces de mammifères, une première réponse claire a été apportée en 1999, au moins chez la souris, pour ces deux sPLA2 [7]. Dans cette espèce, les sPLA2 IB et IIA se lient à PLA2R1 avec une haute affinité de l'ordre du nM. Cependant, les résultats apparaissaient différents chez le rat et l'homme, suggérant des propriétés de liaison de PLA2R1 dépendantes de l'espèce [7]. On sait maintenant qu'il



Structure de PLA2R1

PLA2R1 (*phospholipase A2 receptor 1*) est une glycoprotéine transmembranaire de 180-kDa appartenant à la superfamille des lectines de type C (Figure 1) [1]. Il présente une structure complexe composée de 10 domaines extracellulaires (représentant 95 % de la protéine), d'un seul segment transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique d'une quarantaine d'acides aminés contenant un motif consensus d'endocytose NPXY [2, 3]. Depuis son extrémité amino-terminale extracellulaire, on distingue une région riche en cystéine (CysR), un domaine fibronectine de type II (FNII) et huit domaines lectine de type C distincts (CTLD). Trois autres récepteurs ont la même structure et forment un sous-groupe au sein de la superfamille des lectines de type C : le récepteur mannose du macrophage (MRC1), le récepteur Endo-180 (MRC2) et le récepteur des cellules dendritiques (DEC-205, LY75) (pour revue voir [4]). Les séquences en acides aminés de ces quatre récepteurs présentent cependant moins de 30 % d'identité, suggérant des fonctions distinctes. Par ailleurs, PLA2R1 existe sous deux formes, transmembranaire et soluble [2]. La forme soluble est clivée après le CTLD8, et est dépourvue de segment transmembranaire et

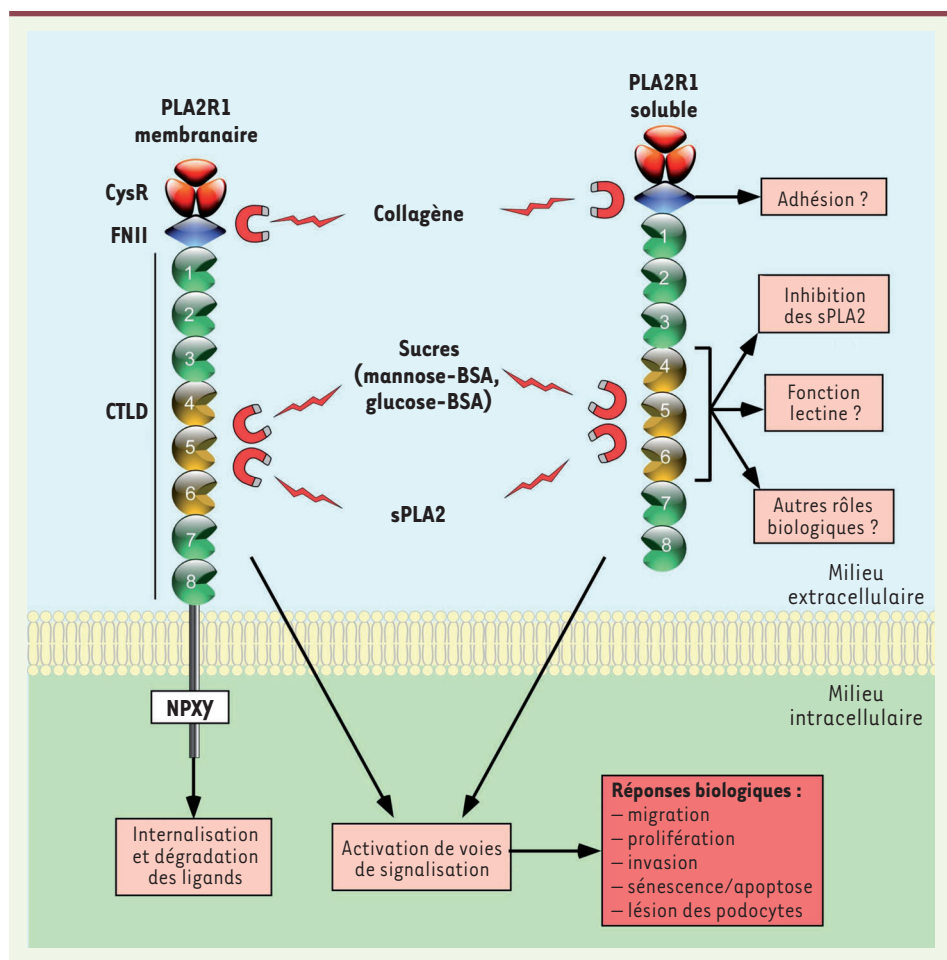


Figure 1. Structure schématique et fonctions moléculaires possibles de PLA2R1. PLA2R1 est composé d'une large région extracellulaire, d'un seul segment transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique contenant un motif d'internalisation (NPXY). La région extracellulaire comprend : un domaine riche en cystéine (CysR), un domaine fibronectine de type II (FNII) qui lie le collagène, et huit domaines lectines de type C (CTLD), dont les domaines CTLD4 à -6 (en jaune) qui lient les sPLA2 et certains sucres. PLA2R1 peut exister sous forme membranaire ou soluble. En liant certaines sPLA2, PLA2R1 pourrait, via l'activation de diverses voies de signalisation, relayer la transduction de certains de leurs effets biologiques ou, inversement, inhiber leur action via leur internalisation et leur dégradation. En liant d'autres ligands, PLA2R1 pourrait aussi agir indépendamment des sPLA2. BSA : bovine serum albumin.

existe une douzaine de sPLA2 humaines ou de souris (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA, XIIIB et otoconin-95) [8, 9]. À nouveau chez la souris, nous avons montré que sept de ces 12 sPLA2 se lient à PLA2R1, ce qui renforce l'idée que ces dernières sont bien des ligands naturels de PLA2R1 [10]. Les propriétés de liaison des sPLA2 sur PLA2R1 restent cependant à caractériser finement dans les autres espèces de mammifères, notamment chez l'homme. On sait aussi que PLA2R1, au moins dans certaines espèces, peut lier du collagène et certains sucres, suggérant que PLA2R1 pourrait avoir d'autres types de ligands endogènes, associés à différentes fonctions de type adhésion ou lectine (Figure 1) [10, 11]. Enfin, les expériences de mutagenèse dirigée ont montré que le domaine fibronectine de type II lie le collagène de type IV [11], tandis que les domaines CTLD4-6 lient les sPLA2 et certains sucres, comme le mannose ou le glucose [12]. La liaison des sPLA2 sur les domaines CTLD4-6 de PLA2R1 se fait cependant par interaction protéine-protéine [10].

L'interaction sPLA2-PLA2R1 pourrait avoir des rôles opposés (Figure 1). Les sPLA2 sont de petites enzymes très stables de 13- à 18-kDa qui hydrolysent les phospholipides pour libérer des acides gras et des lysophospholipides, deux précurseurs de la synthèse de nombreux médiateurs lipidiques [8, 9, 41] (→). Cette propriété est à la base d'un grand nombre de leurs fonctions biologiques [8, 9]. La liaison sPLA2-PLA2R1 pourrait donc être

(→) Voir la synthèse de H. Ait-Oufella et al., page 526 de ce numéro

un moyen efficace de stopper leur activité biologique, en inhibant leur activité enzymatique et en favorisant leur élimination du milieu extracellulaire. En effet, *in vitro*, la liaison des sPLA2 au récepteur PLA2R1 soluble entraîne une inhibition de leur activité enzymatique, et leur liaison au récepteur membranaire conduit non seulement à leur inhibition, mais aussi à leur internalisation et leur dégradation dans les lysosomes [2, 3, 10]. Inversement, PLA2R1 pourrait relayer la transduction de certaines fonctions biologiques des sPLA2 en activant diverses voies de signalisation intracellulaire [13] ou, peut-être même, en les adressant dans des compartiments intracellulaires, comme le noyau [14]. Mais, la démonstration formelle du rôle de PLA2R1 dans ces deux derniers cas reste à apporter.

Rôles physiopathologiques du récepteur PLA2R1

Rôles opposés de PLA2R1 dans l'inflammation

Plusieurs sPLA2 (IIA, V et X) et le récepteur PLA2R1 sont exprimés dans les poumons [9]. Les sPLA2 IIA et X sont présentes dans les lavages broncho-alvéolaires de

patients souffrant d'asthme. Henderson *et al.* ont mis en évidence un rôle clé de la sPLA2-X dans un modèle d'asthme chez la souris [15]. Dans ce modèle induit par administration intranasale d'ovalbumine, les souris invalidées pour la sPLA2-X produisent moins d'icosanoïdes pro-inflammatoires et ont moins d'asthme. *In vitro*, la liaison des sPLA2 à PLA2R1 entraîne leur internalisation et leur dégradation dans la voie lysosomale [3, 13]. Ces observations ont conduit Tamaru *et al.* à étudier le rôle de PLA2R1 dans l'asthme [16]. Dans le même modèle que celui utilisé par Henderson *et al.*, ils ont observé que les souris invalidées pour PLA2R1 (souris *Pla2r1*^{-/-}) présentent une réponse inflammatoire plus intense que les souris sauvages, caractérisée par une infiltration plus importante de cellules inflammatoires dans les voies respiratoires. Les lavages broncho-alvéolaires des souris *Pla2r1*^{-/-} contenaient davantage de sPLA2 IB et X, et des concentrations plus élevées de plusieurs icosanoïdes et de cytokines Th2. Par administration intratrachéale de sPLA2 radiomarkée, ces auteurs ont pu mettre en évidence que ces taux plus élevés de sPLA2 résultaient d'une clairance et d'une dégradation réduites de ces sPLA2 [16]. Au niveau pulmonaire, PLA2R1 pourrait donc jouer un rôle protecteur dans la pathogenèse de l'asthme en inhibant l'activité des sPLA2 et en les éliminant du milieu extracellulaire.

Contrairement à son rôle anti-inflammatoire au niveau pulmonaire, il semblerait que PLA2R1 joue un rôle pro-inflammatoire dans le choc septique [17]. L'administration de lipopolysaccharide (LPS, un composant de la membrane des bactéries Gram-négatives) chez des souris sauvages induit un choc septique qui provoque la mort des animaux en 24 heures. Chez ces souris, d'importantes quantités de TNF α (*tumor necrosis factor α*) sont produites dans les poumons, la rate, le rein et l'utérus, des tissus qui expriment la sPLA2 IB. L'expression de PLA2R1 est également augmentée dans les cellules épithéliales des alvéoles pulmonaires et dans les lymphocytes spléniques des souris sauvages

exposées au LPS [18]. *In vitro*, l'application de sPLA2 IB sur des cellules de parenchyme pulmonaire ou des cellules endothéliales vasculaires provoque la sécrétion d'icosanoïdes. Lorsqu'ils sont appliqués sur des macrophages exposés à une endotoxine, ces dérivés lipidiques stimulent la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF α et l'IL-1 β (interleukine-1 β). Ces observations ont conduit Hanasaki *et al.* à étudier le rôle du complexe sPLA2 IB/PLA2R1 dans la pathogenèse du choc septique. Ils ont montré que, comme le LPS, la sPLA2 IB induit un choc septique lorsqu'elle est administrée à des souris préalablement sensibilisées avec des doses sub-léthales de LPS. En revanche, les souris *Pla2r1*^{-/-} sont plus résistantes que les souris sauvages au choc septique, induit aussi bien par le LPS que par la sPLA2 IB [17]. De plus, chez ces souris, les concentrations plasmatiques de TNF α et d'IL-1 β induites par le LPS sont sensiblement réduites. L'ensemble de ces résultats suggèrent que dans ce modèle inflammatoire, PLA2R1 pourrait cette fois relayer la transduction de certains effets des sPLA2 et participer, notamment *via* la production de cytokines pro-inflammatoires, à la progression du choc septique.

Rôles de PLA2R1 dans le cancer

L'équipe de David Bernard, en collaboration avec notre équipe, a été la première à suggérer un rôle antitumoral de PLA2R1, lors d'un criblage génétique fonctionnel destiné à identifier des gènes contrôlant la sénescence cellulaire [19]. La sénescence est un arrêt irréversible de la prolifération cellulaire. Elle constitue, au même

titre que l'apoptose, un puissant mécanisme antitumoral [20, 42, 43]. Plusieurs mécanismes provoquent l'entrée en sénescence : l'épuisement du pouvoir réplcatif des cellules (on parle alors de sénescence réplcatrice), et l'exposition à un stress oncogénique (on parle alors d'*oncogene-induced senescence* ou OIS). Le rôle crucial de PLA2R1 dans la sénescence réplcatrice a d'abord été mis en évidence *in vitro*, dans des cultures primaires de fibroblastes pulmonaires humains (WI38) et dans des cellules épithéliales mammaires (HMEC) [19]. Lorsque ces cellules entrent en sénescence, elles expriment davantage de PLA2R1 (Figure 2). La diminution

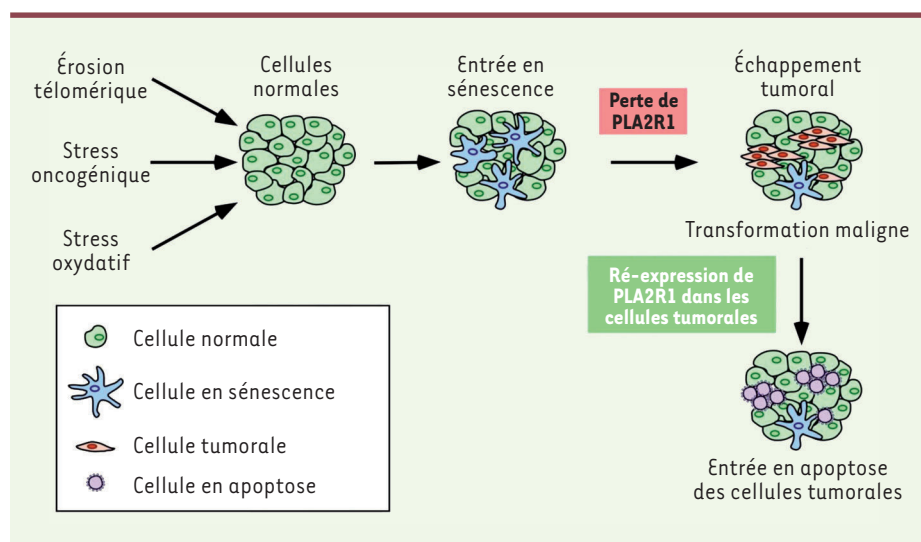


Figure 2. Rôle antitumoral de PLA2R1. Représentation schématique des mécanismes de sénescence. Différents stimulus induisent l'entrée en sénescence de cellules normales. Dans ces cellules, l'inactivation de PLA2R1 permet un échappement à la sénescence et la transformation maligne. Sa réexpression dans les cellules tumorales induit leur entrée en apoptose.

d'expression de PLA2R1 par ARN interférence retarde l'entrée en sénescence, tandis que la surexpression de PLA2R1 l'induit de façon prématurée [19]. L'effet pro-sénescence de PLA2R1 dépend de la production de radicaux oxygénés (*reactive oxygen species*, ROS), de l'induction de dommages à l'ADN et de l'activation du gène suppresseur de tumeurs p53 [19]. Les sPLA2 IB et IIA contrôlent également la sénescence cellulaire [19, 21, 42, 43]. Néanmoins, la contribution de PLA2R1 dans leurs effets n'est pas clairement établie [19].

PLA2R1 joue également un rôle clé dans l'OIS. En effet, *in vitro*, la déplétion de PLA2R1 permet l'échappement à l'OIS, ainsi que la transformation de kératinocytes et des HMEC exposés à l'oncogène Ras^{V12G} [22]. *In vivo*, cela se traduit par l'apparition plus rapide et en plus grand nombre de papillomes chez les souris *Pla2r1*^{-/-} dans un modèle de tumorigenèse cutanée induite chimiquement [22]. L'analyse de la base de données Oncomine (<https://www.oncomine.org>) révèle que l'expression de PLA2R1 diminue dans plusieurs cancers (sein, rein, côlon, tête, cou, etc.) [22]. Chez certains patients atteints de leucémie, et dans des lignées tumorales lymphocytaires (Jurkat, U937) et mammaires (MDAMB-453, Camal, BT20), cette perte d'expression semble être la conséquence d'un contrôle épigénétique *via* une hyperméthylation du promoteur [23]. Lorsque PLA2R1 est réintroduit par une approche virale dans des lignées tumorales mammaires, il induit leur apoptose [24]. Cette réponse pro-apoptotique, plutôt que pro-sénescence, pourrait résulter de l'altération fréquente dans ces cellules des voies p16/Rb et p53, qui participent à l'effet pro-sénescence de PLA2R1 dans les cellules normales. L'effet pro-apoptotique de PLA2R1 ne semble dépendre ni de son domaine cytosolique, ni du domaine de liaison des sPLA2. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques suggère que l'effet de PLA2R1 ne dépend pas non plus de la production de médiateurs lipidiques [22, 24]. En revanche, il impliquerait l'activation d'une voie de signalisation dépendante de JAK2 (*Janus kinase 2*) et la production de ROS d'origine mitochondriale [22, 24]. L'action de PLA2R1 pourrait ainsi être déterminante à plusieurs étapes clés du processus tumoral. Dans les cellules normales, PLA2R1 pourrait empêcher la formation de tumeurs en participant à leur entrée en sénescence, à la suite d'un stress oncogénique. Dans les cellules cancéreuses, sa réexpression pourrait freiner la progression tumorale en favorisant leur apoptose. Les travaux de Judith Campisi ont montré que la sénescence cellulaire produit un environnement pro-inflammatoire riche en cytokines [25, 43]. Il serait donc tentant de rapprocher les effets de PLA2R1 décrits ci-dessus sur l'inflammation et la production de cytokines de son rôle pro-sénescence. Cependant, nous n'avons à ce jour aucune donnée suggérant une contribution claire des cytokines dans la réponse de type sénescence induite par PLA2R1.

Rôle de PLA2R1 dans la glomérulonéphrite extra-membraneuse idiopathique

La glomérulonéphrite extra-membraneuse (GEM) est la première cause de syndrome néphrotique chez l'adulte [26, 27]. On distingue la GEM primitive ou idiopathique (80 % des cas), dont l'origine est indéterminée, de la GEM secondaire (20 % des cas), qui est associée à une pathologie extra-rénale (lupus, cancers, infections, expositions à certains

médicaments). La GEM idiopathique est une maladie auto-immune dont l'évolution clinique est variable. Certains patients entrent en rémission spontanée, tandis que d'autres progressent vers une insuffisance rénale terminale, nécessitant le recours à la dialyse ou à la greffe de rein. Le diagnostic de GEM idiopathique repose exclusivement sur l'analyse histologique d'une biopsie rénale. La GEM se caractérise par la présence de dépôts auto-immuns au niveau de la membrane basale glomérulaire (MBG). Ces dépôts, généralement composés d'immunoglobulines de type IgG4 et de protéines du complément, sont associés à une perte de sélectivité de la barrière glomérulaire, ce qui conduit au passage anormal de protéines sanguines dans les urines, expliquant la protéinurie de rang néphrotique retrouvée chez les patients atteints de GEM (Figure 3).

L'identification des cibles moléculaires des auto-anticorps a fait l'objet d'intenses recherches. En 1959, Heymann fut le premier à développer un modèle de GEM chez le rat et à montrer que l'antigène principal était dans ce cas la mégaline, une protéine exprimée à la surface des podocytes, les cellules épithéliales essentielles à la filtration glomérulaire [26, 28]. La mégaline étant absente du podocyte humain, ces découvertes n'étaient cependant pas transposables à l'homme. Il fallut attendre 2002 pour que l'équipe de Pierre Ronco identifie chez l'homme l'endopeptidase neutre (NEP) comme un premier antigène de la GEM [29, 44]. Cependant, cet antigène est impliqué dans une forme rare de GEM néonatale de type allo-immune, mais pas dans les GEM idiopathiques de l'adulte. C'est enfin en 2009 que l'équipe de David Salant, en collaboration avec notre équipe, a mis en évidence qu'environ 70 % des patients atteints de GEM idiopathique avaient des auto-anticorps circulants de type IgG4 dirigés contre PLA2R1 [30]. Les anticorps anti-PLA2R1 sont absents chez les patients souffrant de GEM secondaires ou d'autres néphropathies glomérulaires. Ces anticorps reconnaissent des épitopes conformationnels de PLA2R1, et sont insensibles à son état de glycosylation.

En accord avec l'hypothèse émise 50 ans plus tôt par Heymann, PLA2R1 est bien exprimé à la surface des podocytes chez le sujet sain (Figure 3). Chez les patients, son expression serait augmentée, et il est colocalisé avec les IgG4 qui forment les dépôts auto-immuns [30, 31]. Ces résultats suggèrent que les dépôts immuns observés *in situ* au niveau de la MBG des patients atteints de GEM idiopathique résultent de la reconnaissance par les auto-anticorps anti-PLA2R1 circulants de l'antigène PLA2R1 exprimé à la surface des podocytes. Cette reconnaissance pourrait déclencher l'activation du complément ou d'autres mécanismes

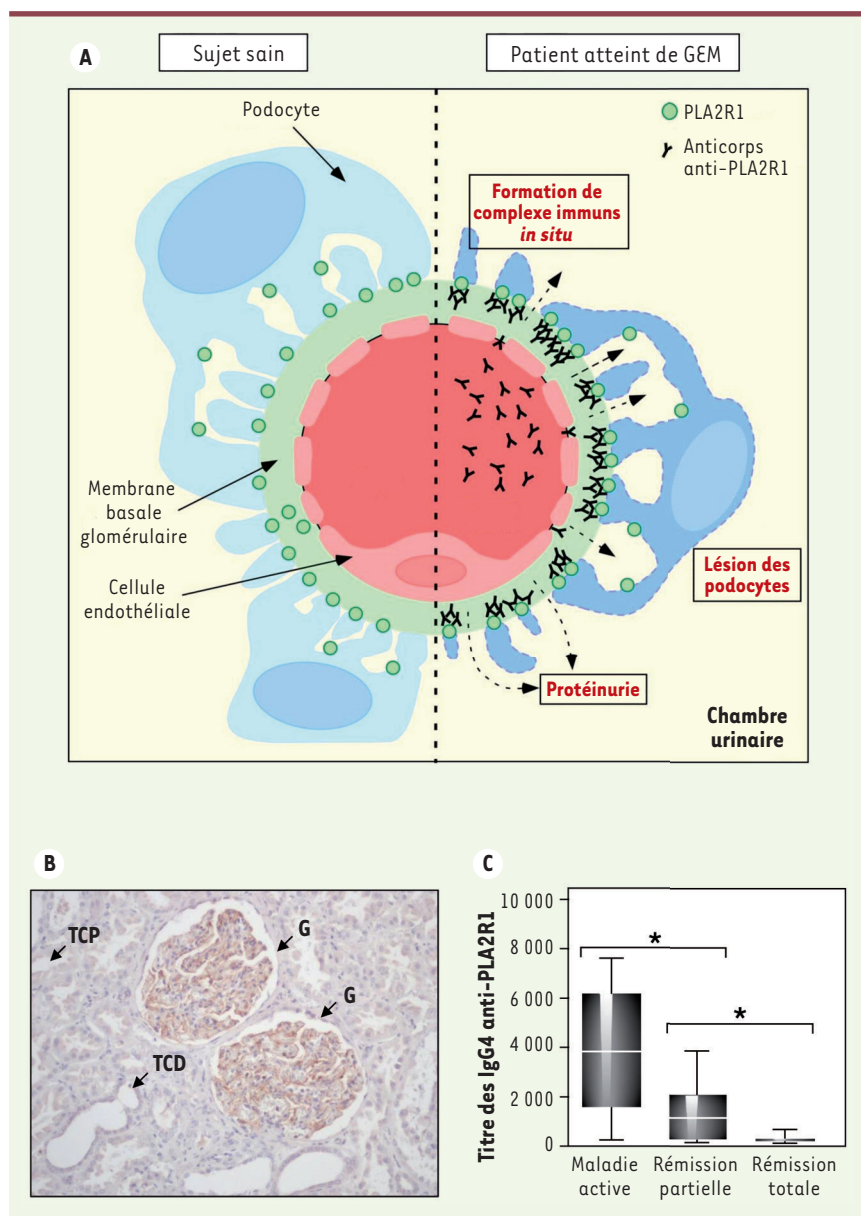


Figure 3. Rôle de PLA2R1 dans la GEM idiopathique. **A.** Modèle de formation de dépôts immuns *in situ* conduisant à une protéinurie chez les patients atteints de GEM idiopathique. **B.** Analyse microscopique d'une biopsie de rein humain montrant la localisation de PLA2R1 (coloration marron) au niveau du glomérule. G : glomérule ; TCP : tubule collecteur principal ; TCD : tubule collecteur distal. **C.** Corrélation entre la sévérité de la maladie (maladie active : protéinurie > 3,5 g/g de créatine urinaire ; rémission partielle : protéinurie entre 0,5 et 3,5 g/g de créatine urinaire ; rémission totale : protéinurie < 0,5 g/g de créatine urinaire) et le taux circulant d'anticorps (IgG4) anti-PLA2R1 chez les patients atteints de GEM idiopathique.

Ces découvertes ont déjà permis de développer de nouveaux tests diagnostiques non invasifs permettant une meilleure prise en charge des malades [39, 40]. De plus, elles devraient contribuer à une meilleure classification des GEM et à une meilleure stratification des patients à risque. Enfin, elles pourraient ouvrir la voie vers des traitements plus spécifiques de la maladie, ciblant PLA2R1, les auto-anticorps et/ou leurs voies d'activation.

Conclusion et perspectives

PLA2R1 apparaît donc aujourd'hui comme un récepteur multifonctionnel capable d'exercer plusieurs fonctions

cytotoxiques, conduisant au dysfonctionnement des podocytes et au syndrome néphrotique.

Plusieurs études indiquent aujourd'hui que le titre des anticorps anti-PLA2R1 est corrélé à l'activité de la maladie (Figure 3) et serait prédictif de la sévérité du pronostic [32, 33]. Ainsi, il diminue sensiblement chez les patients en rémission spontanée ou induite par un traitement, et augmente lors de rechutes [32, 34]. De plus, les taux des anticorps anti-PLA2R1 circulants varient plus rapidement après un traitement immunosuppresseur que la protéinurie des patients, permettant de prédire la réponse au traitement et d'anticiper la rechute [34]. Ces observations pourraient s'avérer particulièrement intéressantes pour prédire les récurrences de GEM chez les patients transplantés [35], bien que l'apport du suivi des anticorps anti-PLA2R1 reste encore discuté [31, 36, 37]. Enfin, certains polymorphismes des gènes PLA2R1 et HLA-DQA1 confèrent un risque accru de développement d'une GEM idiopathique [38].

dans l'inflammation, le cancer et la GEM, une maladie auto-immune. Par ses différents domaines extracellulaires, il serait capable de lier différents types de ligands, comme les sPLA2, le collagène et certains sucres, mais l'importance relative de ces ligands dans ses effets biologiques reste à préciser. Il semble aussi que ses fonctions et ses propriétés de liaison dépendent de l'espèce, et ne sont pas systématiquement conservées de la souris à l'homme et *vice versa*. Ainsi, chez la souris, PLA2R1 jouerait un rôle dans l'inflammation qui semble associé à la liaison des sPLA2, mais une telle fonction, ainsi que la contribution des sPLA2, restent à valider chez l'homme. Inversement, son effet antitumoral et son rôle dans la GEM idiopathique ont d'abord été mis en évidence chez l'homme. Un rôle équivalent chez la

souris, notamment dans le cas de la GEM, et la contribution des sPLA2 ou des autres ligands de PLA2R1 dans ces effets, restent à démontrer. Nos travaux futurs devront prendre en compte cet état des lieux. Par exemple, au niveau fonctionnel, la mise en place d'un modèle animal de la GEM pourrait s'avérer délicate chez la souris puisque PLA2R1 est fortement exprimé dans le rein humain au sein des podocytes, mais pas dans le rein de souris, de rat ou de lapin, ce qui suggère une fonction rénale de PLA2R1 spécifique à l'homme. L'étude du rôle antitumoral de PLA2R1 chez la souris pourrait aussi être rendue difficile par les différences de liaison et d'expression observées entre les récepteurs dans les deux espèces. Il s'agira aussi de savoir dans quel contexte les patients atteints de GEM génèrent des auto-anticorps contre PLA2R1, et s'il existe un lien entre la fonction antitumorale de PLA2R1 et son dysfonctionnement dans les podocytes, après liaison des auto-anticorps de patients. Au niveau moléculaire, les travaux à venir auront pour but d'identifier les ligands endogènes du récepteur PLA2R1, notamment chez l'homme, et aussi d'identifier les partenaires moléculaires directs de PLA2R1, chez l'homme et la souris, lesquels pourraient être différents. Enfin, les propriétés de liaison et les effets en apparence complexes de PLA2R1 sont à mettre en regard de ce que l'on sait, ou plutôt de ce que l'on ne sait pas, pour ses paralogues MRC1 (*mannose receptor, C type 1*), MRC2 et LY75 (*lymphocyte antigen 75*). Leurs fonctions et leurs ligands sont, là aussi, loin d'être compris, aussi bien chez la souris que l'homme. Nonobstant cette complexité apparente et la place des sPLA2, premiers ligands de PLA2R1, ce dernier apparaît maintenant sous un jour nouveau, comme un acteur clé de la GEM idiopathique, cible directe d'auto-anticorps, et peut-être comme un nouveau gène antitumoral, ouvrant de nouvelles perspectives diagnostiques et thérapeutiques en santé publique. C'est déjà le cas pour la GEM, puisque le dosage des auto-anticorps améliore significativement la prise en charge des patients, et permet de mieux identifier leur maladie et de leur prescrire un traitement plus efficace. ♦

SUMMARY

New physiopathological roles for the PLA2R1 receptor in cancer and membranous nephropathy

PLA2R1 is a large transmembrane receptor of 180-kDa that belongs to the superfamily of C-type lectins. It was discovered because of its high affinity for secreted phospholipases A2 (sPLA2), enzymes that play a key role in lipid mediator synthesis. Early PLA2R1 physiological roles include the clearance of sPLA2 from the extracellular medium and/or promotion of their actions. Over the last four years, two independent studies suggested that PLA2R1 plays a role in cancer as a tumor gene suppressor and is the major target antigen of auto-immune antibodies involved in idiopathic membranous nephropathy, a severe human kidney disease. These novel findings shed light on PLA2R1 and pave the way for its use as a reliable biomarker and an attractive therapeutic target in these diseases. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier la fondation ARC pour la recherche sur le cancer, l'association pour la recherche internationale sur le cancer (AICR), et le ministère des Affaires sociales et de la santé (PHRC PRAM-KT) pour leur soutien financier. Nous remercions aussi le Dr. Damien Ambrosetti (service d'anatomopathologie du CHU de Nice) pour la figure d'immunomarquage de PLA2R1 dans le glomérule rénal humain et Nadège Parassol-Girard pour ses commentaires. Ce travail a bénéficié d'une aide de l'Agence nationale de la recherche au titre du programme Labex SIGNALIFE « investissements d'avenir » portant la référence ANR-11-LABX-0028-01.

RÉFÉRENCES

- Lambeau G, Lazdunski M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. *Trends Pharmacol Sci* 1999 ; 20 : 162-70.
- Ancian P, Lambeau G, Mattéi MG, Lazdunski M. The human 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2. Molecular cloning, identification of a secreted soluble form, expression, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 8963-70.
- Zvaritch E, Lambeau G, Lazdunski M. Endocytic properties of the M-type 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 250-7.
- East L, Isacke CM. The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2002 ; 1572 : 364-86.
- Higashino K, Yokota Y, Ono T, et al. Identification of a soluble form phospholipase A2 receptor as a circulating endogenous inhibitor for secretory phospholipase A2. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 13583-8.
- Lambeau G, Schmid-Alliana A, Lazdunski M, Barhanin J. Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A2 in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 9526-32.
- Cupillard L, Mulherkar R, Gomez N, et al. Both group IB and group IIA secreted phospholipases A2 are natural ligands of the mouse 180-kDa M-type receptor. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 7043-51.
- Lambeau G, Gelb MH. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu Rev Biochem* 2008 ; 77 : 495-520.
- Murakami M, Taketomi Y, Girard C, et al. Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: Lessons from transgenic and knockout mice. *Biochimie* 2010 ; 92 : 561-82.
- Rouault M, Le Calvez C, Boilard E, et al. Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor. *Biochemistry* 2007 ; 46 : 1647-62.
- Ancian P, Lambeau G, Lazdunski M. Multifunctional activity of the extracellular domain of the M-type (180 kDa) membrane receptor for secretory phospholipases A2. *Biochemistry* 1995 ; 34 : 13146-51.
- Nicolas J-P, Lambeau G, Lazdunski M. Identification of the binding domain for secretory phospholipases A2 on their M-type 180 kDa membrane receptor. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 28869-73.
- Hanasaki K, Arita H. Phospholipase A2 receptor: a regulator of biological functions of secretory phospholipase A2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002 ; 68-69 : 71-82.
- Fayard JM, Tessier C, Pageaux JF, et al. Nuclear location of PLA2-I in proliferative cells. *J Cell Sci* 1998 ; 111 : 985-94.
- Henderson WR, Jr, Chi EY, Bollinger JG, et al. Importance of group X-secreted phospholipase A2 in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model. *J Exp Med* 2007 ; 204 : 865-77.
- Tamaru S, Mishina H, Watanabe Y, et al. Deficiency of phospholipase A2 receptor exacerbates ovalbumin-induced lung inflammation. *J Immunol* 2013 ; 191 : 1021-8.
- Hanasaki K, Yokota Y, Ishizaki J, et al. Resistance to endotoxemic shock in phospholipase A2 receptor-deficient mice. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 32792-7.
- Yokota Y, Ikeda M, Higashino K, et al. Enhanced tissue expression and elevated circulating level of phospholipase A(2) receptor during murine endotoxemic shock. *Arch Biochem Biophys* 2000 ; 379 : 7-17.
- Augert A, Payré C, de Launoit Y, et al. The M-type receptor PLA2R regulates senescence through the p53 pathway. *EMBO Rep* 2009 ; 10 : 271-7.
- Collado M, Serrano M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 2010 ; 10 : 51-7.

RÉFÉRENCES

21. Kim HJ, Kim KS, Kim SH, *et al.* Induction of cellular senescence by secretory phospholipase A2 in human dermal fibroblasts through an ROS-mediated p53 pathway. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009 ; 64 : 351-62.
22. Vindrieux D, Augert A, Girard CA, *et al.* PLA2R1 mediates tumor suppression by activating JAK2. *Cancer Res* 2013 ; 73 : 6334-45.
23. Menschikowski M, Platzbecker U, Hagelgans A, *et al.* Aberrant methylation of the M-type phospholipase A2 receptor gene in leukemic cells. *BMC Cancer* 2012 ; 12 : 576.
24. Augert A, Vindrieux D, Girard CA, *et al.* PLA2R1 kills cancer cells by inducing mitochondrial stress. *Free Radic Biol Med* 2013 ; 65C : 969-77.
25. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Ann Rev Physiol* 2013 ; 75 : 685-705.
26. Ronco P, Debiec H. Pathogenesis of membranous nephropathy: recent advances and future challenges. *Nat Rev Nephrol* 2012 ; 8 : 203-13.
27. Ponticelli C, Glassock RJ. Glomerular diseases: membranous nephropathy - A modern view. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013 ; DOI : 10.2215/CJN.04160413.
28. Heymann W, Hackel DB, Harwood S, *et al.* Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions. *Proc Soc Exp Biol Med* 1959 ; 100 : 660-4.
29. Debiec H, Guignon V, Mougnot B, *et al.* Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral endopeptidase antibodies. *N Engl J Med* 2002 ; 346 : 2053-60.
30. Beck LH, Jr., Bonegio RG, Lambeau G, *et al.* M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2009 ; 361 : 11-21.
31. Debiec H, Ronco P. PLA2R autoantibodies and PLA2R glomerular deposits in membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2011 ; 364 : 689-90.
32. Hofstra JM, Beck LH, Jr., Beck DM, *et al.* Anti-phospholipase A2 receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011 ; 6 : 1286-91.
33. Kanigicherla D, Gummadova J, McKenzie EA, *et al.* Anti-PLA2R antibodies measured by ELISA predict long-term outcome in a prevalent population of patients with idiopathic membranous nephropathy. *Kidney Int* 2013 ; 83 : 940-8.
34. Beck LH, Jr., Fervenza FC, Beck DM, *et al.* Rituximab-induced depletion of anti-PLA2R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2011 ; 22 : 1543-50.
35. Rodriguez EF, Cosio FG, Nasr SH, *et al.* The pathology and clinical features of early recurrent membranous glomerulonephritis. *Am J Transplant* 2012 ; 12 : 1029-38.
36. Stahl R, Hoxha E, Fechner K. PLA2R autoantibodies and recurrent membranous nephropathy after transplantation. *N Engl J Med* 2010 ; 363 : 496-8.
37. Debiec H, Martin L, Jouanneau C, *et al.* Autoantibodies specific for the phospholipase A2 receptor in recurrent and de novo membranous nephropathy. *Am J Transplant* 2011 ; 11 : 2144-52.
38. Stanescu HC, Arcos-Burgos M, Medlar A, *et al.* Risk HLA-DQA1 and PLA2R1 alleles in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2011 ; 364 : 616-26.
39. Hofstra JM, Debiec H, Short CD, *et al.* Antiphospholipase A2 receptor antibody titer and subclass in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2012 ; 23 : 1735-43.
40. Dahnrich C, Komorowski L, Probst C, *et al.* Development of a standardized ELISA for the determination of autoantibodies against human M-type phospholipase A2 receptor in primary membranous nephropathy. *Clin Chim Acta* 2013 ; 421C : 213-8.
41. Ait-Oufella H, Mallat Z, Tedgui A. Lp-PLA2 et sPLA2 : biomarqueurs cardiovasculaires. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 526-31.
42. Bischof O, Dejean A, Pineau P. Une re-vue de la sénescence cellulaire. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 153-60.
43. Augert A, Bernard D. Les facteurs sécrétés associés à la sénescence. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 789-90.
44. Ronco P, Debiec H, Guignon V. Allo-immunisation fœto-maternelle anti-CD10. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 64-8.

TIRÉS À PART

G. Lambeau

**Services en
ADN plasmidique
et minicirculaire**

PlasmidFactory
The Minicircle Company

PlasmidFactory.com

5. Bibliographie :

- Abedi-Valugerdi, M., Hu, H., and Moller, G. (1997). Mercury-induced renal immune complex deposits in young (NZB x NZW)F1 mice: characterization of antibodies/autoantibodies. *Clinical and experimental immunology* 110, 86-91.
- Agmon-Levin, N., Arango, M.T., Kivity, S., Katzav, A., Gilburd, B., Blank, M., Tomer, N., Volkov, A., Barshack, I., Chapman, J., *et al.* (2014). Immunization with hepatitis B vaccine accelerates SLE-like disease in a murine model. *Journal of autoimmunity*.
- Ancian, P., Lambeau, G., and Lazdunski, M. (1995a). Multifunctional activity of the extracellular domain of the M-type (180 kDa) membrane receptor for secretory phospholipases A2. *Biochemistry* 34, 13146-13151.
- Ancian, P., Lambeau, G., Mattei, M.G., and Lazdunski, M. (1995b). The human 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2. Molecular cloning, identification of a secreted soluble form, expression, and chromosomal localization. *The Journal of biological chemistry* 270, 8963-8970.
- Aoki, V., Millikan, R.C., Rivitti, E.A., Hans-Filho, G., Eaton, D.P., Warren, S.J., Li, N., Hilario-Vargas, J., Hoffmann, R.G., Diaz, L.A., *et al.* (2004). Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research* 9, 34-40.
- Augert, A., Payre, C., de Launoit, Y., Gil, J., Lambeau, G., and Bernard, D. (2009). The M-type receptor PLA2R regulates senescence through the p53 pathway. *EMBO reports* 10, 271-277.
- Augert, A., Vindrieux, D., Girard, C.A., Le Calve, B., Gras, B., Ferrand, M., Bouchet, B.P., Puisieux, A., de Launoit, Y., Simonnet, H., *et al.* (2013). PLA2R1 kills cancer cells by inducing mitochondrial stress. *Free radical biology & medicine* 65, 969-977.
- Baker, P.J., Ochi, R.F., Schulze, M., Johnson, R.J., Campbell, C., and Couser, W.G. (1989). Depletion of C6 prevents development of proteinuria in experimental membranous nephropathy in rats. *The American journal of pathology* 135, 185-194.
- Bech, A.P., Hofstra, J.M., Brenchley, P.E., and Wetzels, J.F. (2014). Association of anti-PLA(2)R antibodies with outcomes after immunosuppressive therapy in idiopathic membranous nephropathy. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 9, 1386-1392.
- Beck, L.H., Jr. (2010). Membranous nephropathy and malignancy. *Seminars in nephrology* 30, 635-644.
- Beck, L.H., Jr., Bonegio, R.G., Lambeau, G., Beck, D.M., Powell, D.W., Cummins, T.D., Klein, J.B., and Salant, D.J. (2009). M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *The New England journal of medicine* 361, 11-21.
- Beck, L.H., Jr., Fervenza, F.C., Beck, D.M., Bonegio, R.G., Malik, F.A., Erickson, S.B., Cosio, F.G., Cattran, D.C., and Salant, D.J. (2011). Rituximab-induced depletion of anti-PLA2R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 22, 1543-1550.
- Behnert, A., Fritzler, M.J., Teng, B., Zhang, M., Bollig, F., Haller, H., Skoberne, A., Mahler, M., and Schiffer, M. (2013). An anti-phospholipase A2 receptor quantitative immunoassay and epitope analysis in membranous nephropathy reveals different antigenic domains of the receptor. *PloS one* 8, e61669.
- Berden, J.H. (1997). Lupus nephritis. *Kidney international* 52, 538-558.

Berg, A.L., and Arnadottir, M. (2004). ACTH-induced improvement in the nephrotic syndrome in patients with a variety of diagnoses. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 19, 1305-1307.

Berg, A.L., Nilsson-Ehle, P., and Arnadottir, M. (1999). Beneficial effects of ACTH on the serum lipoprotein profile and glomerular function in patients with membranous nephropathy. *Kidney international* 56, 1534-1543.

Bhinder, S., Singh, A., and Majithia, V. (2010). Membranous (class V) renal disease in systemic lupus erythematosus may be more common than previously reported: results of a 6-year retrospective analysis. *The American journal of the medical sciences* 339, 230-232.

Bockenhauer, D., Debiec, H., Sebire, N., Barratt, M., Warwicker, P., Ronco, P., and Kleta, R. (2008). Familial membranous nephropathy: an X-linked genetic susceptibility? *Nephron Clinical practice* 108, c10-15.

Bomback, A.S., and Appel, G.B. (2010). Updates on the treatment of lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21, 2028-2035.

Branten, A.J., du Buf-Vereijken, P.W., Klasen, I.S., Bosch, F.H., Feith, G.W., Hollander, D.A., and Wetzels, J.F. (2005). Urinary excretion of beta2-microglobulin and IgG predict prognosis in idiopathic membranous nephropathy: a validation study. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 16, 169-174.

Brenchley, P.E., Coupes, B., Short, C.D., O'Donoghue, D.J., Ballardie, F.W., and Mallick, N.P. (1992). Urinary C3dg and C5b-9 indicate active immune disease in human membranous nephropathy. *Kidney international* 41, 933-937.

Briganti, E.M., Dowling, J., Finlay, M., Hill, P.A., Jones, C.L., Kincaid-Smith, P.S., Sinclair, R., McNeil, J.J., and Atkins, R.C. (2001). The incidence of biopsy-proven glomerulonephritis in Australia. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 16, 1364-1367.

Briganti, E.M., Russ, G.R., McNeil, J.J., Atkins, R.C., and Chadban, S.J. (2002). Risk of renal allograft loss from recurrent glomerulonephritis. *The New England journal of medicine* 347, 103-109.

Cambier, J.F., and Ronco, P. (2012). Onco-nephrology: glomerular diseases with cancer. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 7, 1701-1712.

Cattran, D.C., Pei, Y., Greenwood, C.M., Ponticelli, C., Passerini, P., and Honkanen, E. (1997). Validation of a predictive model of idiopathic membranous nephropathy: its clinical and research implications. *Kidney international* 51, 901-907.

Coenen, M.J., Hofstra, J.M., Debiec, H., Stanescu, H.C., Medlar, A.J., Stengel, B., Boland-Auge, A., Groothuismink, J.M., Bockenhauer, D., Powis, S.H., *et al.* (2013). Phospholipase A2 receptor (PLA2R1) sequence variants in idiopathic membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 24, 677-683.

Costanza, M.E., Pinn, V., Schwartz, R.S., and Nathanson, L. (1973). Carcinoembryonic antigen-antibody complexes in a patient with colonic carcinoma and nephrotic syndrome. *The New England journal of medicine* 289, 520-522.

Couser, W.G., and Salant, D.J. (1980). In situ immune complex formation and glomerular injury. *Kidney international* 17, 1-13.

Couser, W.G., Wagonfeld, J.B., Spargo, B.H., and Lewis, E.J. (1974). Glomerular deposition of tumor antigen in membranous nephropathy associated with colonic carcinoma. *The American journal of medicine* 57, 962-970.

Cravedi, P., Ruggenenti, P., and Remuzzi, G. (2010). Low-dose rituximab for posttransplant recurrent membranous nephropathy. *American journal of*

transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 10, 1336.

Cybulsky, A.V., Quigg, R.J., and Salant, D.J. (1986a). The membrane attack complex in complement-mediated glomerular epithelial cell injury: formation and stability of C5b-9 and C5b-7 in rat membranous nephropathy. *Journal of immunology* 137, 1511-1516.

Cybulsky, A.V., Rennke, H.G., Feintzeig, I.D., and Salant, D.J. (1986b). Complement-induced glomerular epithelial cell injury. Role of the membrane attack complex in rat membranous nephropathy. *The Journal of clinical investigation* 77, 1096-1107.

Dabade, T.S., Grande, J.P., Norby, S.M., Fervenza, F.C., and Cosio, F.G. (2008). Recurrent idiopathic membranous nephropathy after kidney transplantation: a surveillance biopsy study. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 8, 1318-1322.

Dahnrich, C., Komorowski, L., Probst, C., Seitz-Polski, B., Esnault, V., Wetzels, J.F., Hofstra, J.M., Hoxha, E., Stahl, R.A., Lambeau, G., *et al.* (2013). Development of a standardized ELISA for the determination of autoantibodies against human M-type phospholipase A2 receptor in primary membranous nephropathy. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 421, 213-218.

Debiec, H., Guigonis, V., Mougnot, B., Decobert, F., Haymann, J.P., Bensman, A., Deschenes, G., and Ronco, P.M. (2002). Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral endopeptidase antibodies. *The New England journal of medicine* 346, 2053-2060.

Debiec, H., Lefeu, F., Kemper, M.J., Niaudet, P., Deschenes, G., Remuzzi, G., Ulinski, T., and Ronco, P. (2011a). Early-childhood membranous nephropathy due to cationic bovine serum albumin. *The New England journal of medicine* 364, 2101-2110.

Debiec, H., Martin, L., Jouanneau, C., Dautin, G., Mesnard, L., Rondeau, E., Mousson, C., and Ronco, P. (2011b). Autoantibodies specific for the phospholipase A2 receptor in recurrent and De Novo membranous nephropathy. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 11, 2144-2152.

Debiec, H., and Ronco, P. (2011). PLA2R autoantibodies and PLA2R glomerular deposits in membranous nephropathy. *The New England journal of medicine* 364, 689-690.

Debiec, H., Valayannopoulos, V., Boyer, O., Noel, L.H., Callard, P., Sarda, H., de Lonlay, P., Niaudet, P., and Ronco, P. (2014). Allo-immune membranous nephropathy and recombinant aryl sulfatase replacement therapy: a need for tolerance induction therapy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 25, 675-680.

East, L., and Isacke, C.M. (2002). The mannose receptor family. *Biochimica et biophysica acta* 1572, 364-386.

El-Zoghby, Z.M., Grande, J.P., Fraile, M.G., Norby, S.M., Fervenza, F.C., and Cosio, F.G. (2009). Recurrent idiopathic membranous nephropathy: early diagnosis by protocol biopsies and treatment with anti-CD20 monoclonal antibodies. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9, 2800-2807.

Fervenza, F.C., Cosio, F.G., Erickson, S.B., Specks, U., Herzenberg, A.M., Dillon, J.J., Leung, N., Cohen, I.M., Wochos, D.N., Bergstralh, E., *et al.* (2008). Rituximab treatment of idiopathic membranous nephropathy. *Kidney international* 73, 117-125.

Fresquet, M., Jowitt, T.A., Gummado, J., Collins, R., O'Cualain, R., McKenzie, E.A., Lennon, R., and Brenchley, P.E. (2014). Identification of a Major Epitope Recognized by PLA2R Autoantibodies in Primary Membranous Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*.

Glaser, K.B., Mobilio, D., Chang, J.Y., and Senko, N. (1993). Phospholipase A2 enzymes: regulation and inhibition. *Trends in pharmacological sciences* 14, 92-98.

Glasscock, R.J. (2009). Human idiopathic membranous nephropathy--a mystery solved? *The New England journal of medicine* 361, 81-83.

Gunnarsson, I., Schlumberger, W., and Ronnelid, J. (2012). Antibodies to M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) and membranous lupus nephritis. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 59, 585-586.

Haas, M. (1994). IgG subclass deposits in glomeruli of lupus and nonlupus membranous nephropathies. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 23, 358-364.

Haggqvist, B., and Hultman, P. (2003). Effects of deviating the Th2-response in murine mercury-induced autoimmunity towards a Th1-response. *Clinical and experimental immunology* 134, 202-209.

Hanasaki, K., and Arita, H. (2002). Phospholipase A2 receptor: a regulator of biological functions of secretory phospholipase A2. *Prostaglandins & other lipid mediators* 68-69, 71-82.

Hanasaki, K., Yokota, Y., Ishizaki, J., Itoh, T., and Arita, H. (1997). Resistance to endotoxic shock in phospholipase A2 receptor-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* 272, 32792-32797.

Henderson, W.R., Jr., Chi, E.Y., Bollinger, J.G., Tien, Y.T., Ye, X., Castelli, L., Rubtsov, Y.P., Singer, A.G., Chiang, G.K., Nevalainen, T., *et al.* (2007). Importance of group X-secreted phospholipase A2 in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model. *The Journal of experimental medicine* 204, 865-877.

Heymann, W., Hackel, D.B., Harwood, S., Wilson, S.G., and Hunter, J.L. (1959). Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 100, 660-664.

Higashino Ki, K., Yokota, Y., Ono, T., Kamitani, S., Arita, H., and Hanasaki, K. (2002). Identification of a soluble form phospholipase A2 receptor as a circulating endogenous inhibitor for secretory phospholipase A2. *The Journal of biological chemistry* 277, 13583-13588.

Hofstra, J.M., Debiec, H., Short, C.D., Pelle, T., Kleta, R., Mathieson, P.W., Ronco, P., Brenchley, P.E., and Wetzels, J.F. (2012). Antiphospholipase A2 receptor antibody titer and subclass in idiopathic membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 23, 1735-1743.

Horikoshi, T., Tamura, J., Kaneko, Y., Maezawa, A., Kanai, H., Kaji, T., Matsushima, T., Sawamura, M., Murakami, H., Yano, S., *et al.* (1993). Membranous nephropathy associated with chronic thyroiditis. *Nephron* 63, 246.

Howard, L.M., Miga, A.J., Vanderlugt, C.L., Dal Canto, M.C., Laman, J.D., Noelle, R.J., and Miller, S.D. (1999). Mechanisms of immunotherapeutic intervention by anti-CD40L (CD154) antibody in an animal model of multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation* 103, 281-290.

Hoxha, E., Harendza, S., Zahner, G., Panzer, U., Steinmetz, O., Fechner, K., Helmchen, U., and Stahl, R.A. (2011). An immunofluorescence test for phospholipase-A(2)-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 26, 2526-2532.

Hoxha, E., Thiele, I., Zahner, G., Panzer, U., Harendza, S., and Stahl, R.A. (2014). Phospholipase A2 receptor autoantibodies and clinical outcome in patients with primary

membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 25, 1357-1366.

Hua, J., Pelletier, L., Berlin, M., and Druet, P. (1993). Autoimmune glomerulonephritis induced by mercury vapour exposure in the Brown Norway rat. *Toxicology* 79, 119-129.

Huang, C.C., Lehman, A., Albawardi, A., Satoskar, A., Brodsky, S., Nadasdy, G., Hebert, L., Rovin, B., and Nadasdy, T. (2013). IgG subclass staining in renal biopsies with membranous glomerulonephritis indicates subclass switch during disease progression. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 26, 799-805.

Hurtado, A., and Johnson, R.J. (2005). Hygiene hypothesis and prevalence of glomerulonephritis. *Kidney international Supplement*, S62-67.

Illies, F., Wingen, A.M., Bald, M., and Hoyer, P.F. (2004). Autoimmune thyroiditis in association with membranous nephropathy. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 17, 99-104.

Kalaaji, M., Fenton, K.A., Mortensen, E.S., Olsen, R., Sturfelt, G., Alm, P., and Rekvig, O.P. (2007). Glomerular apoptotic nucleosomes are central target structures for nephritogenic antibodies in human SLE nephritis. *Kidney international* 71, 664-672.

Kalaaji, M., Mortensen, E., Jorgensen, L., Olsen, R., and Rekvig, O.P. (2006). Nephritogenic lupus antibodies recognize glomerular basement membrane-associated chromatin fragments released from apoptotic intraglomerular cells. *The American journal of pathology* 168, 1779-1792.

Kanigicherla, D., Gummadova, J., McKenzie, E.A., Roberts, S.A., Harris, S., Nikam, M., Poulton, K., McWilliam, L., Short, C.D., Venning, M., *et al.* (2013). Anti-PLA2R antibodies measured by ELISA predict long-term outcome in a prevalent population of patients with idiopathic membranous nephropathy. *Kidney international* 83, 940-948.

Kao, L., Lam, V., Waldman, M., Glassock, R.J., and Zhu, Q. (2014). Identification of the Immunodominant Epitope Region in Phospholipase A2 Receptor-Mediating Autoantibody Binding in Idiopathic Membranous Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*.

Kini, R.M., and Evans, H.J. (1989). A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 27, 613-635.

Koch, P.J., Mahoney, M.G., Ishikawa, H., Pulkkinen, L., Uitto, J., Shultz, L., Murphy, G.F., Whitaker-Menezes, D., and Stanley, J.R. (1997). Targeted disruption of the pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) gene in mice causes loss of keratinocyte cell adhesion with a phenotype similar to pemphigus vulgaris. *The Journal of cell biology* 137, 1091-1102.

Kramers, C., Hylkema, M.N., van Bruggen, M.C., van de Lagemaat, R., Dijkman, H.B., Assmann, K.J., Smeenk, R.J., and Berden, J.H. (1994). Anti-nucleosome antibodies complexed to nucleosomal antigens show anti-DNA reactivity and bind to rat glomerular basement membrane in vivo. *The Journal of clinical investigation* 94, 568-577.

Kuroki, A., Iyoda, M., Shibata, T., and Sugisaki, T. (2005). Th2 cytokines increase and stimulate B cells to produce IgG4 in idiopathic membranous nephropathy. *Kidney international* 68, 302-310.

Kuroki, A., Shibata, T., Honda, H., Totsuka, D., Kobayashi, K., and Sugisaki, T. (2002). Glomerular and serum IgG subclasses in diffuse proliferative lupus nephritis, membranous lupus nephritis, and idiopathic membranous nephropathy. *Internal medicine* 41, 936-942.

Lambeau, G., Ancian, P., Barhanin, J., and Lazdunski, M. (1994). Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipases A2. *The Journal of biological chemistry* 269, 1575-1578.

Lambeau, G., Barhanin, J., and Lazdunski, M. (1991a). Identification of different receptor types for toxic phospholipases A2 in rabbit skeletal muscle. *FEBS letters* 293, 29-33.

Lambeau, G., Barhanin, J., Schweitz, H., Qar, J., and Lazdunski, M. (1989). Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom. *The Journal of biological chemistry* 264, 11503-11510.

Lambeau, G., and Gelb, M.H. (2008). Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annual review of biochemistry* 77, 495-520.

Lambeau, G., Lazdunski, M., and Barhanin, J. (1991b). Properties of receptors for neurotoxic phospholipases A2 in different tissues. *Neurochemical research* 16, 651-658.

Lambeau, G., Schmid-Alliana, A., Lazdunski, M., and Barhanin, J. (1990). Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A2 in skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry* 265, 9526-9532.

Lefaucheur, C., Stengel, B., Nochy, D., Martel, P., Hill, G.S., Jacquot, C., Rossert, J., and Group, G.-P.S. (2006). Membranous nephropathy and cancer: Epidemiologic evidence and determinants of high-risk cancer association. *Kidney international* 70, 1510-1517.

Li, N., Aoki, V., Hans-Filho, G., Rivitti, E.A., and Diaz, L.A. (2003). The role of intramolecular epitope spreading in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *The Journal of experimental medicine* 197, 1501-1510.

Li, S.J., Zhang, S.H., Chen, H.P., Zeng, C.H., Zheng, C.X., Li, L.S., and Liu, Z.H. (2010). Mercury-induced membranous nephropathy: clinical and pathological features. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 5, 439-444.

Liao, M.T., Chang, M.H., Lin, F.G., Tsai, I.J., Chang, Y.W., and Tsau, Y.K. (2011). Universal hepatitis B vaccination reduces childhood hepatitis B virus-associated membranous nephropathy. *Pediatrics* 128, e600-604.

Lionaki, S., Derebail, V.K., Hogan, S.L., Barbour, S., Lee, T., Hladunewich, M., Greenwald, A., Hu, Y., Jennette, C.E., Jennette, J.C., *et al.* (2012). Venous thromboembolism in patients with membranous nephropathy. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 7, 43-51.

Makker, S.P., and Singh, A.K. (1984). Characterization of the antigen (gp600) of Heymann nephritis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 50, 287-293.

Mannik, M., Stapleton, S.A., Burns, M.W., Alpers, C.E., and Gauthier, V.J. (1991). Glomerular subendothelial and subepithelial immune complexes, containing the same antigen, are removed at different rates. *Clinical and experimental immunology* 84, 367-372.

Monga, G., Mazzucco, G., Basolo, B., Quaranta, S., Motta, M., Segoloni, G., and Amoroso, A. (1993). Membranous glomerulonephritis (MGN) in transplanted kidneys: morphologic investigation on 256 renal allografts. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 6, 249-258.

Moodie, F.D., Leaker, B., Cambridge, G., Totty, N.F., and Segal, A.W. (1993). Alpha-enolase: a novel cytosolic autoantigen in ANCA positive vasculitis. *Kidney international* 43, 675-681.

Moroni, G., Gallelli, B., Quaglini, S., Leoni, A., Banfi, G., Passerini, P., Montagnino, G., and Messa, P. (2010). Long-term outcome of renal transplantation in patients with idiopathic membranous glomerulonephritis (MN). *Nephrology, dialysis, transplantation : official*

publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association 25, 3408-3415.

Mukherjee, A.B., Cordella-Miele, E., and Miele, L. (1992). Regulation of extracellular phospholipase A2 activity: implications for inflammatory diseases. *DNA and cell biology* 11, 233-243.

Mulay, A.V., van Walraven, C., and Knoll, G.A. (2009). Impact of immunosuppressive medication on the risk of renal allograft failure due to recurrent glomerulonephritis. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 9, 804-811.

Murakami, M., Taketomi, Y., Girard, C., Yamamoto, K., and Lambeau, G. (2010). Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: Lessons from transgenic and knockout mice. *Biochimie* 92, 561-582.

Murtas, C., Bruschi, M., Candiano, G., Moroni, G., Magistrini, R., Magnano, A., Bruno, F., Radice, A., Furci, L., Argentiero, L., *et al.* (2012). Coexistence of different circulating anti-podocyte antibodies in membranous nephropathy. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 7, 1394-1400.

Nakajima, M., Hanasaki, K., Ueda, M., and Arita, H. (1992). Effect of pancreatic type phospholipase A2 on isolated porcine cerebral arteries via its specific binding sites. *FEBS letters* 309, 261-264.

Nawaz, F.A., Larsen, C.P., and Troxell, M.L. (2013). Membranous nephropathy and nonsteroidal anti-inflammatory agents. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 62, 1012-1017.

Nicolas, J.P., Lambeau, G., and Lazdunski, M. (1995). Identification of the binding domain for secretory phospholipases A2 on their M-type 180-kDa membrane receptor. *The Journal of biological chemistry* 270, 28869-28873.

O'Regan, S., Smith, M., and Drummond, K.N. (1976). Antigens in human immune complex nephritis. *Clinical nephrology* 6, 417-421.

Oleinikov, A.V., Feliz, B.J., and Makker, S.P. (2000). A small N-terminal 60-kD fragment of gp600 (megalin), the major autoantigen of active Heymann nephritis, can induce a full-blown disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 11, 57-64.

Ponticelli, C., Passerini, P., Salvadori, M., Manno, C., Viola, B.F., Pasquali, S., Mandolfo, S., and Messa, P. (2006). A randomized pilot trial comparing methylprednisolone plus a cytotoxic agent versus synthetic adrenocorticotrophic hormone in idiopathic membranous nephropathy. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 47, 233-240.

Prunotto, M., Carnevali, M.L., Candiano, G., Murtas, C., Bruschi, M., Corradini, E., Trivelli, A., Magnasco, A., Petretto, A., Santucci, L., *et al.* (2010). Autoimmunity in membranous nephropathy targets aldose reductase and SOD2. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21, 507-519.

Pruzanski, W., and Vadas, P. (1991). Phospholipase A2--a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunology today* 12, 143-146.

Pumphrey, R. (1986). Computer models of the human immunoglobulins shape and segmental flexibility. *Immunology today* 7, 174-178.

Qin, W., Beck, L.H., Jr., Zeng, C., Chen, Z., Li, S., Zuo, K., Salant, D.J., and Liu, Z. (2011). Anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 22, 1137-1143.

Radhakrishnan, J., and Cattran, D.C. (2012). The KDIGO practice guideline on glomerulonephritis: reading between the (guide)lines--application to the individual patient. *Kidney international* 82, 840-856.

Raychowdhury, R., Niles, J.L., McCluskey, R.T., and Smith, J.A. (1989). Autoimmune target in Heymann nephritis is a glycoprotein with homology to the LDL receptor. *Science* 244, 1163-1165.

Remuzzi, G., Chiurciu, C., Abbate, M., Brusegan, V., Bontempelli, M., and Ruggenenti, P. (2002). Rituximab for idiopathic membranous nephropathy. *Lancet* 360, 923-924.

Roth, A.J., Ooi, J.D., Hess, J.J., van Timmeren, M.M., Berg, E.A., Poulton, C.E., McGregor, J., Burkart, M., Hogan, S.L., Hu, Y., *et al.* (2013). Epitope specificity determines pathogenicity and detectability in ANCA-associated vasculitis. *The Journal of clinical investigation* 123, 1773-1783.

Rouault, M., Le Calvez, C., Boilard, E., Surrel, F., Singer, A., Ghomashchi, F., Bezzine, S., Scarzello, S., Bollinger, J., Gelb, M.H., *et al.* (2007). Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor. *Biochemistry* 46, 1647-1662.

Sabbaga, J., Pankewycz, O.G., Lufft, V., Schwartz, R.S., and Madaio, M.P. (1990). Cross-reactivity distinguishes serum and nephritogenic anti-DNA antibodies in human lupus from their natural counterparts in normal serum. *Journal of autoimmunity* 3, 215-235.

Saeed, M., Beggs, M.L., Walker, P.D., and Larsen, C.P. (2014). PLA2R-associated membranous glomerulopathy is modulated by common variants in PLA2R1 and HLA-DQA1 genes. *Genes and immunity*.

Saito, A., Pietromonaco, S., Loo, A.K., and Farquhar, M.G. (1994). Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 9725-9729.

Salant, D.J., Belok, S., Madaio, M.P., and Couser, W.G. (1980). A new role for complement in experimental membranous nephropathy in rats. *The Journal of clinical investigation* 66, 1339-1350.

Schieppati, A., Mosconi, L., Perna, A., Mecca, G., Bertani, T., Garattini, S., and Remuzzi, G. (1993). Prognosis of untreated patients with idiopathic membranous nephropathy. *The New England journal of medicine* 329, 85-89.

Seitz-Polski, B., Payre, C., Ambrosetti, D., Albano, L., Cassuto-Viguier, E., Berguignat, M., Jeribi, A., Thouret, M.C., Bernard, G., Benzaken, S., *et al.* (2014). Prediction of membranous nephropathy recurrence after transplantation by monitoring of anti-PLA2R1 (M-type phospholipase A2 receptor) autoantibodies: a case series of 15 patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*.

Shah, P., Tramontano, A., and Makker, S.P. (2007). Intramolecular epitope spreading in Heymann nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18, 3060-3066.

Shima, Y., Nakanishi, K., Togawa, H., Obana, M., Sako, M., Miyawaki, M., Nozu, K., Iijima, K., and Yoshikawa, N. (2009). Membranous nephropathy associated with thyroid-peroxidase antigen. *Pediatric nephrology* 24, 605-608.

Simon, P., Ramee, M.P., Autuly, V., Laruelle, E., Charasse, C., Cam, G., and Ang, K.S. (1994). Epidemiology of primary glomerular diseases in a French region. Variations according to period and age. *Kidney international* 46, 1192-1198.

Simon, P., Ramee, M.P., Boulahrouz, R., Stanescu, C., Charasse, C., Ang, K.S., Leonetti, F., Cam, G., Laruelle, E., Autuly, V., *et al.* (2004). Epidemiologic data of primary glomerular diseases in western France. *Kidney international* 66, 905-908.

Skoberne, A., Behnert, A., Teng, B., Fritzler, M.J., Schiffer, L., Pajek, J., Lindic, J., Haller, H., and Schiffer, M. (2014). Serum with phospholipase A2 receptor autoantibodies

interferes with podocyte adhesion to collagen. *European journal of clinical investigation* 44, 753-765.

Sommers, C.D., Bobbitt, J.L., Bemis, K.G., and Snyder, D.W. (1992). Porcine pancreatic phospholipase A2-induced contractions of guinea pig lung pleural strips. *European journal of pharmacology* 216, 87-96.

Song, Y.S., Min, K.W., Kim, J.H., Kim, G.H., and Park, M.H. (2012). Differential diagnosis of lupus and primary membranous nephropathies by IgG subclass analysis. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 7, 1947-1955.

Sprangers, B., Lefkowitz, G.I., Cohen, S.D., Stokes, M.B., Valeri, A., Appel, G.B., and Kunis, C.L. (2010). Beneficial effect of rituximab in the treatment of recurrent idiopathic membranous nephropathy after kidney transplantation. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 5, 790-797.

Stahl, R., Hoxha, E., and Fechner, K. (2010). PLA2R autoantibodies and recurrent membranous nephropathy after transplantation. *The New England journal of medicine* 363, 496-498.

Stanescu, H.C., Arcos-Burgos, M., Medlar, A., Bockenhauer, D., Kottgen, A., Dragomirescu, L., Voinescu, C., Patel, N., Pearce, K., Hubank, M., *et al.* (2011). Risk HLA-DQA1 and PLA(2)R1 alleles in idiopathic membranous nephropathy. *The New England journal of medicine* 364, 616-626.

Svobodova, B., Honsova, E., Ronco, P., Tesar, V., and Debiec, H. (2013). Kidney biopsy is a sensitive tool for retrospective diagnosis of PLA2R-related membranous nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 28, 1839-1844.

Swaminathan, S., Leung, N., Lager, D.J., Melton, L.J., 3rd, Bergstralh, E.J., Rohlinger, A., and Fervenza, F.C. (2006). Changing incidence of glomerular disease in Olmsted County, Minnesota: a 30-year renal biopsy study. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 1, 483-487.

Tamaru, S., Mishina, H., Watanabe, Y., Watanabe, K., Fujioka, D., Takahashi, S., Suzuki, K., Nakamura, T., Obata, J.E., Kawabata, K., *et al.* (2013). Deficiency of phospholipase A2 receptor exacerbates ovalbumin-induced lung inflammation. *Journal of immunology* 191, 1021-1028.

Tang, S., and Lai, K.N. (2006). Hepatitis B-related membranous nephropathy should be treated with a specific anti-viral agent. *Kidney international* 70, 818.

Terrier, B., Degand, N., Guilpain, P., Servettaz, A., Guillevin, L., and Mouthon, L. (2007). Alpha-enolase: a target of antibodies in infectious and autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews* 6, 176-182.

Timmermans, S.A., Ayalon, R., van Paassen, P., Beck, L.H., Jr., van Rie, H., Wirtz, J.J., Verseput, G.H., Frenken, L.A., Salant, D.J., Cohen Tervaert, J.W., *et al.* (2013). Anti-phospholipase A2 receptor antibodies and malignancy in membranous nephropathy. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 62, 1223-1225.

Tramontano, A., and Makker, S.P. (2004). Conformation and glycosylation of a megalin fragment correlate with nephritogenicity in Heymann nephritis. *Journal of immunology* 172, 2367-2373.

Vadas, P., Keystone, J., Stefanski, E., Scott, K., and Pruzanski, W. (1992). Induction of circulating group II phospholipase A2 expression in adults with malaria. *Infection and immunity* 60, 3928-3931.

Vadas, P., and Pruzanski, W. (1986). Role of secretory phospholipases A2 in the pathobiology of disease. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 55, 391-404.

Vadas, P., Pruzanski, W., Kim, J., and Fornasier, V. (1989). The proinflammatory effect of intra-articular injection of soluble human and venom phospholipase A2. *The American journal of pathology* 134, 807-811.

Vadas, P., Wasi, S., Movat, H.Z., and Hay, J.B. (1981). Extracellular phospholipase A2 mediates inflammatory hyperaemia. *Nature* 293, 583-585.

van den Brand, J.A., Hofstra, J.M., and Wetzels, J.F. (2012). Prognostic value of risk score and urinary markers in idiopathic membranous nephropathy. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 7, 1242-1248.

Vindrieux, D., Augert, A., Girard, C.A., Gitenay, D., Lallet-Daher, H., Wiel, C., Le Calve, B., Gras, B., Ferrand, M., Verbeke, S., *et al.* (2013). PLA2R1 mediates tumor suppression by activating JAK2. *Cancer research* 73, 6334-6345.

Warren, S.J., Arteaga, L.A., Rivitti, E.A., Aoki, V., Hans-Filho, G., Qaqish, B.F., Lin, M.S., Giudice, G.J., and Diaz, L.A. (2003). The role of subclass switching in the pathogenesis of endemic pemphigus foliaceus. *The Journal of investigative dermatology* 120, 104-108.

Weening, J.J., D'Agati, V.D., Schwartz, M.M., Seshan, S.V., Alpers, C.E., Appel, G.B., Balow, J.E., Bruijn, J.A., Cook, T., Ferrario, F., *et al.* (2004). The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney international* 65, 521-530.

Woo, K.T., Chan, C.M., Mooi, C.Y., H., L.C., Tan, H.K., Foo, M., Lee, G.S., Anantharaman, V., Lim, C.H., Tan, C.C., *et al.* (2010). The changing pattern of primary glomerulonephritis in Singapore and other countries over the past 3 decades. *Clinical nephrology* 74, 372-383.

Wu, C.C., Lu, K.C., Lin, Y.F., Chen, J.S., Huang, C.F., Chen, C.C., Lin, S.H., Chu, P., and Sytwu, H.K. (2012). Pathogenic role of effector cells and immunoglobulins in cationic bovine serum albumin-induced membranous nephropathy. *Journal of clinical immunology* 32, 138-149.

Yokota, Y., Ikeda, M., Higashino, K., Nakano, K., Fujii, N., Arita, H., and Hanasaki, K. (2000). Enhanced tissue expression and elevated circulating level of phospholipase A(2) receptor during murine endotoxic shock. *Archives of biochemistry and biophysics* 379, 7-17.

Zhang, X., Liu, S., Tang, L., Wu, J., Chen, P., Yin, Z., Li, M., Xie, Y., Cai, G., Wei, R., *et al.* (2014). Analysis of pathological data of renal biopsy at one single center in China from 1987 to 2012. *Chinese medical journal* 127, 1715-1720.

Zvaritch, E., Lambeau, G., and Lazdunski, M. (1996). Endocytic properties of the M-type 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2. *The Journal of biological chemistry* 271, 250-257.

Résumé

La Glomérulonéphrite extra-membraneuse est une maladie auto-immune rare mais grave qui conduit dans 30% des cas à une insuffisance rénale chronique terminale nécessitant le recours à la dialyse ou la greffe rénale. Dans les suites d'une greffe, la GEM récidive dans 30 à 40% des cas. En 2009, l'équipe du Pr. Salant en collaboration avec notre équipe a montré que 70% des patients présentant une GEM étaient porteurs d'anticorps (Ac) dirigés contre le récepteur des phospholipases A2 (PLA2R1). Le titre d'anticorps est corrélé à l'activité de la maladie. Il n'existe actuellement aucun biomarqueur permettant de prédire l'évolution de la fonction rénale d'un patient lors de sa prise en charge : dans 30% des cas les patients présentent une rémission spontanée sans traitement immunosuppresseur. Le traitement de la GEM repose sur un traitement symptomatique et une ré-évaluation après 6 mois. En cas de maladie active persistante, il faut débiter un traitement immunosuppresseur. Dans les formes graves, cette période d'observation de 6 mois peut être à l'origine de lésions irréversibles.

Nous avons validé un test ELISA permettant de quantifier les Ac anti-PLA2R1 au cours du suivi de patients porteurs d'une GEM. Ce test nous a permis de montrer sur une cohorte de 15 patients greffés dans les suites d'une GEM qu'un titre d'Ac anti-PLA2R1 persistant après la greffe était associé à un risque de récurrence de la maladie sur le greffon.

Nous avons ensuite produit dans des cellules HEK les orthologues de PLA2R1 (les récepteurs humain, lapin et murin). Nous avons montré que 100% des patients reconnaissent le récepteur humain et de lapin mais seulement un patient sur 2 reconnaît le récepteur de souris, ce qui suppose qu'il existe plusieurs épitopes reconnus et partiellement conservés entre les 3 espèces. Nous avons mis en évidence que les patients qui reconnaissent le récepteur de souris ont une moins bonne survie rénale à 3 ans, suggérant que les anticorps reconnaissant les épitopes conservés de l'homme à la souris sont associés à des formes de mauvais pronostic. Pour confirmer ce résultat, nous avons produit dans des cellules HEK293 9 mutants de PLA2R1 par délétion successive des 10 domaines extracellulaires. Nous avons mis en évidence que les Ac de patients reconnaissent au moins 3 domaines différents de PLA2R1. Nous avons montré qu'un épitope situé en position N-terminale est associé à des formes peu actives, de bon pronostic, et qu'il existe aussi des passages d'une forme active à une forme quiescente et inversement, associées à une modification du profil épitopique définissant ainsi un «étalement intra-moléculaire des épitopes», associé à une aggravation de la maladie.

Enfin, j'ai participé à l'identification d'un deuxième auto-antigène, THSD7A, associé à 5 à 10% des cas de GEM.

Ces travaux nous ont permis d'identifier un sous-groupe de patients porteurs d'une GEM avec Ac anti-PLA2R1 et à risque de développer une insuffisance rénale qui nécessiterait un recours précoce à un traitement immunosuppresseur. Nous avons débuté une étude prospective pour confirmer ces résultats et poursuivre l'identification moléculaire des épitopes impliqués. Nous souhaitons confirmer le rôle pathogène des Ac anti-PLA2R1 sur des lignées podocytaires.

Nous souhaitons également mettre au point un test ELISA permettant le dosage des anticorps anti-THSD7A afin de confirmer, comme pour les Ac anti-PLA2R1, leur association à des maladies actives ou des formes récidivantes en transplantation rénale ainsi que leur rôle pathogène dans un modèle cellulaire ou animal.

Abstract

Membranous Nephropathy (MN) is a major cause of nephrotic syndrome in adults. It is a rare but severe kidney disease with different etiologies and outcomes. In most cases (85%), the disease is idiopathic (iMN) and has an autoimmune origin. One third of patients develop end-stage kidney disease and are on kidney transplant waiting list. MN recurred in 30% after transplantation. Another third enter in spontaneous remission under renin-angiotensin system blockade. The treatment of iMN is controversial. KDIGO guidelines recommend a supportive symptomatic treatment with RAS-blockade and diuretics in all patients with iMN, and immunosuppressive therapy in case of renal function deterioration or persistent nephrotic syndrome. Therefore, immunosuppressive treatments are often started only after significant and potentially irreversible complications. No biological markers can predict clinical outcome and orient therapy.

A major breakthrough was the discovery of autoantibodies to the phospholipase A2 receptor (PLA2R1, 180 kDa) in 70% of iMN patients in 2009, which has now allowed to develop diagnosis and prognosis tests for better medical care. During my PhD, I have first participated to the development of an ELISA which is now commercially available. I then used this latter to demonstrate that persistent anti-PLA2R1 activity can predict iMN recurrence after transplantation in a retrospective cohort of 15 patients.

We then screened 50 patients with iMN on native kidney for their cross-reactivity to human (h), rabbit (rb) and mouse (m) PLA2R1 by western blot (WB) and antigen-specific ELISAs. All iMN patients positive on hPLA2R1 were highly to weakly positive on rbPLA2R1 but only a maximum of 78% were positive on mPLA2R1, indicating that iMN patients exhibit different subsets of anti-PLA2R1 antibodies against epitopes that are shared or not among the three PLA2R1 orthologs. In a retrospective cohort of 41 patients with a mean follow-up of 42 months from anti-PLA2R1 assay, we demonstrated that the detection of anti-mPLA2R1 antibodies was an independent predictor of clinical outcome.

We then screened the reactivity of the 50 iMN patients on a series of PLA2R1 deletion mutants covering its ten extracellular domains. We confirmed the presence of several epitopes in the CysR, CTLD1 and CTLD7 domains and stratified the cohort into three subgroups of 12, 11 and 27 patients, according to their epitope profiles. When recognition was restricted to CysR, the disease was less active with more spontaneous remission and better renal survival. A stable epitope profile during follow-up was associated with the same disease activity. Conversely, an epitope profile spreading during follow-up from CysR to CTLD7 was associated with disease worsening whereas a reverse spreading from CTLD1/CTLD7 profiles to CysR was associated with favorable outcome.

Finally, I participated to the discovery of THSD7A as a second autoantigen involved in iMN, with circulating autoantibodies against THSD7A in 5-10% of patients, with all of these latters negative for anti-PLA2R1, thus defining a novel subgroup of iMN patients.

Together, my PhD studies have led to the identification of new prognosis and diagnosis markers for iMN that should now be validated in larger and prospective cohorts of patients. The pathogenic effects of anti-PLA2R1 and anti-THSD7A autoantibodies remain to be addressed using cellular and animal models of iMN disease.

Keywords: Membranous Nephropathy, anti-PLA2R1 antibodies, epitopes