HAL
open science

Une étude translationnelle de la néphropathie à IgA de l'enfant : des variants génétiques à la physiopathologie des biomarqueurs et leurs liens de causalité avec les lésions histologiques

Alexandra Cambier

▶ **To cite this version:**

Alexandra Cambier. Une étude translationnelle de la néphropathie à IgA de l'enfant : des variants génétiques à la physiopathologie des biomarqueurs et leurs liens de causalité avec les lésions histologiques. Urologie et Néphrologie. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS371 . tel-03407272

HAL Id: tel-03407272

https://theses.hal.science/tel-03407272v1

Submitted on 28 Oct 2021

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

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

Thèse de doctorat de Physiologie & Physiopathologie

École Doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique
Laboratoire Renato Monteiro. Centre de Recherche sur l'Inflammation CRI
Faculté de Médecine de l'Université de Paris, site Bichat INSERM UMR1149
Laboratoire CHATZIANTONIOU Christos Maladies Rénales Fréquentes et Rares : des Mécanismes Moléculaires à la Médecine Personnalisée INSERM UMR S 1155

Une étude translationnelle de la néphropathie à IgA de l'enfant : des variants génétiques à la physiopathologie des biomarqueurs et leurs liens de causalité avec les lésions histologiques

A translational study in children IgA nephropathy: from genetic variants to physiopathological biomarkers and their causal relationship with histologic lesions

Par Alexandra CAMBIER

Thèse de doctorat de Physiologie & Physiopathologie

Dirigée par Pr Laurent Mesnard et Pr Renato Monteiro

Présentée et soutenue publiquement le 02/11/2020

Devant le jury composé de :

M. Nicolas Maillard, PH, Université Jean Monnet-Saint-Etienne	Rapporteur
M. Bertrand Knebelmann, PU-PH, Université de Paris	Rapporteur
M. Georges Deschênes, PU-PH, Université de Paris	Examinateur
Mme. Olivia Boyer, PU-PH, Université de Paris	Examinateur
Mme. Marie-Agnès Dragon-Durey MCU-PH, Université de Paris	Examinateur
Mr Tim Ulinski PU-PH, Sorbonne Université	Examinateur
M. Renato Monteiro, PU-PH, Université de Paris	Directeur de thèse
M. Laurent Mesnard, PU-PH, Sorbonne Université	Directeur de thèse

I. Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Nicolas Maillard et le Pr. Bertrand Knebelmann d'avoir aimablement accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je tiens à remercier le Pr. Renato Monteiro de m'avoir encadré durant cette thèse. Merci pour votre aide, votre apprentissage et votre soutien durant ces trois dernières années. Ce fut un honneur que de travailler au sein de votre équipe. Merci pour votre implication et votre optimisme durant cette dernière ligne droite.

Merci au Pr. Laurent Mesnard pour son encadrement pour la deuxième partie de ma thèse. Merci pour ton aide dans cette étude. Merci pour ton soutien toi qui me connais depuis mon externat (Fameux service de l'élite de l'univers).

Merci aux membres de mon jury :

Merci au Pr. Georges Deschênes, sans qui cette thèse n'aurait jamais pu voir le jour. Merci de m'avoir donné le temps et les moyens pour la réaliser. Merci de m'avoir accompagné durant ces trois dernières années. Merci pour votre soutien infaillible et votre bienveillance.

Merci au Pr. Olivia Boyer qui m'a connu toute jeune interne dans son service. Merci de m'avoir soutenu et accompagné dans ce projet. Un grand merci pour ta disponibilité sans faille.

Merci au Pr. Tim Ulinski pour son soutien et son aide dans ce projet depuis toujours.

Merci au Dr. Marie-Agnès Dragon-Durey d'être membre de ce jury. Merci d'avoir participé à toutes les réunions de mi-thèse et de nous avoir partagé vos réflexions et vos conseils.

Merci au Pr. Michel Peuchmaur pour votre précieuse aide pour toute la partie anatomopathologie de ce projet. Merci pour vos précieux conseils et votre enseignement. J'ai énormément appris grâce à vous. Merci à toute l'équipe et en particulier, un immense merci à Pascale Blain pour son aide dans les marquages. Merci pour ta patience et ta disponibilité.

Merci au Dr. Thomas Robert qui m'a aidé à élaborer la cohorte pédiatrique et à analyser les variants avec le Pr. Laurent Mesnard.

Merci au Dr. James Gleeson, mon co-équipier de bureau, mon ami, qui m'énormément appris au cours de ses 3 dernières années. Merci pour tous ces bons moments au laboratoire, à la bricole ou encore en ski de randonnée. Bonne continuation à Dublin et avec les algues.

Merci à toute l'équipe de Bichat pour votre aide dans ce projet. Merci à Lilia pour ta disponibilité et ton aide dans la collection des échantillons, l'apprentissage des techniques, tes bonnes idées sur les manips. Merci à Erwan pour ton aide et ton apprentissage des différentes techniques du laboratoire, ta bonne humeur inégalable et ta disponibilité. Merci à Jennifer pour ton aide aux facs, pour le recueil des échantillons et ta disponibilité pour mes commandes toujours en urgence. Merci à Julie pour les petits déjeuners et ta douce patience avec les souris. Merci à Fanny pour ton dynamisme et ton aide dans la production rapide des réactifs. Merci à Marie Bénédicte pour ton aide et tes conseils pour les cultures

de cellules mésangiales. Merci à Stéphanie pour ta bonne humeur et nos déjeuners ensemble. Merci à Laureline pour tes précieux conseils au cours de cette thèse.

Merci à toute l'équipe de Robert Debré qui m'a permis d'aller travailler au laboratoire. Merci à Anne Couderc ma co-chef d'avoir accepté de me supporter dans le même bureau, de m'avoir remplacée en salle. Merci pour tous ces dinosaurus de soutien. Merci à Claire Dossier pour ton soutien dans ce projet et les petits carrés de chocolats. Merci pour ta patience avec Bamara et moi. Merci à Theresa Kwon, la geek la plus cool qu'on puisse connaitre à RDB. Merci pour ta disponibilité à toute heure de la nuit, pour les liens zooms et pour tes GIFS mythiques spécialement pendant les greffes. Merci à Véronique Baudouin, l'amie des chats et des anticorps anti-HLA. Merci pour ta participation dans ce projet, et pour ta super mousse au chocolat. Merci à Julien Hogan, mon ancien CCA qui m'a aidé et soutenu depuis le début dans ce projet. Merci pour tes bonnes idées et de m'aider à ce que ce projet continue. Merci à notre deuxième maman Anne Maisin, pour savoir adapter nos plannings, nous rappeler nos cv, nos vacances, nos ouvertures. Merci pour tous ces petits cafés dans ton bureau et ton aide dans mes démarches.

À mes collègues-amis de médecine. À Aphaia mon amie Corse pleine d'énergie. À Arielle mon bol de gentillesse. À Danièle ma deuxième sœur. À Dacine mon amie aventurière. À doudou Gérald de la réunion.

À mes amies depuis toujours. À ma douce Marie-Alix guapita, au trio éternel Pika, Eléonor et Camille, à Nicolas et son soutien dans le marc de café. À Yvane ma copine de Jazz. À Mathieu et Hugo mes amis du collège.

À mes amis Californiens, Marie, Mika, Emilie, Martin, Nathan, Mathilde, Lauren et mon cher Ansu ; le PHD est enfin là.

À mes amies d'escalade et d'alpinisme, la team grimpette, Florie et la téméraire Pauline.

Merci aux enfants et à leurs familles d'avoir accepté de participer à cette étude

Merci à mes parents qui m'ont toujours soutenu durant toutes mes études. Cette fois-ci, c'est ma dernière thèse promis.

À mon grand frère Cyril, merci pour tous ces déjeuners à la Bricole où on a pu s'évader un peu de l'hôpital.

À ma petite sœur chérie Tatiana, qui me suit toujours dans mes péripéties même au Québec.

À Tom.

Sommaire

I. Remerciements 2

II. Tables des illustrations 8

III. Abréviations 9

IV. Avant-propos 12

V. Introduction : 14

A. L'immunoglobuline de type A 14

1. La structure de l'IgA 15

3. La synthèse des IgA 16

4. Le rôle de l'IgA 17

5. La glycosylation des IgA1 20

B. Les récepteurs aux IgA 23

1. Le récepteur FcαRI ou CD89 23

2. Le récepteur aux immunoglobulines polymériques (pIgR) 30

3. Le récepteur Fcα/μ 30

4. Les récepteurs alternatifs : 31

a) Le récepteur à la transferrine (TfR) 31

b) Le récepteur aux asialoglycoprotéines (ASGP-R) 31

c) Le récepteur DC-SIGN / SIGNR1 31

d) Le récepteur inhibiteur aux IgA Fc receptor-like Protein 4 (FcRL4) 32

C. Les mécanismes pathogéniques de la néphropathie IgA 33

1. Le premier hit, le défaut de galactosylation des IgA 33

2. Le deuxième hit, la présence d'autoanticorps IgG anti-Gd-IgA1 33

3. Le troisième hit, la présence du complexe sCD89-IgA 34

a) 3.3.1 le rôle du CD89 soluble (s) et du sCD89-IgA. 34

b) L'aide des modèles animaux pour déterminer le rôle du CD89 36

4. Les dépôts des complexes immuns IgA dans le mésangium 39

a) L'identification des possibles récepteurs aux complexes immuns 39
b) Le rôle de la transglutaminase de type 2 40
c) Les voies de signalisation mésangiales 41
d) Les voies de signalisation mésangio-podocytaire 41
D. La néphropathie à IgA de l'enfant (Issue de notre chapitre dans Néphrologie de l'enfant et de la revue de la littérature CAMBIER et al pediatric nephrology 2020)[8] 43
1. Epidémiologie 43
2. Tableau clinique 43
3. Diagnostic 44
4. Pronostic 45
5. Les facteurs de risque 46
E. La néphropathie à IgA de l'enfant. Une maladie différente de celle de l'adulte (issue de notre étude CAMBIER et al 2020) [6] 47
1. Une maladie plus inflammatoire chez l'enfant 47
F. Les traitements de la N-IgA de l'enfant (issue de la revue de littérature publiée par notre équipe CAMBIER et al 2020 [165]) 48
1. Les traitements conventionnels 48
a) Les inhibiteurs du système rénine-angiotensine 48
b) La corticothérapie 49
2. Les thérapeutiques permettant de cibler la formation des complexes immuns 49
a) La déplétion des lymphocytes B 49
b) Les récepteurs des facteurs d'activation des lymphocytes B (B cells activating factors) BAFF/TNF récepteur avec le ligand de prolifération (proliferation-inducing ligand) APRIL 49
c) Les TOLL-like Recepteur (TLRs) 50
d) Les cibles du protéasome : interaction entre les cellules B et les cellules T (Bortezomib) 50
e) Les inhibiteurs de la Spleen tyrosine kinase (SYK) 51
f) Les immunoadsorptions (IA) 51
3. Les thérapeutiques ciblant la voie du complément 51
a) L'activation du complément dans la N-IgA 51
b) L'antagoniste du récepteur C5a 52

c) MASP-2 inhibiteur 52
4. De nouvelles thérapies ciblant le système immunitaire intestinal-muqueux 53
a) L'interaction entre les agents pathogènes des muqueuses et l'immunité aux IgA 53
b) Les Antigènes alimentaires 53
c) Le budesonide 53
d) Les antibiotiques ou probiotiques 54
e) Le ciblage du premier hit : Gd-IgA1 55
f) Les IgA1 protéases (IgA1-P) recombinantes 55
G. Les aspects génétiques de la néphropathie à IgA 56
1. Les N-IgA familiales 56
2. Les études de lésions génétiques 57
3. Les études d'association génétique. 58
a) Le système rénine-angiotensine 58
b) Les Gd-IgA1 58
c) Le récepteur CD89 59
4. Les études d'association pangénomique (Genome-Wide Association Study)..... 59
5. Le séquençage à haut débit ou de dernière génération 60
6. Les variants du collagène dans la N-IgA :..... 61
VI. Problématiques et objectifs de la Thèse 62
VII. Résultats 63
A. Partie 1 : le rôle des complexes immuns et du CD89 dans la N-IgA de l'enfant et leur lien de causalité avec les lésions histologiques 63
1. Article 1 : Le CD89 soluble est un facteur de gravité de la néphropathie à IgA de l'enfant en induisant la prolifération mésangiale..... 63
2. Article 2 : L'évolution des complexes immuns chez deux enfants atteints de néphropathie à IgA sévère traité. L'intérêt de l'immunoadsorption dans la N-IgA de l'enfant rapidement progressive. 93
B. Partie 2 : L'aspect des variants du collagène dans la Néphropathie à IgA de l'enfant 103

1. Article 3 : Description de variants rares hétérozygotes du collagène dans la néphropathie à IgA de l'enfant 103

VIII. Discussion et perspectives 118

A. Discussion 118

1. La mise en évidence de marqueurs spécifiques de la N-IgA de l'enfant : 118

2. Le rôle du Gd-IgA1 : 118

3. Le rôle des IgG-IgA1 : 119

4. Le rôle du sCD89 et du sCD89-IgA1 : 119

5. Le rôle du sCD89 in vitro dans la prolifération mésangiale via le TfR1 et la voie PI3K/Akt/mTOR 120

6. Le rôle du sCD89 in vivo dans la prolifération mésangiale endocapillaire et extracapillaire 121

7. Les variants du collagène dans la cohorte de cIgAN 121

B. Perspectives 123

1. Le blocage du relargage du CD89 123

2. Le blocage du CD89 en bloquant la voie mTOR 124

3. Les inhibiteurs de protéases clivant l'IgA1 124

IX. Bibliographie et Annexes 127

II. Tables des illustrations

Figure 1 : La représentation des différents types d'immunoglobuline (Ig) 14
Figure 2 : Les représentations schématiques des IgA1 et IgA2..... 16
Figure 3 : Les voies de la commutation de classe vers la classe IgA 17
Figure 4 : Au niveau intestinal, les différentes fonctions des IgA..... 18
Figure 5 : L'activation ou l'inhibition par le CD89 est dépendant de la liaison aux IgA qu'elles soient complexées ou monovalentes. 19
Figure 6. Les modifications post traductionnelles des IgA1 20
Figure 7. Les étapes de la O glycosylation des IgA1 22
Figure 8 : Les différents ligands du CD89..... 23
Figure 9 : Les différentes formes du CD89 [21]..... 24
Figure 10: Le site de lésion du FcαRI (CD89) 25
Figure 11: Les différentes réponses possibles aux IgA. 26
Figure 12: Le rôle de PP2A dans la signalisation du CD89 27
Figure 13 : Le clivage du CD89 par les pIgA..... 29
Figure 14 : Les différents récepteurs aux IgA 32
Figure 15 : Les 3 hits dans la néphropathie à IgA 35
Figure 16 : Le rôle des potentiels biomarqueurs dans l'évolution de la N-IgA de l'adulte 36
Figure 17 : Le modèle de la souris humanisée ayant le phénotype complet de la N-IgA 38
Figure 18 : Les récepteurs aux complexes immuns..... 40
Figure 19 : Schéma récapitulatif de l'inflammation intra-rénale via les complexes immuns IgA et leurs différents récepteurs..... 42
Figure 20 : Description schématique du rein, du néphron et du glomérule avec des dépôts mésangiaux d'IgA..... 45
Figure 21 : La biopsie rénale en microscopie optique..... 47
Figure 22 : Les nouvelles thérapeutiques potentielles de la N-IgA de l'enfant..... 56
Figure 23 : Les nouvelles perspectives de thérapies ciblées..... 125

Tableau 1 : Les modulateurs de l'expression du CD89 30

III. Abréviations

α1KI-CD89Tg : IgA1 *Knock In* et CD89 transgénique

ADAMs : A Disintegrin And Metalloprotease

ADCC : Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps

ADN / ARN : Acide désoxyribonucléique / Acide ribonucléique

AID : *Activation-Induced cytidine Deaminase*

Ala : Alanine

APRIL: Membre 13 de la superfamille des ligands du TNF

ARAII : Antagonistes du Récepteur à l'Angiotensine 2

ASGPR : Récepteur des asialoglycoprotéines

Asn : Asparagine

BAFF : Membre 13B de la superfamille des ligands du TNF

Bcl-2 : Lymphome à cellule B 2

C1GalT1 : *Core 1 β1,3-galactosyltransferase 1*

Cosmc : *C1GALT1-specific chaperone 1*

C_H : Chaine lourde d'immunoglobules A(Cα), G(Cγ), M(Cμ), D(Cδ), E(Cε)

CD : Cluster de Différenciation

CDR3 : *Complimentarity determining regions 3*

CD40L : Ligand du CD40

CD89/FcαRI : Récepteur à la fraction Fc des IgA

sCD89 : CD89 soluble

CI : complexes immuns

CMHII : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II

CRP : Protéine C réactive

CNV : Variabilité du nombre de copie

CS *: Secretory Component*

Cys: cystéine

DC : Cellules dendritiques

DC-SIGN : *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

DFG : Débit de Filtration Glomérulaire

Epo : Erythropoïétine

Fab : Fraction de liaison à l'antigène

Fc : Fraction cristallisable

FcεRI, FcγRI : Récepteur à la fraction Fc des IgE, Récepteur à la fraction Fc des IgG

FcRL4 : *Fc receptor-like Protein 4*

Gal : Galactose

GalNac : N-acetylgalactosamine

G(M)-CSF: *Granulocyte (Macrophage) Colony-Stimulating Factor*

Gd-IgA1 : IgA1 hypogalactosylées

GWAS : Etude d'associations pangénomiques (*Genome-Wide Association Study*)

HLA : *Human Leucocyte Antigen*

HTA : Hypertension Artérielle

IEC : Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion

IFNγ : Interféron γ

IgA : Immunoglobuline A

IgA1P : *IgA1 protease*

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IRC : Insuffisance Rénale Chronique

IRT : Insuffisance Rénale Terminale

ITAM : *Immunoreceptor-based Tyrosine Activation Motif*

ITAMi : ITAM inhibiteur

ISRA : Inhibiteur du système rénine angiotensine

KDIGO : *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*

KIM1 : *Kidney Injury Molecule-1*

KI/KO : *Knock In/Knock Out*

LPS : lipopolysaccharide

Lymphocytes NK : Lymphocyte tueur naturel - *Natural Killer*

PBMC : Cellules Monocytaires du Sang Périphérique

pIgR : Récepteur Polymérique aux Immunoglobulines (*Polymeric Immunoglobulin Receptor*)

mIgA, dIgA, pIgA, SIgA : IgA monomérique, dimérique, polymérique, sécrétoire

miARN : micro ARN

NGAL : *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*

NIgA : Néphropathie à IgA

PCR : Polymerase chain reaction

PP2A : protéine sérine phosphatase

SA : Acide N-acetylneuraminique ou acide syalique

SIgA : IgA sécrétoire

Ser : Sérine

TCR : Récepteur des cellules T

TfR : Récepteur à la transferrine

TG2 : Transglutaminase 2

TGFβ : facteur de croissance transformant β

Th1/Th2 : Lymphocytes T auxiliaries 1/ Lymphocytes T auxiliaries 2

Thr : Thréonine

TLR : Récepteur de type Toll

TNFα : facteur de nécrose tumorale α

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VL : chaînes légères comportent un domaine variable

IV. Avant-propos

La néphropathie à immunoglobulines A (N-IgA) de l'enfant, initialement décrite en 1968 par Jean Berger [1], est une des glomérulonéphrites primitives les plus répandues au monde, après le syndrome néphrotique. Elle est pourvoyeuse d'insuffisance rénale terminale (IRT) au long terme. Cette maladie pouvant survenir très tôt dans la vie des enfants, il est devenu indispensable de trouver un traitement et un suivi des plus adéquats chez ces enfants malades.
La N-IgA est considérée comme une maladie auto immune, et de ce fait, son mécanisme physiopathologique reste en majorité non élucidé. L'argument principal de l'implication des complexes immuns circulants dans la N-IgA a été décrit par Jean Berger [2] sur le cas d'un patient, présentant une insuffisance rénale, qui a été greffé de façon erronée avec le rein d'un donneur ayant une N-IgA avec des dépôts d'IgA mis en évidence à la biopsie rénale de contrôle post-greffe. Avec le suivi, ces dépôts d'IgA ont disparu quelques mois après, explicitant que la maladie ne venait pas du rein mais plutôt des complexes d'IgA circulants du donneur. Depuis, des complexes immuns circulants ont été retrouvés dans le plasma et dans le parenchyme intra-rénal par plusieurs équipes. Ces complexes sont composés d'IgA de sous classe 1, présentant un défaut de galactosylation [3] leur permettant de former de volumineux complexes d'IgA1 après avoir été reconnus par des anticorps anti-IgA [4], ou encore de se complexer à la forme soluble du récepteur pour le fragment Fc des IgA, le CD89. [5] Néanmoins, l'étiologie de la formation de tous ces complexes circulants et leurs rôles dans la progression de la maladie restent en général controversés. Ces complexes immuns pourraient représenter de potentiels biomarqueurs de la N-IgA, mais ceux-ci ont été principalement étudiés chez l'adulte et très peu chez l'enfant.
La N-IgA de l'enfant est une maladie très inflammatoire qui peut présenter des récidives et des poussées tout au long de la vie. La N-IgA de l'enfant a été décrite comme une glomérulonéphrite plus inflammatoire que celle de l'adulte.[6] Il n'existe à ce jour aucune recommandation thérapeutique dans la N-IgA de l'enfant avec une prescription importante d'immunosuppresseurs non spécifiques de la maladie. [7, 8]
Il y a donc une nécessité d'obtenir des biomarqueurs spécifiques afin de poser un diagnostic précis de la maladie, pouvoir monitorer son évolution et développer des traitements plus adaptés. En effet, la N-IgA peut mimer d'autres glomérulopathies, comme les maladies du collagène avec le syndrome d'Alport. Il est donc indispensable de bien différencier ces deux maladies pour le suivi et le traitement de celles-ci. Ces deux maladies pourraient également être liées puisqu'un locus 2q36 [9] codant pour COLA4 et COL4A3 impliqué dans les membranes basales fines a été décrit dans la N-IgA. Les dépôts mésangiaux d'IgA1 n'étant pas spécifiques de la N-IgA, il est donc nécessaire de bien caractériser cette maladie à l'aide de biomarqueurs de la N-IgA, mais également de la caractériser d'un point de vue génétique en recherchant des variants du collagène pouvant mimer cliniquement et biologiquement cette pathologie.
Le premier objectif de cette thèse sera de pouvoir identifier des biomarqueurs spécifiques de la N-IgA de l'enfant et de mieux comprendre leur implication dans la physiopathologie rénale.
Le deuxième objectif sera de rechercher les variants du collagène COL4A3, COL4A5, COL4A4 au sein de cette cohorte pédiatrique et de comprendre leur implication dans le développement de la N-IgA.
La compréhension de ces mécanismes permettra d'envisager de nouvelles cibles moléculaires et d'établir de nouvelles approches thérapeutiques.

Ce manuscrit se divise en plusieurs parties.
L'introduction compose la première partie de la thèse.
Cette introduction porte en premier lieu sur les différents aspects moléculaires des IgA, leur synthèse et leur fonction, ainsi que la présentation des récepteurs associés à l'IgA.

Dans un second temps est développé l'aspect de la N-gA de l'enfant, ses particularités, sa prise en charge et les possibles traitements actuels.
La troisième partie porte quant à elle sur l'aspect génétique de la N-IgA.

Les résultats composent la seconde partie de la thèse. Les résultats sont présentés sous forme d'articles. La première partie portera sur le rôle des complexes immuns et du CD89 dans la N-IgA de l'enfant et leurs liens de causalité avec les lésions histologiques. Le premier article démontre le rôle du CD89 dans l'inflammation de la N-IgA de l'enfant ainsi que son rôle pronostique dans cette dernière. Le deuxième article portera sur l'évolution des complexes immuns (sCD89-IgA, IgG-IgA), du sCD89 libre et des Gd-IgA1.
La deuxième partie portera sur l'aspect des variants du collagène dans la N-IgA de l'enfant. Le troisième article portera lui sur la description des enfants ayant une N-IgA porteurs des variants du collagène dans la cohorte.

L'apport de ces travaux est discuté dans **Discussion et Perspectives.**

Enfin, dans la partie **Annexes** sont présentés les projets auxquels j'ai participé durant mes années de thèse ainsi que les **Références Bibliographiques.**

V. Introduction :

A. L'immunoglobuline de type A

L'Immunoglobuline de type A (IgA) est la deuxième immunoglobuline la plus abondante dans le sérum après l'immunoglobuline de type G (IgG). Elle est l'une des cinq isotypes d'immunoglobulines (Ig) produites par les lymphocytes B. L'IgA partage la structure de base de toutes les immunoglobulines IgG, IgM, IgE et IgD. Chaque Ig a sa taille, sa charge, sa séquence d'acides aminés et sa glycosylation. [10, 11] Le type d'anticorps est déterminé par le type de chaine lourde (μ, γ, α, ε and δ). Les chaines légères sont les mêmes présentes sous 2 isoformes (λ et ϰ). Les IgG, IgE, et IgD n'existent que sous formes monomériques alors que les IgM n'existent que sous forme polymériques **(Figure 1).** Les IgA elles peuvent être produites sous l'une ou l'autre de ces formes.

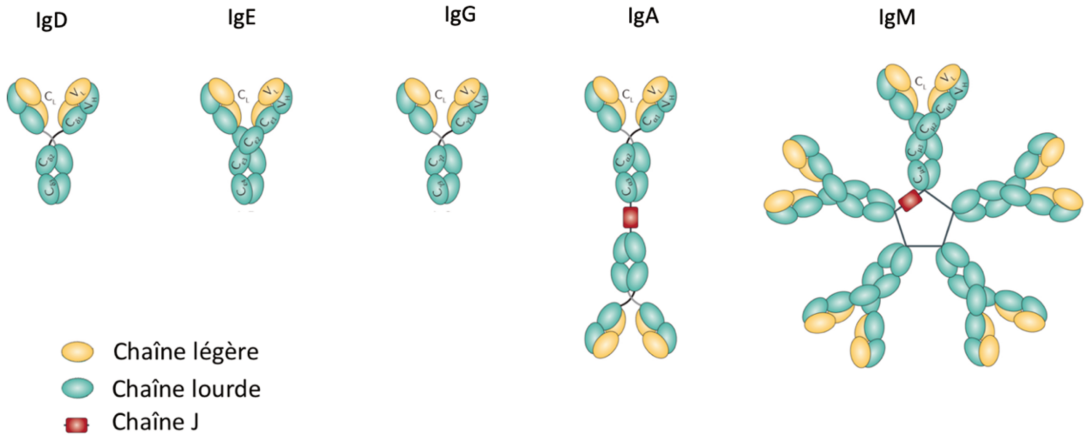


Figure 1 : La représentation des différents types d'immunoglobulines (Ig)

(Adapté du Milestone 8 de Nature de JH Duarte, 2016)
Les chaines lourdes (en vert) d'IgD, IgG et IgA sont constituées de trois domaines constants (C) alors que ceux des IgE et IgM sont constituées de quatre domaines. Elles ont toutes un seul domaine variable (V). A ces chaines lourdes s'associent les chaines légères (en jaune). La chaine J (en rouge) permet la polymérisation des IgA et des IgM.

Avec les IgM, les IgA garantissent l'immunité au niveau des muqueuses. Chez l'Homme, on dénombre deux types de sous-classes d'IgA : les IgA1 et les IgA2, ces dernières étant elles-mêmes réparties principalement en deux variants allotypiques que sont les IgA2m(1) et IgA2m(2), avec un troisième variant potentiel, peu décrit, nommé IgA2(n). [12]

1. La structure de l'IgA

L'IgA est une glycoprotéine de 160 KDA avec 2 chaines lourdes et 2 chaines légères qui sont reliées par des ponts disulfures et des lésions non covalentes. L'IgA comporte des chaines lourdes et des chaines légères contenant un domaine constant et un domaine variable. **(Figure 2)**

Le site de lésions de l'antigène (la région Fab) est constitué des régions variables des chaines lourdes et légères. La chaine légère (25kDa) est constituée d'une région variable (V_L) et d'une région constante (C_L) alors que la chaine lourde (55 kDa) est composée d'une région variable (V_H) et 3 régions constantes (Cα1 à Cα3).[13] La fraction cristallisable (fraction Fc) est constituée de l'extrémité C terminale des chaines lourdes. La fraction Fc permet d'interagir avec d'autres molécules effectrices comme d'autres récepteurs Fc ou le complément.

Il existe plusieurs formes d'IgA, les formes monomériques, dimériques ou polymériques. La polymérisation des IgA est rendue possible par la région caudale dans la partie C terminale (Cα2 et 3) et d'une chaine additionnelle la chaine J (j a joigning). Les séquences dans les domaines Cα2 et Cα3 évitent fortement la création de multimères, alors que les IgM peuvent être sécrétées sous forme penta ou hexamèriques. La chaîne J aide à la dimérisation des IgA grâce à un pont disulfure avec une des deux chaînes lourdes de chaque IgA.

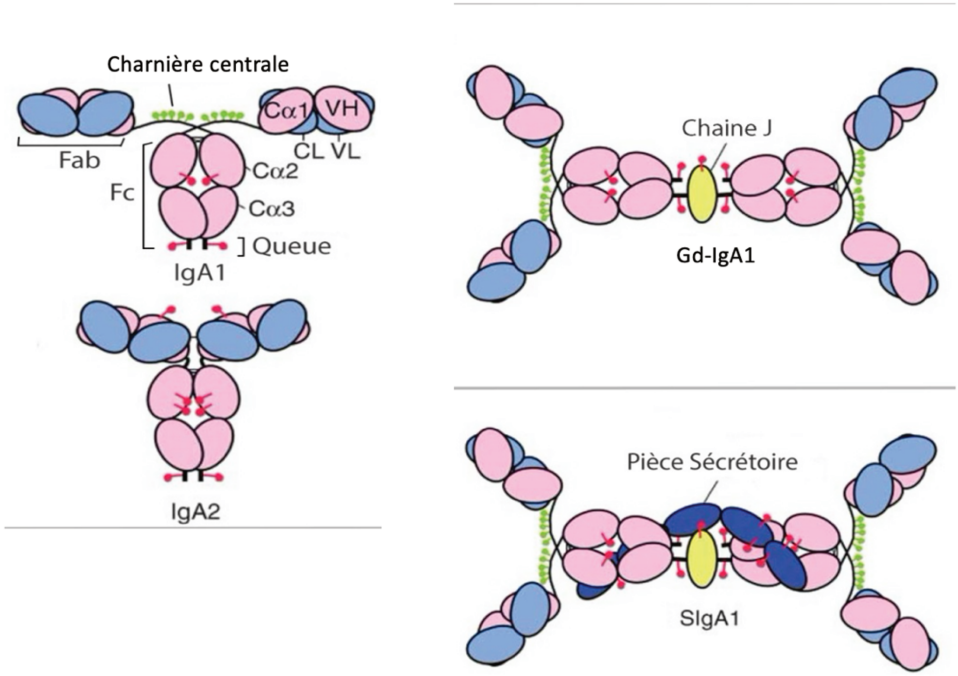


Figure 2 : Les représentations schématiques des IgA1 et IgA2

(Adapté Woolf and Russel 2011) [14]
Schéma d'une IgA1 et d'une IgA2. Les chaines lourdes sont représentées en couleur rose et les chaines légères en bleue. La chaine J est représentée en couleur jaune et le composant sécrétoire est représenté en couleur bleu foncé. On retrouve en couleur rouge les sites de O glycosylations, absents dans l'IgA2 à cause d'une délétion de 13 acides aminés dans sa région charnière.

3. La synthèse des IgA

La synthèse des IgA se déroule au niveau de la moelle osseuse et dans les muqueuses. Dans l'intestin, cette synthèse a lieu au niveau des plaques de Payer. Les IgA sont synthétisées par les lymphocytes B et plasmocytes suite à une commutation de classe. Cette commutation est induite en premier lieu par le facteur de croissance transformant β (TGFβ) ainsi que les interleukines IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 ou IL-10. [15, 16] En second lieu, cette commutation est induite grâce au ligand CD40L présent sur les lymphocytes T activés. Le CD40L va ensuite se lier au Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMHII) sur le récepteur au travers du Cluster de Différenciation 40 (CD40) présent dans la membrane des lymphocytes B. Cette lésion aboutit à la production d'IgA. Cette commutation par les lymphocytes T est également possible par l'intermédiaire des membres 13 (APRIL) et 13B (BAFF) de la superfamille des ligands du facteur de nécrose tumorale (TNF) sécrétés par les cellules dendritiques [17] et par les cellules épithéliales [18] en réponse aux pathogènes. [19]

Après la commutation de classe, les plasmocytes qui se situent en majorité au niveau de l'intestin [20] produisent une grande quantité d'IgA. [21] Chez l'individu adulte sain, le nombre d'anticorps de classe

IgA produits par jour est plus grand que celui de toutes les autres classes d'Ig. Les taux de synthèse (mg/kg/jour) des différentes Ig sont de 66 pour les IgA, de 34 pour les IgG, de 8 pour les IgM, de 0,4 pour les IgD et 0,02 pour les IgE. [22] Cette forte production d'IgA est expliquée par la perte des IgA dans les secrétions de façon journalière. Le taux des IgA sériques (2 ± 0,6 g/l), cependant, est en moyenne à peine un cinquième de celui des IgG (11,6 ± 3 g/l), en raison du moins en partie, de la courte demi-vie des IgA (3 à 6 jours) comparés aux 21 jours pour les IgG. La quantité d'IgA est aussi une réponse directe au microbiote et à la flore intestinale. En effet les nouveaux nés ou les souris anexiques ont une muqueuse intestinale très pauvre en IgA. [23] **(Figure 3)**

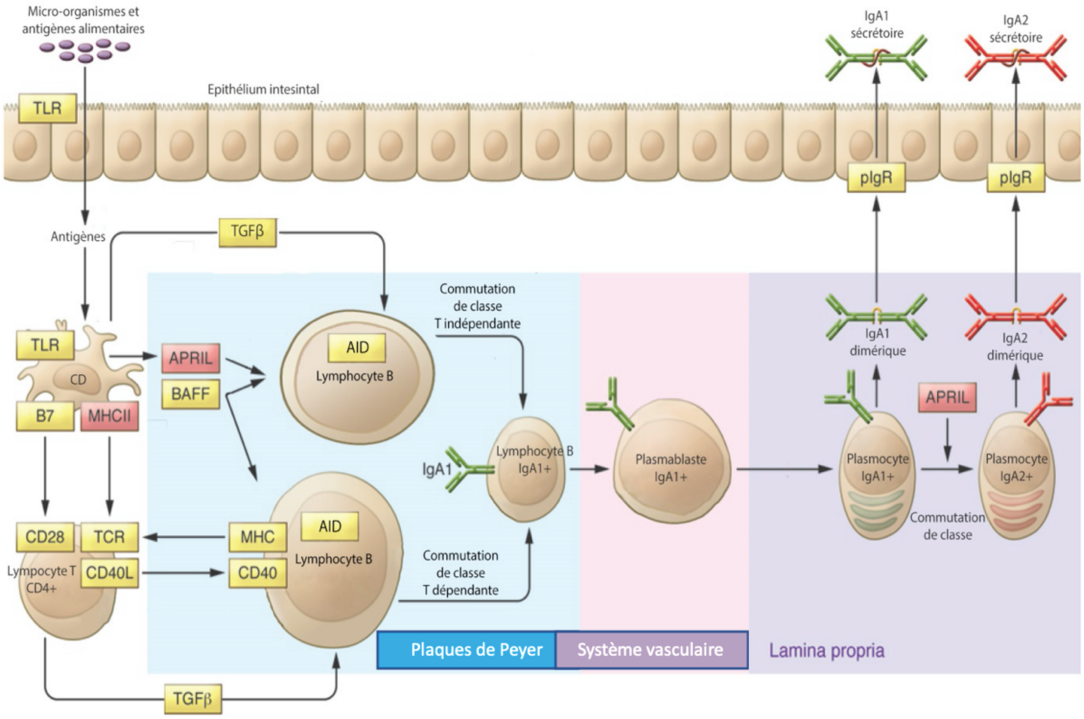


Figure 3 : Les voies de la commutation de classe vers la classe IgA

(Adapté de Kiryluk et al, 2014)[24]
A la surface des lymphocytes B, l'expression des IgA est induite par la commutation de classe médiée par la cytidine désaminase AID. Cette commutation de classe peut être induite par la production de APRIL et/ou BAFF au niveau des cellules dendritiques avec le TGFβ. Les lymphocytes B peuvent aussi faire une commutation de classe de manière dépendante des lymphocytes T par les lésions CD40-CD40L ainsi que par le TCR (LT) et le CMH complexé à l'antigène (LB). Les lymphocytes B peuvent dans un deuxième temps se transformer en plasmocytes secrétant des IgA dans la lamina propria.

4. Le rôle de l'IgA

L'IgA est essentielle dès la naissance en conférant une protection des muqueuses intestinales et respiratoires. L'IgA dans les muqueuses est représentée sous forme d'IgA associée au composant sécrétoire (CS), appelée IgA sécrétoire. Elle représente la moitié des protéines du colostrum. Le lait maternel fournit au nourrisson entre 0,5 et 1,5 g des IgA sécrétoires par jour. [25, 26]

L'IgA sécrétoire est formée à la face apicale de la cellule épithéliale des muqueuses. L'IgA est produite dans la sous muqueuse par les plasmocytes sous forme dimérique. Elle est captée par le récepteur des Ig polymériques (pIgR) exprimé sur la partie baso-lateral des cellules épithéliales, internalisée par transcytose jusqu'à la face apicale. Cela entraine le clivage de la partie extracellulaire du pIgR formant le CS. Le CS est une protéine de 80 kDa, composée de cinq domaines de type Ig (D1 à D5). On peut la retrouver sous la forme liée aux domaines Cα2 et Cα3 des IgA mais peut aussi être retrouvée sous forme libre. [14, 27-29] Au niveau intestinal, l'IgA sécrétoire est impliquée dans la régulation de la balance défense-tolérance vis-à-vis de la colonisation par la flore bactérienne. L'IgA pouvant se dimériser et former les IgA dimériques qui sont alors capables de se lier aux pathogènes au niveau de la lamina propria. Les IgA dimériques se lient ensuite aux récepteurs des Ig polymériques (pIgR) des cellules épithéliales où a lieu la transcytose. Le complexe pathogène-IgA va ensuite vers la lumière intestinale et est éliminé par le péristaltisme par le mécanisme d'exclusion immune. [30] Les IgA dimériques peuvent aussi neutraliser les virus et bactéries infectant la cellule épithéliale grâce aux endosomes de recyclage mais peuvent également neutraliser des éléments pro-inflammatoires comme des composés bactériens sécrétés, typiquement le lipopolysaccharide (LPS). [31] Ensuite, dans la lumière intestinale, les IgA sécrétoires recouvrent les pathogènes afin d'empêcher leur fixation aux cellules épithéliales soit par la fraction Fab, soit par les motifs de glycosylation. [32] L'exclusion immune n'entraine pas d'inflammation et les bactéries pathogènes sont ensuite évacuées naturellement. **(Figure 4)**

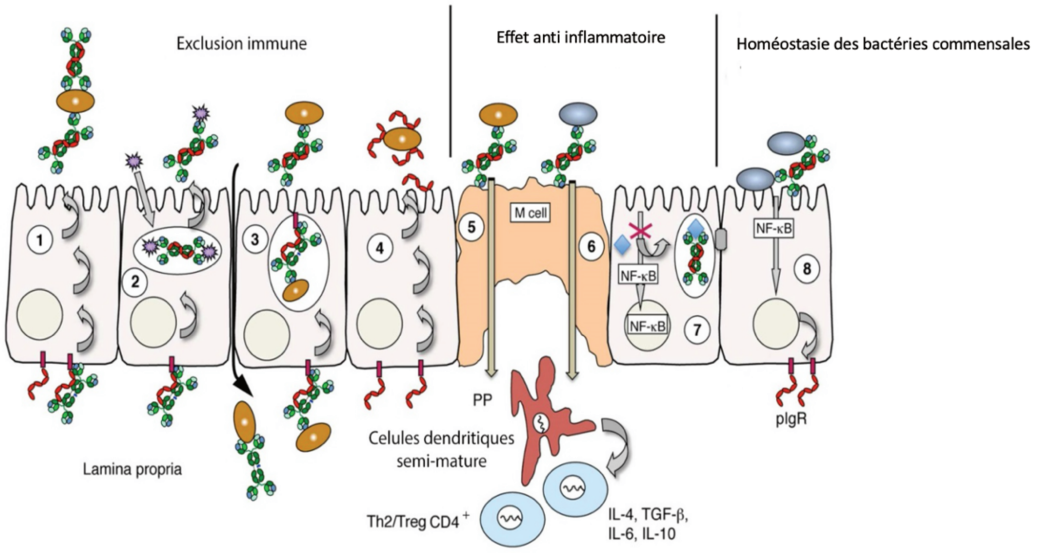


Figure 4 : Au niveau intestinal, les différentes fonctions des IgA

(Adapté de Corthésy, 2013)[33]
Les bactéries pathogènes sont représentées en marron, les bactéries commensales sont représentées en gris.

Au niveau systémique, le rôle de l'IgA dépend de sa forme, à savoir si elle est monomérique ou polymérique. Dans le sérum, l'IgA monomérique représente 90 % des IgA principalement constituées

de la sous-classe 1. L'IgA2 est plutôt représentée dans les muqueuses allant jusqu'à 50% des IgA sécrétoires. Selon que l'IgA soit sous une forme monomérique ou polymérique dans les complexes avec l'antigène, la liaison au CD89 induit une réponse respectivement anti- ou pro-inflammatoire. [21, 34]

L'IgA monomérique a un effet anti-inflammatoire. Elle permet la diminution du relargage cytokinique par les monocytes, elle inhibe le recrutement de cellules inflammatoires par chimiotactisme comme les neutrophiles, ou elle peut avoir un effet inhibiteur sur le chimiotactisme des éosinophiles. [35-39] Ce rôle anti-inflammatoire des IgA monomériques peut expliquer l'augmentation de l'incidence des maladies auto-immunes chez les patients atteints d'un déficit sélectif en IgA.

Au contraire les IgA polymériques comme le complexe IgA-antigène activent la cellule, induisent la phagocytose médiée par les IgA via le récepteur CD89 sur les neutrophiles [37-39] et l'ADCC (la Cytotoxicité Cellulaire Dépendante des Anticorps) [40] ainsi que la production des facteurs pro-inflammatoires. [21] **(Figure 5)**

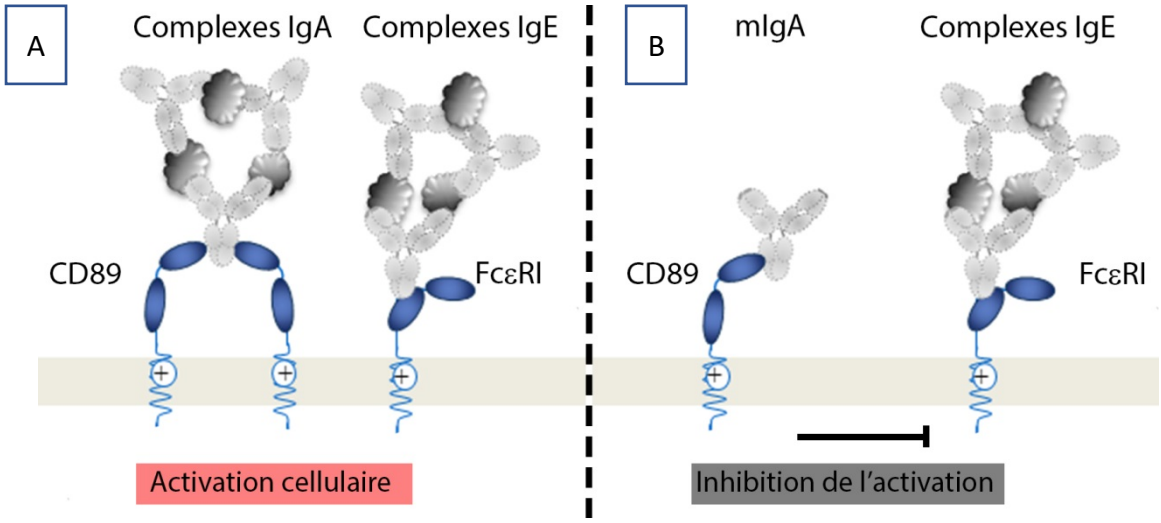


Figure 5 : L'activation ou l'inhibition par le CD89 est dépendant de la liaison aux IgA qu'elles soient complexées ou monovalentes

(Adapté de Ben Mkaddem et al., 2013)[41]

A : La liaison des complexes IgA au récepteur CD89 conduit à l'activation cellulaire indépendamment de l'activation des autres récepteurs aux Ig.

B: La liaison monovalente des mIgA au récepteur CD89 conduit à un signal inhibiteur bloquant l'activation des réponses d'autres récepteurs.

5. La glycosylation des IgA1

L'IgA est l'Ig la plus glycosylée de l'organisme représentant 6% de son poids moléculaire. La glycosylation des IgA1 est une modification post traductionnelle indispensable dans la fonctionnalité des IgA. Contrairement aux IgA2, L'IgA1 contient une région charnière de 18 acides aminés (acides aminés de 223 à 235) située entre les régions constantes Cα1 et Cα2 de la chaine lourde.[40, 42] Cette zone charnière confère une forme "T" à l'IgA1 qui est plus mobile et faciliterait la reconnaissance de structures antigéniques.[43] La région charnière de l'IgA1 est plus longue que l'IgA2 permettant un accès aux protéases spécifiques produites par certaines bactéries pathogènes de l'Homme et des grands singes (Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae…). [43, 44]
Cette zone charnière est riche en proline, sérine et thréonine. Ces acides aminés sont des sites de fixation de O glycosylation composés de résidus N-acétylgalactosamine (Gal NAC) avec un galactose β1,3-lié à Gal NAC ainsi que des acides sialiques. [45] L'ajout du N-acétylgalactosamine (Gal NAC) sur un atome d'oxygène d'une proline, sérine ou thréonine se fait par la Gal NAC transférase. La composition glucidique de ces glycanes-O, liés dans la région charnière de l'IgA1 sérique est hétérogène. Les formes les plus courantes comprennent le disaccharide Gal NAC-galactose et ses formes mono- et di-sialylées. Des formes déficientes en galactose avec une Gal NAC terminale ou une Gal NAC sialylée peuvent être trouvées mais représentent un pourcentage mineur des O-glycanes dans les IgA1 sériques. [45] Ces défauts de galactosylation représentent un lourd facteur de risque pour le développement de la N-IgA. **(Figure 6)**

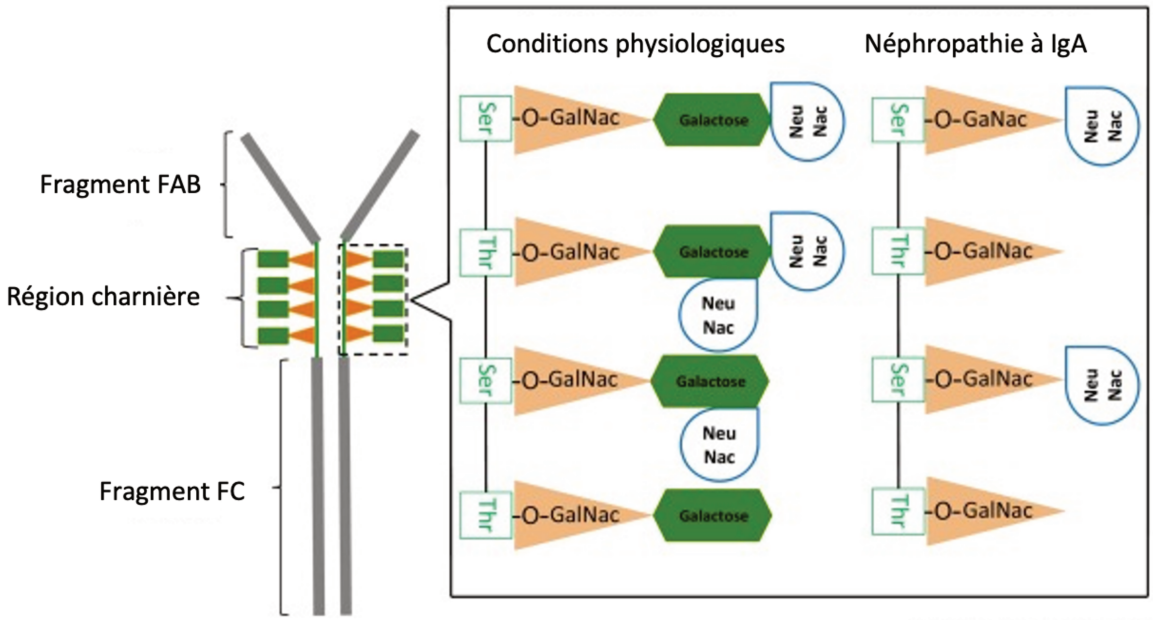


Figure 6. Les modifications post traductionnelles des IgA1

(Adapté de Robert et al, 2015)[46]
En conditions physiologiques, une sérine ou une thréonine est rattachée à un atome d'oxygène sur lequel s'attache un N acétyl-galactosamine (Gal NAC). Un galactose est ensuite associé. Le O glycoside galactosylé peut ensuite subir une sialylation par α2,3 sialyltransférase sous 3 différentes formes ou rester libre. Dans la N-IgA, on retrouve un défaut de la galactosylation suivi ou non d'une sialylation. NeuNac= N-acetylneuraminic acid.

La chaine J peut elle aussi subir une glycosylation. Elle ne possède qu'un seul site de N-glycosylation (Asn 48) qui permet la dimérisation des IgA. [47] La pièce sécrétoire peut elle aussi être l'objet d'une glycosylation. Elle présente également des sucres sur les 7 sites de N-glycosylation, la rendant capable de lier directement les pathogènes.[32] Ces glycosylations des différentes parties de l'IgA jouent un rôle majeur dans sa fonction, sa dimérisation, ainsi que sa liaison aux récepteurs et aux pathogènes. [11]

Des études d'association génétique ont été menées avec quatre gènes clés des glycosyltransférases pour la O-glycosylation des IgA1 (C1GALT1, ST6GALNAC2, C1GALT1C1, MUC20). [48-50] Le défaut de galactosylation est peu connu. Le défaut de galactosylation des IgA impliquerait l'enzyme de *Core 1* β1,3 galactosyltransferase (C1GalT1) et sa protéine chaperonne la *C1GALT1-specific chaperone 1* (Cosmc). La C1GalT1 permettrait l'ajout d'un galactose sur le O glycoside. Il a également été montré que l'expression de la protéine chaperonne Comsc était réduite chez les patients présentant une N-IgA. [51, 52] Cette protéine Cosmc est essentielle pour la stabilité enzymatique de la C1GalT1. [53] **(Figure 7)**
Différentes études d'association pangénomique (GWAS) ont permis d'identifier un loci de susceptibilité au développement de la N-IgA directement associé aux enzymes participant à la O-glycosylation. [24] La synthèse des GD-IgA1 serait le résultat d'un défaut d'activité enzymatique post traductionnelle dans l'appareil de Golgi. Il a également été montré un défaut d'activité de la C1GalT1 et une hausse de l'activité de la α2,3 sialyltransferase (ST6GalNAc) chez les lymphocytes circulants des patients ayant une N-IgA. [54-57] En effet, les variations d'expression de ces deux enzymes contribueraient à la formation d'une chaîne O-glycosidique alternative où le résidu sialylé est ajouté avant le résidu galactosylé, ce qui empêche l'ajout de ce dernier et forme ainsi une chaîne plus courte et déficiente en galactosylation. [58]

Certains variants génétiques et certains polymorphismes fonctionnels de la C1GalT1 ont été associés à une plus grande susceptibilité de développer la N-IgA dans les cohortes chinoises et italiennes. [48, 59] L'expression de la protéine Cosmc a été retrouvée diminuée dans la N-IgA par méthylation du promoteur du gène Cosmc. [60] Une origine épigénétique serait donc suspectée dans la N-IgA.

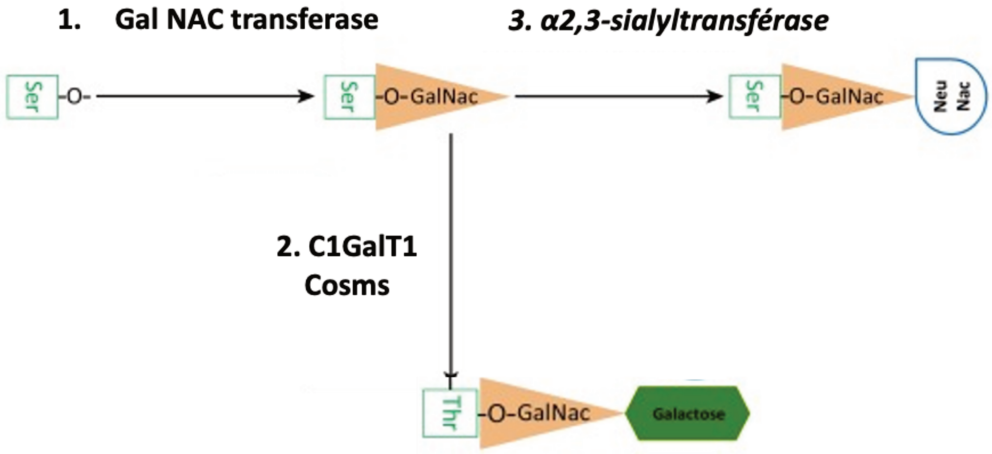


Figure 7. Les étapes de la O glycosylation des IgA1

(Adapté de Robert et al, 2015)[46]
L'étape numéro 1 commence par l'ajout d'une N-acétylgalactosamine (Gal NAC) par la Gal NAC transférase. La deuxième étape est l'ajout du galactose par la *Core 1* β1,3 galactosyltransférase (C1GalT1) avec sa protéine chaperonne Cosms. Dans la N-IgA, l'activité de cette enzyme serait réduite. La troisième étape est l'ajout d'un résidu sialylé par la α2,3 sialyltransférase. Dans la N-IgA l'activité de cette enzyme serait augmentée. Les Gal NAC sialylées ne peuvent subir de galactosylation secondairement. Tandis que les Gal NAC galactosylées peuvent subir une sialylation secondairement.

Les épisodes infectieux et l'environnement bactérien du microbiote et du MALT semblent également jouer un rôle sur la galactosylation des IgA. En effet, l'immunisation secondaire au niveau des muqueuses par un pathogène induirait préférentiellement la production de Gd-IgA1 sériques spécifiques non seulement chez les patients N-IgA mais aussi chez les témoins. La Gd-IgA1 serait la forme spécifique de pathogènes muqueux. [61] Il a également été montré que les cytokines IL-4, IL-5 et IL-6 agissent directement sur l'activité de C1GalT1 et ST6GalNAc en favorisant la production de Gd-IgA1 [62], ajoutant un nouveau mécanisme de régulation post-traductionnelle lié à l'inflammation et aux infections. [63]

Il semblerait également que le microbiote des patients ayant une maladie progressive aurait une diversité microbienne plus pauvre avec un plus haut pourcentage de bactéries type Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Eubacteriaceae et Streptococcaeae. [64] Le site de lésion aux IgA de la protéine M4 du streptocoque se lierait préférentiellement aux Gd-IgA1 entrainant une réponse inflammatoire très importante. [65] Cela renforce l'axe supposé entre l'intestin et le rein.

Également, il semblerait que l'augmentation des Gd-IgA1 sériques serait liée à une localisation anormale des lymphocytes B. En effet il a été retrouvé une augmentation de lymphocytes B producteurs de chaîne au niveau de la moelle osseuse, soulignant une possible relocalisation de ces derniers depuis la muqueuse. [66, 67] Ces plasmocytes muqueux seraient donc relocalisés en dehors des muqueuses entrainant une augmentation des Gd-IgA1. Il a également été évoqué une localisation anormale des lymphocytes avec une augmentation de lymphocytes T CD4+ activés exprimant un récepteur de localisation systémique. [68]

B. Les récepteurs aux IgA

Il existe différents types de récepteurs aux IgA en fonction de leur site de reconnaissance.

1. Le récepteur FcαRI ou CD89

Le FcαRI ou CD89 a été le premier récepteur aux IgA identifié. Il se situe sur le chromosome 19 contrairement aux autres récepteurs de l'IgA qui se situent sur le chromosome 1. [69] C'est un récepteur membranaire exprimé à la surface des cellules myéloïdes : cellules dendritiques, macrophages, monocytes et éosinophiles. [21, 70-72] Les macrophages spléniques et alvéolaires, et les cellules de Kupffer expriment également le CD89 ([21, 73], contrairement aux macrophages intestinaux dépourvus de CD89. [74] Ce récepteur participe au catabolisme des IgA. [75] Le CD89 est apparenté à une glycoprotéine plaquettaire du collagène GPVI (structure similaire) [76] et aux récepteurs de type Ig des cellules natural killer. [77] Le CD89 est capable aussi de se lier à d'autres ligands comme la CRP [78], le récepteur à la transferrine [79] et les bactéries. [80] **(Figure 8)**

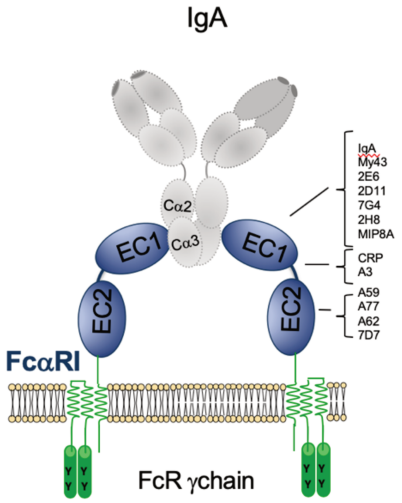


Figure 8 : Les différents ligands du CD89

(Adapté d'après en Mkaddem et al)[41]
Le CD89 (FcαRI) par ses 2 domaines extracellulaires EC1 et EC2 est capable de lier les différents ligands cités ci-dessus.

Le CD89 est composé d'un domaine extracellulaire avec 2 régions D1/ECA et D2/EC2, une région transmembranaire et une queue cytoplasmique. La queue cytoplasmique du CD89 ne contient pas de motif de signalisation, ce sont les deux chaînes γ du récepteur FcγR associées à la partie intracellulaire du CD89 qui sont responsables de la transduction du signal. Les deux sous-unités γ du récepteur FcγR portent le motif activateur ITAM (Immunoreceptor-based Tyrosine Activation Motif). La transduction du signal se fait par la phosphorylation des motifs ITAMs. Le CD89 peut également se retrouver sous une forme clivée avec seulement la partie extracellulaire. [21] (**Figure 9**)

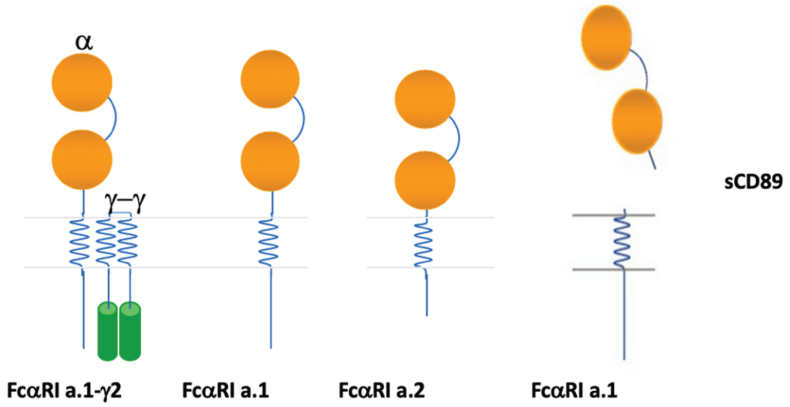


Figure 9 : Les différentes formes du CD89

(Adapté de Monteiro and Van De Winkel, 2003b) [21]
Le CD89 (FcαRI) existe sous 2 formes a.1 et a.2 associées ou non aux chaînes γ. La partie extracellulaire du CD89 peut subir un clivage pour former le CD89 circulant libre (sCD89). On retrouve en jaune les domaines d'immunoglobulines, en blanc le domaine de type carbohydrate, en vert les motifs ITAM des chaînes γ.

La liaison des IgA au CD89 se fait entre les régions Cα2 et Cα3 des chaînes lourdes et le domaine D1 du CD89, avec comme ratio une IgA pour deux récepteurs CD89. En effet, l'implication du domaine D1 du CD89 a été mise en évidence en utilisant des anticorps bloquants ciblant l'un ou l'autre des 2 domaines Ig, et confirmée par la résolution cristallographique de la liaison IgA-CD89 par Herr et al. [81] (**Figure 10**) Ce récepteur peut lier les IgA1 et les IgA2 sous formes monomériques ou polymériques avec une plus grande affinité pour les pIgA. [82]

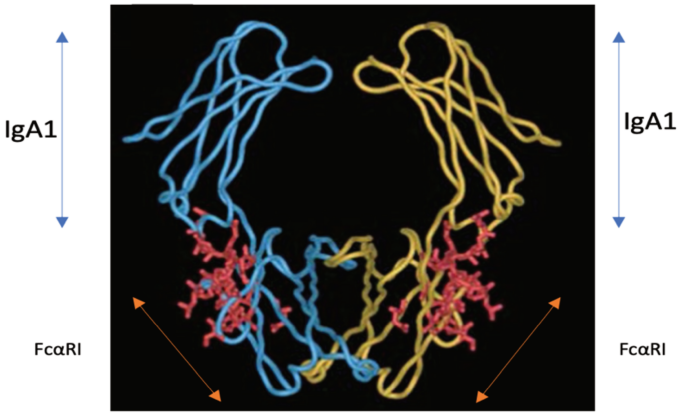


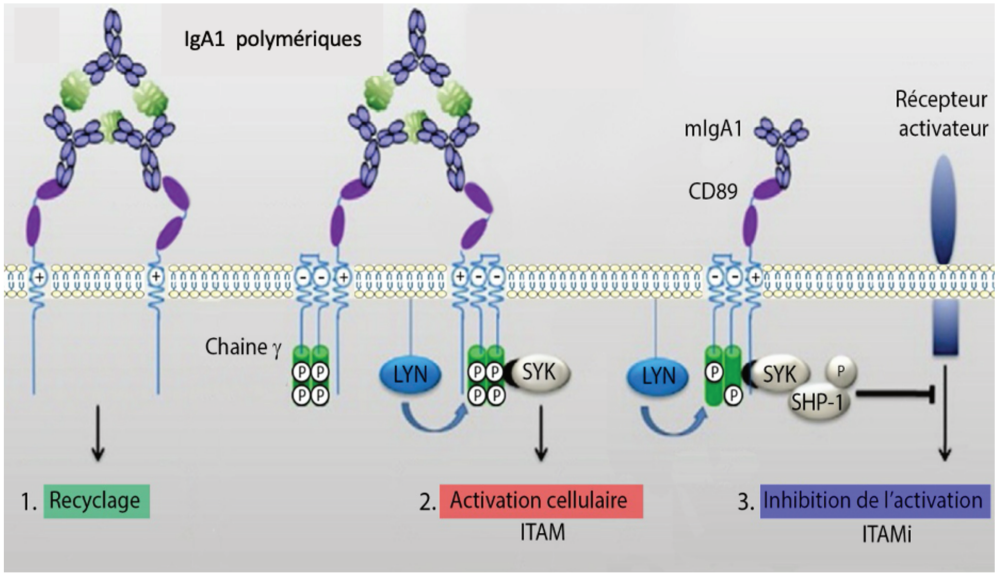
Figure 10: Le site de lésion du FcαRI (CD89)

(Adapté de Woof and Russell, 2011)[14]
Représentation cristallographique du site de liaison entre la portion Cα2 et Cα3 des IgA1 (bleu et jaune) au CD89 membranaire (rouge).

Lorsque le CD89 n'est pas associé au récepteur FcγR il peut permettre l'internalisation et le recyclage des IgA. [21, 83] Par contre lorsque le CD89 est lié au récepteur FcγR, la liaison de complexes de pIgA ayant fixé l'antigène (opsonisation de pathogènes ou de macro-complexes) peut induire la phosphorylation complète des quatre tyrosines de motifs ITAM conduisant à un signal activateur avec à la production de facteurs pro-inflammatoires (IL-1 β, IL-8, ions superoxydes...)[82, 83] et à la présentation antigénique via le complexe majeur d'histocompatibilité´(CMH). [21, 83]

L'activité du CD89 dépend de la polymérisation des IgA. Les mIgA se lient transitoirement au CD89 avec une faible affinité alors que les pIgA1 se lient au CD89 avec une forte avidité. **(Figure 11 A)** [21] En cas de liaison des mIgA, la phosphorylation des motifs ITAM n'est que partielle. Cela induit un signal inhibiteur appelé ITAM inhibiteur (ITAMi), semblable à celui induit par un anticorps spécifique ciblant le CD89 (clone A77). [39] Cela entraine également l'inhibition des récepteurs aux IgE (récepteur FcεRI) ou aux IgG. **(Figure 11 B)**

A



B

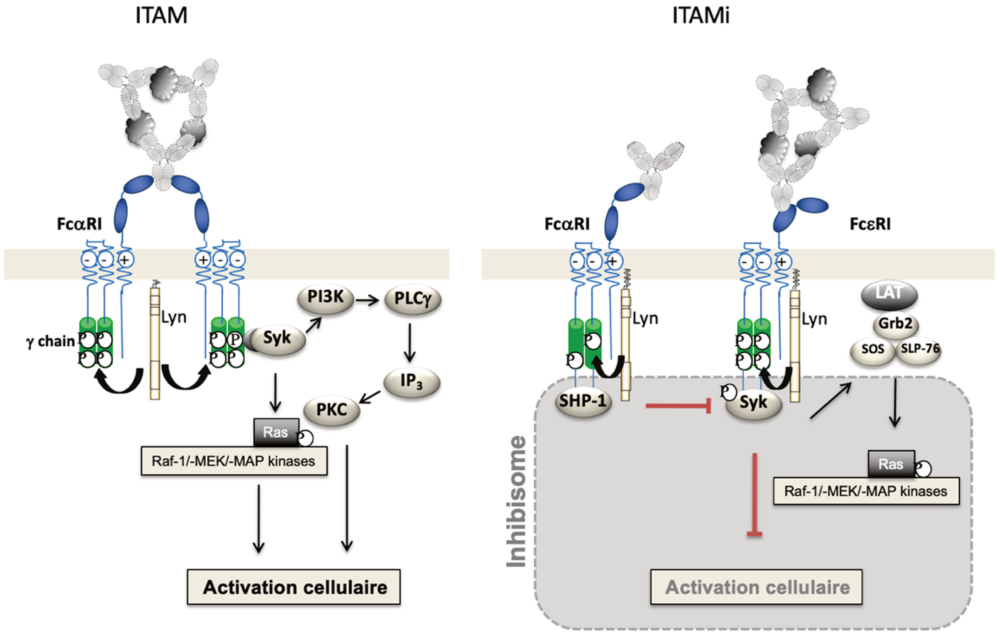


Figure 11: Les différentes réponses possibles aux IgA

(Adapté de Ben Mkaddem et al., 2013) **[41]**

A. La liaison des complexes d'IgA (ou d'IgA monomérique) au récepteur CD89 non lié aux chaines γ entraine un recyclage du récepteur et des complexes (1). Si le récepteur CD89 est lié aux chaines γ, la lésion des IgA complexées entraine une activation cellulaire avec une réponse

ITAM (2) alors que si la liaison d'IgA est monomérique, elle va elle entrainer un signal inhibiteur et empêcher l'activation cellulaire avec une réponse ITAMi (3).

B. Les 2 types de réponse sont la réponse activatrice ITAM et la réponse inhibitrice ITAMi. La réponse ITAMi inhibe en parallèle l'activation des récepteurs aux IgE le FcεRI.

Cette activation du CD89 dépend également d'une serine phosphatase (PP2A). Une fois activée par des cytokines (telle que qu'IL-3, GM-CSF), PP2A se lie à la queue intracellulaire du récepteur inactif et entraine une déphosphorylation de la sérine 263 activant ainsi le CD89. [84, 85] Le CD89 actif est capable de se lier aux IgA avec une plus grande avidité et d'initier ainsi une réponse immunitaire comme la phagocytose d'agents pathogènes recouverts d'IgA. [85] PP2A peut être qualifié de facteur commutateur important dans l'activation du CD89. **(Figure 12)**

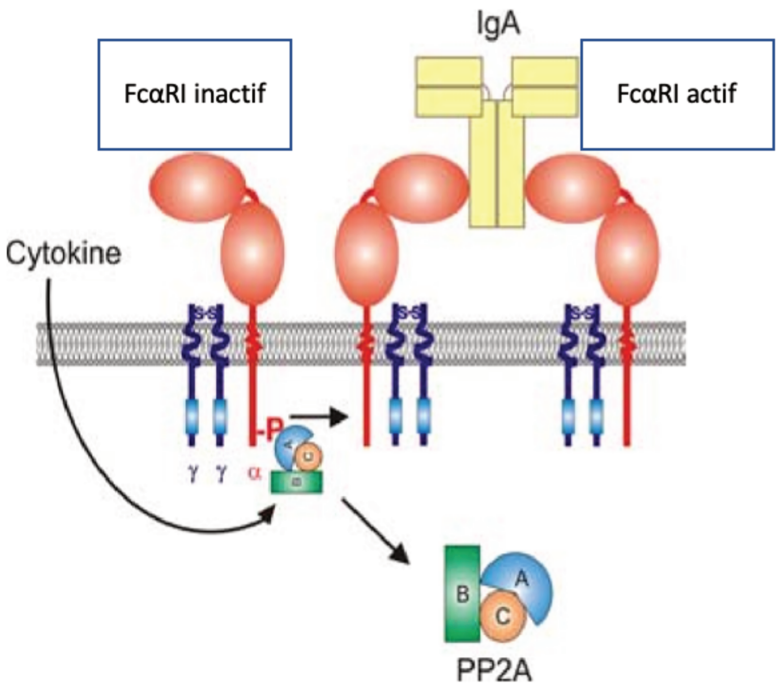


Figure 12: Le rôle de PP2A dans la signalisation du CD89

(Adapté de Bakema et al., 2008).[85]
Le domaine intracellulaire du FcαRI est inactif lorsqu'il est phosphorylé (P) par des kinases. Lors d'une stimulation cytokinique, PP2A s'active et entraine une déphosphorylation de la partie intracellulaire sur les résidus S263 du récepteur.

L'activité du CD89 dépend également de sa glycosylation. Le CD89 est une glycoprotéine de 266 acides aminés (55 à 100 kDa), dont le poids moléculaire théorique est de 30kD. Cependant son poids diffère selon le type cellulaire en lien avec son degré de glycosylation. Il est de 55-75 kD pour les monocytes et neutrophiles et 70-100 kD pour les éosinophiles. [86, 87] Cette glycosylation est impliquée dans l'affinité de liaison aux IgA. [70, 73]) En effet, la désialylation du CD89 ou la suppression du site de glycosylation en position 58 [88] entrainent une augmentation importante de sa capacité de liaison aux IgA. [70] L'affinité du CD89 pour les IgA serait donc régulée par ses glycosylations, ce qui rend ce récepteur suffisamment sensible pour induire une réponse activatrice ou inhibitrice en fonction de la polymérisation de l'IgA.

Il existe plus de 10 variants d'épissages alternatifs identifiés dans les monocytes et les PNN du CD89. Cependant il faut noter qu'il n'existe qu'un type de variant retrouvé dans la N-IgA avec un défaut d'expression et de glycosylation uniquement retrouvé dans les monocytes. Les neutrophiles quant à eux ne présentent aucune anomalie du CD89 et restent identiques à ceux d'individus sains. [82, 89] Cette particularité du CD89 et le rôle de ce variant retrouvé uniquement chez des patients ayant une N-IgA n'a jamais été expliqué.

Le CD89 sous sa forme soluble (sCD89) semble jouer un rôle important dans la N-IgA. Les mécanismes qui conduisent à la formation de cette forme soluble reste non élucidés. Le CD89 est capable d'être clivé dans sa forme extra cellulaire au niveau des monocytes. Seul les pIgA entrainent le clivage du CD89. **(Figure 13)** En effet, la stimulation de cellules avec des mIgA ne provoque aucune libération ou modification du récepteur.[87]

Le CD89 lié aux IgA permettrait la polymérisation des IgA sériques entre elles formant des complexes immuns de haut poids moléculaires. Le clivage du CD89 suggèrerait l'implication de protéases. Bien que le mécanisme de ce clivage demeure à ce jour inconnu, il a été montré que in vitro des métalloprotéases comme les désintégrines et les métalloprotéases 10 et 17 (ADAM 10 et ADAM 17) étaient capables de cliver le CD89 membranaire.[90] L'addition d'inhibiteurs de métalloprotéases empêcherait le clivage du CD89. [87, 90]

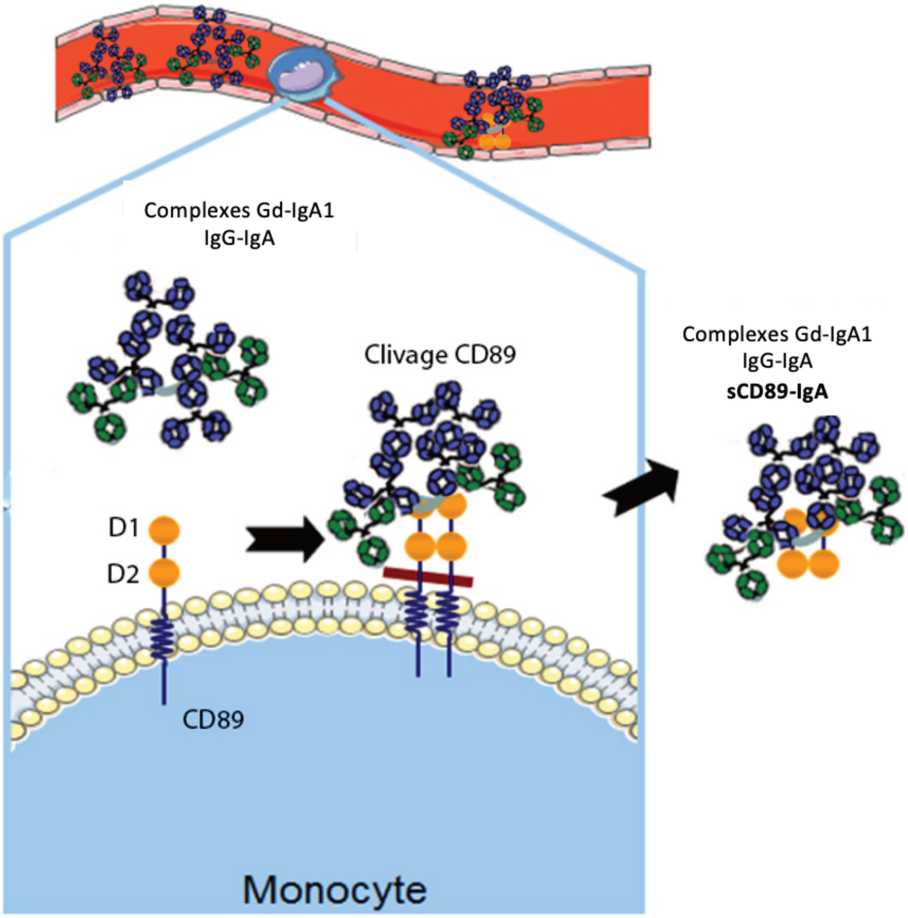


Figure 13 : Le clivage du CD89 par les pIgA

(Adapté de Papista et al., 2011)[91]
Les pIgA formés de Gd-IgA1 (bleu) et d'Ig spécifiques contre les IgA1 (vert) se lient au recepteur CD89 sur les monocytes. Cette lésion entraine le clivage de la partie extracellulaire du CD89 formant le sCD89 dont le mécanisme reste encore inconnu. Le sCD89 se retrouve ainsi piégé dans des macrocomplexes circulants formant les complexes sCD89-IgA.

En résumé la signalisation par le CD89 est régulée à trois niveaux. En premier lieu, son expression membranaire qui peut être régulée par différents facteurs détaillés dans le **Tableau 1**. Ensuite, l'association du CD89 avec la chaine γ, nécessaire à la transduction du signal, est stimulée par l'interféron γ (IFNγ) et le Phorbole 12-Myristate-13-Acetate (PMA) mis en évidence *in vitro* sur une lignée monocytaire [83], montrant ainsi que le contexte cytokinique joue sur le type de réponse du monocyte. Enfin, l'avidité du CD89 pour l'IgA a été décrite comme étant régulée positivement par des cytokines différentes selon le type cellulaire exprimant le CD89 : l'IL4 et l'IL5 augmenteraient l'avidité du récepteur sur les éosinophiles. [92] Les Granulocytes Colony-Stimulating Factor (G-CSF) et

Granulocytes Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) augmenteraient l'affinité du récepteur sur les neutrophiles. [93]

Type cellulaire	Augmente l'expression	Diminue l'expression
Monocytes/macrophages	Calcitriol, PMA, TNF-α, IL-1β, GM-CSF, LPS	TGF-β, IFN-γ, suramine, pIgA
Neutrophiles	IL-8, TNF-α, GM-CSF, FMLP, ZAS, ionomycine	
Eosinophiles	Ionomycine	

Tableau 1 : Les modulateurs de l'expression du CD89

(Adapté de Monteiro and Van De Winkel, 2003)[21]

2. Le récepteur aux immunoglobulines polymériques (pIgR)

C'est un récepteur permettant la transcytose des IgA dimériques et des IgMs pentamériques. Le pIgR est une glycoprotéine transmembranaire qui comporte une partie extracellulaire avec cinq domaines de type Ig, d'une séquence transmembranaire et d'une queue intracellulaire. Il se situe à la surface basolatérale des cellules épithéliales. La lésion du ou des récepteurs aux immunoglobulines se fait par la chaine J. [94] Ce récepteur est impliqué dans les défenses immunitaires des muqueuses. [95] Ce récepteur peut être également activé par d'autres molécules comme les Toll like receptors (TLR). Des modèles murins déficitaires en TLR ont une expression réduite du pIgR dans les cellules épithéliales. [96]

La quantité d'IgA pourrait donc être régulée par le microbiote et les cellules épithéliales via le pIgR. On peut également rappeler que lors de la transcytose d'une IgA, une partie du pIgR est clivée, formant le composant sécrétoire lié à la partie Cα3 et Cα2 de l'IgA. [97]

3. Le récepteur Fcα/μ

Le récepteur Fcα/μ est un récepteur membranaire homodimérique pouvant à la fois reconnaitre les IgA et les IgM. [94, 98] On retrouve une homologie importante entre son domaine extracellulaire et celle du pIgR. [30, 43] Il permet l'endocytose des bactéries recouvertes d'IgM. [99] Les souris déficientes en récepteur Fcα/μ ont un taux d'IgA circulants plus importants. [100] Ce récepteur est retrouvé au niveau des cellules mésangiales et serait impliqué dans le développement de la néphropathie à IgA. [101]

4. Les récepteurs alternatifs :

Ces récepteurs sont définis comme étant des récepteurs alternatifs et non exclusifs au Ig mais pouvant reconnaitre les IgA **(Figure 14)**.

a) Le récepteur à la transferrine (TfR)

Le TfR1 est un récepteur alternatif aux IgA impliqué dans la physiologie de la N-IgA.[75] Ce récepteur existe sous 2 formes TfR1 et TfR2. Le TfR1est une glycoprotéine ubiquitaire. Il est connu également sous le nom de CD71 ou récepteur à la transferrine. [102] Il a été décrit initialement comme le récepteur transportant la transferrine [102] et la protéine de l'hémochromatose humaine. [103]

Le TfR1 est constitué de 2 monomères identiques reliés par 2 lésions disulfures. Ce récepteur comporte un domaine extracellulaire C terminale avec 3 sites de glycosylation, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique N terminal. [104] Le TfR1 exprimé à la surface des cellules mésangiales [75] a la capacité de se lier aux IgA et particulièrement aux formes polymériques hypogalactosylées. [105] Le TfR1joue un rôle dans l'érythropoïèse avec les pIgA1 qui agissent en collaboration avec l'érythropoïétine (Epo). [106] Ce récepteur sera décrit plus amplement dans la section d'après.

b) Le récepteur aux asialoglycoprotéines (ASGP-R)

Le récepteur aux asialoglycoprotéines (ASGPR) exprimé au niveau hépatique permet le catabolisme des IgA. [107] Ce récepteur reconnait les résidus galactosylés des glycoprotéines sériques retrouvées sur les IgA permettant ainsi sa dégradation intracellulaire hépatocytaire. [107] Ce récepteur est aussi exprimé par les éosinophiles humains et du rat mais pas chez la souris. [108] Les IgA sont principalement catabolisés au niveau du foie [109] avec un transport biliaire.

Ce récepteur a une affinité plus importante pour les IgA2 que pour les IgA1 expliquant ainsi des taux sériques d'IgA1 plus important que IgA2. [110]

c) Le récepteur DC-SIGN / SIGNR1

C'est un récepteur capable de se lier aux IgA sécrétoires permettant l'endocytose de l'IgA et de son récepteur. [111] Le récepteur DC-SIGN / SIGNR1 (CD209) présent à la surface des cellules dendritiques et des macrophages est un récepteur de la lectine de type C. Ce récepteur permet la reconnaissance des hydrates de carbone type mannose qui sont associés aux agents pathogènes PAMP (bactéries, fongiques et virus). Leur lésion active la phagocytose. [112]

Initialement ce récepteur a été décrit comme ayant la capacité de se lier à la protéine ICAM-3 sur les lymphocytes T [113] et à la protéine gp120 du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Cette dernière liaison entraine l'infection des lymphocytes T par le VIH. [114]

En se liant aux IgA sécrétoires et par l'endocytose, le récepteur DC-SIGN / SIGNR1 induit une tolérance de la DC et la production d'IL-10 favorisant l'expansion de lymphocytes T régulateurs. [115] Il joue donc également un rôle dans la tolérance immunitaire des muqueuses via les cellules dendritiques. [115]

d) Le récepteur inhibiteur aux IgA Fc receptor-like Protein 4 (FcRL4)

Le FLR4 est un récepteur multi-ligand avec une fonction inhibitrice. On retrouve ce récepteur à la surface des lymphocytes B et principalement à la surface des lymphocytes B mémoires des muqueuses comme ceux présents dans les amygdales. La liaison des IgA (et plus faiblement des IgG3 et IgG4) à ce récepteur permettrait de limiter la réponse des lymphocytes B vis-à-vis des antigènes du soi, des bactéries commensales via l'induction d'une activation chronique au travers d'une liaison aux phosphatases Src homology region 2 domain-containing phosphatase (SHP) 1 et -2. Ce récepteur inhibiteur pourrait être la cible de nouvelles thérapies régulant les lymphocytes B. [116, 117]

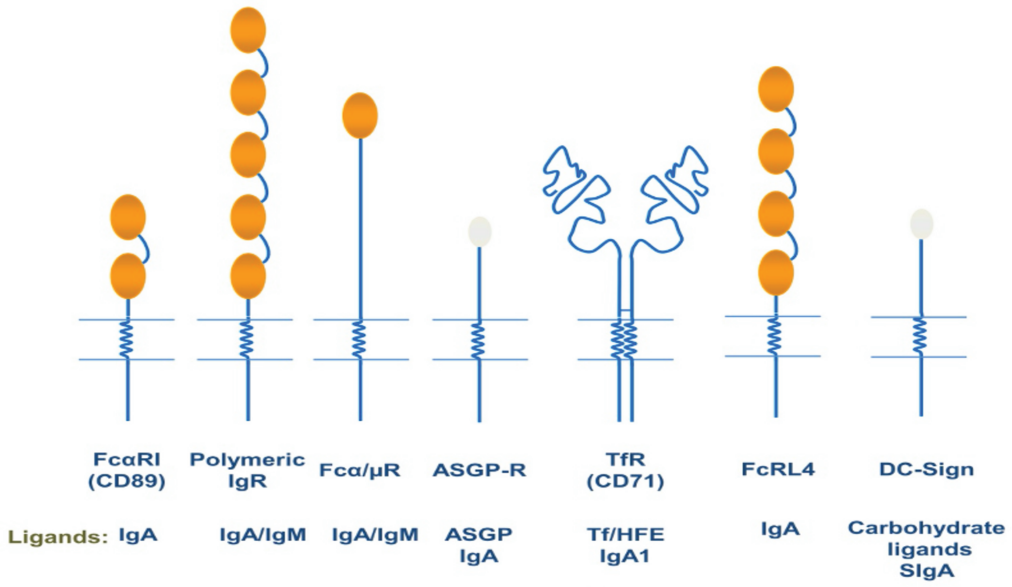


Figure 14 : Les différents récepteurs aux IgA

(Adapté de Monteiro and Van De Winkel, 2003b)[21]
On retrouve en jaune les domaines d'immunoglobulines, en blanc le domaine de type carbohydrate, en vert les motifs ITAM des chaînes γ.

C. Les mécanismes pathogéniques de la néphropathie IgA

1. Le premier hit, le défaut de galactosylation des IgA

La première anomalie à avoir été mise en évidence chez les patients ayant une N-IgA est un défaut de galactosylation des IgA. [4, 118-121] Les éluas des dépôts mésangiaux des biopsies des N-IgA ont montré des IgA chargées négativement [122-124] ainsi que la présence de Gd-IgA1[121]. Aussi, les patients atteints de myélome secrétant une IgA ne développaient la N-IgA que si l'IgA présentait un défaut de galactosylation. [29] Également, les patients ayant un purpura rhumatoïde ne développaient une atteinte rénale que s'ils présentaient des Gd-IgA1 circulants plasmatiques. [125] (**Figure 15**)

Ces Gd-IgA1 retrouvés dans le sérum et le rein formant des complexes immuns peuvent également se retrouver chez des sujets sains. [126] Il a été décrit une sensibilité de 60% et une spécificité de 90 % des Gd-IgA dans la N-IgA. [127, 128] Il a également été montré que des niveaux élevés de Gd-IgA1 sont associés à un mauvais pronostique rénal [129, 130] et à une récidive sur le greffon. [131]

D'autres équipes au contraire ont montré que les Gd-IgA1 n'étaient pas toujours associés à un mauvais pronostic rénal et pouvaient se retrouver dans d'autres glomérulopathies et chez les porteurs sains [126, 132]. Même si dans la majorité des cas, les Gd-IgA1 sont plus élevées dans la N-IgA, sa seule présence ne se suffirait pas au diagnostic de la maladie. [127]

Afin de mieux comprendre le rôle pathogène des IgA1, une souris transgénique exprimant l'IgA1 humaine a été obtenue (la souris α1-KI) avec des IgA1 monomériques et polymériques. [133] Ces souris montraient seulement des dépôts d'IgA1 endocapillaires sans protéinurie ni hématurie soulevant le fait que les IgA1 sont nécessaires mais non suffisantes pour développer la maladie. [79]

Chez les adultes les Gd-IgA1 n'étaient pas corrélées à la protéinurie. [127, 134] Les Gd-IgA1 ont été peu étudiées dans la N-IgA de l'enfant avec des résultats contradictoires. Bien qu'un taux élevé soit aussi retrouvé chez les enfants [135, 136], la valeur pronostique des Gd-IgA1 reste controversée en fonction des études. En effet 2 études n'ont trouvé aucun lien avec les données cliniques notamment avec la protéinurie de la N-IgA de l'enfant. [128, 137] Ces études utilisaient pour réaliser leur Elisas la technique de la lectine HAA. Les 2 dernières études chez l'enfant utilisant les derniers kits Elisa Km55 comprenant un anticorps monoclonal Gd-IgA1 ont retrouvé que le niveau de Gd-IgA1 était corrélé à la fonction rénale [138, 139] mais aussi aux dépôts mésangiaux d'IgA [139]. Le niveau de Gd-IgA1 a été retrouvé stable pendant des années dans des cohortes de patients N-IgA pédiatriques et adultes. [140] Le niveau de Gd-IgA1 a été retrouvé moins élevé dans la N-IgA de l'enfant que dans la N-IgA de l'adulte. [127]

2. Le deuxième hit, la présence d'autoanticorps IgG anti-Gd-IgA1

Il a été rapporté un taux plus élevé d'IgA1 dans la N-IgA chez l'adulte [141] et de façon moins importante chez l'enfant [142] sans qu'on ne retrouve de corrélation avec la sévérité de la maladie. [143] On retrouve à la fois une augmentation des monomères mais principalement des pIgA. La formation des pIgA vient de la capacité des Gd-IgA1 à se polymériser. L'absence de galactosylation de l'IgA1 est

considérée par le système immunitaire comme un néo-épitope avec la formation d'anticorps IgG, mais aussi d'IgA, formant ainsi de volumineux complexes immuns. [4, 144]

Ces anticorps sont dits naturels car ils peuvent aussi être détectés chez les individus sains. En effet ils sont impliqués dans la réponse infectieuse bactérienne comme certains virus (le virus respiratoire syncytiale, virus de l'Epstein-Barr) et certaines bactéries (comme le streptocoque) qui expriment le résidu N-acétyle galactosamine à leur surface. [145-147] Une étude a révélé la colocalisation de la protéine (M4) du streptocoque avec les dépôts mésangiaux d'IgA1 chez des patients atteint de N-IgA. [148] Une étude a rapporté aussi la présence d'entérovirus dans les biopsies rénales. [149] Une autre étude a rapporté la présence d'antigènes du parainfluenzae dans le sérum et les biopsies rénales des patients ayant une N-IgA .[150] Cependant aucun antigène spécifique bactérien ou viral n'a pu être détecté au sein des complexes immuns.

Dans la néphropathie à IgA, les IgG reconnaissant les Gd-IgA1 ont une structure particulière. Le fragment Fab impliqué dans la reconnaissance du O-glycoside dégalactosylé est la cible d'une mutation qui substitue une alanine pour une serine. Cela lui confère une affinité très importante pour les Gd-IgA1. Cette mutation somatique pourrait être en lien avec la réponse immunitaire anti-bactérienne. [151] Les complexes IgG-IgA1 présenteraient une sensibilité de 89% et avec une spécificité de 92% pour le diagnostic de la N-IgA. Cela représente une spécificité et une sensibilité bien meilleure que pour les Gd-IgA1. [152] **(Figure 15)**

En termes de facteurs pronostiques, les IgG anti-Gd-IgA1, ou anti-IgA, seraient associées à un risque de progression de la maladie. [152, 153] Ces complexes IgG-IgA seraient corrélés à la protéinurie chez les patients atteints. [151] Cependant même s'ils semblent indéniablement impliqués dans la maladie on ne les retrouve pas toujours dans la biopsie rénale de ces malades. [154-156]

Les IgG-IgA ont également été étudiés dans la N-IgA de l'enfant. Leurs taux étaient plus importants dans le purpura rhumatoïde avec atteinte rénale que dans le purpura sans atteinte rénale. [157] Ils ont également été retrouvés augmentés dans la N-IgA de l'enfant en comparaison aux patients contrôles corrélés avec la protéinurie des 24h00. [158]

3. Le troisième hit, la présence du complexe sCD89-IgA

a) 3.3.1 le rôle du CD89 soluble (s) et du sCD89-IgA.

L'augmentation des taux sériques d'IgA et des pIgA a été également expliquée par un défaut de clairance par ses récepteurs. [159] Comme décrit précédemment, le CD89 appartient à la famille des 6 récepteurs connus des IgA. [160] Le CD89 FcαRI est un récepteur qui se lie à la fraction Fc des IgA mais aussi à d'autres immunoglobulines et protéines. [70, 71, 143] Son expression est retrouvée uniquement au niveau des cellules myéloïdes et est absente dans le MALT. [74, 81] Ce récepteur permet l'internalisation et la catabolisation des IgA1 au niveau des cellules myéloïdes circulantes. Le FcαRI a une affinité modérée pour l'IgA monomérique (Ka à 5 x 10^6 to 10^7 M^{-1}) mais présente une affinité beaucoup plus forte pour les polymères. [21]

La particularité du CD89 dans la néphropathie à IgA est qu'il existe sous une forme soluble (sCD89) qui se retrouve complexé au sein des complexes immuns d'IgA. Cette forme soluble est absente des

individus sains. [161] Son expression membranaire au niveau des cellules myéloïdes circulantes est diminuée dans la N-IgA sans que l'on ne retrouve un défaut de synthèse intracellulaire. [161]

En effet le sCD89 se retrouve piégé au sein des complexes immuns. Les IgA1 polymériques se lieraient de manière covalente au CD89 [70, 143], et leur hypoglycosylation favoriserait la liaison au récepteur chez les patients atteints de N-IgA [88], ce qui activerait le CD89 [162] et induirait le clivage de sa partie extracellulaire, formant dans la circulation des macro-complexes d'IgA contenant le sCD89. [5, 21] Le mécanisme de ce clivage reste encore inconnu. **(Figure 15)**

Le sCD89 a été retrouvé sous deux isoformes : de 50 à 70 kDa et à 30 kDa. Ces isoformes semblent jouer un rôle dans la formation des complexes immuns. Cependant leurs rôles exacts et le contrôle de l'excrétion des différents isoformes reste non élucidé. L'isoforme de 50 à 70 kDa est exclusivement augmenté dans le sérum des patients avec N-IgA après la liaison de pIgA avec CD89 non associé à FcRγ [5] alors que l'isoforme 30 kDa est dépendant du FcRγ. [163]

Le niveau de sCD89-IgA serait lui aussi un facteur pronostique. Il a été montré qu'un faible taux de sCD89-IgA chez l'adulte était lié à une maladie active avec un probable trapping des complexes dans le mésangium rénal. [163] En effet le CD89 a également été retrouvé associé aux dépôts mésangiaux d'IgA. [79] Il a également été montré que des taux faibles de sCD89-IgA étaient lié à une récidive de la maladie. [131] Cependant autre étude coréenne n'a elle retrouvé aucun lien avec l'évolution rénale de la maladie. [164]

Le complexe sCD89-IgA a aussi été étudié dans la N-IgA de l'enfant en particulier dans le purpura rhumatoïde. Pillebout et al ont montré que les taux des complexes sCD89-IgA et IgG-IgA étaient plus élevés chez les purpuras ayant une atteinte rénale comparé aux purpuras sans atteinte rénale. [157]

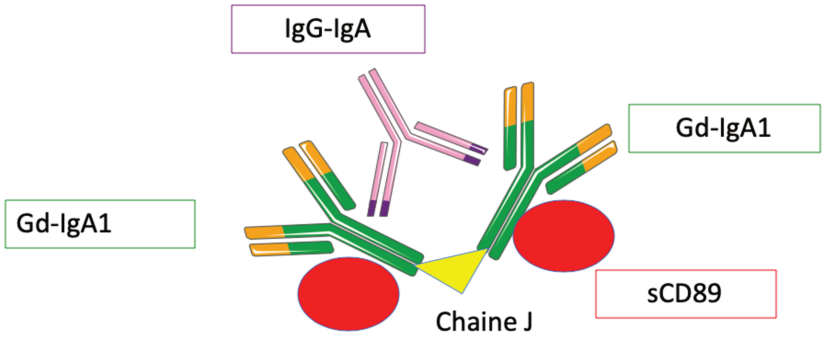


Figure 15 : Les 3 hits dans la néphropathie à IgA

(Adapté de CAMBIER et al)[165]
Le premier hit est la présence de Gd-IgA1 pouvant se dimériser par la chaine J et former des volumineux complexes. Le deuxième hit est la reconnaissance des complexes Gd-IgA1 par des autoanticorps type IgG pour former des complexes IgG-IgA. Le troisième hit est la présence du sCD89 piégé dans les complexes immuns à Ig.

Ces 3 hits pourraient donc être des potentiels biomarqueurs d'évolution de la maladie**. (Figure 16)**

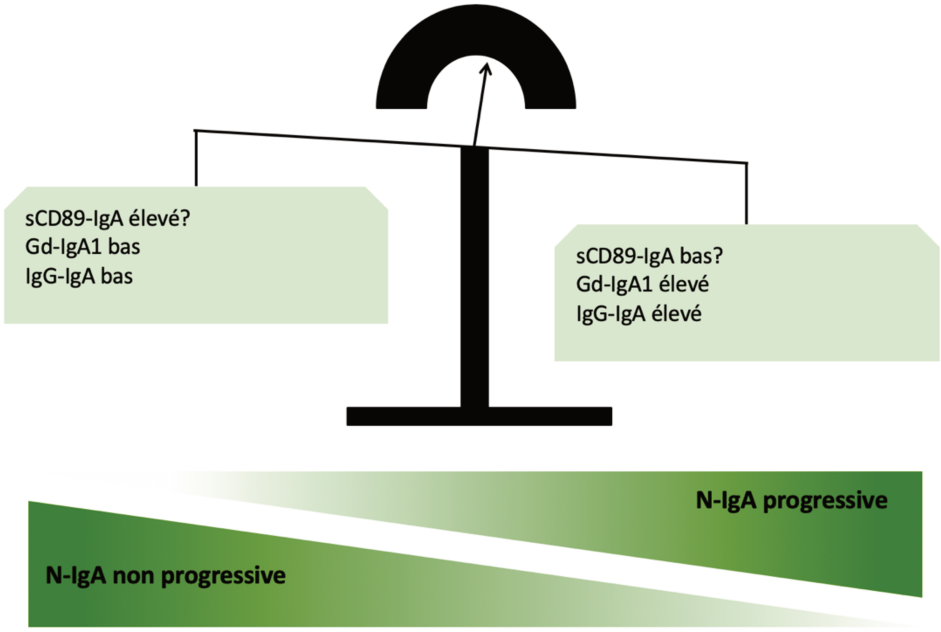


Figure 16 : Le rôle des potentiels biomarqueurs dans l'évolution de la N-IgA de l'adulte

(Adapté de Robert et al, 2015)[46]
Des taux de complexes immuns sCD89-IgA élevés avec des taux de Gd-IgA1 et IgG-IgA bas pourraient être associés chez l'adulte à une maladie non progressive. Au contraire des taux de complexes immuns sCD89-IgA bas avec des taux de Gd-IgA1 et IgG-IgA élevés pourraient être associés chez l'adulte à une maladie progressive.

b) L'aide des modèles animaux pour déterminer le rôle du CD89

Les modèles murins n'ont pas permis de caractériser le rôle du CD89 dans la N-IgA car la souris n'exprime pas ce récepteur. Aussi l'IgA de la souris est différente de l'IgA1 humaine puisqu'elle présente une plus petite région charnière sans les sucres de liaison O. Des souris exprimant la chaine lourde de l'IgA1 humaine ont donc été créées (souris α1-KI). [133] Ces souris ne présentaient que des dépôts endothéliaux d'IgA sans anomalies urinaires ou de défaillance rénale.

Une souris transgénique (Tg) exprimant le récepteur CD89 humain a ensuite été créée (souris CD89-Tg). Le transgène dépend du promoteur du CD11b humain spécifique de la lignée myéloïde, entrainant une expression importante de CD89 à la surface des monocytes. Ces souris CD89-Tg ont dans la circulation plasmatique du CD89 soluble formant des complexes avec les IgA murines. Ces souris CD89-Tg développaient tardivement (à 40 semaines) la maladie avec des dépôts mésangiaux d'IgA, un infiltrat macrophagique, une hématurie et une faible protéinurie sans dysfonction rénale. [5] L'injection d'IgA de patients atteints de N-IgA entrainait quant à elle une diminution du CD89 membranaire sur les

cellules circulantes avec des dépôts mésangiaux d'IgA humaines et une hématurie macroscopique indiquant que l'affinité du CD89 pour les IgA humaines était beaucoup plus forte que pour les IgA de souris. [5]

Le croisement des 2 lignées α1-KI et CD89-Tg a permis de générer un autre modèle murin humanisé de la N-IgA, la souris α1-KI -CD89-Tg. Chez cette souris exprimant à la fois le CD89 et les IgA1 humaines, on retrouvait un phénotype complet de la maladie précocement (au bout de 12 semaines) avec des dépôts mésangiaux d'IgA1 dans le rein, une protéinurie accompagnée d'une hématurie avec une dysfonction rénale en lien avec la formation de complexes circulants sCD89-IgA associée à une baisse de l'expression du CD89 à la surface des monocytes. [79] **(figure 17)** Cette double souris transgénique confirme que les complexes sCD89-IgA1 ont un caractère néphrotoxique envers le mésangium. Sans le CD89, il semblerait que l'IgA1 se lie préférentiellement aux cellules endothéliales. Le sCD89 libre circulant a donc un effet pro-inflammatoire.

Cependant il semblerait que le sCD89 à lui seul n'engendre pas la maladie chez la souris normale. L'injection du sCD89 recombinant à une souris sauvage n'induisait pas de dépôts d'IgA,[166] probablement à cause d'une affinité faible des IgA murines pour le sCD89 humain recombinant. [79] Rappelons que les IgA monomériques en se liant au CD89 entrainent une réaction anti-inflammatoire [39, 167] alors que les pIgA se fixant au CD89 entrainent une agrégation du récepteur menant à une activation du motif ITAM de la chaîne FcRγ. Sa phosphorylation entraine un processus d'activation des kinases menant à une réponse inflammatoire.[168] Il semblerait que cette agrégation induirait le clivage du CD89 et la formation du CD89 soluble. [87] Une collaboration CD89 et IgA serait donc nécessaire pour obtenir le caractère néphrotoxique dans la N-IgA.

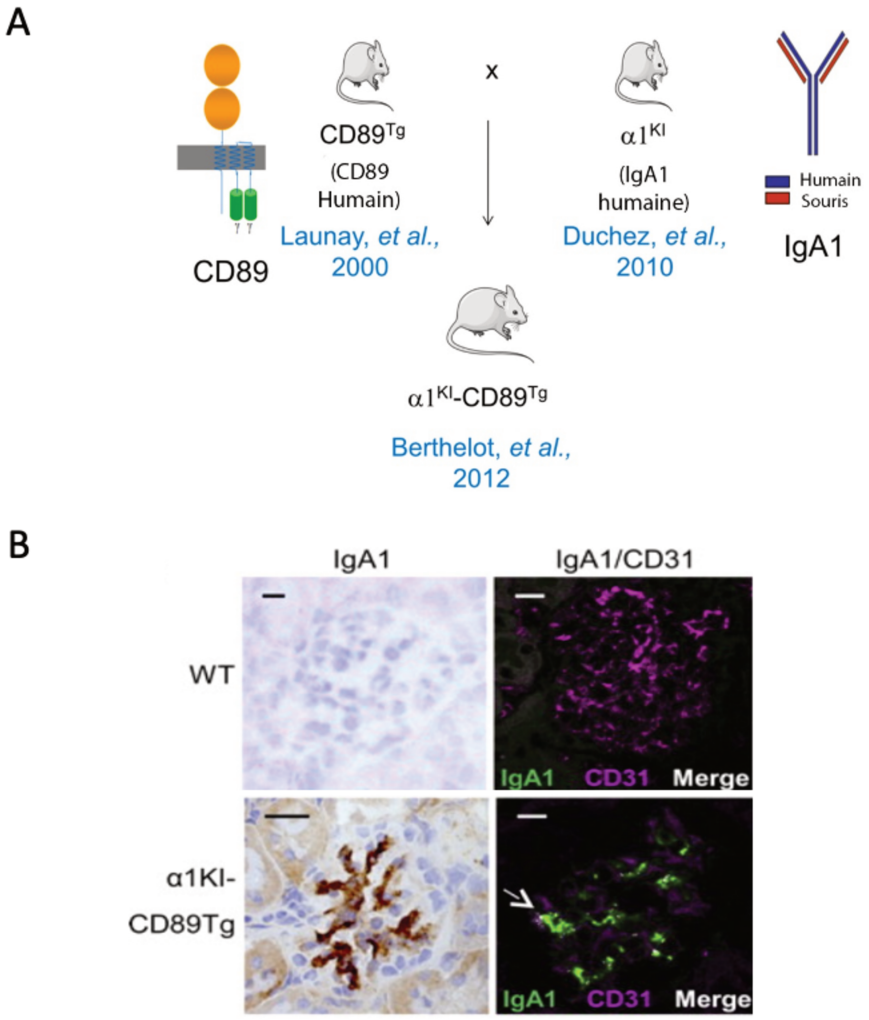


Figure 17 : Le modèle de la souris humanisée ayant le phénotype complet de la N-IgA

(Adapté de Launay et al 2000, Duchez et al 2010, Berthelot et al 2012)[5, 79, 133]

A. Le croisement de la souris α1-KI exprimant les IgA1 humaines et CD89-Tg exprimant le CD89 a donné un modèle murin de N-IgA.

B. Immunohistochimie chez les souris Wild type (WT) et α1-KI-CD89-Tg. A gauche, on observe chez les souris α1-KI-CD89-Tg des dépôts d'IgA1 en marron. A droite en immunofluorescence, on observe aussi des dépôts d'IgA1 en vert chez la souris α1-KI-CD89-Tg sans co-localisation avec le CD31, marqueur endothélial et pas dans la souris WT.

4. Les dépôts des complexes immuns IgA dans le mésangium

a) L'identification des possibles récepteurs aux complexes immuns

Les gros complexes immuns d'IgA sont trop volumineux pour être éliminés dans l'espace de Disse par la lésion au récepteur ASGPR mais suffisamment petit pour passer les capillaires fenestrés et se déposer dans le rein entrainant les dépôts mésangiaux d'IgA et la prolifération mésangiale. [107, 109] Des études ont montré que les complexes immuns contenant les Gd-IgA1 étaient capable d'induire in vitro de la prolifération mésangiale quand leurs tailles étaient supérieures à 800 KDA. [169, 170] Ces complexes entrainent une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, IL-1B, des chémokines (IL-8, macrophage inflammatory protein MIP-2, interferon-inducible protéine INF) ou des facteurs de croissance (tumor necrosis factor TNF-α, transforming growth factor- β TGF-β). [58, 79, 171, 172]

Les complexes immuns d'IgA circulants se lient aux cellules mésangiales (HMC). [173, 174] Cette lésion aux HMC est spécifique [175] et saturable [176, 177] avec une affinité plus grande pour les pIgA que les mIgA. [177]

La recherche du récepteur des HMC fixant l'IgA a été primordiale. Pendant longtemps les études se sont concentrées sur le récepteur CD89. Les premières investigations ont retrouvé l'expression de l'ARN messager (ARNm) du CD89 dans des glomérules humains des patients avec une N-IgA (40%), mais pas chez des individus sains. [178] Aussi l'activation des HMC humaines avec l'IL-6 ou TNF-α conduisait à une augmentation de la liaison des IgA, accompagnée d'une expression plus importante de l'ARNm du CD89. [176] Cependant, ces études n'ont pas été confirmées par autres équipes et l'expression du CD89 à la surface des HMC, ou sa présence in vitro sous forme soluble dans le milieu de culture n'a jamais été retrouvée. [178] Les fragments de transcription identifiés pourraient donc encoder une autre protéine avec une homologie partielle avec le récepteur CD89. [175, 178, 179]

Les récepteurs pIgR et le ASGP-R ont également été étudiés et ne sont également pas exprimés par les HMC. [178]

Le récepteur à la transferrine (TfR1 ou CD71) a été identifié comme un récepteur aux IgA1 et aux complexes immuns IgA1. Le récepteur CD71 est un récepteur essentiel à la vie (les souris KO CD71 ne sont pas viables) car toutes cellules ont besoin d'un apport en fer. Cependant le CD71 peut se lier à plusieurs ligands comme la transferrine, la HFE, les IgA1, le sCD89 et des virus. [103, 180, 181] Comme nous l'avons déjà décrit en partie un peu plus haut, le CD71 est impliqué dans l'homéostasie du fer et joue un rôle dans la réponse à l'EPO pendant une anémie. [106] Il est également impliqué dans la maladie cœliaque en reconnaissant les IgA sécrétoires au niveau des entérocytes. [182]

Ce récepteur a été retrouvé surexprimé au niveau des HMC dans la N-IgA et chez les patients atteints de purpura rhumatoïde. [75, 183] Le TfR1 colocalise avec les IgA et se lie de préférence avec les pIgA avec une plus grande affinité avec les Gd-IgA1.[105] La délétion des sites de glycosylation N- ou O- sur l'IgA1 empêchait sa liaison au TfR1, alors que le traitement avec la sialidase et la β- galactosidase, deux enzymes de glycosylation, permettait d'augmenter l'interaction IgA1-TfR1. [105] Cependant l'inhibition du TfR1 ne bloque pas complètement l'interaction avec les IgA. Le TfR1 n'est probablement pas le seul récepteur aux IgA1. D'autres candidats ont été mis en avant comme l'intégrine α1 / β1 et α2 / β1[184], et la beta1,4-galactosyltransférase 1. [185] **(figure 18-19)**

b) Le rôle de la transglutaminase de type 2

Les modèles murins comme la souris α1-KI-CD89-Tg a permis de mieux comprendre le mécanisme du TfR1. Les complexes immuns sCD89-IgA1 étaient capables de se lier au CD71 murin par les IgA1 mais aussi via le sCD89. [79] L'interaction du sCD89 seul serait donc capable d'induire une surexpression du TfR1 avec une production de cytokines. Cette interaction fait intervenir une autre molécule qui est la transglutaminase de type 2 (TG2) grâce à une boucle d'auto-amplification. La liaison du sCD89 et des Gd-IgA1 induirait l'expression de la TG2 une enzyme calcium dépendante complexée au CD71 membranaire permettant de stabiliser l'interaction avec les complexes immuns circulants. [79] La TG2 est connue pour son implication dans le développement de la fibrose rénale. [79, 186, 187] Ikee *et* al ont été les premiers à montrer son hyperexpression dans le mésangium des patients atteints de la N-IgA. Ils ont montré que la TG2 était surexprimée chez les patients ayant une N-IgA et que son expression était en lien avec la sévérité clinique et histologique de la N-IgA. [188] Berthelot et al ont permis de confirmer cette surexpression aussi chez les patients ayant une N-IgA et ont montré aussi que chez les souris α1-KI-CD89-Tg, la surexpression de la TG2 colocalisait avec les dépôts d'IgA1. La TG2 était beaucoup moins exprimée chez les souris α1-KI. [79] Afin de mieux caractériser le rôle de la TG2 une souris modifiée α1-KI-CD89-Tg avec un knock-out de la TG2 a été créé. Ces souris ne développaient pas ou peu de dépôts d'IgA1 mésangiaux, ni d'hématurie ou de dysfonction rénale et l'expression du CD71 était diminuée. [79]

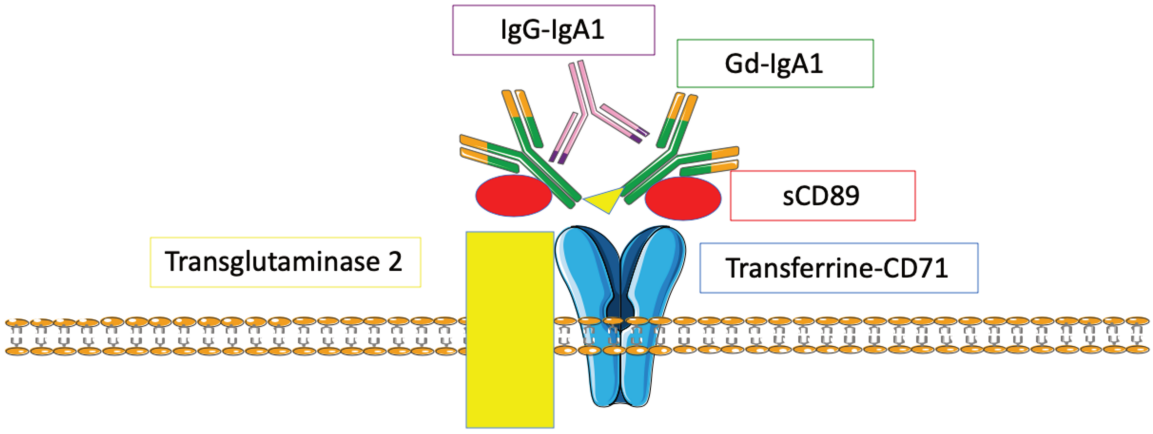


Figure 18 : Les récepteurs aux complexes immuns

(Adapté de CAMBIER et al)[165]
Les complexes immuns IgG-IgA, sCD89-IgA seraient capable de passer les capillaires fenestrés et venir se déposer dans le mésangium. Ils se lieraient ensuite au récepteur mésangial de la transferrine TfR1 (CD71) et à la transglutaminase de type 2 entrainant un phénomène d'auto-amplification.

c) Les voies de signalisation mésangiales

Il semblerait que la voie des MAPK/ERK kinase soit impliquée dans la voie de signalisation de la prolifération mésangiale induite par les complexes d'IgA1. Les MAPK sont un ensemble de protéines kinases nécessaires à la mitose des cellules. Les pIgA1 sont capables d'induire une prolifération mésangiale via un signal calcique et une phosphorylation de ERK avec une sécrétion de TGF-β et de fibronectine. [189] Cette prolifération peut être inhibée par un antagoniste de la tyrosine kinase splénique (SYK, spleen tyrosine kinase)[190] mais également par un inhibiteur p42/44 MAPK ou de la voie NF- κB. [191] Une autre voie également impliquée est celle de la protéine morphogénique osseuse (BMP-7, bone morphogenetic protein- 7) un membre de la superfamille des TGF- β. In vitro, les HMC sous expriment les récepteurs BMP-7 lorsque celles-ci sont cultivées avec des pIgA de patients. La BMP-7 va induire la production du récepteur du péroxyme activée par la prolifération gamma (PPAR-gamma, peroxisome proliferator activated receptor gamma). Cette activation entraine une inhibition de la prolifération mésangiale avec une baisse de sécrétion de TNF-α, IL6, TGF-β et de la fibronectine induite par les IgA des patients. L'agoniste PPAR gamma pourrait reproduire l'effet du BMP-7 en inhibant les production TNF-α et IL6 ainsi que la translocation de NF-κB induites par les IgA des patients. [192]

d) Les voies de signalisation mésangio-podocytaire

Via le récepteur CD71, les pIgA1 vont entrainer une cascade cytokinique avec une prolifération mésangiale ainsi qu'une sécrétion d'interleukine 6 en activant les voies de signalisation PI3K/Akt/mTOR et ERK1/2. [187] Une association entre l'expression mésangiale de ERK1/2 et la protéinurie a été retrouvée pouvant montrer une dérégulation du cross talk mésangio-podocytaire conduisant à une altération de la barrière de filtration glomérulaire par atteinte des podocytes par la prolifération mésangiale. Le détachement des podocytes de la membrane basale, avec l'excrétion urinaire des podocytes a été associé à une dysfonction de la barrière de filtration glomérulaire dans la N-IgA. [193-195] Le podocyte n'exprime aucun récepteur à l'IgA connu. Lai et al ont exploré le cross talk mésangio-podocytaire avec des cultures podocytaires traitées par le medium des cellules mésangiales stimulées par des pIgA des patients ayant une N-IgA. On retrouvait une diminution de l'expression de la néphrine au sein des podocytes. [196] Il a également été montré que la synthèse de TGF-β et l'activation du SRA était induite par les HMC entrainant la fibrose rénale. [197] Les pIgA des adultes [169] mais également des enfants ayant une N-IgA étaient aussi capables d'induire une prolifération mésangiale. [170] **(Figure 19)**

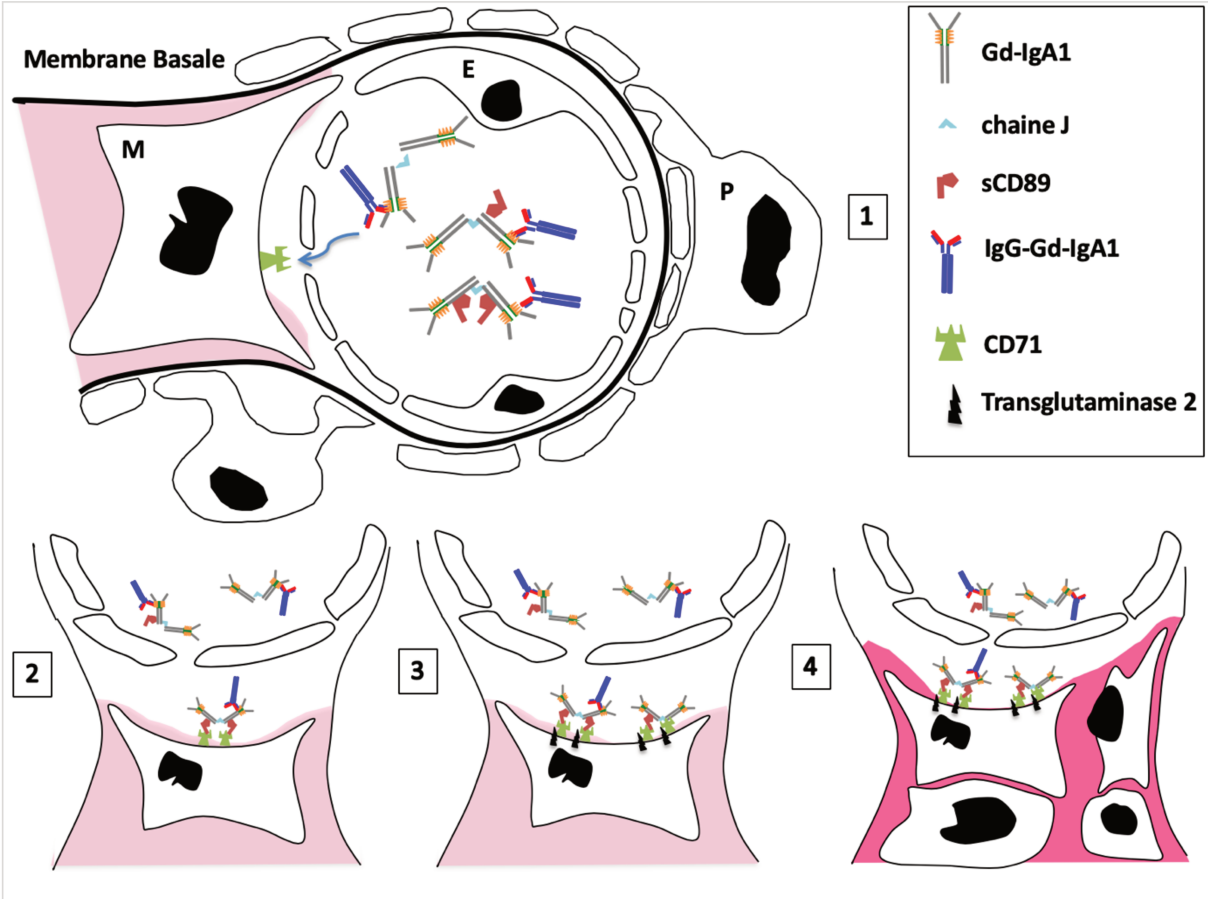


Figure 19 : Schéma récapitulatif de l'inflammation intra-rénale via les complexes immuns IgA et leurs différents récepteurs

(Adapté de Robert et al, 2015)[46]
1.Les complexes immuns d'IgA interagissent avec le récepteur à la transferrine CD71 après avoir passé les capillaires fenestrés. **2**. Cette lésion des complexes dans le mésangium via le CD71 va activer le récepteur à la transglutaminase de type 2 entrainant une stabilisation et une amplification des dépôts des complexes immuns. **3**. Ces dépôts entrainent une activation des cellules mésangiales avec libération de facteurs pro inflammatoires (cytokines, chémokines et hormones de croissance).**4**. S'en suit une prolifération mésangiale avec libération de facteurs entrainant une altération des podocytes pouvant être responsable de la protéinurie.

D. La néphropathie à IgA de l'enfant (Issue de notre chapitre dans Néphrologie de l'enfant et de la revue de la littérature CAMBIER et al pediatric nephrology 2020)[8]

1. Epidémiologie

Son incidence chez les enfants est variable en fonction des régions du monde, entre 2 et 10 pour 100 000 personnes/années. [198] Au Japon, la N-IgA représente la glomérulopathie primitive la plus répandue (40 %). En Europe (France, Italie) et en Australie, les N-IgA représentent 18% des glomérulopathies primitives, et seulement entre 2 et 10% aux États-Unis, au Canada et au Royaume-Uni. Ces variations peuvent être en partie expliquées par une politique de dépistage spécifique et une indication plus large des biopsies rénales chez l'enfant en Asie. Au Japon, tous les enfants scolarisés entre six et dix-huit ans bénéficient d'une analyse d'urine systématique. En Asie et plus particulièrement au Japon, les hématuries asymptomatiques isolées bénéficient d'une biopsie rénale contrairement au reste du monde.

2. Tableau clinique

La N-IgA de l'enfant peut se présenter sous différentes formes cliniques mais la présentation est dominée par l'hématurie :
L'hématurie macroscopique récidivante (visible à l'œil nu), sans caillot ni douleur, survenant typiquement dans les 48h00 suivant le début d'un épisode infectieux ORL ou gastro-intestinale est typiques de la N-IgA de l'enfant. Ces épisodes peuvent s'accompagner d'insuffisance rénale aiguë obstructive par la formation de cylindres hématique lorsque l'hématurie macroscopique est abondante. L'hématurie macroscopique est en général spontanément résolutive ou peut être inaugurale de l'entrée dans la maladie.
L'hématurie microscopique (>10 000 hématies) isolée et asymptomatique, généralement découverte lors d'un examen systématique (bandelette urinaire chez le pédiatre), accompagnée ou non d'une protéinurie glomérulaire.
Les autres présentations possibles sont :
Le syndrome néphrotique impur, plus fréquent chez les enfants (7 et 10%) et les adolescents que chez l'adulte, il est associé à un risque élevé de progression vers l'insuffisance rénale terminale (IRT). [199] Il existe une entité de chevauchement entre la N-IgA et les lésions glomérulaires minimes du syndrome néphrotique idiopathique (N-IgA-LGM) reposant sur la présence de dépôts d'IgA mésangiaux et de prolifération mésangiale isolée et d'un syndrome néphrotique. Ces patients présentent un effacement diffus podocytaire en microscopie électronique. L'incidence de la N-IgA-LGM est variable entre 2,8% à 8%. Le syndrome néphrotique idiopathique à LGM est l'étiologie la plus fréquente de syndrome néphrotique chez les enfants et la N-IgA est une des glomérulopathies primitives les plus fréquentes. [200] Leur association est probablement fortuite et ne suggère pas de lien physiopathologique sous-jacent. Cette entité a été décrite pour la première fois dans les années 1980. [201, 202] Le pronostic à court terme et la réponse aux stéroïdes sont équivalents aux LGM du SNI comme retrouvés dans les études Shen et Herlitz. [203, 204] La prise en charge de la N-IgA devrait être équivalente à celle du syndrome néphrotique idiopathique isolé, comme il est suggéré dans les recommandations KDIGO. [205]

La glomérulonéphrite rapidement progressive dont la définition varie dans la littérature : présence de plus de 50% de croissants à l'histologie rénale ou d'une insuffisance rénale rapidement progressive (entre quelques jours et quelques semaines) avec une hématurie et une protéinurie. Ce type de présentation nécessite un traitement par une corticothérapie orale et intraveineuse à la vue de l'atteinte rénale sévère. Les KDIGO conseillent l'utilisation de la corticothérapie en analogie aux vascularites à ANCA associé à du cyclophosphamide. [205] Un essai contrôlé randomisé chez l'adulte a montré l'efficacité des bolus de méthylprednisolone chez les adultes avec une N-IgA progressive. [247-249] Chez les enfants avec une N-IgA progressive, seul des cases reports ont montré l'efficacité de la méthylprednisolone en intra veineux. Roccatello et al ont rapporté 2 enfants avec une N-IgA rapidement progressive traités avec trois bolus de méthylprednisolone (15 mg /kg) suivis d'un traitement par une corticothérapie orale associé à du cyclophosphamide et 7 échanges plasmatiques pendant 8 semaines. Aucune efficacité n'a été retrouvé, un enfant a progressé vers l'IRT et l'autre présente une insuffisance rénale chronique (IRC). [206] Niaudet et al ont quant à eux montré l'efficacité des bolus de méthylprednisolone (1 g / 1,73 m^2) suivis d'une corticothérapie orale pendant 21 mois chez 12 enfants avec N-IgA rapidement progressive. Deux patients ont également reçu un échange plasmatique et du cyclophosphamide oral et un patient a reçu du cyclophosphamide oral seul. Avec un suivi de 1 à 9 ans, aucun n'avait progressé vers l'IRT et neuf avaient une histologie améliorée lors de la biopsie rénale de contrôle avec une rémission complète chez 6 enfants. [207] Kawasaki et al ont également montré l'efficacité des bolus de méthylprednisolone associés à une amygdalectomie chez 33 enfants qui présentaient une baisse de leur protéinurie avec une amélioration des lésions inflammatoires histologiques à la biopsie rénale suite au traitement. [208] D'autres séries de cas n'ont pas rapporté d'efficacité des bolus de méthylprednisolone chez les N-IgA rapidement progressive. [209] [210]

3. Diagnostic

Le diagnostic est histologique. Il se base sur la présence de dépôts mésangiaux d'IgA en immunofluorescence dominés par les IgA1, souvent associés à des dépôts de C3. (**Figure 20**) Des dépôts d'IgG et/ou d'IgM peuvent coexister mais de moindre intensité par rapport aux dépôts d'IgA. La microscopie optique permet d'apprécier l'intensité des lésions rénales. Les lésions observées chez l'enfant sont le plus fréquemment des lésions histologiques actives de prolifération glomérulaires, contrairement aux lésions chroniques souvent observées chez les patients adultes (fibrose et atrophie tubulo-interstitielle, glomérulosclérose segmentaire). Dans la N-IgA le complément sérique est normal et < 20 % des enfants ont un taux d'IgA circulants élevé.

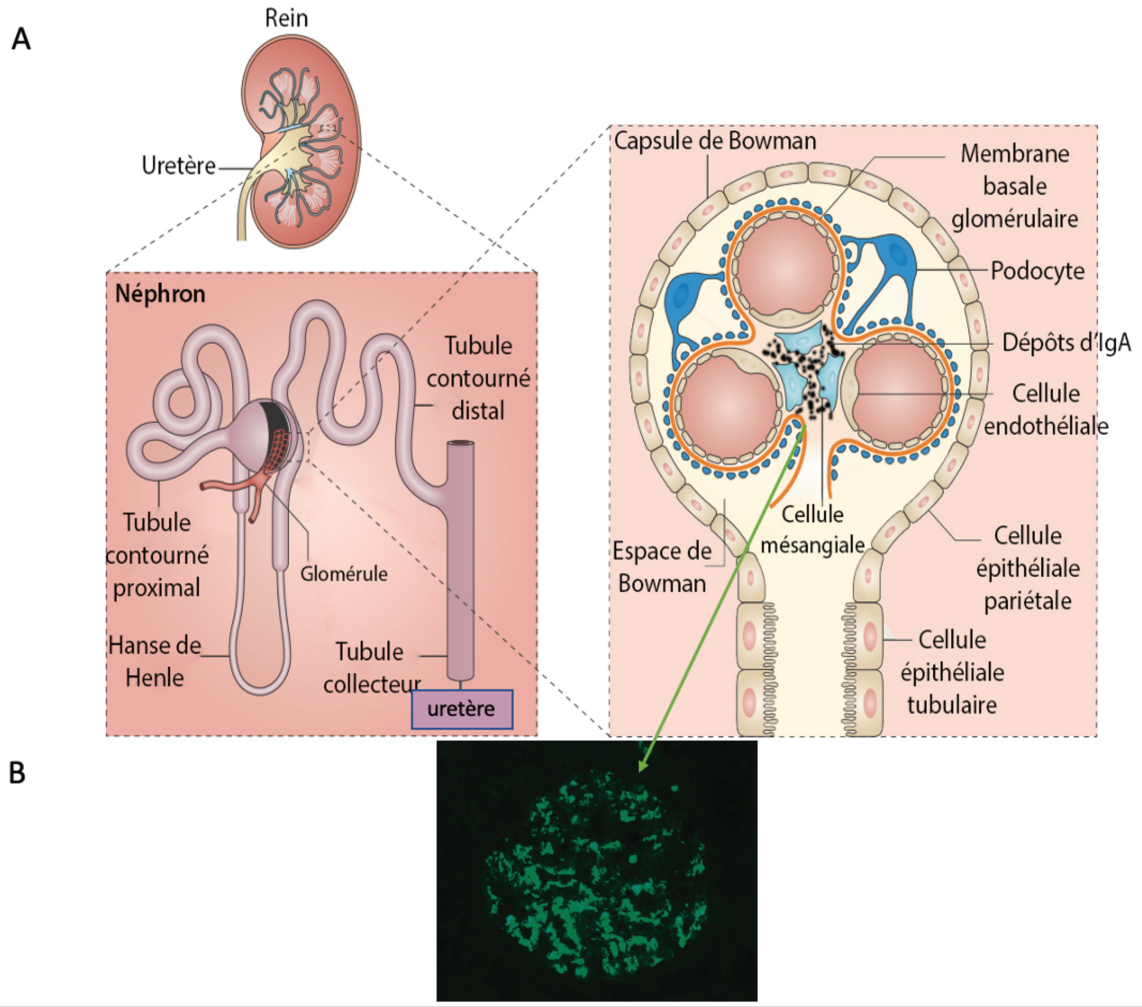


Figure 20 : Description schématique du rein, du néphron et du glomérule avec des dépôts mésangiaux d'IgA

(Adapté de Kurts et al., 2013)[211]
A. Description des différentes sections du rein. Au niveau du glomérule ou a lieu la filtration glomérulaire, on retrouve dans la N-IgA ses dépôts d'IgA (en noir) au niveau du mésangium en bleu.
B. Dépôts mésangiaux d'IgA.
Source : Dr Marion Rabant. Service d'anatomopathologie, Hôpital Necker, AP-HP, Paris.

4. Pronostic

Le pronostic de la N-IgA est très variable. Habituellement, la maladie progresse très lentement avec des phases de rechute et de rémission possibles. Les rémissions sont caractérisées par une normalisation du sédiment urinaire et de la protéinurie avec une fonction rénale normale peuvent survenir dans 50% des cas. Cependant des rechutes peuvent survenir pendant l'enfance voire même des années plus tard à l'âge adulte.[212] Le suivi à vie de ces patients est donc primordial. L'incidence de l'IRT dans la néphropathie à IgA de l'enfant est de 13 % au bout de 10 ans de suivi et de 30 % d'IRT au bout de 20 ans de suivi, ce qui est similaire aux cohortes adultes.

5. Les facteurs de risque

Les critères pronostiques validés chez l'adulte et utilisés en pédiatrie sont :
-**L'hypertension artérielle.** On la retrouve principalement au diagnostic, elle reste moins fréquente que chez les patients adultes.
-**La protéinurie.** La persistance à long terme d'une protéinurie de débit important (>1g/j) constitue le plus grand facteur de risque de progression vers l'IRT.[213] La rémission d'une protéinurie en dessous de 0,5 g/j, quelque que soit le débit initial, est un excellent facteur pronostique chez l'enfant. [214] Cependant, le seuil de protéinurie réduisant au maximum le risque d'IRT reste encore débattu.
-**Le DFG.** La réduction du DFG témoigne le plus souvent de lésions irréversibles de glomérulosclérose et d'atrophie et de fibrose tubulo-intersitielle. [214]
-**Les lésions histologiques de la classification d'oxford.** Les cinq lésions histologiques qui la composent sont des facteurs pronostiques indépendants de la survie rénale : la prolifération mésangiale (M), la prolifération endocapillaire (E), la glomérulosclérose segmentaire ou la fibrose (S) et l'atrophie tubulaire / fibrose interstitielle (T) et la prolifération extracapillaire (C) qui a été inclus dans la nouvelle classification d'oxford de 2017. [215] **(figure 21)** Cette classification est validée chez l'adulte mais reste débattue chez l'enfant.
En effet l'étude initiale qui a validé la classification d'Oxford n'incluait que seulement 56 enfants. [216] Depuis, 4 études ont tenté de valider la classification d'Oxford en pédiatrie avec des résultats discordants. [217-219] Dans une cohorte pédiatrique chinoise, seule la lésion T était un facteur pronostique indépendant de la survie rénale. [218] Dans une cohorte suédoise, les lésions M, E et T ainsi que la prolifération extracapillaire, étaient des facteurs pronostiques indépendants de la survie rénale. [217] La cohorte pédiatrique japonaise montrait que seulement les lésions M et T et la prolifération extracapillaire étaient des facteurs prédictifs indépendants de la survie rénale. [219] Et puis récemment la cohorte européenne Valiga réévaluant la classification d'Oxford chez l'enfant (174 enfants) n'a pas validé les composants du score de MEST-C en pédiatrie. Cette absence de mise en évidence des facteurs pronostiques connus peut s'expliquer par le fait que les enfants sont traités de manière plus agressive que les adultes pouvant faire régresser certaines lésions proliferatives mais également par le manque de puissance des études pédiatriques. [214]
Récemment la hyalinose segmentaire et focale (HSF) a été mise en évidence comme pouvant être également un facteur pronostique de la survie rénale et est désormais incluse également dans la nouvelle classification d'Oxford. [7, 215]
En effet l'étude de Kahil et al [220] avait mis en évidence la HSF comme un facteur pronostic de la survie rénale dans une cohorte de 128 patients adultes atteints de N-IgA. Ils ont montré que la présence de lésions de HSF à la biopsie rénale était liée à une moins bonne survie rénale au bout de 80 mois de suivi comparé aux patients qui n'en présentaient pas. [220] L'étude de Shubha mettait également en évidence le rôle pronostique de la HSF. La HSF était liée à la protéinurie initiale, et chez les patients non traités par immunosuppresseur, la HSF était liée à un mauvais pronostic rénal. [221] Par ailleurs, l'origine des lésions de HSF est généralement secondaire à la réduction néphronique, l'hypertension artérielle et l'obésité, qui sont des caractéristiques fréquemment rencontrées chez l'adulte et très peu chez l'enfant. L'origine, la signification et le traitement peuvent potentiellement être différents entre l'adulte et l'enfant. Les lésions chroniques S et T sont celles qui sont associées à un plus mauvais pronostic rénal. Ces lésions sont beaucoup plus fréquentes chez l'adulte par rapport à l'enfant. Dans les N-IgA pédiatriques, ce sont les lésions de prolifération glomérulaire, M, E et C qui sont prédominantes. [222] Par conséquent, même si la classification d'Oxford a été évaluée adéquate dans certaines études pédiatriques ; au vue de la particularité pédiatrique de la maladie il semble nécessaire de poursuivre les études de validation de cette classification en pédiatrie.

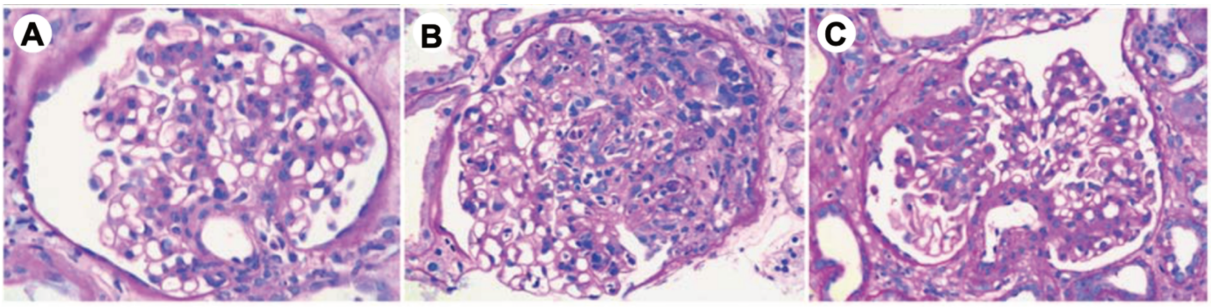


Figure 21 : La biopsie rénale en microscopie optique

(Adapté de Ian et al, 2014)[223]
Coloration à l'acide périodique de Schiff. On retrouve de la prolifération cellulaire mésangiale **(A)**, de la prolifération endocapillaire **(B)**, de la fibrose glomérulaire segmentaire **(C)**

E. La néphropathie à IgA de l'enfant. Une maladie différente de celle de l'adulte (issue de notre étude CAMBIER et al 2020) [6]

La néphropathie à IgA est particulièrement fréquente chez les jeunes adultes avec une progression vers l'IRT sur 20 ans chez environ un tiers des patients. L'âge médian des patients débutant une dialyse varie de 40 à 50 ans, ce qui indique cliniquement que la maladie peut, chez certaines personnes, débuter pendant l'enfance.

Il existe un large spectre clinique de la N-IgA qui varie selon les groupes ethniques, en particulier chez les patients asiatiques où il a été suggéré que la N-IgA aurait une évolution plus sévère. [224-226] Les médecins ont longtemps considéré la N-IgA de l'enfant comme une entité bénigne sujette à des rémissions et parfois à des rechutes tardives à l'âge adulte [227] en comparaison à la N-IgA de l'adulte considérée comme une maladie grave avec 15 à 40% de patients ayant une IRT selon la région. [228] Cependant, le pronostic de la N-IgA de l'enfant est aussi sévère que chez l'adulte : à 10 ans de suivi, 10 à 13% des enfants atteindront l'IRT et dans les 20 ans, 20 à 30% auront une IRT. [227, 229, 230]

1. Une maladie plus inflammatoire chez l'enfant

Il a été rapporté que les caractéristiques histologiques de la N-IgA pédiatrique sont différentes des N-IgA de l'adulte. Les enfants auraient plus de lésions histologiques inflammatoires légères avec moins de lésions chroniques (glomérulosclérose et / ou fibrose interstitielle / atrophie tubulaire) que les adultes. [231, 232] La réduction des lésions chroniques de la N-IgA de l'enfant pourrait être possible par une détection rapide des lésions actives de prolifération à la biopsie rénale, avec la mise en route précoce d'un traitement adapté. Dans une cohorte japonaise pédiatrique, la prolongation du temps d'attente de la biopsie rénale diagnostique était associée à une fréquence plus élevée de lésions T et à une diminution des lésions M et E, soulignant l'intérêt d'effectuer une biopsie rénale précoce pour détecter des lésions actives et permettre une réduction des lésions chroniques par un traitement approprié.[233]

Dans une récente étude, il a été montré que la N-IgA de l'enfant présente plus de lésions histologiques M1 et E1 que les adultes, où l'on observe plus de glomérulosclérose focale S1 et T2. [6] Cela soutient l'idée que les adultes diagnostiqués avec une N-IgA peuvent avoir eu une maladie non détectée et non traitée depuis l'enfance. Chez les enfants, la protéinurie semble être la cause d'une prolifération et d'une inflammation aiguë, tandis que chez les adultes, cette protéinurie serait liée à des lésions chroniques et à une réduction néphronique. Le défi chez l'enfant est donc d'éviter la transformation des lésions histologiques aiguës proliferatives en lésions histologiques chroniques. Si la N-IgA de l'enfant est diagnostiqué tôt dans l'enfance, nous pouvons anticiper sur la progression naturelle de la maladie. Ainsi, les options thérapeutiques doivent être soigneusement examinées et réadaptées tout au long du suivi.

F. Les traitements de la N-IgA de l'enfant (issue de la revue de littérature publiée par notre équipe CAMBIER et al 2020 [165])

1. Les traitements conventionnels

a) Les inhibiteurs du système rénine-angiotensine

Les inhibiteurs du système rénine-angiotensine (ISRA) sont préconisés dans la N-IgA avec une protéinurie <0,5 g / jour / 1,73 m, en l'absence d'insuffisance rénale aiguë et d'inflammation glomérulaire importante à la biopsie rénale. [234] Un essai contrôlé contre placebo mené par Coppo et al a montré l'avantage du traitement par un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC) pour réduire la progression de la maladie chez les jeunes patients atteints de N-IgA avec une protéinurie modérée. [235]

Les ISRA sont néphroprotecteurs. Ils sont utiles dans le traitement de la N-IgA en raison de leurs effets hémodynamiques sur l'artériole afférente rénale, permettant d'améliorer des facteurs pronostiques importants tels que l'hypertension artérielle et la protéinurie. [236] Les ISRA ont également un rôle antiproliferatif et anti-inflammatoire. Dans la N-IgA il y a une activation du système rénine-angiotensine (SRA) au niveau tissulaire, impliquée dans le développement de la fibrose rénale. La liaison des complexes immuns aux cellules mésangiales induit une hyperactivation locale du SRA, entraînant la libération d'angiotensine 2 et d'aldostérone. [197]
La production locale d'angiotensine 2 stimule la prolifération mésangiale [237] Elle est aussi impliqué dans le cross talk mésangio-podocytaire modulé par l'expression de l'intégrine au niveau des podocytes. [238]
De plus, l'amiloride pourrait être utilisé dans les N-IgA présentant une HSF en inhibant l'expression du récepteur des urokinases à la surface des podocytes (uPAR). [239] En effet uPAR participe à la formation des lésions de HSF. [240] Il entraine l'effacement des podocytes via l'intégrine $\alpha V\beta 3$. [241]
Les ISRA ayant peu d'effets indésirables, devraient toujours être la première ligne thérapeutique utilisée dans la N-IgA de l'enfant.

b) La corticothérapie

Dans la N-IgA de l'adulte, selon les KDIGO, la corticothérapie est indiquée chez les patients présentant des formes proliferatives (présence de prolifération extracapillaire) et/ou avec une protéinurie persistante> 1 g / jour malgré 3 à 6 mois d'un traitement bien conduit par les IEC ou les ARA2 pour retarder la progression vers l'IRT. [205] Dans la dernière étude par Rauen et al, il ne semble pas y avoir d'effet supplémentaire de l'ajout d'une corticothérapie lorsque la thérapie de soutien est optimisée. [242] Dans la N-IgA de l'enfant, il n'existe pas de recommandation. [243] Étant donné que la N-IgA de l'enfant a un phénotype plus inflammatoire, avec une protéinurie corrélée aux lésions de prolifération [7] ainsi qu'une formation aiguë de complexes immuns IgA1 conduisant à l'activation des cellules mésangiales, cela explique le fait que la corticothérapie semble plus efficace dans la N-IgA de l'enfant par rapport à l'adulte.[7, 199] Cependant l'indication d'une corticothérapie doit être bien réfléchie car les stéroïdes ont des effets secondaires pouvant entrainer des retards staturaux chez l'enfant d'où l'intérêt porté au budésonide à libération locale et lente, qui diminuerait la protéinurie et stabiliserait le DFG. [244] Cela souligne également le potentiel rôle de l'immunité des muqueuses dans la N-IgA. [24, 245]

2. Les thérapeutiques permettant de cibler la formation des complexes immuns

a) La déplétion des lymphocytes B

Étant donné que des auto-anticorps sont impliqués dans la pathogenèse de la N-IgA, la déplétion des lymphocytes B pourrait être une approche thérapeutique intéressante puisque le taux des auto-anticorps (IgG-IgA, IgA-IgA) et des Gd-IgA1 sont corrélés à un risque important de progression de la maladie. [129, 153]
Cependant, dans un récent essai contrôlé randomisé chez l'adulte, le rituximab (traitement anti CD20) n'améliorait pas de manière significative la fonction rénale ou la protéinurie après un an de suivi. Bien que le rituximab entrainât une déplétion des lymphocytes B, les taux sériques de Gd-IgA1 et IgG-IgA1 restaient les mêmes. [246] Ces résultats suggèrent que le rituximab pourrait ne pas cibler les lymphocytes B produisant les IgA intestinaux en raison du manque d'expression de CD20 par les plasmocytes muqueux sécréteurs d'IgA. [247]

b) Les récepteurs des facteurs d'activation des lymphocytes B (B cells activating factors) BAFF/TNF récepteur avec le ligand de prolifération (proliferation-inducing ligand) APRIL

Il a été suggéré que des membres de la famille des récepteurs du TNF tels que le facteur d'activation des cellules B (BAFF) et le ligand induisant la prolifération (APRIL), et TACI (un récepteur à la fois pour BAFF et APRIL) pourraient être impliqués dans la pathogenèse de la N-IgA. BAFF est nécessaire à la maturation et à la survie des lymphocytes B. La surexpression de BAFF chez la souris induit des niveaux plus élevés de pIgA ainsi que des dépôts mésangiaux d'IgA. [248] Des polymorphismes dans la molécule TNFSF13 qui code pour APRIL ont été associés à la N-IgA dans une population chinoise.[249] APRIL partage des récepteurs communs avec BAFF et est nécessaire à la maturation des lymphocytes B et à la

survie des plasmocytes sécrétant des IgA. Les taux d'APRIL ont toujours été rapportés comme élevés dans la N-IgA, alors que les taux circulants de Baff sont contradictoires selon les études. [250, 251] BAFF est lié à la production oropharyngée d'IgA chez les enfants. [252] La corrélation entre les lymphocytes B muqueux, les récepteurs Toll like (TLR) et le couple BAFF / APRIL, serait une cible thérapeutique pour empêcher le développement de la N-IgA.[253] Le blisibimod (un antagoniste de BAFF) et l'atacicept (un antagoniste de TACI, un double récepteur d'APRIL et de BAFF) sont actuellement évalués dans des études de phase II dans la N-IgA de l'adulte (essai clinique n ° NCT02808429 et NCT02062684). VIS649, un mAb anti-APRIL humanisé, a récemment montré une efficacité dans la réduction du niveau d'IgA circulants chez les primates. [254] La voie BAFF / APRIL / TACI recèle d'un potentiel thérapeutique dans la N-IgA de l'enfant. [253] Le blisibimod et l'atacicept pourraient être mieux tolérés chez les enfants car ils ciblent la co-stimulation des cellules B plutôt que la déplétion B direct. Cibler l'axe BAFF / APRIL / TACI pourrait être une deuxième ligne de traitement intéressante pour la N-IgA de l'enfant.

c) Les TOLL-like Recepteur (TLRs)

Outre ses effets antipaludiques, l'hydroxychloroquine (HCQ) est un inhibiteur des TLR-7, TLR-8 et TLR-9. Il interfère avec la présentation de l'antigène aux lymphocytes B par l'alcalinisation des protéasomes dans les cellules présentatrices de l'antigène. [255] Yang YZ et al et Liu lj et al ont montré l'intérêt de l'hydoxychloroquine dans la N-IgA de l'adulte dans une étude contrôlée randomisée. Ils ont montré que le traitement par l'hydroxychloroquine réduisait considérablement la protéinurie dans la N-IgA quand celui-ci est associé aux ISRA .[256, 257] À notre connaissance, aucun essai n'a été réalisé dans la N-IgA de l'enfant mais la HCQ est déjà administrée aux enfants comme antipaludéen mais aussi comme traitement de la néphropathie lupique avec une bonne tolérance de ce médicament. L'administration de HCQ peut conduire à une rétinopathie qui dépend de la dose et de la durée d'exposition au traitement. Ce traitement nécessite un suivi ophtalmologique régulier. [258] L'HCQ pourrait permettre une épargne stéroïdienne dans la N-IgA de l'enfant. Des essais pédiatriques sont nécessaires.

d) Les cibles du protéasome : interaction entre les cellules B et les cellules T (Bortezomib)

Une dérégulation de l'axe protéasome-immunoprotéasome a été identifiée dans les cellules mononucléaires des patients ayant une N-IgA. Le passage du protéasome à l'immunoprotéasome dans la N-IgA était associé à une présentation clinique plus sévère, avec une protéinurie plus importante. [259] L'inhibition des protéasomes et des immunoprotéasomes par le bortézomib réduirait de manière significative la protéinurie chez les sujets N-IgA présentant de la prolifération histologique à la biopsie rénale avec une fonction rénale normale. [260] Le bortézomide pourrait représenter une option thérapeutique intéressante pour le traitement de la N-IgA de l'enfant, puisque ces enfants ayant le plus souvent une fonction rénale peu altérée présentent une inflammation glomérulaire avec peu de lésions histologiques chroniques en comparaison des adultes.

e) Les inhibiteurs de la Spleen tyrosine kinase (SYK)

SYK semblerait être un facteur clef d'activation de la N-IgA. [261] Il est impliqué dans la maturation et la survie des cellules B, ainsi que dans l'activation du CD89 dans les cellules myéloïdes. SYK serait impliqué dans l'inflammation glomérulaire de la N-IgA et représenterait une cible thérapeutique intéressante chez l'enfant. La stimulation des cellules mésangiales in vitro avec des IgA1 purifiées à partir de patients ayant une N-IgA conduisait à l'activation de SYK par phosphorylation. [190] Aussi, lors de la prolifération endocapillaire E1 on retrouvait des niveaux de SYK plus importants en comparaison aux patients sans prolifération endocapillaire E0, suggérant une activation du récepteur CD89 sur les cellules myéloïdes infiltrantes in situ. [262] Un essai de phase II est en cours afin de tester le fostamatinib, un inhibiteur sélectif du SYK, pour évaluer son innocuité et son efficacité dans la N-IgA (essai clinique n ° NCT02112838). Les résultats préliminaires montreraient que le fostamatinib ne réduirait pas de manière significative la protéinurie par rapport au placebo, cependant, les patients ayant une protéinurie initiale> 1 g/jour présenteraient une réduction dose-dépendante de la protéinurie. Étant donné la présence de lésions inflammatoires dans la N-IgA de l'enfant, l'inhibition de SYK avec le fostamatinib pourrait être une cible intéressante. Il convient toutefois de noter que ce médicament présente des effets secondaires comme l'hypertension.

f) Les immunoadsorptions (IA)

La possibilité de retirer les anticorps circulants est envisageable avec l'immunoadsorption. C'est une technique d'aphérèse épurant le plasma de façon plus sélective que la plasmaphérèse. En effet la plasmaphérèse permet également d'épurer le sang mais elle a l'inconvénient de réaliser une élimination inutile des protéines du plasma et de recourir à des volumes importants de plasma à substituer. Les IA permettent une double séparation par une circulation sanguine extracorporelle à l'aide d'un cathéter central. La première séparation permet de séparer le plasma des globules rouges. Le plasma passe ensuite dans des colonnes qui vont adsorber les immunoglobulines. Il existe des colonnes semi sélectives épurant les IgG totales et des colonnes sélectives n'épurant qu'un seul motif antigénique (anti IgE, Ig anti A ou B). L'IA est indiquée dans plusieurs maladies auto-immunes sans preuve de supériorité aux échanges plasmatiques. Dans la néphropathie à IgA, l'intérêt des échanges plasmatiques a été étudié mais reste controversé. [263-267] Coppo et al ont rapporté le succès des échanges plasmatiques chez 5 enfants ayant une N-IgA progressive inflammatoire avec peu de lésions de fibrose. [268] L'efficacité des IA n'a pas été étudié dans la N-IgA. Nous rapporterons l'intérêt de cette technique chez un enfant ayant une N-IgA rapidement progressive dans nos résultats.

3. Les thérapeutiques ciblant la voie du complément

a) L'activation du complément dans la N-IgA

Le complément est impliqué dans la physiopathologie de la N-IgA. [269] En effet des dépôts de C3 sont souvent retrouvés en association avec des dépôts d'IgA dans les glomérules. La voie alterne et la voie des lectines sont les 2 voies impliquées dans la N-IgA. En effet des dépôts de lectine lié au mannose, de

la ficoline et du C4d ont été décrit dans les glomérules suggérant l'implication de la voie des lectines dans cette maladie. [269]
Espinosa M et al ont proposé les dépôts intra glomérulaire de C4d comme biomarqueurs de progression de la N-IgA. [270]
Il faut également noter qu'une production locale de C3 in situ était retrouvée dans des cellules mésangiales stimulées par des Gd-IgA1 ou des pIgA1. [65]
Il a également été démontré qu'une délétion commune à 1q32, y compris les gènes (CFHR3 et CFHR1) codant pour les protéines 3 et 1 liées au facteur H, protègerait contre le développement de la N-IgA. [175][269] Cette délétion conduirait à une diminution du facteur H (inhibiteur du CFH) conduisant à une baisse de l'activité de la voie alterne. [271] Une meilleure compréhension de l'activation du complément dans la N-IgA nous permettrait de mettre en évidences de nouvelles cibles thérapeutiques.
Chez les enfants, seuls des cases reports avec un traitement par éculizumab (anticorps monoclonal anti-C5) ont été réalisés. Traol Rings et al ont décrit un jeune garçon de 16 ans avec une N-IgA qui n'a pas répondu à un traitement immunosuppresseur conventionnel et qui a reçu en deuxième intention 900 mg d'éculizumab chaque semaine pendant un mois, suivi d'une dose unique de 1200 mg conduisant à une amélioration rapide de sa fonction rénale et de sa protéinurie.[272] Rosenblad et al ont rapporté un adolescent avec une N-IgA rapidement progressive réfractaire à un traitement immunosuppresseur conventionnel et qui a été traité par éculizumab pendant 3 mois avec une stabilisation de la fonction rénale et une baisse de la protéinurie. L'arrêt du traitement a été suivi d'une rechute. [273] Ces deux cas suggèrent que l'initiation précoce de l'éculizumab chez les patients atteints de N-IgA rapidement progressive pourrait être bénéfique.
Le facteur B favorise l'activation de la voie alternative du complément. Le cemdisiran, un inhibiteur du facteur B, est actuellement testé chez des adultes N-IgA ayant une protéinurie > 1 gramme par jour malgré un traitement standard par ISRA (essai clinique n °NCT03841448).

b) L'antagoniste du récepteur C5a

Le C5a est généré suite au clivage du C5 par la C3 convertase. C'est une anaphylotoxine attirant les cellules immunitaires vers le site inflammatoire. La présence de dépôts de C5a dans les biopsies rénales serait corrélée à la gravité histologique, à la protéinurie et à la fonction rénale dans la N-IgA de l'adulte. [274]

Chez l'adulte, l'avacopan, un antagoniste des récepteurs C5a, a été évalué dans un essai ouvert de phase II chez sept adultes atteints de N-IgA après 4 semaines de traitement bien conduit par ISRA avec une protéinurie> 1 g / g de créatinine et un DFG> 60 ml / min / 1, 73 m^2 (numéro d'essai NCT02384317). [179] Après 12 semaines de suivi, la protéinurie diminuait chez 6 des 7 patients suivis. (Résultats présentés à la 54e European Renal Association). L'avacopan pourrait être une thérapie intéressante dans la N-IgA par la suppression de l'inflammation locale sans bloquer la formation du complexe d'attaque membranaire C5b-9.

c) MASP-2 inhibiteur

Les polymères Gd-IgA1 ont la capacité d'activer la voie des lectines. Des dépôts mésangiaux de C4d sont retrouvés dans 25% des biopsies rénale suite à l'activation par la voie des lectines. Les dépôts de

C4d associés aux dépôts des sérines protéases associées à la lectine de liaison au mannose (MASP) -1, MASP-2 et à la L-ficoline, sont des facteurs de mauvais pronostiques. [275] Le ciblage de MASP-2 pourrait réduire l'activation de la voie des lectines et diminuer l'inflammation intra glomérulaire. L'inhibiteur de MASP-2 OMS721 est en cours d'évaluation dans une étude de phase II et de phase III (essai clinique n ° NCT03608033) dans la N-IgA.

En résumé, cibler le complément dans la N-IgA de l'enfant représenterait une option thérapeutique intéressante. Néanmoins, ce traitement présente un risque infectieux en particulier chez les jeunes enfants où l'immunité innée est essentielle. Le risque d'infection à méningocoque est favorisé par les inhibiteurs du C5 tandis que les inhibiteurs C3 favorisent les infections à germes encapsulés. La vaccination contre le méningocoque et le pneumocoque est donc recommandée sans qu'elle ne puisse fournir une protection parfaite. [276] **(Figure 22)**

4. De nouvelles thérapies ciblant le système immunitaire intestinal-muqueux

a) L'interaction entre les agents pathogènes des muqueuses et l'immunité aux IgA

Il existerait des interactions entre la flore microbienne et l'immunité des muqueuses dans la N-IgA. [277] Des loci impliqués dans l'immunité des muqueuses ont été mis en évidence par les GWAS soulevant le rôle de l'axe intestin-rein dans la physiopathologie de la N-IgA. [24]

b) Les Antigènes alimentaires

Dans les années 90, des antigènes alimentaires ont été suggérés comme des facteurs impliqués dans le développement de la N-IgA. [278] Des dépôts d'antigènes alimentaires (comme le soja, les protéines de haricot, la caséine et les protéines de riz) ont été retrouvés dans le mésangium des patients atteints. [278] L'un des principaux antigènes proposé a été le gluten. [279]
Dans une population en bonne santé, la prévalence de la maladie cœliaque est de 0,5 à 1% alors qu'elle est de 4% chez les patients atteints de N-IgA. [280]. Néanmoins, le mécanisme physiopathologie entre le gluten et la N-IgA reste non élucidé. Dans le modèle murin α1-KI -CD89-Tg (exprimant à la fois l'IgA1 humaine et le CD89 humain), un régime sans gluten pendant trois générations permettait de réduire les dépôts mésangiaux d'IgA1 humaine ainsi que l'inflammation glomérulaire.[281]. Dans une étude prospective non contrôlée, les patients avec une N-IgA sous régime sans gluten avait une baisse de la protéinurie, de leur hématurie et de la formation de complexes immuns IgA ainsi que des anticorps IgA anti-gliadine. Cependant avec un suivi de 4 ans, il n'y avait pas de modification de la fonction rénale. [282]. À la vue des effets secondaires limités, un régime sans gluten pourrait être proposé dans la N-IgA de l'enfant.

c) Le budesonide

La dysrégulation de la production d'IgA au niveau des muqueuses résulterait de l'inflammation in situ en lien avec l'immunité intestinale au niveau des plaques de Peyer. Le budésonide entérique, un

corticostéroïde à libération locale, ciblant le système immunitaire au niveau de la muqueuse intestinale a été évalué dans L'étude NEFIGAN. [283]
Cette formulation permettrait de délivrer localement le médicament au niveau des patchs iléocécaux de Peyer, avec une exposition systémique minime (seulement 10% de passage dans la circulation systémique) et donc moins d'effets secondaires liés à la corticothérapie orale. Dans cet essai prospectif randomisé contrôlé contre placebo, après 9 mois de traitement, il y avait une réduction significative de la protéinurie chez les patients recevant 8 mg ou 16 mg de budésonide par jour.
Un essai de phase 3 du budésonide pour le traitement de la N-IgA est en cours (NEFICON - NCT03643965).

Chez les enfants, Venettacci et al ont montré l'efficacité du budénoside en diminuant la protéinurie chez un garçon de 12 ans atteint d'une N-IgA avec une protéinurie de rang néphrotique. [284] Des études supplémentaires sont nécessaires pour voir si le budesonide est aussi efficace que la corticothérapie orale sans les effets secondaires connus et décrits dans STOP-IgAN [242] et l'essai TESTER chez les adultes. [285]

d) Les antibiotiques ou probiotiques

Les récidives des épisodes d'hématurie dans la N-IgA sont souvent liées à une infection des voies respiratoires hautes ou à une infection gastro-intestinale. Une réponse immunitaire innée pourrait être déclenchée par la translocation des bactéries elles-mêmes ou de leurs produits libérés (LPS, métabolites) et entrainerait des poussées de N-IgA. [286]
Les patients présentant une sensibilité au gluten ont une augmentation de la perméabilité intestinale accrue avec une inflammation locale [287] pouvant permettre la translocation bactérienne du microbiote. Les infections bactériennes chroniques favoriseraient la production d'IgA en stimulant la réponse immunitaire au niveau des muqueuses. Comme décrit précédemment Qin et al. ont montré que le TLR4 est activé par le LPS bactérien suite une méthylation de la protéine chaperon Cosmc, réduisant l'activité de la galactosyltransférase et diminuant la galactosylation de l'IgA1 dans les lymphocytes B des patients sains et de patients avec une N-IgA. [288]
Une dysbiose intestinale du microbiote a été décrite chez des patients avec une N-IgA par rapport à des témoins sains. [64] Aussi comme nous l'avons déjà vu le modèle de souris humanisé (souris α1-KI-CD89-Tg qui développent spontanément des N-IgA) a été utilisé pour mieux comprendre l'implication du microbiote en le modulant avec des antibiotiques. Le traitement de ces souris avec un cocktail d'antibiotiques (vancomycine / amoxicilline / néomycine / métronidazole) pendant 8 semaines supprimait les dépôts mésangiaux d'IgA1 et réduisait la protéinurie, sans réduire les taux sériques d'IgA1. La formation des complexes IgG-IgA1 pathogènes était liée avec la charge bactérienne fécale des souris. [289] Cela suggère qu'une dysbiose intestinale pourrait être la cause plutôt que la conséquence de la N-IgA et que l'IgA1 néphrotoxique proviendrait de la muqueuse intestinale. Des études supplémentaires sont nécessaires pour voir si des espèces commensales pourraient être impliquées dans la physiopathologie de la maladie.
Puisqu'il y a autant de bactéries dans le corps humain que de cellules humaines, une des stratégies thérapeutiques envisageable serait de manipuler le microbiote intestinal avec des probiotiques ou des antibiotiques. Une greffe de microbiote fécal serait également une stratégie envisageable en modifiant globalement tout le microbiote comme cela est déjà proposé dans les infections compliquées à Clostridium difficile. [290] La technique, y compris la procédure de sélection des donneurs, n'est pas encore au point et un effet indésirable grave a été rapporté à cause de la transmission d'E. Coli à spectre

étendu bêta-lactamase ayant entraînant la mort du receveur. Un essai clinique de greffe fécal pour les N-IgA réfractaires est actuellement en cours en Chine (NCT03633864).

e) Le ciblage du premier hit : Gd-IgA1

Une autre approche thérapeutique intéressante serait de pouvoir modifier la glycosylation des IgA1. En effet il serait intéressant de développer des molécules neutralisant les Gd-IgA1 dans les premiers stades de la maladie de l'enfant, avant le développement de lésions chroniques.[291]

f) Les IgA1 protéases (IgA1-P) recombinantes

Les protéases microbiennes IgA1 sont des protéines recombinantes qui permettraient d'éliminer les dépôts d'IgA1 et de dégrader les complexes immuns dans le mésangium intra-rénal. [292] Dans le modèle murin α1-KI-CD89-Tg (exprimant l'IgA1 et le CD89 humain), les IgA1-P ont permis de réduire les dépôts mésangiaux d'IgA, l'inflammation et la fibrose histologique ainsi que l'hématurie. [293] Cette voie thérapeutique innovante sera développée dans la discussion.

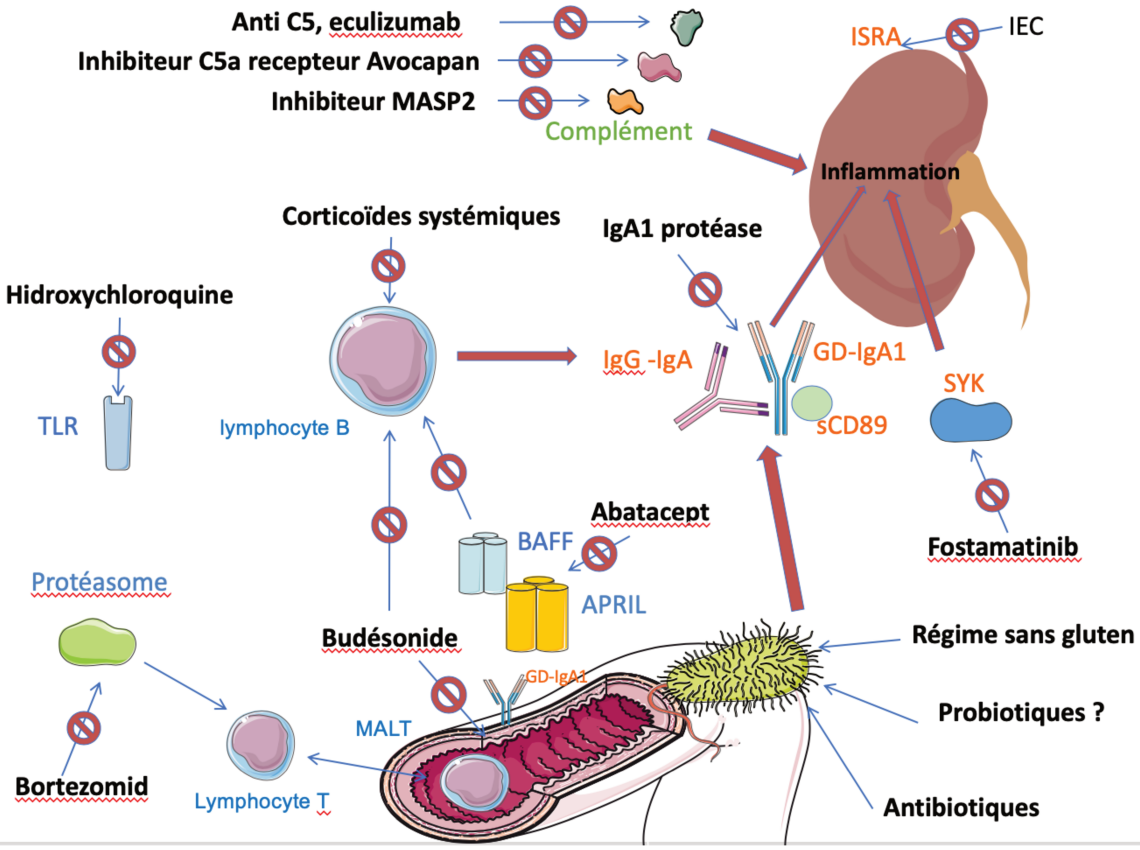


Figure 22 : Les nouvelles thérapeutiques potentielles de la N-IgA de l'enfant

(Adapté de Cambier et al) [165]
Les cibles potentielles thérapeutiques sont le SRA, les Lymphocytes B, BAFF et APRIL, les TLRs, SYK, le protéasome, les GD-IgA1, les complexes immuns (IgG-IgA, sCD89-IgA), le complément et le microbiote.

G. Les aspects génétiques de la néphropathie à IgA

Des facteurs génétiques prédisposant ont été suggérés dans cette maladie. [294] Tout d'abord parce qu'il existe des diversités ethniques et géographiques avec une fréquence plus élevée de N-IgA en Asie qu'en Europe et une fréquence très faible en Afrique. [225, 294] Mais également parce que des ségrégations familiales ont été décrites [294] avec des transmissions autosomiques dominantes à pénétrance incomplète.

1. Les N-IgA familiales

Des familles de néphropathie à IgA ont été publiées dans les années 1970. Ces observations ont interrogé l'implication du groupe HLA dans la maladie. En effet il a été décrit des sœurs jumelles ayant une N-IgA [295] ainsi que des frères ayant des groupes HLA identiques avec une N-IgA. [296, 297]

Des clusters familiaux ont également été décrits dans le monde entier. [298, 299] Dans certaines cohortes on retrouvait des antécédents familiaux évoquant une N-IgA comme une hématurie macroscopique, une protéinurie mais sans preuve histologique.[300]

Dans une étude réalisée en Italie dans la région de Brescia, les patients atteints de N-IgA ont été classés en « sporadiques » (un seul membre de la famille était affecté), « suspects » (1 membre avait une N-IgA prouvée par biopsie et d'autres présentaient une hématurie microscopique persistante n'ayant pas eu de biopsie rénal) et « familiale » (au moins 2 personnes avaient une N-IgA prouvée par biopsie). [301] Les investigateurs ont observé que plus de 50% des patients ayant une N-IgA avaient une N-IgA familiale ou une N-IgA suspectée. [301] Une observation similaire a été faite aussi aux états Unis dans le Kentucky. [298] Sur 75 patients présentant une N-IgA, 14 avaient des antécédents familiaux de maladies rénales. Six de ces patients avaient le même ancêtre commun. Ces deux séries italiennes et françaises présentaient un taux de consanguinité important. La description de ces familles soulève la question de l'implication génétique dans cette maladie. Dans ces cas familiaux, il semblerait que l'évolution clinique soit identique à celle des cas sporadiques.

La présence de Gd-IgA1 est une des caractéristiques des patients atteints de N-IgA. Les études familiales ont révélé des anomalies génétiques de glycosylation des IgA1. Gharavi et al. ont montré des concentrations plus importantes de Gd-IgA1 chez 202 sujets asymptomatiques qui ont directement un lien de parenté avec un patient présentant une N-IgA prouvée histologiquement. [126] Plus le patient ayant une N-IgA avait des taux élevés de Gd-IgA1 plus les apparentés asymptomatiques avaient également des taux élevés de Gd-IgA1. [126] La même observation a été réalisée chez les enfants ayant une N-IgA-ou un purpura rhumatoïde. [135] Cette observation a été confirmée dans une cohorte asiatique de N-IgA avec leurs apparentés. [302] Cette observation est en défaveur pour un rôle environnemental puisque les conjoints des sujets atteints de N-IgA avaient un taux de Gd-IgA1 semblable à une population contrôle.

2. Les études de lésions génétiques

Le principe des études de lésions génétiques est de génotyper des loci chez des familles présentant une N-IgA. Pour chaque locus une étude statistique est menée avec l'aide d'un arbre généalogique pour établir un lien génétique avec la maladie (risque de transmission de la N-IgA). Cette étude statistique va donner un Logarithme of Odds (LOD score) pour chaque locus. Tout LOD score supérieure à 3 établira une relation significative entre le locus et la maladie. Dans les années 2000, Gharavi et al. ont montré une forte lésion génétique de la région 6q22-23 (LOD score 5,7) avec la maladie. Cette région a été appelée IGAN1. [303] Cela a soulevé la possibilité d'une transmission dominante à pénétrance incomplète. Cependant on retrouvait une hétérogénéité génétique puisque seulement 60% des familles étaient liées à ce gène. Cette région n'est donc pas responsable de toutes les formes génétiques de la N-IgA.
Une étude italienne a permis de trouver deux autres loci supplémentaires liés à la N-IgA : 4q26-31 (IGAN2) et 17q12-22 (IGAN3). [304]
Une grande cohorte canadienne a aussi permis d'identifier un autre locus situé au 2q36. [9] De façon très intéressante ce locus renferme les gènes COL4A4 et COL4A3 impliqués dans les formes autosomiques récessives des maladies d'Alport et les membranes basales fines. Un lien entre ces deux maladies pourrait être possible chez ces formes familiales de N-IgA. [305]

Après avoir identifié les loci susceptibles de provoquer la maladie, de nombreuses études ont fait des efforts considérables pour explorer les gènes responsables dans ces régions, mais malheureusement, aucun gène n'a été identifié à ce jour. Ceci peut s'expliquer par le fait que le diagnostic de N-IgA se fait de manière invasive par une ponction biopsie rénale et que donc le diagnostic des suspicions de N-IgA n'est jamais confirmé si la biopsie rénale ne peut être réalisée.

3. Les études d'association génétique.

Ces études peuvent se décliner de deux façons. La première consiste en l'étude de la relation entre un ou plusieurs gènes candidats et la maladie. Cette première façon a commencé à être développée dans les années 1990. Par comparaison entre une cohorte de N-IgA et une cohorte témoin, on compare la fréquence d'un ou plusieurs polymorphismes du gène candidat. La deuxième façon est une approche à la grandeur du génome (GWAS Genome Wide Association Study).

Si on s'intéresse à la première façon nous verrons que la plupart des premières études d'association génétique, basées sur une approche gène-candidat, ne sont pas reproductibles. L'hétérogénéité génétique entre les groupes ethniques, les problèmes méthodologiques (par exemple, petite taille d'échantillon, contrôles mal appariés, couverture inadéquate des variantes dans les gènes candidats) et un manque de puissance statistique ont rendu les études d'association génétique avec une approche gène-candidat plutôt non concluantes.

Certains gènes comme ceux de l'antigène leucocytaire humain (HLA) [299, 306], le TRAC [307, 308] et les cytokines (interleukine-1, facteur de croissance transformant-β1) [309, 310] ont fait l'objet d'études d'associations pour tester le développement et/ou la progression des N-IgA. Nous développerons certains de ces aspects plus bas.

a) Le système rénine-angiotensine

Les gènes liés au système rénine-angiotensine ont été mis en avant avec des études d'association dans la N-IgA donnant des résultats contradictoires. [249, 311-315]

Parmi les variants du système rénine-angiotensine, des polymorphismes d'insertion / suppression dans les gènes de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) ont été observés. Des revues systématiques et des méta-analyses ont démontré une association entre les polymorphismes dans les gènes ECA et la maladie dans les populations asiatiques, or cette association était beaucoup plus faible dans les populations caucasiennes, voir ne modifiait pas le risque. [311, 313]

b) Les Gd-IgA1

Le O-glycane des molécules d'IgA1 est synthétisé par une série de glycosyltransférases. Des études d'association génétique ont été menées avec quatre gènes clés des glycosyltransférases pour la O-glycosylation des IgA1 (C1GALT1, ST6GALNAC2, C1GALT1C1, MUC20). [48-50] Une étude chinoise a proposé une association génétique entre la galactosyltransferase C1GALT1 et la N-IgA. En

effet, ils ont identifié un haplotype régulateur protecteur (YATIG) et deux haplotypes à risque (YAGDA, YATDG) dans le gène C1GALT1. [48] Cette association a été validée par d'autres études européennes et chinoises. [49, 50] Il a également été montré que l'haplotype ADG dans la région promotrice de ST6GALNAC2 est un polymorphisme régulateur fonctionnel se traduisant par une prédisposition à la N-IgA. [316]

c) Le récepteur CD89

Comme nous l'avons déjà décrit auparavant, le récepteur CD89 semble être un élément central dans la N-IgA. En effet, il a été montré que les polymorphismes de FcgammaRIIa et FcgammaRIIIa influenceraient sur la sévérité mais non l'incidence des N-IgA au Japon, suggérant que l'IgG-IC aurait un rôle important dans la progression et le pronostic de cette maladie via les récepteurs au fragment FC gamma des IgG. [317] Vuong et al ont étudié les variations génétiques du gène CD89 et le taux de complexes sCD89 dans le sérum des patients avec une N-IgA et les témoins. Le polymorphisme mono-nucléotidique (SNP) rs11084377 était significativement associé à une expression plus faible de sCD89 chez 112 patients avec une N-IgA et 447 contrôles caucasiens. [318] Des polymorphismes du CD89 ont été décrits, notamment trois polymorphismes mono-nucléotidiques du promoteur et de la région 5'UTR du gène FCAR, gène du CD89. Ces polymorphismes n'étaient pas liés à un risque plus important de développer la maladie ni de faire une forme plus sévère.[319] Maillard et al ont regardé la mutation 844 A->G qui n'était pas non plus associée à un risque plus important de développer la maladie ou de faire une forme plus sévère dans la population étudiée. [320] Il est possible que d'autres polymorphismes du CD89 soient impliqués dans la N-IgA ou que les polymorphismes retrouvés dans les études précédentes ne soient pathogènes que dans d'autres populations cibles.

Ces études, malgré les limites décrites, permettraient de rechercher des pistes physiopathologiques et des biomarqueurs potentiels à étudier.

4. Les études d'association pangénomique (Genome-Wide Association Study)

Les GWAS ont fait avancer de manière importante la connaissance du déterminisme génétique de la N-IgA. Ces études ont été élaborées à partir du génotypage de polymorphismes le plus souvent fréquents (>1%) ou marqueurs nucléotidiques >360 000 – 1 million, couvrant l'ensemble du génome humain (puces à ADN). Pour ce type d'analyse, un grand nombre de cas et de témoins appareillés sur l'origine géographique ou l'ethnie (caucasien, africain, asiatique principalement) est nécessaire. Ces études permettent de mettre en évidence des polymorphismes génétiques associés statistiquement à la maladie, que ces polymorphismes soient codants ou non codants. L'association est statistique et le plus souvent non mécanistique, et explique que seule une partie faible de la variance phénotypique soit observée.

La première GWAS dans la N-IgA a été réalisée en 2010 chez 914 sujets malades et 4980 contrôles provenant d'une cohorte de donneurs de sang. Dans cette étude, les régions HLA (à travers les loci pour HLA-B, DRB1, DQA et DQB) ont montré des associations significatives avec la maladie, ce qui était en accord avec les résultats d'études d'association génétique antérieures, dans lesquelles une famille de gènes HLA a été identifiée.[321]

La GWAS suivante publiée en 2011, a utilisé plus de 2000 sujets du nord de la Chine et a été validée ensuite dans une cohorte de réplication faite avec des sujets du sud de la Chine et du Caucase. [322]

Cette GWAS a identifié cinq locus de susceptibilité pour les N-IgA : 3 locus sur le chromosome 6p21 dans la région du CMH, un sur le chromosome 22q12 appelé locus HORMAD2 et un sur le chromosome 1q32 contenant le groupe de gènes CFH (CFHR1 et CFHR2 sont impliqués dans la régulation alterne de la voie du complément). [322]

La dernière GWAS de la N-IgA a été effectuée sur 20612 individus caucasiens et asiatiques. [24] Six nouvelles associations significatives à l'échelle du génome ont été identifiées ; quatre dans ITGAM-ITGAX, VAV3 et CARD9 et deux nouvelles associations liées à HLA-DQB1 et DEFA ont été signalées.

5. Le séquençage à haut débit ou de dernière génération

Ces dernières années, un bond technologique s'est opéré avec le développement du séquençage de deuxième génération ou à haut débit ou de nouvelle génération ((NGS ; Next-Generation Sequencing). Avant la mise au point de cette technique, l'analyse était faite par la technique de Sanger, développée en 1975 et dite de première génération.
Cette analyse repose sur l'amplification d'une séquence choisie à l'aide d'amorces spécifiques à celle-ci, conduisant à la production de fragments de tailles différentes qui se termine par une base (ACGT) marquée d'un fluorochrome.
Par électrophorèse capillaire, les fragments de tailles différentes sont ensuite séparés [323, 324] et déterminés par lecture de la fluorescence.
Cette technique a besoin d'amorces spécifiques de chaque partie du gène cible à séquencer après PCR (Polymerase Chain Reaction). Avec la technique de Sanger le séquençage du génome humain a nécessité plus de 10 ans avec de multiples équipes. [325, 326]

Avec le séquençage à haut débit, séquencer le génome humain ne nécessite que quelques heures aujourd'hui. Le NGS permet de séquencer en parallèle des millions de séquences d'ADN ou lectures (reads). [327] Il existe des critères de qualité comme la couverture (quelle couverture est séquencée par le génome) et la profondeur (le nombre de fois que la base a été séquencée à une position donnée). Il existe plusieurs techniques de NGS, nous avons utilisé dans notre étude la technique Illumina.
Le NGS permet donc une analyse à 3 niveaux. L'analyse de panels de gènes avec l'analyse de la séquence d'un certain nombre de gènes d'intérêt. Cette approche est la plus développée pour analyser des listes de gênes connus. L'analyse d'exome (WES - Whole Exome Sequencing) permet l'analyse des séquences codantes d'environ 22000 gènes. L'analyse du génome (WGS - Whole Genome Sequencing) permet l'analyse des séquences codantes et non codantes et limite les biais de capture d'exon (GC riche) et de PCR. Il est possible aussi de faire des choix de stratégies larges (panel, exome ou génome) puis de réaliser un filtre bio-informatique sur certains gènes. Cela permet une ouverture du filtre bio-informatique en cas de résultat non concluants. [328]
L'interprétation des variants est plus ou moins difficile et est aujourd'hui guidée par des recommandations comme celles de l'ACMG (American College of Medical Genetics and the Association for Molecular Pathology). [329]
Cinq classes ont donc été attribuées pour le classement : Classe 5. Variant Pathogène, Classe 4. Variant probablement pathogène, Classe 3. Variant de signification inconnue, Classe 2. Variant probablement bénin, Classe 1. Variant bénin. [330, 331]
Ces attributions prennent en compte une vingtaine de critères strictes, notamment l'origine ethnique, pour interpréter la fréquence d'un variant donné dans une base de référence de patients sains ou atteints

de maladies communes (diabète ou HTA). Les variants retrouvés sont ensuite confrontés aux publications rapportant ces variants via la base de données Pubmed ou la base HGMD. [332] Bien évidemment, les critères cliniques et biologiques doivent être décrits et en accord, en regard du variant et des données de ségrégation. Des données fonctionnelles peuvent aussi être incluses montrant in vivo ou in vitro le caractère pathogène du variant sur le gène ou son produit.

6. Les variants du collagène dans la N-IgA :

Comme nous l'avons décrit ci-dessus, le locus situé au 2q36 renferme les gènes COLA4 et COL4A3 (situés l'un par rapport à l'autre "tête-bêche"). Ces gènes sont impliqués dans les formes autosomiques récessives ou dominantes des syndromes d'Alport. [9] Étant donné que les syndromes d'Alport peuvent mimer cliniquement une néphropathie à IgA comme une phénocopie, il est intéressant de vouloir séparer ces deux entités.[333] En effet, les dépôts mésangiaux d'IgA ne sont hélas pas spécifique de la maladie puisque qu'ils sont retrouvés dans 16% des biopsies rénales de patients asymptomatiques.[334]

Une étude très récente a rapporté des variants pathogènes ou probablement pathogène du collagène IV dans 9 familles de N-IgA. Malheureusement, outre la présence de dépôts d'IgA, la description détaillée de la biopsie rénale n'était pas disponible. [335] Ces variants pathogènes, selon les critères biologiques ACMG ont aussi été retrouvés dans d'autres glomérulopathies comme la HSF. [336] Des cases reports ont aussi retrouvé des variants pathogènes dans des familles avec des hématuries diagnostiquées initialement comme N-IgA. Une variation COL4A5 liée à l'X avait été retrouvée chez un jeune patient asiatique de 9 ans ayant un diagnostic de N-IgA à la biopsie rénale et répondant peu au traitement immunosuppresseur. Cette variation était retrouvée chez les apparentés symptomatiques. [337] Un variant COL4A3 avait aussi été retrouvé chez un jeune garçon caucasien de 9 ans ayant un diagnostic de N-IgA avec des membranes basales normales à la première biopsie rénale mais retrouvées ensuite amincies à la deuxième biopsie rénale. [338]

Toutes ces données soulèvent trois hypothèses : la première serait que certaines N-IgA soient au final des N-IgA avec des variants fortuits non relevant. La deuxième serait la coexistence de deux maladies. La troisième est que la maladie initiale soit en fait un syndrome d'Alport *per se* avec des dépôts d'IgA à la biopsie rénale. C'est ce que nous chercherons à définir dans notre deuxième partie.

VI. Problématiques et objectifs de la Thèse

La néphropathie à IgA est une glomérulonéphrite pourvoyeuse d'insuffisance rénale terminale même chez l'enfant. La N-IgA de l'enfant a longtemps été considérée plus bénigne et moins agressive que chez les adultes. Cependant la survie rénale à 20 ans reste la même que chez les adultes avec 30% d'IRT. [227] Des biomarqueurs spécifiques de la maladie sont donc nécessaires pour suivre et traiter la N-IgA. Les complexes IgA (sCD89-IgA, IgG-IgA) et les Gd-IgA1 ont été mis en évidence comme des potentiels biomarqueurs de la N-IgA. Cependant ces complexes ont été très peu étudiés chez l'enfant.

Le premier objectif de ma thèse a donc été d'étudier l'intérêt diagnostique et pronostique des complexes IgA (sCD89-IgA, IgG-IgA) comme des potentiels biomarqueurs de cette maladie dans une cohorte rétrospective de 67 enfants. Grace à une cohorte prospective de 26 enfants, j'ai aussi pu étudier la relation de ces biomarqueurs avec les lésions histologiques classées selon la classification d'Oxford. Les biomarqueurs les plus spécifiques de la N-IgA impliqués dans les lésions histologiques ont été ensuite testés *in vitro* sur des cultures de cellules mésangiales humaines pour étudier leurs effets sur la prolifération mésangiale. Ces biomarqueurs, dans un troisième temps, ont été testé *in vivo* pour voir leur effet proliferatif cytopathogène intra-rénal.

D'une manière parallèle, j'ai étudié ces biomarqueurs au cours du temps chez deux patients. J'ai regardé comment ces biomarqueurs évoluaient avec les données cliniques, biologiques, histologiques et les traitements administrés.

Le second volet de ma thèse a été d'étudier l'incidence des variants du collagène dans la cohorte des N-IgA de l'enfant, afin d'envisager si des syndromes d'Alport pouvaient être à même de mimer la clinique de la N-IgA. Dans un premier temps, après séquençage panel ou exome, j'ai phénotypé les patients porteurs de variants COL4/3/5 afin de savoir si les patients présentaient un phénotype clinique, histologique et immunologique in fine compatible avec une N-IgA. Dans un second temps je me suis intéressée à voir si ces variations COL4/3/5 pourraient être considérées comme un facteur pronostique de la N-IgA. Les variants retrouvés dans COL4/3/5 ont aussi été recherchés chez les parents. Ainsi nous pourrons répondre à nos 3 hypothèses diagnostiques initiales décrites précédemment.

VII. Résultats

A. Partie 1 : le rôle des complexes immuns et du CD89 dans la N-IgA de l'enfant et leur lien de causalité avec les lésions histologiques

1. Article 1 : Le CD89 soluble est un facteur de gravité de la néphropathie à IgA de l'enfant en induisant la prolifération mésangiale.

La néphropathie à IgA (N-IgA) de l'enfant comprend un large éventail de présentations cliniques allant de l'hématurie isolée à la glomérulonéphrite aiguë avec une perte rapide de la fonction rénale. La N-IgA est une maladie auto-immune impliquant 3 biomarqueurs, les IgA1 hypogalactosylées (Gd)-IgA1, des auto-anticorps IgG anti-Gd-IgA1 et le récepteur soluble (s) CD89 IgA Fc lié à l'IgA (sCD89-IgA). L'implication de ces facteurs dans la N-IgA de l'enfant reste non-élucidée.

Ici, nous avons étudié ces biomarqueurs dans une cohorte de 67 enfants ayant une N-IgA ainsi que chez 42 contrôles. Nous avons étudié leur relation avec l'activité de la maladie et leurs lésions histologiques.

Alors que les taux de Gd-IgA1 n'étaient que modérément augmentés dans le plasma des patients, les taux de complexes IgA circulants (sCD89-IgA et IgG-IgA) et du sCD89 libre étaient nettement augmentés dans la N-IgA de l'enfant. Les complexes sCD89-IgA et le sCD89 libre étaient fortement liés à la protéinurie alors qu'aucune corrélation n'était retrouvée avec les autres marqueurs. Histologiquement, les complexes sCD89-IgA et le sCD89 libre étaient liés à la prolifération mésangiale, endocapillaire et extracapillaire ainsi qu'à la glomérulosclérose. Des dépôts de sCD89 dans le mésangium ont été retrouvés dans les biopsies des enfants ayant une N-IgA. Les fractions de chromatographie contenant les complexes sCD89-IgA ou le sCD89 libre provenant de patients ont induit une prolifération de cellules mésangiales *in vitro* en corrélation avec l'activité de la maladie. La protéine recombinante (r) sCD89 était également capable d'induire une prolifération des cellules mésangiales *in vitro* qui était inhibée par l'adjonction du récepteur recombinant (r)CD71 ou par la rapamycine inhibiteur de la voie mTOR. Les injections répétées de rsCD89 ont entrainé une prolifération histologique intra-glomérulaire importante associée à une protéinurie chez de jeunes souris exprimant l'IgA1 humaine.

En conclusion, le sCD89 en circulation sous forme libre ou complexé aux IgA serait un acteur clé de la prolifération mésangiale suite à une interaction avec le récepteur CD71. Ces découvertes révèlent un nouveau rôle du sCD89 comme biomarqueur et comme potentielle cible thérapeutique dans la N-IgA de l'enfant.

Circulating Soluble CD89 Induces Mesangial Cell Proliferation and Correlates with Severity of IgA Nephropathy in Children

Alexandra Cambier[1,2], Patrick J. Gleeson[1], Lilia Abbad[1], Fanny Canesi[1], Jennifer da Silva[1], Julie Bex-Coudrat[1], Georges Deschênes[1,2], Olivia Boyer[3], Marion Rabant[4], Tim Ulinski [5], Michel Peuchmeur[6], Laureline Berthelot[1,7] and Renato C. Monteiro[1,8]

[1]Université de Paris, Paris, France ; Centre de recherche sur l'inflammation (CRI); INSERM U1149; CNRS ERL8252 ; Inflamex Laboratory of Excellence, Paris, France ;

[2]Service de Néphrologie Pédiatrique, Assistance Publique de Paris, Hôpital Robert Debré, Paris, France;

[3] Service de Néphrologie pédiatrique, APHP, Hôpital Universitaire Necker, Paris, France

[4]Service de Pathologie, Hôpital Universitaire Hôpital Necker APHP, Paris, France

[5]Service de Néphrologie pédiatrique, APHP, Hôpital Universitaire Armand Trousseau, Paris, France

[6]Service d'Anatomo-pathologie, Assistance Publique de Paris, Hôpital Robert Debré, APHP, Paris, France ;

[7]Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie (CRTI), UMR1064, Université de Nantes, INSERM, Nantes, France.

[8]Service d'Immunologie, FHU Apollo, Assistance Publique de Paris, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France.

Running head: Soluble CD89 in pediatric IgA nephropathy.

Correspondence: Renato C. Monteiro, Center for Research on Inflammation, Paris University Medical School (Bichat campus), INSERM U1149 & CNRS ERL8252. Email: renato.monteiro@inserm.fr

ABSTRACT

Childhood IgA nephropathy (cIgAN) includes a wide spectrum of clinical presentations, from isolated hematuria to acute nephritis with rapid loss of renal function. IgAN is an autoimmune disease and its pathogenesis involves galactose deficient (Gd) IgA1, IgG anti-Gd-IgA1 autoantibodies and the soluble IgA Fc receptor (sCD89). However, the implications of such factors in cIgAN pathogenesis remain unclear. Here, we studied these biomarkers in a cohort of 67 cIgAN patients and 42 controls. While Gd-IgA1 was only moderately enhanced in patient plasma, levels of circulating IgA complexes (sCD89-IgA and IgG-IgA) and free sCD89 were markedly increased in cIgAN. sCD89-IgA1 complexes and free sCD89 correlate with proteinuria, as well as histological markers of disease activity: mesangial, endocapillary and extracapillary proliferation. Mesangial sCD89 deposits were detected in cIgAN biopsies. Plasma chromatography fractions containing sCD89-IgA1 or free sCD89 from patients induced mesangial cell proliferation *in vitro*. Recombinant (r) sCD89 induced mesangial cell

proliferation *in vitro* that was inhibited by rCD71 or rapamycin. Injection of rsCD89 induced marked glomerular proliferation and proteinuria in human IgA1 transgenic mice. In conclusion, free and IgA1-complexed sCD89 are key players in mesangial proliferation. These findings reveal a new role for sCD89 in cIgAN, making it a potentially useful biomarker and therapeutic target.

INTRODUCTION

Since its discovery in 1968, IgA nephropathy (IgAN) or Berger's disease [1] becomes the most common primary glomerular disease worldwide and one of the major cause of end-stage renal disease.[2] Childhood IgAN (cIgAN) is also a frequent chronic disease among pediatric primary glomerulonephritis (GN).[3] In young adults, IgAN is the most common cause of end-stage renal disease.[4] cIgAN presents however particular features being a more proliferative GN with fewer sclerotic lesions than adults with IgAN and more often steroid sensitive.[5] Despite of a number of prognostic factors being considered by clinicians such as the presence of hypertension, proteinuria > 1g/24h, estimated glomerular filtration rate (eGFR), and renal pathologic findings, none of these prognostic factors provide adequate precision regarding prognosis and response to therapy, and thus there is an urgent unmet medical need to identify valuable biomarkers that can guide therapeutic decisions in cIgAN.[6]

Studies since the 80's revealed three key factors in the pathogenesis of IgAN, namely galactose-deficient IgA1 (Gd-IgA1), anti-IgA autoantibodies and soluble (s) CD89 IgA Fc receptor.[7] These molecules form circulating immune complexes which have been identified as potential markers for adult IgAN progression but not yet for cIgAN.[8, 9] These markers were also found during recurrence of IgAN after kidney transplantation.[10] All these molecules are implicated in IgA1 mesangial deposit formation. [10-13]

Mesangial cells participate in the regulation of glomerular hemodynamics and are critical for renal glomerular function. It has been previously identified that transferrin receptor 1 (TfR1/CD71) serves as an IgA1 receptor.[14] CD71 is a multi-ligand receptor which participates in cellular functionsbymanyways.[15-18] It was shown in IgAN and celiac disease, that TfR1 is overexpressed in mesangial cells and enterocytes from patients allowing binding of IgA1. [14, 19, 20] Moreover, IgA1 molecular size and its glycosylation (both altered in IgAN patients) are essentials for IgA1 binding to TfR1.[21] In vitro stimulation of human mesangial cells by high-molecular- mass IgA1 or sCD89 enhances TfR1 expression, which initiates a positive feedback loop that could increase IgA1 mesangial deposition.[22] It has been further demonstrated that IgA1 binding to human mesangial cells induces MAPK/ERK and PI3K/Akt/mTOR pathways in vitro and that phosphorylated ERK identified on patient mesangial areas was associated with a worse prognosis of IgAN patients. [23, 24] Nevertheless, whether sCD89-TfR1 interaction induces PI3K/Akt/mTOR pathway remains not determined.

CD89 is an IgA Fc receptors (FcαRI) expressed on human myeloid cells but not on mesangial cells.[25] CD89 binds both subclasses of IgA (IgA1 and IgA2) with moderate affinity, but also bind other molecules such as transferrin receptor, C-reactive protein and bacterial ligands.[24, 26, 27] CD89 was first identified as a putative pathogenic factor in IgAN following detection of a decreased surface expression on patient blood monocytes and neutrophils.[28] It has been shown thereafter that soluble CD89 was generated in patient cells following shedding by protease-mediated cleavage mechanism. [29-31] Soluble CD89 form complexed with human IgA that are able to spontaneously induce the disease in mice

expressing human IgA1 heavy chain and transgenic for the human CD89.[24] The presence of human CD89 in mice provides a mesangial IgA1-deposit pattern that differs from the endothelial IgA1 pattern observed in mice expressing human IgA1 alone. Moreover, injection of recombinant sCD89 into human IgA1-expressing mice were able to markedly increase mesangial IgA1 deposits.[24] However, the precise pathogenic mechanisms by which soluble CD89 is driven IgAN glomerular lesions remains unknown.

In this article, we first report circulating free sCD89 and sCD89-IgA complexes as valuable biomarkers for cIgAN progression which were correlated with histological proliferative lesions in patient biopsies. We next demonstrate that patient derived sCD89 or recombinant sCD89 induces marked mesangial cell proliferation in culture following interaction with mesangial CD71 receptor via PI3K/Akt/mTOR pathway. Our results suggest a striking effect of sCD89 in promoting mesangial cell proliferation and expansion in vitro. Moreover, the administration of recombinant sCD89 to a young human IgA1 expressing mice, led, surprisingly, to not only a severe mesangial cell proliferation but also to marked proteinuria. These results suggest a more complex effect of sCD89 in vivo, resulting in a worse outcome in this model, possibly related to unexpected proinflammatory effects following interaction with mesangial CD71 receptors.

RESULTS

Between 2015 and 2019, sixty-seven cIgAN patients and forty-two controls were included in a cross-sectional multicentric study in three pediatric hospitals in Paris. Among the 67 cIgAN patients, twenty-six were included prospectively with available biopsy. Control children included were displaying CAKUT, Barter and Gitelman syndrome. In the cIgAN cohort, mean age was 13 years. 39 were male (58.2%). Macroscopic hematuria was found in 53 (79.1%) children. Mean eGFR was 93.88±29.02 ml/min/1.73m^2 and median urinary protein/creatinine ratio was 0.119 [0.029-0.35] g/mmol (Table 1). In the prospective cohort, mean age was 10 years. Male represent 53.8% of the cohort. Macroscopic hematuria was found in 18 (69.2%) children. Mean eGFR was 92.82 ±32.73 ml/min/1.73m^2 and median proteinuria was 0.06 [0.02-0.42] g/mmol of creatinine. In kidney biopsies from patients with cIgAN, mesangial proliferation (M1), endocapillary proliferation (E1), extracapillary proliferation (C1-C2) and glomerulosclerosis (S1) were frequently observed (76.9%, 42,3%, 42,3%, 65.38%, respectively) whereas tubular atrophy (T1) was rarely detected (7.6%) (Table 2).

Circulating IgA complexes and free sCD89 are associated with proteinuria and eGFR decline

We first assessed the levels of Gd-IgA1 in plasma of cIgAN patients using a specific anti-Gd-IgA1 mAb, the KM55.[32, 33] Circulating Gd-IgA1 levels were enhanced in cIgAN as compared to controls (Figure 1a). The levels of circulating IgA complexes in plasma (sCD89-IgA and IgG anti-IgA) were markedly increased in cIgAN as compared with controls (Figure 1b and Figure 1c, respectively). We next address whether free, unbound, sCD89 could be detected in cIgAN plasma using a sandwich ELISA composed of MIP8a mAb anti-CD89 extracellular domain 1 (that competes with IgA binding) and A77 mAb anti-CD89 domain 2. [34, 35] In contrast to adult IgAN patients in whom no free sCD89 was detected, [24] free sCD89 levels were increased in cIgAN plasma as compared to pediatric controls (Figure 1d). All above markers display significant ROC curves with AUC higher than 0.7 indicating higher specificity for cIgAN diagnosis (Supplementary Figure S1).

To identify the putative origin of circulating sCD89 in cIgAN, we analyzed surface expression of CD89 on blood monocytes and neutrophils from cIgAN patients. As shown in Figure 1e, CD89 expression was markedly decreased on monocytes from cIgAN as compared to those of CAKUT controls but not

on neutrophils (Figure 1f). These results suggest that CD89 may be shedded from circulating monocytes in cIgAN. Importantly, sCD89-IgA complexes and free sCD89 levels in plasma correlate significantly with proteinuria (g/mmol creatininuria) ($p<0.001$ for both, Figure 1g,h respectively), microalbuminuria (mg/mmol creatininuria) (p=0,02 and p=0=0,002) and eGFR ($p<0.001$ and $p<0.0048$ respectively, Supplementary Figure S2). However, circulating Gd-IgA1 and IgA-IgG complexes were not associated with proteinuria or eGFR (p=0.2 and p=0.5 respectively, Supplementary Figure S3).

Circulating sCD89-IgA complexes and sCD89 are linked to glomerular cell proliferation

We next analyzed 26 cIgAN patients with renal biopsy and measurement of IgA1 complexes and sCD89 levels at the time of biopsy. As shown in Figure 2, levels of sCD89-IgA complexes (a-d) and free sCD89 (f-i) were strongly associated with endocapillary proliferation (p=0.0008 and $p<0.0001$), extracapillary proliferation ($p<0.0001$ and 0.0004) association of endocapillary and extracapillary proliferation (p=0.0001 and $p<0.0001$) and with glomerulosclerosis (p=0.03 and p=0.0053), but not with sclerosis (not shown). Concerning mesangial proliferation among these 26 patients, 22 were classified in Oxford M1 and only 4 as M0. This indicates that mesangial proliferation is very common in cIgAN. In the context of this very small M0 group, levels of sCD89-IgA complexes (Figure 2e) and free sCD89 (Figure 2j) were marginally associated with mesangial proliferation (p=0.05, respectively). In contrast, levels of Gd-IgA1 were associated with endocapillary proliferation (p=0.01) and extracapillary proliferation (p=0.01) and association of endocapillary and extracapillary proliferation (p=0,02) (Supplementary Figure S4), but not with mesangial proliferation (p=0.19), or glomerulosclerosis (p=0.2) or sclerosis (p=0.44). Moreover, IgG-IgA complex levels were not associated with MEST scores (Supplementary Figure S5).

To better evaluate the proliferative state of glomerular cells in cIgAN, we stained 18 frozen biopsy sections with anti-Ki67 mAb, a nuclear marker of cell proliferation. Figure 3a shows three representative glomeruli of a $Ki67^{+}$ versus a $Ki67^{-}$ patient biopsy. Ki67 staining of three additional cIgAN and two control biopsies are shown in Supplementary Figure S6. sCD89 and sCD89-IgA1 levels were increased in patients expressing Ki67 but not Gd-IgA1 (Figure 3b-d). sCD89 and sCD89-IgA levels were more correlated with the percentage of glomeruli containing Ki67+ cells (Figure 3e, f) than Gd-IgA1 levels (Figure 3g). Remarkably, for the prediction of presence of endocapillary proliferation in cIgAN, sCD89-IgA and free sCD89 (AUC=0.9276, p=0.0003 and AUC= 0.9394, p=0.0003) were better markers than proteinuria (AUC=0.8182, p=0.0073, Figure 4a, b). Similarly, for the prediction of extracapillary proliferation, sCD89-IgA and sCD89 (AUC=0.9212, p=0.0037 and AUC= 0.8909 p 0.008) were better markers than proteinuria (AUC= 0.8442, p=0.0037, Figure 4c,d).

sCD89 deposits in the mesangium of cIgAN patients are co-localized or not with IgA

We next stained kidney biopsies from 3 cIgAN patients using anti-CD89 monoclonal antibodies. Figure 5a shows a representative sCD89 immunostaining in a kidney biopsy from a patient with cIgAN with mesangial, endocapillary and extracapillary proliferation whereas staining of a kidney biopsy from a control CAKUT patient was negative. To evaluate colocalization of sCD89 with IgA in the glomeruli, we performed triple staining of three cIgAN biopsies with labeled antibodies: anti-sCD89, anti-IgA and anti-CD34 as an endothelial marker using antibodies labeled with different fluorochromes (Figure 5b).

Co-localisation of sCD89 with IgA was found in mesangium (black stars) but sCD89 was also detected alone in the mesangium (double black stars). $CD34^+$ cells were IgA negative (white stars).

Molecular and functional analysis of immune IgA complexes from cIgAN fractionated sera

To assess the functional effects of these biomarkers, we separated serum fractions from cIgAN patients with active (n=5) or inactive (n= 5) disease and CAKUT patients (n=3) using HPLC (Supplementary Table 1). Disease activity was defined by the presence of at least endocapillary and/or extracapillary proliferation. Figure 6a shows a representative HPLC profile pattern with similar amounts of IgA between an active cIgAN and a CAKUT patient. Gd-IgA1, sCD89-IgA and IgA-IgG complexes were detected in high and intermediate molecular weight fractions from cIgAN patients but not in those from control patients (Figure 6b-d). We next analyzed HPLC fractions from cIgAN patients (n=3) using SDS-PAGE and identified proteins and complexes by Western blot using either anti-CD89 (A77 mAb) or anti-Gd-IgA1 (KM55 mAb). While sCD89 was detected mostly in high molecular weight fractions (>690 KDa) and intermediate sized complexes (between 690 and 250 KDa) (Figure 6e), the galactose deficient hinge region epitope of IgA1, that is recognized by KM55, was detected mainly in monomeric fractions and as dimers (Figure 6f). Similar profiles were obtained with serum HPLC fractions from two additional cIgAN patients (Supplementary Figures S7 and S8).

The functional effect of serum fractions containing these complexes on human mesangial cell (HMC) proliferation was assessed in vitro. We first compared the proliferation of HMC between 5 inactive cIgAN and 5 active cIgAN patients (Supplementary Table 1 and Supplementary Figure S9a,b). Of note, active cIgAN patients display significantly more IgA complexes (IgA-IgG, sCD89-IgA) and free sCD89 than inactive cIgAN but no differences were observed for Gd-IgA1 (Supplementary Figure S9). Similarly, decrease in CD89 expression on monocytes, but not neutrophils, was associated with disease activity (Supplementary Figure S9g,h, respectively). Remarkably, fractions from patients with active cIgAN lead to more HMC proliferation than those from inactive cIgAN (Figure 6g). We next analyse the molecular size of proliferation inducers of active cIgAN patients. High molecular weight fractions 6-8 (> 690 kDa) containing sCD89 led to stronger proliferation of HMC than fractions 12-14 (~350 KDa) that contained CD89 and Gd-IgA1, relative to fractions 24-25 (Figure 6h, p=0.002). Surprisingly, lower molecular weight fractions (n° 29-31) from active cIgAN also induced proliferation (Figure 6g,h).

sCD89 directly induced proliferation of human mesangial cells

To evaluate whether free sCD89 was present in low molecular weight fractions (n° 29-31) shown in Figures 6, we measured free sCD89 by sandwich ELISA involving clone MIP8a that recognizes domain 1 of the receptor and only binds to sCD89 when IgA is not engaged. [34] As shown in Figure 7a, sCD89 was found in these fractions and was characterized by Western blot for three patient's samples showing two molecular forms of 55 and 24 kDa, potentially corresponding to different CD89 glycosylation forms (Figure 7b). We next examined whether free sCD89 induced HMC proliferation via the TfR1/CD71 receptor pathway. As rsCD89 induced activation was previously shown to be inhibited by rsCD71 [24] and HMC proliferation by rapamycin through blocking CD71 signaling, [23] we examined whether these reagents could block the proliferative effects of fraction 30 on HMC. Indeed, both inhibitors significantly blocked HMC proliferation (47 and 45% respectively) suggesting a direct effect of free sCD89 on mesangial cells via the CD71 signaling pathway (Figure 7c).

Recombinant sCD89 induces mesangial proliferation in vitro and in mice expressing human IgA1

To demonstrate that sCD89 could directly induce HMC proliferation in the absence of IgA, we took advantage of recombinant sCD89 (rsCD89) as an inducer of proliferation and compared to an unrelated recombinant protein produced in the same conditions: rβ-synuclein protein (rβ-syn). While a dose response proliferation was observed with rsCD89, no effect was obtained with addition of r-syn (p= 0.0026, Figure 8a). Moreover, uncomplexed Gd-IgA1 do not lead to HMC proliferation (Supplementary Figure S10). The proliferative effect of rsCD89 was inhibited by the addition of rsCD71 (p=0.0079) and also by rapamycin (p=0.008) (47 and 46% of inhibition, respectively) (Figure 8b). Taken together these results indicate that sCD89 is able to induce proliferation via the transferrin receptor pathway.

Since it has previously been shown that rsCD89 modulates IgA1 deposits in six week-old α1KI mice,[24] we applied the same protocol to study glomerular cell proliferation. Two injections of 200 μg of rsCD89 intravenously over one week induced massive cellular proliferation in glomeruli as measured by anti-Ki67 mAb staining (Figure 8c). As expected,[24] an increase in IgA1 deposits were observed in all three α1KI mice following injection of sCD89 but not with injection of control protein (BSA) (Supplementary Figure S11). rsCD89 injection also induced increased levels of sCD89-IgA complexes and free sCD89 associated with proteinuria (Figure 8e). Moreover, free sCD89 was detected in the urine of all three animals (Figure 8e).

DISCUSSION

Childhood IgAN is an immune complex–mediated glomerulonephritis characterized by mesangial IgA1 deposition and cellular proliferation. The first goal of this multi-center case-control study was to evaluate potential biomarkers of cIgAN. Gd-IgA1 has been proposed as the first hit for IgA deposition in the kidney [36] with the formation of autoreactive IgG antibodies and the generation of immune complexes in the circulation. [37] The soluble CD89 IgA Fc receptor (or soluble FcαRI) binds to IgA following shedding of its extracellular domain generating nephrotoxic sCD89-IgA complexes as demonstrated previously in humanized mouse models.[24, 30, 38] sCD89-IgA1 is trapped in the glomerular mesangium by the mesangial IgA receptors, notably CD71.[24] In this study we showed that sCD89-IgA complexes and free sCD89 are valuable biomarkers to measure disease activity in cIgAN.

Gd-IgA1, sCD89-IgA, IgA-IgG complexes have been identified as potential biomarkers in childhood IgA vasculitis.[39] In this study, however, we have not observed Gd-IgA1 and IgA-IgG complexes as reliable biomarkers in cIgAN. This is in agreement with Hastings et al.[40] In contrast, both sCD89-IgA and free sCD89 were markedly linked to cIgAN histological activity score and clinical features. Indeed, both markers were linked to proteinuria and associated with glomerular cell proliferation including endocapillary, mesangial, extracapillary proliferation as well as glomerulosclerosis. This was confirmed by the Ki67 nuclear proliferation marker that stains cells in mitosis and allows quantification of glomerular cell proliferation. Ki67 immunostaining of kidney biopsies could thus constitute a complementary quantitative method of the Oxford classification for pathologists. Moreover, free sCD89 and sCD89-IgA complexes have a better sensitivity and specificity than proteinuria for endocapillary and extracapillary proliferation. This outcome differs from data observed by others in adult IgAN studies which reported low serum levels of sCD89-IgA associated with bad prognosis.[9] An explanation for such discrepancies is that cIgAN display more acute renal lesions[6] as compared to those of IgAN adults whose present more chronic lesions. Under these conditions, sCD89 generation in cIgAN may be an early and more abrupt event that induces proliferative glomerular lesions and proteinuria contributing to a severe prognosis. This statement is supported by experimental procedures in mice in which sCD89 was able to induce marked proliferation and proteinuria. One can postulate that sCD89 can be found in both

circulation and kidneys in the acute phases of cIgAN disease whereas it would be rather in the kidneys in the chronic phase of the disease in adults. This hypothesis is supported by the detection of increased levels of sCD89-IgA complexes in the serum rapidly after kidney transplantation in adults during recurrence of IgAN. [10] Of note, from our study we have no explanation why sCD89 is found free of IgA in circulation of cIgAN patients. Whether free sCD89 originates from shedding or secretion from different mechanisms as described previously[25], remains to be demonstrated. Nevertheless, the measurements in the circulation of sCD89 under free and complexed forms could constitute thus a new approach for a non-invasive assessment of the disease severity to avoid repeated kidney biopsies.

The mechanism by which sCD89-immune complexes of various sizes differentially modulate mesangial cell proliferation in vitro was partially elucidated by this study. While high molecular weight complexes were able to induce stronger proliferation of mesangial cells, complexes of intermediate size were less effective. This is partially in agreement with data observed from IgA complexes isolated from pediatric patients.[41] However, our data show that high molecular weight complexes (>690 kDa) contain mainly sCD89 rather than Gd-IgA1, that were able to induce a higher level of mesangial proliferation than intermediate size complexes between 250 and 690 kDa containing sCD89 and Gd-IgA1. Moreover, we found that cIgAN fractions with an active disease induce more mesangial proliferation than children with a less active disease. The role of CD89 in the formation of the pathogenic IgA immune complexes was further supported by the observation that cIgAN with active disease had a higher level of sCD89-IgA compared to cIgAN patients with inactive disease.

The observation that serum chromatography fractions containing free sCD89 (without the presence of IgA) were a potent inducer of HMC proliferation in vitro, led us to postulate that sCD89 directly mediates HMC proliferation. This was confirmed using recombinant sCD89 which showed to be a potent inducer of mesangial cell proliferation in vitro when compared to irrelevant recombinant protein (β-Synuclein) and in vivo following intravenous injection in mice expressing human IgA1 alone (α1KI mice). Interestingly, rsCD89 induces proliferation of not only mesangial cells but also other glomerular cell types and importantly it induces proteinuria. The mechanism by which sCD89 was acting on HMC appeared to be due at least partially to interaction with CD71 transferrin receptor 1 as soluble CD71 was able to nearly inhibit by half sCD89-mediated HMC proliferation, confirming previous observations. [24] We cannot exclude from our study that other mesangial IgA receptors [42, 43] may participate in this process. However, our results are in agreement with our previous studies in which sCD89 was found to be a ligand for CD71 which up-regulates its expression on HMC and induces secretion of proinflammatory cytokines.[24] Finally, we showed that rapamycin, a mTOR inhibitor, blocked about half of sCD89-mediated proliferation activity underlying that of sCD89 is involved at least partially in signaling through TfR1-PI3K/Akt/mTOR pathway. Indeed, it is well established that PI3K/Akt/mTOR is one of the major pathways involved in cellular proliferation[44] and it has been shown previously that PI3K/Akt/mTOR pathway is induced after HMC stimulation by IgA1 complexes from IgAN patients which was associated with disease progression.[23] Taken together, our study demonstrates the pivotal role of sCD89 in the pathogenesis of cIgAN notably by favoring glomerular cell proliferation.

METHODS

Patients

This multicentric longitudinal observational case-control study was undertaken across three university hospitals in Paris (Necker Enfants Malades, Robert-Debré and Trousseau hospitals) and included 67 consecutive cases of children and adolescents recorded between 1990 and 2015, aged <18 years, and

newly diagnosed since 2015 with primary IgAN after a renal biopsy. The control cohort included 42 CAKUT patients. The study was approved by the ethics committee of St Antoine Hospital in Paris, France. Diagnosis of cIgAN was based on immunofluorescence microscopy findings showing predominant or co-dominant mesangial deposition of IgA. Patients with systemic diseases, such as systemic lupus erythematosus, IgA vasculitis, inflammatory bowel disease or chronic liver diseases were excluded.

Clinical data set

The following clinical and biological parameters were collected for each patient at time of renal biopsy and time of measurement of immune complexes: Age, sex, weight, height, clinical presentation at disease onset, time from onset to renal biopsy, presence of a macroscopic hematuria at diagnosis, history of tonsillectomy, familial IgAN history (either proven by renal biopsy or suspected because of a medical history of microscopic and/or macroscopic hematuria in a next of kin), systolic and diastolic blood pressure, serum albumin, serum IgA levels, serum creatinine (sCreat, expressed in μmol/L), eGFR, urine protein-to-creatinine ratio ([g/mmol], used as an estimation of 24-h protein excretion adjusted for body surface area) as defined previously. [5]

Production of soluble proteins and antibodies

sCD89 and human sTfR1 were expressed and produced in lytic baculovirus/insect cell expression systems in our laboratory.[15] The anti-CD89 mAb A3 was produced and purified in our laboratory.

Flow cytometry

Blood (50 μl) from patients and controls were stained with anti-CD89-PE antibodies (clone A59, BD-Biosciences) and with isotype control (mouse IgG1-PE), as described previously. [28]

Gd-IgA1, sCD89 and IgA complex measurements

For the Gd-IgA1 levels measurement, ELISA was performed with the anti-Gd-IgA1 KM55 Assay Kit (IBL international, Japan) according to manufacturer instructions using 1/200 plasma dilution. For the measurement of free, unbound sCD89, MIP8a anti-human CD89 (1/500, Thermo Fisher) was used for coating overnight in BBS at 4 ˚C, followed by blocking for 4 h at 37 ˚C and overnight incubation with 1/5 dilution of plasma at 4°C, then detected using biotinylated A77 anti-sCD89 (5 μg/L) [35] and streptavidin-HRP.

For the IgA immune complex measurements, ELISA plates (Nunc Maxisorp, ThermoScientific) were coated with goat anti-human IgA heavy chain antibody (1/500 in BBS, Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA) or with murine clone A3 anti-human sCD89 (5 µg/mL) [35] for 4 h at 37 ˚C, followed by blocking for 4 h at 37 ˚C. An isotype control was used for each ELISA. Plasma samples (1/5 dilution) were incubated overnight at 1/10 at 4°C. Detection was performed using an anti-human

IgG Fc specific Ab (1/5000, Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA) coupled to HRP or an anti-IgA heavy chain antibody (1/2000, BD Biosciences Le Pont de Claix, France) coupled with alkaline phosphatase, for IgA-IgG or sCD89-IgA complex detection, respectively. The substrates were TMB solution (Interchim SA) or Sigma fast P-nitrophenyl phosphate tablets (Sigma-Aldrich), respectively. The optic density was read at 450 nm for HRP or 405nm for AP.

HPLC

300 µl of serum from cIgAN or CAKUT controls were resolved through a Superdex 200 10/30 column (GE Healthcare) connected to an HPLC AKTA-basic automated liquid chromatography system (GE Healthcare) and fractions were collected as described previously.[24]

SDS-PAGE and Western blotting analysis

HPLC fractions were solubilized in Laemmli buffer sample under non reducing conditions and subjected to SDS-8%PAGE for low molecular weight (MW) proteins (fractions 29-31) or 4-12% SDS-PAGE (BIO RAD) for high MW proteins (fractions 5-20). Proteins were electroblotted on polyvinylidene fluoride membranes (Millipore) and subjected to Western blot analysis, unlabeled rat mAb anti-Gd-IgA1 (clone KM55, IBL) for Gd-IgA1 detection, a biotinylated mouse mAb anti-human CD89 (clone A77; purified in our laboratory) or a mouse mAb anti-human CD89 (clone A3; purified in our laboratory). Revelation was performed using HRP conjugated, human cross-adsorbed, goat anti-mouse IgG (1/30 000 dilution; Invitrogen) for A3 mAb detection, HRP conjugated, human cross-adsorbed, goat anti-rat IgG (1/5000 Invitrogen) for Gd-IgA1 detection or streptavidin-HRP for biotinylated A77 detection followed by the developing step using enhanced chemical luminescence treatment (GE Healthcare). Secondary antibodies and streptavidin-HRP were incubated with blots alone, or with isotype controls, in parallel, as controls

Histopathology

All biopsy samples were re-analyzed for the purpose of this study by our renal pathologists (MR and MP) using the Oxford classification as previously described.[5]

Immunohistochemistry and immunofluorescence

For IgA staining in immunofluorescence, human or α1-KI mice frozen kidney sections were incubated with a rabbit anti-human polyclonal IgA antibody coupled with FITC (Dako). For sCD89 staining in immunohistochemistry, human frozen kidney sections were incubated with a mousse anti-human sCD89 antibody (clone A3 1/1000).[35] The primary antibody incubation will be followed by incubation with a polyclonal anti-Ig-DAB (leica). For colocalization experiments, frozen kidney sections were incubated successively with a mousse anti-human sCD89 (clone A3), anti CD34 (Leica) and a rabbit anti-human polyclonal IgA antibody coupled with FITC for 2 h followed by incubation with a polyclonal Ig-DAB and a polyclonal refine red at room temperature using Leica bond techniques. For cellular proliferation experiments, immunostaining was performed on paraffin-section in human using a mousse anti human Ki-67(Dako) or in α1-KI mice a rabbit anti-mouse Ki-67 (Invitrogen) followed a polyclonal anti-Ig-

DAB (leica). Tissue sections has been mounted in Robert Debré Hospital and were read with a laser-scanning microscope.

Proliferation and stimulation of human mesangial cells

HMC were cultured in 5% CO2, in RPMI 1640 supplemented with l-glutamine (2 mM), 5 ug/ml insulin, 20% FCS (Life Technologies, Gaithersburg, MD), 7 mM glucose, 50 U/ml streptomycin. HMC were used at passages 4 to 6. HMC were trypsinized, resuspended in RPMI 1640 with 0.5% FCS, added in triplicate at a concentration of $1x10^4$ cells/well in 96-well tissue culture plates (Falcon, Oxnard, CA, USA). HMC were serum-deprived for 24 hours (arrested in G0 phase of the cell cycle) before stimulation in RPMI 0.5% FCS and replaced 24 h, 22 hours, 12 h and 2 h before the stimulation. Proliferation of quiescent HMC was induced with indicated samples, as well as culture medium alone and medium supplemented with platelet-derived growth factor (PDGF, 50 ng/mL; R&D Systems, Minneapolis, MN) as negative and positive controls, respectively. For inhibition experiments, rapamycin (25nM) or recombinant sTfR1 (200 μg/ml, produced in our lab) was added 1 h before addition of sCD89. Proliferation was measured after 24 h of stimulation by ELISA using cell counting kit 8 (MedChemExpress) 10 μl added to each well for the last 4 h of incubation. Average values were normalised to the negative control (sample / culture medium alone) for each assay and expressed as a proliferation index.

In vivo study of recombinant sCD89 in mice

Mice expressing human IgA1 heavy chain (α1-KI mice) [45] were used for this experiment. The mice were raised in the animal facility at Claude Bernard Bichat Faculty. The national ethical guidelines approved the experiment with the approval of local authorities of the Comité d'Éthique Expérimentation Animale Bichat-Debré. 200 μg of recombinant sCD89 or bovine serum albumin (BSA) was injected IV in 6 w-old α1-KI-mice on days 0, 3, 6 and 7. The mice were sacrificed 2 h after the last injection on day 7 and kidneys were processed for paraffin-embedded or frozen in optimal cutting temperature (OCT) medium.

Statistical analysis

Median (interquartile range IQR) values and frequencies are provided for the description of continuous and categorical variables, respectively. The Shapiro-Wilk test was used to test the normality of the data distribution for T test. The mean values and proportions of two groups were compared using Mann-Whitney and Fisher's exact tests, respectively. For multiple group comparisons, an Anova test was used followed by Kruskal-Wallis test. Aberrant values for biological variables were determined by a Dixon test and excluded. Spearman's rank correlation coefficient was used to assess the correlation between two continuous variables. All tests were two-sided, and values of $p<0.05$ were considered statistically significant. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism version 7 (GraphPad Software) and SPPS.

DISCLOSURE

All the authors declared no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Erwan Boedec for his technical advices in this study. This research was supported by ANR-11-IDEX-0005-02 Laboratory of Excellence INFLAMEX and Fondation pour la Recherche Médicale (EQU201903007816).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Plasma levels of Gd-IgA1, IgA immune complexes (IgA-IgG sCD89-IgA) and free sCD89 in cIgAN and control patients. (a) Gd-IgA1, (b) IgA-IgG complexes, (c) sCD89-IgA complexes, (d) Free sCD89, (e) Cell surface expression of CD89 on blood monocytes from cIgAN and control patients by flow cytometry. (f) Cell surface expression of CD89 on blood Neutrophils from cIgAN and control patients by flow cytometry Results are expressed by mean fluorescence intensity (MFI). (g) Correlation between the amounts of sCD89-IgA complexes and proteinuria (h) Correlation between free sCD89 concentrations and proteinuria. Values are expressed as mean ± SEM, *P< 0.05; ** P<0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001, compared with the control group. Statistical significance was determined using a non-parametric Mann-Whitney test or Spearman's rank correlation coefficients.

Figure 2. Increased levels of sCD89-IgA1 and free sCD89 are associated with (a,f) mesangial (M), (b,g) endocapillary (E), (c,h) extracapillary (C), (d,i) cell proliferation (E + C) as well as (e,j) glomerulosclerosis (S). Patient levels of sCD89 with or without IgA were comparatively analyzed by groups with (1) or without (0) histological alterations as defined by the Oxford classification. Statistical significance was determined using a non-parametric Mann-Whitney test. *P< 0.05; **P<0.01; ***P < 0.001.

Figure 3. Increased expression Ki67 proliferation marker on patient glomeruli: Correlation with levels of sCD89 and sCD89-IgA complexes. Eigtheen kidney biopsies of cIgAN were stained with anti-human Ki67 mAb. **(a)** Three representative glomeruli stained with anti-Ki67 mAb of Ki67 + and – biopsies. **(b, c)** sCD89 and sCD89-IgA1 levels were increased in patients expressing Ki67 (p=0.0008 and p=0.041, respectively). **(d)** No differences in Gd-IgA1 levels between Ki67 groups (p=0.566). Statistical significance was determined using a non-parametric Mann-Whitney test. *P< 0.05; ***P < 0.001. **(e,f,g)** Correlation between sCD89 with or without IgA and Gd-IgA1**(g)** with the percentage of Ki67 defined by the number of Ki67+ glomerulus reported to total number of glomeruli.

Figure 4. sCD89-IgA1 and free sCD89 plasma levels are better predictors than proteinuria for endocapillary (E1) /extracapillary (C1/C2) proliferation in cIgAN. (a) Receiver operating

characteristic (ROC) curve of sCD89-IgA and proteinuria (g/mmol) level showing specificity and sensitivity for endocapillary proliferation. **(b)** ROC curve of scD89-IgA and proteinuria (g/mmol) level showing specificity and sensitivity for extracapillary proliferation (C1/C2). **(c)** ROC curve of free sCD89 and proteinuria (g/mmol) level showing specificity and sensitivity for endocapillary proliferation. **(d)** ROC curve of free sCD89 and proteinuria (g/mmol) level showing specificity and sensitivity for extracapillary proliferation. AUC: area under the ROC curve.

Figure 5. Detection of sCD89 in the mesangium of cIgAN patients. (a) For immunostaining of sCD89, representative paraffin kidney sections from a control and a cIgAN patient were incubated with primary mouse mAb anti-human sCD89 biotinylated (clone A3). **(b)** Colocalisation between sCD89 and IgA deposits in the mesangial area in kidney biopsies from three cIgAN patients. Immunostaining of patient's biospies N°1 to 3 are indicated. Immunostaining of sCD89 (1st, Brown), CD34 (2nd, Red) and IgA (3rd, Fluorescent green) in kidney biopsy of cIgAN patients (N° 1 and 2) using Immunohistochemical Automat Bond III (Leica, Germany). Frozen kidney sections were incubated successively with mouse mAb anti-sCD89 (A3) plus Polymer HRP (Leica, Bond; DAB-Brown) followed by mAb anti-CD34 (Polymer Alcaline Phosphatase, Red, Leica, Bond) and third by incubation with FITC conjugated goat anti-human IgA antibody (Southern Biotech). For immunostaining of patient biospy N°3, CD89 was labeled in red and CD34 in brown. * indicates CD89 colocalized with IgA; ** indicates CD89 without IgA. White * indicates CD34 staining.

Figure 6. Molecular and functional analyses of sCD89-IgA and IgA-IgG complexes and Gd-IgA1 from serum of cIgAN (circles) and control (triangles) patients. (a-d) Serum samples were fractionated by HPLC on Sephadex 200 column and fractions analyzed for **(a)** total IgA**, (b)** Gd-IgA1, **(c)** sCD89-IgA, **(d)** IgA-IgG, **(e,f)** Fractions n° 5 to 20 were analyzed by SDS-PAGE followed by Western blot for sCD89 or Gd-IgA1 as indicated. The same quantity of proteins were loaded per well. CD89 protein was detected by immunoblotting using anti-human CD89 (clone A3). Detection of Gd-IgA1 by immunoblotting using a rat mAb anti human Gd-IgA1 (clone KM 55). **(g,h)** proliferation index of human mesangial cells (HMC) in function of the molecular size of each serum fraction. Quiescent HMC were stimulated with different HPLC fractions and proliferation was measured after 24 h. **(h)** Proliferation profiles of five cIgAN patients with active disease (red lines) and five with inactive cIgAN (grey lines) **(g)** Mean proliferation of HMC stimulated with different fractions from different active cIgAN patients (n=5). Statistical significance was determined using a using Anova Kruskal Wallis test **P<0.01.

Figure 7. Molecular characterization of patient-derived free sCD89 and its effect on HMC proliferation. (a) Detection of low molecular weight sCD89 in serum fractions of a representative active cIgAN by ELISA using two anti-CD89 mAbs. **(b)** Molecular analysis of HPLC fractions (N°29, 30 and 31) of three cIgAN patients on 8% gradient SDS-PAGE. After migration, immunoblotting was performed using a biotinylated mouse mAb anti-human CD89 (clone A77) plus streptavidin-HRP as a developing reagent. **(c)** Patient derived free sCD89 induces mesangial cell proliferation in vitro. Quiescent HMC were stimulated with fractions 30 (F30) of 3 different cIgAN versus one control (CTL). The adjunction of rCD71 or rapamycin was done 60 min before the stimulation of the HMC by

fraction 30. Statistical significance was determined using a non-parametric Mann-Whitney test. *P< 0.05

Figure 8. Recombinant sCD89 injection induces HMC proliferation in vitro and glomerular cell proliferation and proteinuria in vivo. (a,b) Recombinant sCD89 induces HMC proliferation that is inhibitable by recombinant CD71 or rapamycin. **(a)** Dose-response effect of rsCD89 on HMC proliferation. Quiescent HMC were stimulated with different concentration of rsCD89 and of □-synuclein as a negative control. **(b)** sCD89 proliferative effect on HMC is dependent on TfR1 and mTOR. The adjunction of rTfR1 or rapamycin added 60 min before the stimulation blocked HMC proliferation induced by rsCD89. **(c,d)** Administration of recombinant sCD89 in α1KI mice increases mesangial cell proliferation. **(c)** 200 μg of recombinant sCD89 or Albumin was injected IV in 6 w-old α1-KI-mice on days 0, 3, 6 and 7. After 2 h of the last injection, mice were sacrified, kidneys were paraffin embedded and colored with hematoxylin and eosin (HES) and were stained with anti-Ki67 mAb. **(d)** proteinuria as well as IgA1, Gd-IgA1, sCD89-IgA1 and free sCD89 were measured in mouse serum and urine (for sCD89). Statistical significance was determined using a non-parametric Mann-Whitney test or T test if the data distribution was normal. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

References

1. Berger J, Hinglais N. [Intercapillary deposits of IgA-IgG]. *J Urol Nephrol (Paris)* 1968; **74:** 694-695.

2. Monteiro RC. Recent advances in the physiopathology of IgA nephropathy. *Nephrol Ther* 2018; **14 Suppl 1:** S1-S8.

3. Coppo R, Gianoglio B, Porcellini MG, *et al*. Frequency of renal diseases and clinical indications for renal biopsy in children (report of the Italian National Registry of Renal Biopsies in Children). Group of Renal Immunopathology of the Italian Society of Pediatric Nephrology and Group of Renal Immunopathology of the Italian Society of Nephrology. *Nephrol Dial Transplant* 1998; **13:** 293-297.

4. Floege J, Amann K. Primary glomerulonephritides. *Lancet* 2016; **387:** 2036-2048.

5. Cambier A, Rabant M, Peuchmaur M, *et al*. Immunosuppressive Treatment in Children With IgA Nephropathy and the Clinical Value of Podocytopathic Features. *Kidney Int Rep* 2018; **3:** 916-925.

6. Cambier A, Gleeson PJ, Flament H, *et al*. New therapeutic perspectives for IgA nephropathy in children. *Pediatr Nephrol* 2020.

7. Robert T, Berthelot L, Cambier A, *et al*. Molecular Insights into the Pathogenesis of IgA Nephropathy. *Trends Mol Med* 2015; **21:** 762-775.

8. Berthoux F, Suzuki H, Thibaudin L, *et al*. Autoantibodies targeting galactose-deficient IgA1 associate with progression of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2012; **23:** 1579-1587.

9. Vuong MT, Hahn-Zoric M, Lundberg S, *et al*. Association of soluble CD89 levels with disease progression but not susceptibility in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2010; **78:** 1281-1287.

10. Berthelot L, Robert T, Vuiblet V, *et al*. Recurrent IgA nephropathy is predicted by altered glycosylated IgA, autoantibodies and soluble CD89 complexes. *Kidney Int* 2015; **88:** 815-822.

11. Hiki Y, Odani H, Takahashi M, *et al*. Mass spectrometry proves under-O-glycosylation of glomerular IgA1 in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2001; **59:** 1077-1085.

12. Allen AC, Bailey EM, Brenchley PE, *et al*. Mesangial IgA1 in IgA nephropathy exhibits aberrant O-glycosylation: observations in three patients. *Kidney Int* 2001; **60:** 969-973.

13. Rizk DV, Saha MK, Hall S, *et al*. Glomerular Immunodeposits of Patients with IgA Nephropathy Are Enriched for IgG Autoantibodies Specific for Galactose-Deficient IgA1. *J Am Soc Nephrol* 2019; **30:** 2017-2026.

14. Moura IC, Centelles MN, Arcos-Fajardo M, *et al*. Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. *J Exp Med* 2001; **194:** 417-425.

15. Lebrón JA, Bennett MJ, Vaughn DE, *et al*. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* 1998; **93:** 111-123.

16. Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, *et al*. The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab* 2008; **7:** 205-214.

17. Radoshitzky SR, Abraham J, Spiropoulou CF, *et al*. Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature* 2007; **446:** 92-96.

18. Coulon S, Dussiot M, Grapton D, *et al*. Polymeric IgA1 controls erythroblast proliferation and accelerates erythropoiesis recovery in anemia. *Nat Med* 2011; **17:** 1456-1465.

19. Matysiak-Budnik T, Moura IC, Arcos-Fajardo M, *et al*. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med* 2008; **205:** 143-154.

20. Lebreton C, Menard S, Abed J, *et al*. Interactions among secretory immunoglobulin A, CD71, and transglutaminase-2 affect permeability of intestinal epithelial cells to gliadin peptides. *Gastroenterology* 2012; **143:** 698-707 e694.

21. Moura IC, Arcos-Fajardo M, Sadaka C, *et al*. Glycosylation and size of IgA1 are essential for interaction with mesangial transferrin receptor in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15:** 622-634.

22. Moura IC, Arcos-Fajardo M, Gdoura A, *et al*. Engagement of transferrin receptor by polymeric IgA1: evidence for a positive feedback loop involving increased receptor expression and mesangial cell proliferation in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16:** 2667-2676.

23. Tamouza H, Chemouny JM, Raskova Kafkova L, *et al*. The IgA1 immune complex-mediated activation of the MAPK/ERK kinase pathway in mesangial cells is associated with glomerular damage in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2012; **82:** 1284-1296.

24. Berthelot L, Papista C, Maciel TT, *et al*. Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors. *J Exp Med* 2012; **209:** 793-806.

25. Monteiro RC, Van De Winkel JG. IgA Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; **21:** 177-204.

26. Lu J, Marjon KD, Marnell LL, *et al*. Recognition and functional activation of the human IgA receptor (FcalphaRI) by C-reactive protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108:** 4974-4979.

27. de Tymowski C, Heming N, Correia MDT, *et al*. CD89 Is a Potent Innate Receptor for Bacteria and Mediates Host Protection from Sepsis. *Cell Rep* 2019; **27:** 762-775 e765.

28. Grossetête B, Launay P, Lehuen A, *et al*. Down-regulation of Fc alpha receptors on blood cells of IgA nephropathy patients: evidence for a negative regulatory role of serum IgA. *Kidney Int* 1998; **53:** 1321-1335.

29. van Zandbergen G, Westerhuis R, Mohamad NK, *et al*. Crosslinking of the human Fc receptor for IgA (FcalphaRI/CD89) triggers FcR gamma-chain-dependent shedding of soluble CD89. *J Immunol* 1999; **163:** 5806-5812.

30. Launay P, Grossetête B, Arcos-Fajardo M, *et al*. Fcalpha receptor (CD89) mediates the development of immunoglobulin A (IgA) nephropathy (Berger's disease). Evidence for pathogenic soluble receptor-Iga complexes in patients and CD89 transgenic mice. *J Exp Med* 2000; **191:** 1999-2009.

31. Peng M, Guo S, Yin N, *et al*. Ectodomain shedding of Fcalpha receptor is mediated by ADAM10 and ADAM17. *Immunology* 2010; **130:** 83-91.

32. Yamasaki K, Suzuki H, Yasutake J, *et al*. Galactose-Deficient IgA1-Specific Antibody Recognizes GalNAc-Modified Unique Epitope on Hinge Region of IgA1. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 2018; **37:** 252-256.

33. Suzuki H, Yasutake J, Makita Y, *et al*. IgA nephropathy and IgA vasculitis with nephritis have a shared feature involving galactose-deficient IgA1-oriented pathogenesis. *Kidney Int* 2018; **93:** 700-705.

34. Zhang W, Bi B, Oldroyd RG, *et al*. Neutrophil lactoferrin release induced by IgA immune complexes differed from that induced by cross-linking of fcalpha receptors (FcalphaR) with a monoclonal antibody, MIP8a. *Clin Exp Immunol* 2000; **121:** 106-111.

35. Monteiro RC, Cooper MD, Kubagawa H. Molecular heterogeneity of Fc alpha receptors detected by receptor-specific monoclonal antibodies. *J Immunol* 1992; **148:** 1764-1770.

36. Kiryluk K, Moldoveanu Z, Sanders JT, *et al*. Aberrant glycosylation of IgA1 is inherited in both pediatric IgA nephropathy and Henoch-Schonlein purpura nephritis. *Kidney Int* 2011; **80:** 79-87.

37. Blanco Quiros A, Blanco C, Alvarez J, *et al*. Anti-immunoglobulin antibodies in children with Schonlein-Henoch syndrome. Absence of serum anti-IgA antibodies. *Eur J Pediatr* 1994; **153:** 103-106.

38. van der Boog PJ, van Zandbergen G, de Fijter JW, *et al*. Fc alpha RI/CD89 circulates in human serum covalently linked to IgA in a polymeric state. *J Immunol* 2002; **168:** 1252-1258.

39. Pillebout E, Jamin A, Ayari H, *et al*. Biomarkers of IgA vasculitis nephritis in children. *PLoS One* 2017; **12:** e0188718.

40. Hastings MC, Afshan S, Sanders JT, *et al*. Serum galactose-deficient IgA1 level is not associated with proteinuria in children with IgA nephropathy. *Int J Nephrol* 2012; **2012:** 315467.

41. Novak J, Raskova Kafkova L, Suzuki H, *et al*. IgA1 immune complexes from pediatric patients with IgA nephropathy activate cultured human mesangial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2011; **26:** 3451-3457.

42. Kaneko Y, Otsuka T, Tsuchida Y, *et al*. Integrin alpha1/beta1 and alpha2/beta1 as a receptor for IgA1 in human glomerular mesangial cells in IgA nephropathy. *Int Immunol* 2012; **24:** 219-232.

43. Molyneux K, Wimbury D, Pawluczyk I, *et al*. beta1,4-galactosyltransferase 1 is a novel receptor for IgA in human mesangial cells. *Kidney Int* 2017; **92:** 1458-1468.

44. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, *et al*. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1773:** 1263-1284.

45. Duchez S, Amin R, Cogné N, *et al*. Premature replacement of mu with alpha immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107:** 3064-3069.

Figure 1

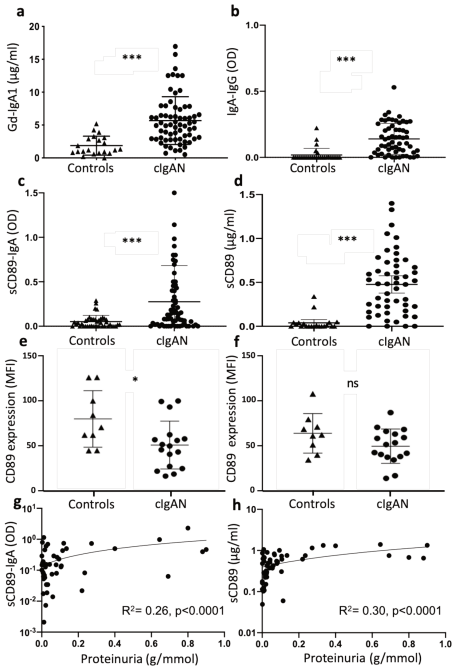
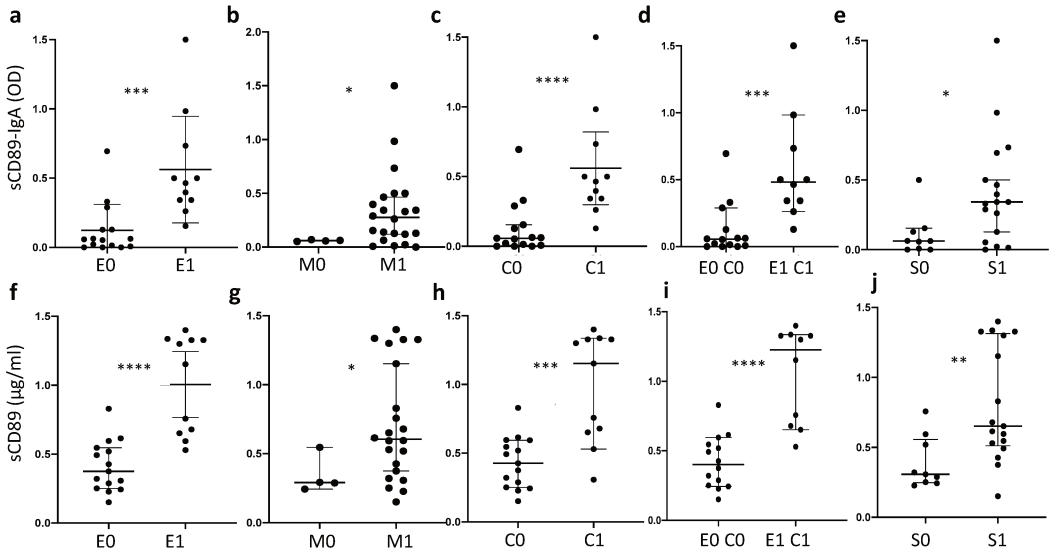


Figure 2



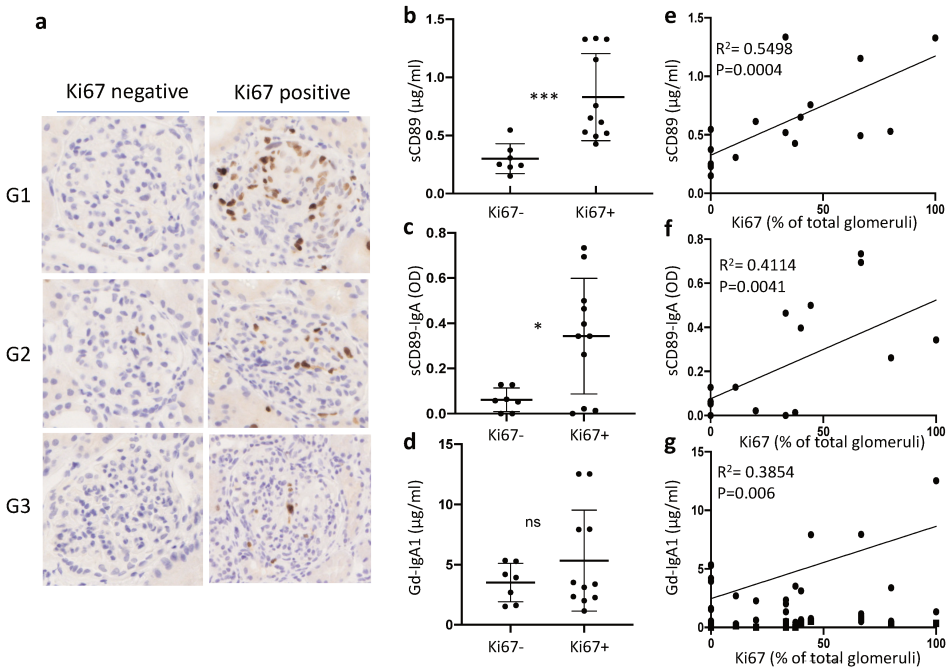


Figure 3

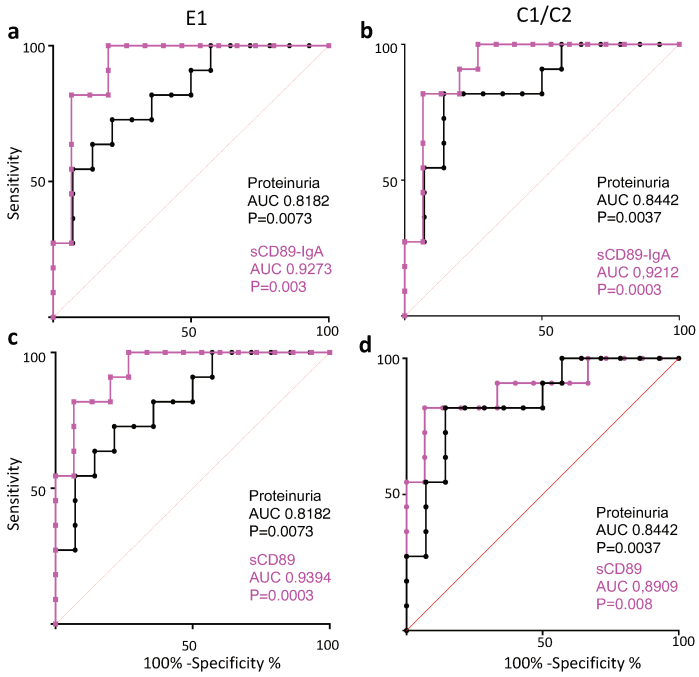


Figure 4

Figure 5

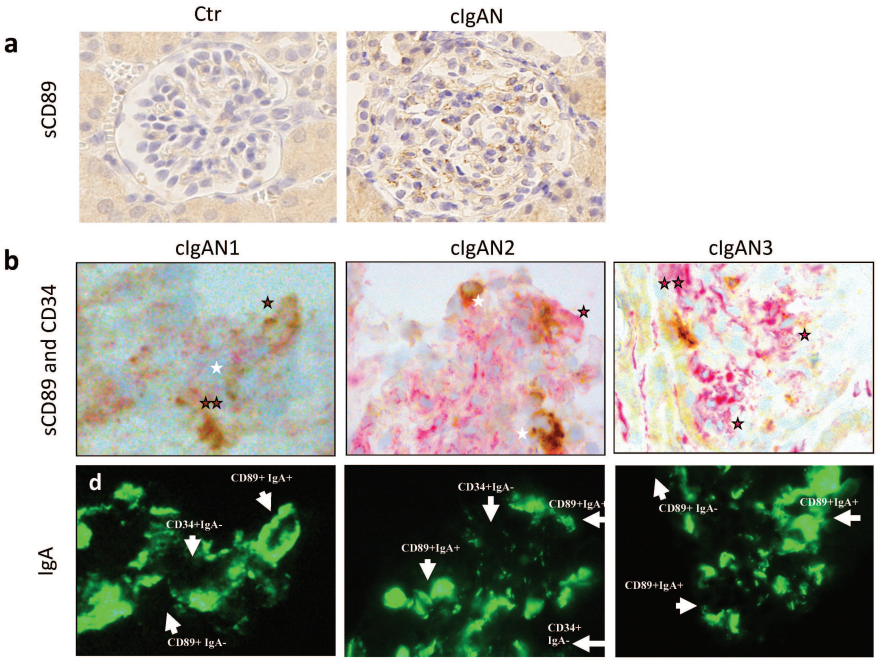


Figure 6

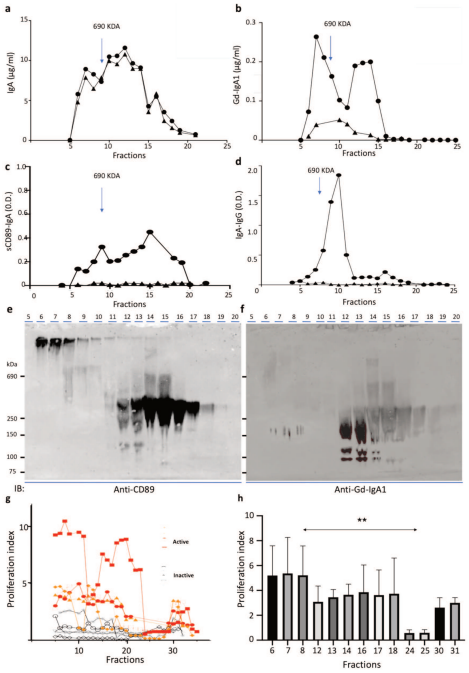


Figure 7

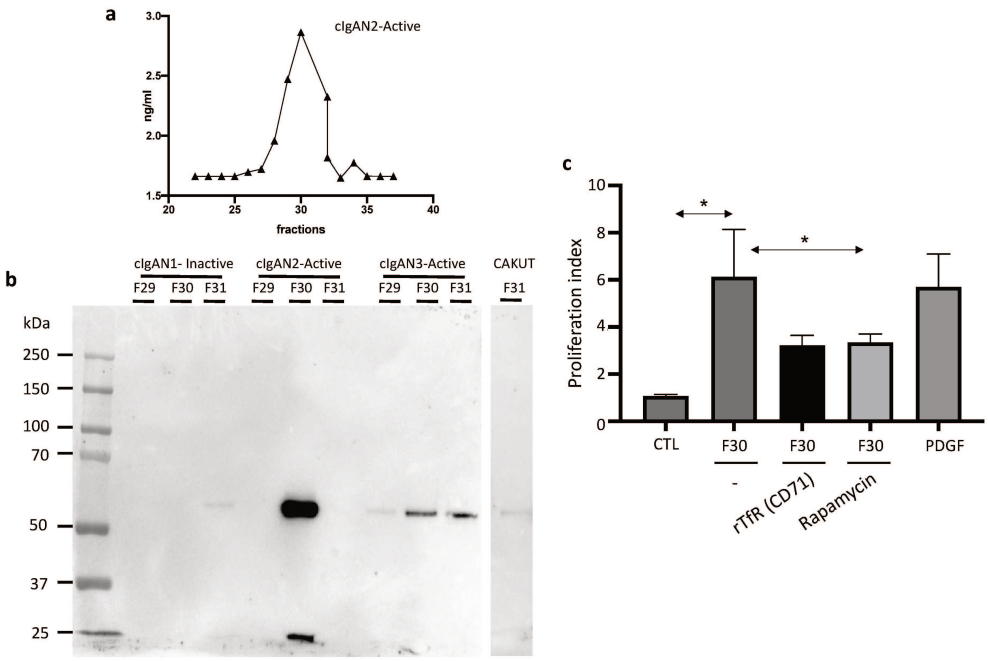


Figure 8

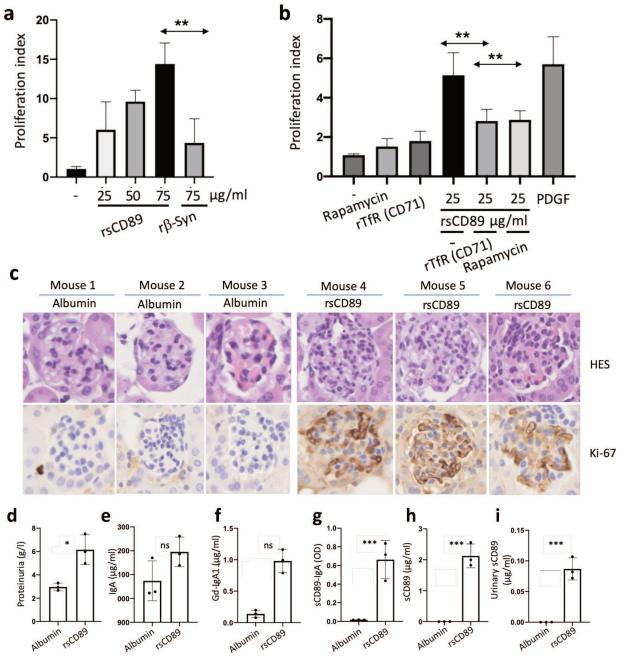


Table 1: Baseline clinical and biological of the entire cohort characteristics

Variable[a]	(n=67)
Age at diagnostic (years)	12.96 ±5
Male	39 (58.2%)
BMI (kg/m^2)	16.95 [15.6-19.63]
Systolic BP (mmHg)	118 [108-125.3]
Diastolic BP (mmHg)	67 [59-74]
eGFR (ml/min/1.73m^2)	93.88 ±29,02
IgA (g/l)	2.06 [1.388-2.778]
Serum albumin (g/l)	34.0 [28.1-38.5]
Proteinuria (g/mmol of creatinine)	0.119 [0.029-0.35]
Hematuria (microscopic or macroscopic)	67 (100%)
Macroscopic hematuria	53 (79.1%)

[a]For quantitative variables with normal distribution, values are expressed as mean±SD, otherwise, median [interquartile ranges]. For qualitative variables, values are expressed as n (%). ACE, angiotensin-converting enzyme; ARB, angiotensin receptor blocker; BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate; IgAN, IgA nephropathy; sCreat, serum creatinine; systolic BP and diastolic BP, systolic and diastolic blood pressure

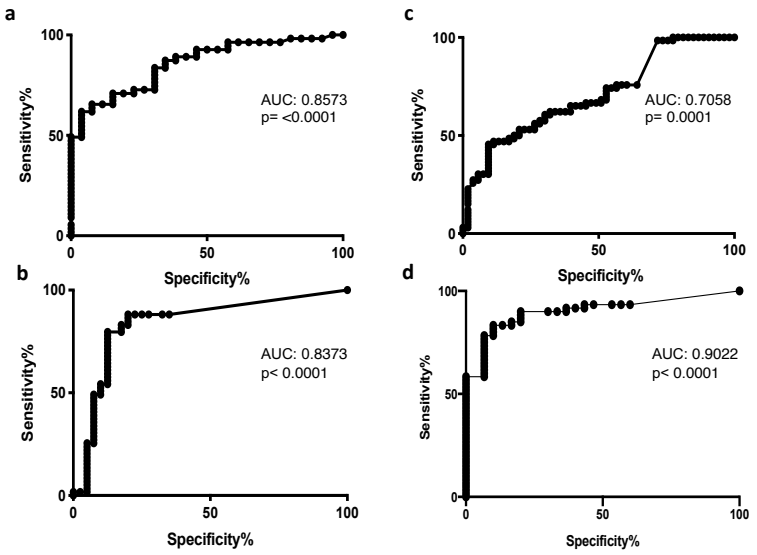
Table 2: Baseline clinical and biological of the prospective cohort characteristics

Variable[a]	(n=26)
Age at diagnostic (years)	10.04 ±3,95
Male	14 (53.8%)
BMI (kg/m^2)	18.06 [16.05-20.21]
eGFR (ml/min/1.73m^2)	92.82 ±32,73
IgA (g/l)	1.70 [1.250-2.550]
Serum albumin (g/l)	34.0 [28.1-38.5]
Proteinuria (g/mmol of creatinine)	0.06300 [0.02463-0.4227]
Hematuria (microscopic or macroscopic)	26 [100%]
Macroscopic hematuria	18 (69.2%)
Pathological findings	
• M1	20; 76.9%
• E1	11; 42.3%
• C1-C2	11; 42.3%
• S1	17; 65.38%
• T1	2; 7.6%

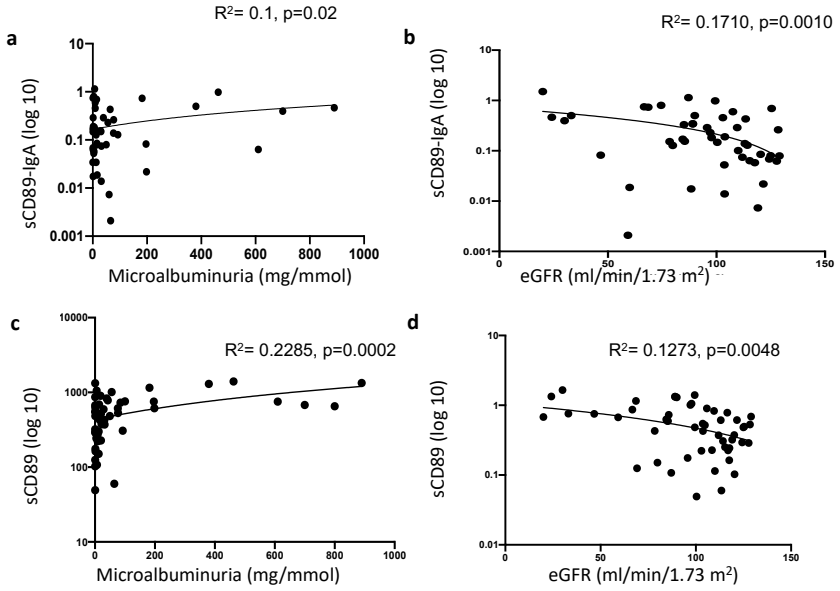
[a]For quantitative variables with normal distribution, values are expressed as mean±SD, otherwise, median [interquartile ranges]. For qualitative variables, values are expressed as n (%). ACE, angiotensin-converting enzyme; ARB, angiotensin receptor blocker; BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate; IgAN, IgA nephropathy; sCreat, serum creatinine; systolic BP and diastolic BP, systolic and diastolic blood pressure

Supplementary Table 1: Baseline clinical, histological and biological features of the active (A 1-A5) and inactive (I 1-I5) cIgAN patients.

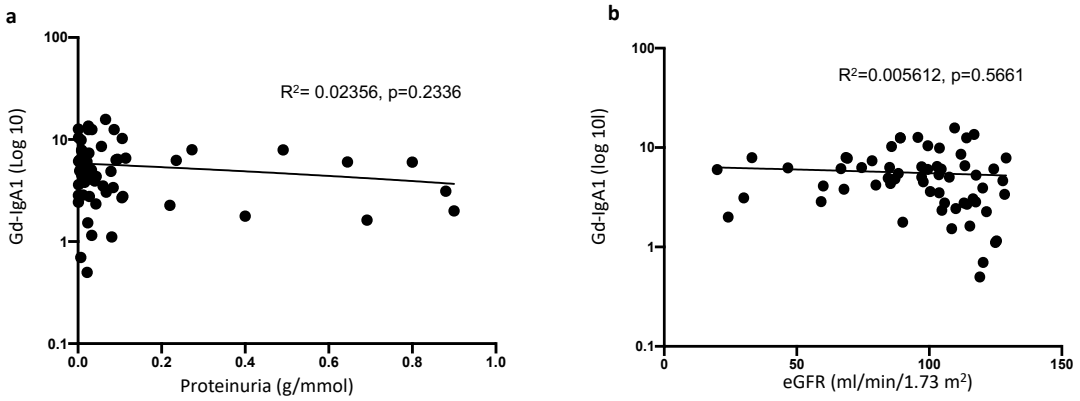
Patient	Age	gender	Oxford classification	Albumine (g/l)	Proteinuria (g/mmol)	eGFR (ml/min/1,73m)	Hematuria
A1	12	F	M0, E1, S1, T0, C1	30	0.11	113.44	10^6
A2	13	F	M1, E1, S1, T1, C1	25	0.27	68.53	5×10^5
A3	7	M	M1, E1, S1, T1, C2	14,2	0.9	24.12	10^6
A4	16	M	M0, E1, S1, T0, C1	25	0.8	20	2×10^5
A5	15	F	M1, E1, S1, T0, C0	27	0.32	65.66	8×10^5
I1	6	M	M0, E0, S0, T0, C0	40	0.06	120.34	10^5
I2	18	M	M1, E0, S0, T0, C0	46	0.08	69.12	10^4
I3	5	F	M1, E0, S0, T0, C0	39	0.021	119.08	1.5×10^4
I4	12	M	M1, E0, S0, T0, C0	37	0.105	114.21	2×10^5
I5	9	M	M0, E0, S0, T0, C0	30	0.009	127.71	10^5



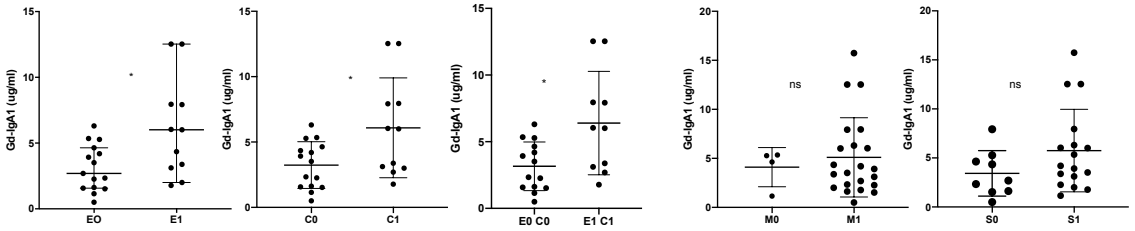
Supplementary Figure S1: Receiver operating characteristic (ROC) curve of Gd-IgA1 (a), IgA-IgG (b), sCD89-IgA (c) and free sCD89 (d) showing specificity and sensitivity for cIgAN diagnosis:. AUC, area under the ROC curve.



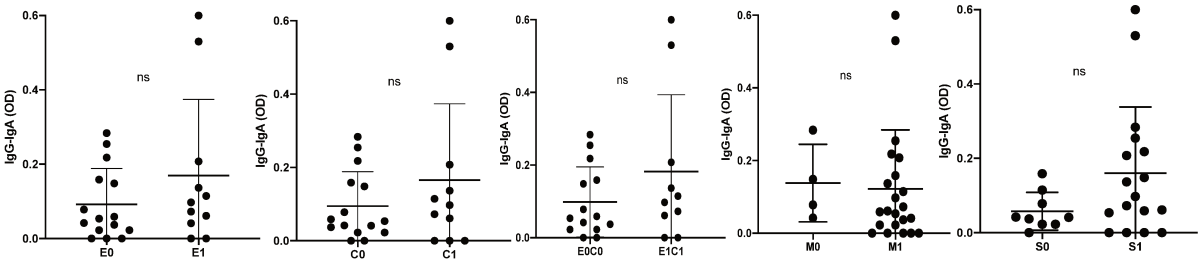
Supplementary Figure S2. sCD89-IgA complexes (a,b) and free sCD89 (c,d) plasma levels were strongly linked to microalbuminuria (g/mmol creatininuria) and to eGFR.



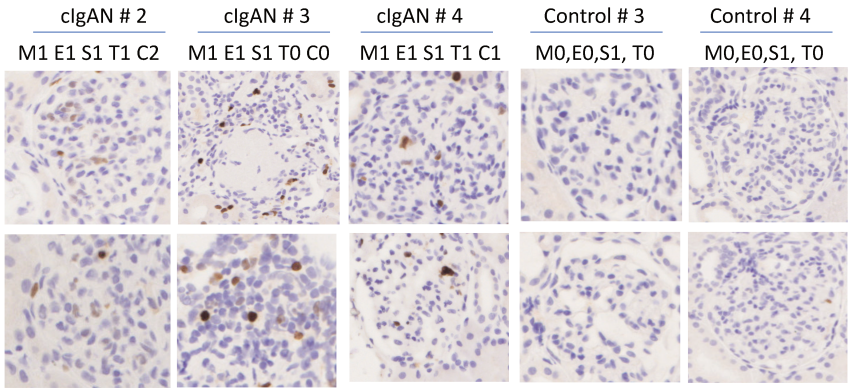
Supplementary Figure S3. Absence of correlation between Gd-IgA1 and proteinuria (**a**) or eGFR (**b**).



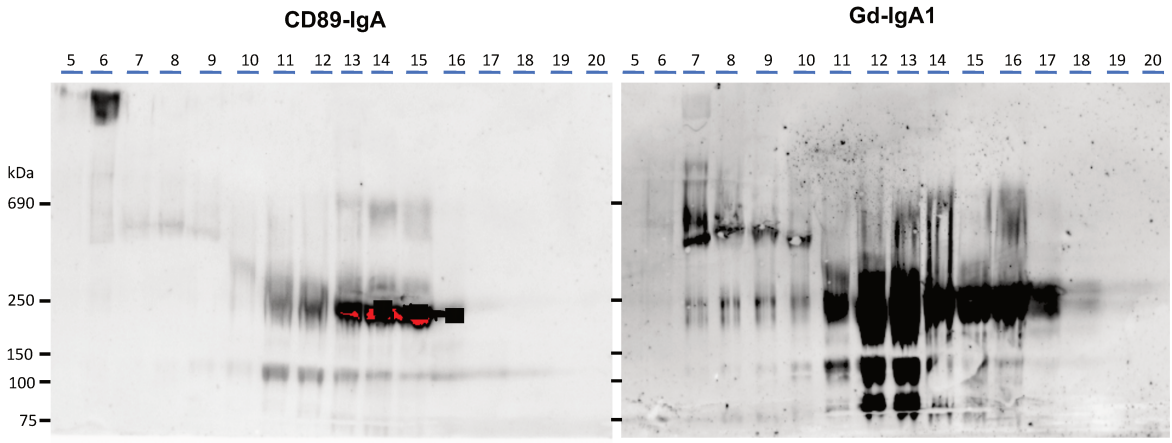
Supplementary Figure S4. Level of Gd-IgA1 weakly correlated with endocapillary and extracapillary proliferation in cIgAN. Histological alterations were indicated as endocapillary proliferation (E); extracapillary proliferation (C), mesangial proliferation (M); glomerulosclerosis (S) . 0 for absence and 1 for presence as defined by the Oxford classification. * P<0.05



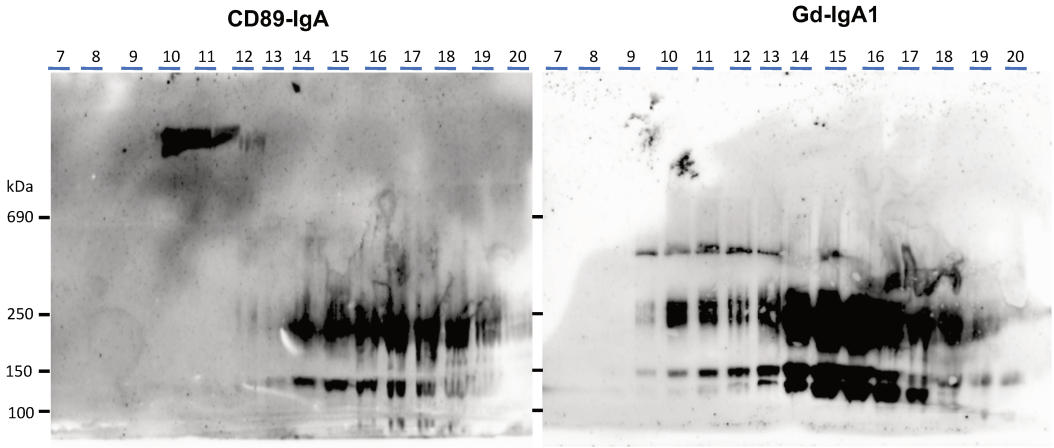
Supplementary Figure S5. Levels of IgG-IgA complexes failed to correlate with mesangial, endocapillary, extracapillary proliferation and glomerulosclerosis.



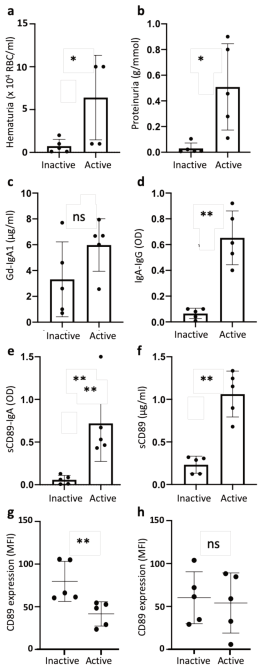
Supplementary Figure S6: Ki67 immunostaining of additonal kidney biopsies of three representatives cIgAN patients and two controls (two glomeruli for each patient)



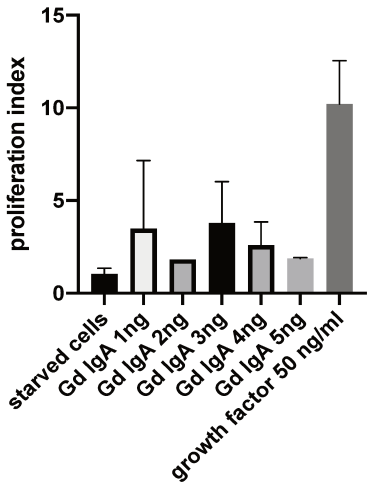
Supplementary Figure S7: Detection of CD89 and Gd-IgA1 in different HPLC fractions of cIgAN patient number 2. CD89 and Gd-IgA1 were detected by immunoblotting using either a mouse anti-human CD89 (A3) plus a cross absorbed goat anti-mouse Ig-HRP or a rat mAb anti-human Gd-IgA1 (KM55) plus cross absorbed goat anti-rat Ig-HRP as developing reagent. The same amount of fractions was loaded.



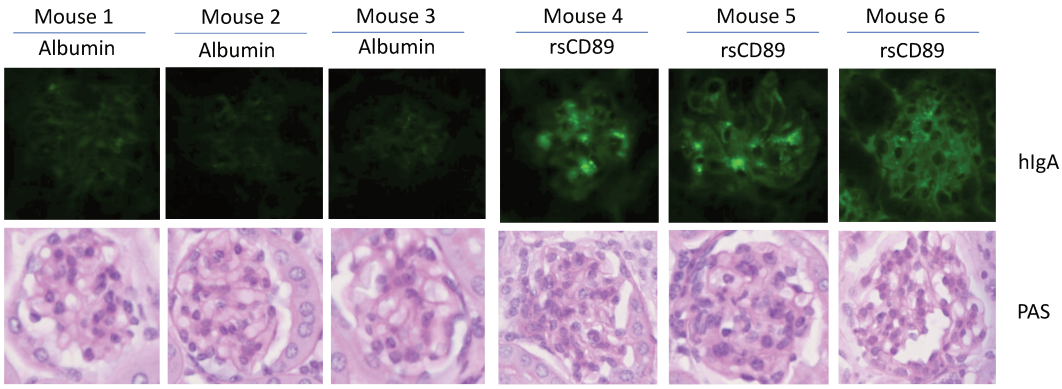
Supplementary Figure S8: Detection of CD89 and Gd-IgA1 in different HPLC fractions of cIgAN patient number 3. CD89 and Gd-IgA1 were detected by immunoblotting using either a mouse anti-human CD89 (A3) plus a cross absorbed goat anti-mouse Ig-HRP or a rat mAb anti-human Gd-IgA1 (KM55) plus cross absorbed goat anti-rat Ig-HRP as developing reagent. The same amount of fractions was loaded.



Supplementary Figure S9: Comparative analysis of biomarkers in plasma from active versus inactive cIgAN patients. Levels of hematuria (**a**), proteinuria (**b**), Gd-IgA1 (**c**), IgA-immune complexes : IgA-IgG (**d**), sCD89-IgA (**e**), free sCD89 (**f**), CD89 surface expression on blood monocytes (**g**) or neutrophils (**h**). Statistical significance was determined using a non-parametric Mann-Whitney test. *P< 0.05; **P<0.01;



Supplementary Figure S10: Quiescent HMC were stimulated with different concentration of Gd-IgA1. Growth factor = PDGF



Supplementary Figure S11: Immunostaining of mouse kidneys with anti-human IgA-FITC.

2. Article 2 : L'évolution des complexes immuns chez deux enfants atteints de néphropathie à IgA sévère traité. L'intérêt de l'immunoadsorption dans la N-IgA de l'enfant rapidement progressive.

La néphropathie à IgA (N-IgA) est l'une des glomérulonéphrites primaires les plus courantes avec une évolution possible vers l'insuffisance rénale terminale. La N-IgA est une maladie auto-immune impliquant des facteurs clés qui sont les IgA1 hypogalactosylées (Gd-IgA1), les auto-anticorps anti-IgA (IgG-IgA) et le(s) récepteur(s) soluble(s) CD89 IgA Fc, lié(s) à l'IgA (sCD89-IgA) ou libre, le CD89 soluble (s)CD89 mis en évidence récemment. Ces complexes immuns ont été décrits comme des biomarqueurs potentiels de progression de la maladie dans la N-IgA de l'adulte mais leur évolution dans le temps sous traitement immunosuppresseur reste inconnue.

Dans cette étude, nous avons rapporté de manière prospective l'évolution des complexes immuns IgA (sD89-IgA, IgG-IgA) sCD89 libre et les Gd-IgA1 en lien avec les caractéristiques cliniques et histologiques chez 2 enfants ayant une N-IgA sévère traitée par immunosuppresseurs et ImmunoAdsorption (IA) pour l'un d'entre eux.

Chez le patient 1, nous avons signalé une diminution des complexes sCD89-IgA, IgG-IgA et du sCD89 libre en lien avec la diminution de la protéinurie sans modification de la fonction rénale alors que le niveau de Gd-IgA1 restait quant à lui stable au cours du temps. Le patient 1 a été traité par 10 injections intramusculaires mensuelles de stéroïdes Kenacort et tacrolimus. Une rechute de N-IgA a induit secondairement une augmentation de la protéinurie de manière cohérente une augmentation des 3 biomarqueurs sCD89-IgA, IgG-IgA et sCD89.

Chez le patient 2, en raison d'une N-IgA rapidement progressive avec des croissants dans plus de 90% des glomérules, le patient a reçu un traitement immunosuppresseur intense avec réalisation d'un programme d'IA. Au cours des IA, la protéinurie diminuait rapidement, ainsi que les complexes immuns sCD89-IgA, IgG-IgA, sCD89 et les taux de Gd-IgA1. Après l'espacement des IA, la protéinurie ré-augmentait, ainsi que les complexes IgG-IgA, tandis que les complexes sCD89-IgA et le sCD89 restaient faibles. Une nouvelle intensification du programme d'IA avec l'ajout de cyclophosphamide améliorait à nouveau la protéinurie et la diminution des complexes IgG-IgA. Une deuxième biopsie a été réalisée à la fin du traitement montrant une réduction de la prolifération extracapillaire à 5,7% avec seulement 8,5% de glomérulosclérose.

Les complexes immuns sCD89-IgA, IgG-IgA et le sCD89 dans la N-IgA de l'enfant sont corrélés avec les caractéristiques cliniques et les lésions de prolifération intra-rénale. Ils pourraient représenter un outil utile pour éviter les biopsies rénales répétées et suivre la réponse aux traitements.

Specific immune biomarkers monitoring in two children with severe IgA Nephropathy and successful therapy with Immunoadsorption in a rapidly progressive case

Alexandra Cambier[1,2], Claire Dossier [2], Anne Couderc,[2] Veronique Baudouin [2], Anne Maisin [2], Michel Peuchmaur[2], Theresa Kwon[2], Georges Deschênes[1,2], Patrick J. Gleeson[1] and Renato C. Monteiro[1]

[1] Université de Paris, Paris, France; INSERM U1149; CNRS ERL8252; Centre de recherche sur l'inflammation (CRI); Inflamex Laboratory of Excellence, Paris, France;
[2] Service de Néphrologie Pédiatrique, Hôpital Robert-Debré, APHP, Paris, France;
[3]Service de Pathologie, Hôpital Universitaire Necker, APHP, Paris, France;
[4] Service d'Anatomo-pathologie, Hôpital Robert-Debré, APHP, Paris, France;
[6] Service d'Immunologie, DHU Fire, Hôpital Bichat-Claude Bernard, APHP, Paris, France.

Abstract

Children IgA nephropathy (cIgAN) is one of the most common primary glomerulonephritis with a possible evolution to end stage renal disease. There is a need for specific prognostic factor identification. IgAN is an autoimmune disease involving key factors which are galactose-deficient IgA1 (Gd-IgA1), anti-IgA autoantibodies and soluble (s)CD89 IgA Fc receptor. These molecules and immune complexes have been described as potential biomarkers of disease progression in adult IgAN but their evolution in time under immunosuppressive treatment remain unknown.

Here, we reported a prospective study of two proliferative cIgAN patients by sequentially biomonitoring immune IgA complexes (sCD89-IgA, IgG-IgA), sCD89 and Gd-IgA1 and correlating with their clinical and histological outcome after treatment. After patient 1 treatment, a decrease in sCD89-IgA, IgG-IgA and free sCD89 was linked to decrease in proteinuria whereas eGFR and Gd-IgA1 level of remained stable. The patient 1 received 10 monthly intramuscular steroid injections of Kenacort and tacrolimus. At the end, a relapse induced an increase of proteinuria consistently with an increase of the three biomarkers.

Patient 2 displayed a rapidly progressive IgAN with crescents in more than 90% of glomeruli and received intense immunosuppression treatment associated with ImmunoAdsorption (IA) approach. During IA, proteinuria decreased rapidly, as well as levels of CD89-IgA, IgG-IgA, sCD89 and Gd-IgA1 biomarkers. After discontinuation of IA, proteinuria increased as well as IgG-IgA complexes whereas sCD89-IgA and sCD89 remained low. Further re-intensification of IA and addition of cyclophosphamide at that time improved proteinuria again and the decreased of IgG-IgA. A second biopsy was performed showing a reduction of extracapillary proliferation to 5.7% of glomeruli and only 8.5% of Glomerulsoclerosis.

In conclusion, sequential biomonitoring with Gd-IgA1, IgA-immune complexes and sCD89 in cIgAN revealed to be valuable by correlating with clinical features and glomerular proliferative lesions in cIgAN. This could represent a useful approach to evaluate kidney injury without the need of repeated kidney biopsies.

Introduction

Children IgA nephropathy (cIgAN) is one of the most common primary glomerular disease in children and adolescents worldwide.(1) The diagnosis relies on kidney biopsy with the identification of IgA deposits in mesangium.(2) IgAN can have different clinical presentations, from isolated hematuria to acute nephritis with rapid loss of renal function. Prognostic factors such as proteinuria, eGFR, HTA, oxford classification have been described in cIgAN but are imperfect for close monitoring of the disease and there is a need for specific biomarkers.

IgAN is an autoimmune disease involving 3 key factors which are galactose-deficient IgA1 (Gd- IgA1), anti-IgA autoantibodies and soluble (s)CD89 IgA Fc receptor (3). CD89 was first identified as a major factor, with a decreased expression on the surface of blood monocytes and neutrophils of IgAN patients.(4) Soluble CD89 was generated following shedding on patient cells by a protease- mediated cleavage, the binding of IgA to surface CD89 leading to the release of sCD89-IgA and also sCD89. (5-7) These immune IgA-sCD89 complexes have been described as potential biomarkers of disease progression in adult IgAN (8, 9) and post-transplant recurrence.(10) Nevertheless, the timeline evolution of these biomarkers and under immunosuppressive treatment remains unknown. Since children have a long life expectancy, optimizing therapy is a necessity in cIgAN, where there is no international consensus especially in more severe forms.(11) Cumulative published cases showed that renal survival in crescentic IgA nephropathy is only 50% at 1 year and 20% at 5 years.(12) ImmunoAdsorptions (IA) have been successfully used to treat a variety of glomerulonephritis. (13) Since IgAN is an antibody-mediated disease, IA could be an appropriate treatment option for proliferative IgAN.

Here, we report for the first time the biomonitoring of IgA immune complexes (sCD89-IgA, IgG-IgA) as well as Gd-IgA1 and free sCD89 in 2 proliferative cIgAN and their clinical and histological outcome, under IA in one patient.

Results

Patient 1

A 13-year-old girl born from unrelated parents, originated from Comoros and with no family history of kidney disease, presented in February 2015 with asthenia and macroscopic hematuria. She had normal blood pressure, normal renal function (eGFR 100 ml/min/1.73m^2) and nephrotic syndrome with hypoalbuminemia (17 g/l) with a proteinuria (0.21 g/l, uP/creat ratio 0,2g/mmol).

A renal biopsy was performed because of nephrotic syndrome and showed mesangial IgA deposits with Oxford classification M1, E1, S1, T1, C1. She received 3 pulses of methylprednisolone (1 g/1.73m^2), oral prednisone for 18 months and mycophenolate mofetil (1000 mg/m^2/d) for 12 months. During follow-up, she presented iterative relapses of nephrotic syndrome and gross hematuria. A total of four kidney biopsies were performed and methylprednisolone pulses and oral prednisone were repeated after each biopsy because of the persistence of proliferation lesions.

At last relapse with nephritic syndrome in 2017, kidney biopsy showed again proliferation with Oxford classification M1, E1, S1, T1, C0. Because of oral steroids inobservance, she was treated with 10 monthly intramuscular steroid injections (Kenacort 40 mg for the first 3 months, then 20 mg monthly)

and tacrolimus (0.2 mg/kg), with a monthly monitoring of proteinuria, serum albumin and eGFR and also Gd-IgA1 and immune IgA complexes.

During follow-up (from 20/12/2017 to 07/09/2018), proteinuria decreased from nephrotic range to <0.02g/mmol and eGFR remained normal. In addition, we reported a decrease in sCD89-IgA (from 0.67 to 0.43 OD p=0.007) IgG-IgA (from 1.23 to 0.59 OD p=0.0079) and sCD89 (from 0.4 µg/ml to 0.11 µg/ml, p=0.0079), while the level of Gd-IgA1 remained stable (0.52 µg/ml to 0.54 µg/dl p=0.91). **(Figure 1)**

A relapse occurred in September 2018 with an increase of proteinuria from 0.007 to 0.08 g/mmol of CrU, consistently with an increase of the 3 biomarkers sCD89-IgA (0.43 to 0.653 OD), IgG-IgA (0.59 to 0.70 OD) and sCD89 (0.11 to 0.40 µg/ml). With a reintroduction of oral steroid, the proteinuria decreased again.

At last-follow-up, this 18-year-old IgAN patient has normal eGFR.

In this first observation, we report that immunosuppressive treatment induced a decrease of both proteinuria and the immune complexes (sCD89-IgA, IgG-IgA) and free sCD89 but not Gd-IgA1.

Patient 2

The second case was an 8-year-old Caucasian boy with a rapidly progressive IgAN. He presented first with gross hematuria, hypertension, acute renal failure (serum creatinine 91 umol/l, eGFR 30 ml/min/1.73m^2) and nephrotic syndrome (serum albumin 22 g/l and urine Protein/creatinine ratio 0.73 g/mmol).

Complement was normal. Antinuclear antibody and antineutrophil cytoplasmic antibody were negative. Kidney biopsy showed mesangial IgA deposits and crescents in more than 90% of glomeruli with Oxford classification M1, E1, S1, T1, C2. Because of severe crescentic nephropathy, he received an aggressive induction therapy with 3 pulses of methylprednisolone (1 g/1,73 m^2), eculizumab (C5 inhibitor 600 mg) during 6 weeks, 3 pulses of cyclophosphamide (600 mg/m^2/15d) and a program of ImmunoAdsorptions (IA) on a transient jugular apheresis catheter. He underwent a total of 28 IA, daily the first week (11), then 3 per week during 70 days in total. Maintenance therapy included an infusion of rituximab (375 mg/m^2) at the end of the IA program with a B-cell depletion of 4 months and oral prednisone for 18 months.

At 5 months' follow-up, serum creatinine was 52 µmol/l (eGFR= 75 ml/min/1.73m^2) and proteinuria had decreased from 0.73 g/mmol to 0.17 g/mmol with no severe adverse event of treatments, and no infections. More precisely, during IA, proteinuria decreased rapidly from 0.73 to 0.15 g/mmol, as well as CD89- IgA (from 0.33 to 0.015 OD), IgG-IgA (from 0.62 to 0) immune complexes, and free sCD89 (from 0.33 to 0.01 µg/ml). In addition, Gd-IgA1 also decreased, by removal of patient's IgA. After discontinuation of IA, proteinuria increased from 0.15 g/mmol to 0.68 g/mmol and serum creatinine from 63 to 70 µmol/l) as well as IgG-IgA complexes whereas sCD89-IgA and sCD89 remained low. **(Figure 2)** Further re-intensification of IA and addition of cyclophosphamide at that time improved proteinuria again and the decreased of IgG-IgA. At month 5, a second biopsy was performed showing a reduction of extracapillary proliferation to 5.7% of glomeruli and only 8.5% of Glomerulsoclerosis.

Endocapillary proliferation was still presented but less severe. Oxford classification was M1, E1, S1, T0, C1. (Figure 3). Between onset and last follow up, we found a significative reduction of the level of Gd-IgA1 ($p=0.014$), IgG-IgA ($p=0.0002$), sCD89-IgA ($p<0.0001$) and sCD89 ($p=0.0002$). **(Figure 3)**

To resume, this intense immunosuppressive procedure allowed a reduction of proteinuria, serum creatinine, and histological inflammation and limited the genesis of glomerulosclerosis. Additionally, IgA immune complexes (sCD89-IgA1, IgG-IgA), Gd-IgA1 and sCD89 were significantly lowered at the end of the treatment.

Discussion

To our knowledge, this is the first report of the evolution of IgA immune complexes (sCD89-IgA and IgG-IgA1), free sCD89 and Gd-IgA1 during treatment of childhood IgAN.

In first case, proteinuria turned negative with IM steroids and tacrolimus. In adults, the efficiency of steroids has been controverted. (14) We recently supported this treatment in a cohort of 82 cIgAN with an improvement of eGFR and a reduction of proteinuria under steroids. (15)

Furthermore, we report here that the decrease of proteinuria was accompanied by a significant decrease of IgA immune complexes (sCD89-IgA and IgG-IgA1) and sCD89, whereas the level of Gd- IgA1 was not influenced by immunosuppression. It was already reported that the level of Gd-IgA1 was stable in time (16) but there was no previous report for the other markers.

It has been suggested that circulating IgA immune complexes could be biomarkers in IgA vasculitis nephritis.(17) Recently, we have reported the similar results in a cohort of 67 patients with cIgAN, with a particular interest in sCD89-IgA and sCD89 that were linked to proteinuria and histologic inflammation M1,E1,C1. (submitted) In the first case report, IgA immune complexes and sCD89 seemed correlated to proteinuria. In addition, the diminution of these biomarkers was also associated to the histological improvement of proliferative lesions in patient 2. Though, monitoring of these immune complexes could represent a valuable biomarker to follow individual outcome under treatment and avoid repeated kidney biopsies.

By studying a second case, we report a favorable outcome with a combination of IA and an intensive immunosuppressive procedure. Plasma exchange have already been successfully reported in progressive cIgAN (18) but not IA so far. Coppo and al reported the effect of plasma exchange in 5 patients with progressive IgA, concluding that this treatment would benefit for cases with acute nephritic syndrome of recent onset without sclerotic lesions. (18) Since IgAN is an auto immune disease, it seems relevant to clear circulating immune complexes. IA is also more tolerated than plasmatic exchange with no need of plasmatic substitution. In this second case, IA showed clinical efficiency on proteinuria, renal function and on histological inflammation with only 10% of fibrosis. We observed also the capacity of IA to remove not only IgA immune complexes (IgG-IgA and sCD89-IgA), but also free sCD89 and Gd-IgA1.The polyclonal sheep antibodies against human IgG coupled to Sepharose (Therasorb adsorbers) is able to remove 50% of IgA in serum.(19) IgA serum level at onset before any IA treatment was 1.36 g/l. With daily IA, IgA serum was 0.35 g/l at the beginning of IA treatment and 0.5 g/l at the end of each IA. Interestingly, free sCD89 was also reduced with IA. One explanation could be that because IgA is removed the shedding of CD89 is not engaged anymore, leading to a clearance of remaining already cleaved sCD89. This therapeutic strategy could have an interest if initiated very early, like reported here. The early discontinuation/spacing of IA lead to an increase of proteinuria, suggesting that IA should not

be discontinued too early. The relapse of proteinuria was followed by the increase of IgG-IgA complexes suggesting an escapement of the clearance of IgG-IgA complexes, whereas the other immune complexes remained low. With the re-intensification of IA and the addition of cyclophosphamide, proteinuria and IgG-IgA were again controlled. In addition, as a maintenance treatment following IA, the patient received a B-cell depletion with rituximab. Although rituximab has failed in reducing serum levels of Gd-IgA1 and IgG–IgA1 in Lafayette et al's study (20), there is no data on the effect of rituximab on sCD89-IgA, and in fact IgA immune complexes (IgG-IgA, sCD89-IgA), sCD89 and Gd- IgA1 remained low at the end of the treatment procedure.

Complement activation is involved in the pathogenesis of IgAN (20) and case reports have shown a benefit of eculizumab at the early phase of rapidly progressive cIgAN (21, 22). Based on these observations, eculizumab was early initiated in the second patient, and reinfused after each IA. The complement pathway blockade was effective with CH50<10%, but due to a multiple approach, the benefit of eculizumab is not evaluable here.

In conclusion, these two observations revealed that evolution of IgA complexes immunes and sCD89 in cIgAN is correlated with clinical features and proliferative lesions. We also reported a benefit of IA combined with immunosuppressive treatment in a case of rapidly progressive IgA nephropathy with extensive crescent formations.

Material and methods

This study was approved by the ethics committee of Saint-Antoine Hospital in Paris, France. Diagnosis of IgAN was based on immunofluorescence microscopy findings showing mesangial deposition of IgA as the predominant or co-dominant immunoglobulin. Complement was normal. Anti-nuclear antibody and anti-neutrophil cytoplasmic antibody were negative. The following clinical, biological, histological parameters were collected for each patient at different time of the treatment with the measurement of immune complexes. These 2 patients were treated at least by RASB during all the follow up.

Gd-IgA1, sCD89 and IgA complex measurements

For the Gd-IgA1 levels measurement, ELISA was performed with anti-Gd-IgA1 KM55 Assay Kit (IBL, Amsterdam, NL) according to manufacturer instructions using 1/200 plasma dilution. For the measurement of free, unbound sCD89, MIP8a anti-human CD89 (1/500, Thermo Fisher) was used for coating overnight at 4 ˚C, followed by blocking for 4 h at 37 ˚C and overnight incubation with 1/5 dilution of plasma at 4°C. Revelation was performed using biotinylated mAb anti-sCD89 (5 µg/L, clone A77) (23) with secondary streptavidin HRP plus chromogen (TMB) solution. The optic density was read at 450 nm. For the IgA immune complex measurements, ELISA was performed as follows: coating with goat anti-IgA cross-adsorbed antibody (1/500 in PBS, Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA) or with anti-sCD89 (5 µg/mL, clone A3) (23) for 4 h at 37 ˚C, followed by blocking for 4 h at 37 C˚ .

Plasma samples (1/5 dilution) were incubated overnight at 1/10 at 4°C. Revelation was performed using an anti-IgG Ab (1/5000, Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA) coupled to HRP or an anti-IgA antibody (1/2000, BD Biosciences Le Pont de Claix, France) coupled with alkaline phosphatase, respectively for IgA-IgG or sCD89-IgA complex detection. The substrates were TMB solution or Sigma fast P-nitrophenyl phosphate tablets (Sigma-Aldrich). The optic density was read at 405nm for AP or 450 nm for HRP.

Protocol of ImmunoAdsorbption (IA)

Immunoglobulin immunoadsorption was performed using the Life 18 Therapeutic Apheresis Unit (Miltenyi Biotect, Germany) and Therasorb adsorbers (Miltenyi Biotect, Germany) made of antihuman Ig antibody covalently coupled to Sepharose CL-4B.(24) The procedure aimed to remove circulating IgG, IgM, IgA, circulating immune complexes and immunoglobulin fragments (mainly light chains k and j). A session consisted of a number of cycles of adsorption that allowed treating a blood volume at least 2.5-fold the individual patient blood volume. One cycle was expected to remove 0.5 g of IgG. IgA was removed also more than 50%. A dose of 0.5 g/cycle of polyclonal intravenous immunoglobulin was administered after each IA session in order to compensate Ig removal. Treatment with IA was administered through a central vein catheter.

Figures legends

Figure 1: Evolution of immune complexes in Patient 1. Evolution of Gd-IgA1, sCD89 and IgA immune complexes (sCD89-IgA, IgG-IgA) with the evolution of microalbuminuria in 16 years-old cIgAN treated monthly with Kentacort IM and prograf. Renal function was stable during this report. Statistical significance was determined using a non-parametric Mann-Whitney test. *P< 0.05; **P<0.01; ***P < 0.001.

Figure 2: Evolution of immune complexes in Patient 2 under IA. Evolution of Gd-IgA1, sCD89 and IgA immune complexes (sCD89-IgA, IgG-IgA) with the evolution of creatinine and proteinuria in 8 years old cIgAN rapidly progressive treated with immunoadsorption (IA) and an intense immunosuppression treatment (methylprednisolone, eculizumab, cyclophosphamide, Rituximab and steroid)

Figure 3: Evolution of clinical, immunological and histological characteristics in patient 2. Evolution of Gd-IgA1, sCD89 and IgA immune complexes (sCD89-IgA, IgG-IgA) with the evolution of creatinine, cystatine C, Oxford classification and proteinuria in Patient 2. Mann-Whitney test. *P< 0.05; **P<0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001.

References

1. Floege J, Amann K. Primary glomerulonephritides. Lancet. 2016;387(10032):2036-48.
2. Berger J, Hinglais N. [Intercapillary deposits of IgA-IgG]. Journal d'urologie et de nephrologie. 1968;74(9):694-5.
3. Robert T, Berthelot L, Cambier A, Rondeau E, Monteiro RC. Molecular Insights into the Pathogenesis of IgA Nephropathy. Trends Mol Med. 2015;21(12):762-75.
4. Grossetête B, Launay P, Lehuen A, Jungers P, Bach JF, Monteiro RC. Down-regulation of Fc alpha receptors on blood cells of IgA nephropathy patients: evidence for a negative regulatory role of serum IgA. Kidney Int. 1998;53(5):1321-35.
5. van Zandbergen G, Westerhuis R, Mohamad NK, van De Winkel JG, Daha MR, van Kooten C. Crosslinking of the human Fc receptor for IgA (FcalphaRI/CD89) triggers FcR gamma-chain-dependent shedding of soluble CD89. J Immunol. 1999;163(11):5806-12.
6. Launay P, Grossetête B, Arcos-Fajardo M, Gaudin E, Torres SP, Beaudoin L, et al. Fcalpha receptor (CD89) mediates the development of immunoglobulin A (IgA) nephropathy (Berger's disease). Evidence for pathogenic soluble receptor-Iga complexes in patients and CD89 transgenic mice. J Exp Med. 2000;191(11):1999-2009.

7. Peng M, Guo S, Yin N, Xue J, Shen L, Zhao Q, et al. Ectodomain shedding of Fcalpha receptor is mediated by ADAM10 and ADAM17. Immunology. 2010;130(1):83-91.
8. Berthoux F, Suzuki H, Thibaudin L, Yanagawa H, Maillard N, Mariat C, et al. Autoantibodies targeting galactose deficient IgA1 associate with progression of IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2012;23(9):1579-87.
9. Vuong MT, Hahn-Zoric M, Lundberg S, Gunnarsson I, van Kooten C, Wramner L, et al. Association of soluble CD89 levels with disease progression but not susceptibility in IgA nephropathy. Kidney Int. 2010;78(12):1281-7.
10. Berthelot L, Robert T, Vuiblet V, Tabary T, Braconnier A, Drame M, et al. Recurrent IgA nephropathy is predicted by altered glycosylated IgA, autoantibodies and soluble CD89 complexes. Kidney Int. 2015;88(4):815-22.
11. Kidney Disease: Improving Global Outcomes CKDMBDWG. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). Kidney Int Suppl. 2009(113):S1-130.
12. Barratt J, Feehally J. Treatment of IgA nephropathy. Kidney Int. 2006;69(11):1934-8.
13. Stummvoll G, Aringer M, Handisurya A, Derfler K. Immunoadsorption in Autoimmune Diseases Affecting the Kidney. Seminars in nephrology. 2017;37(5):478-87.
14. Floege J, Rauen T, Eitner F. Intensive Supportive Care plus Immunosuppression in IgA Nephropathy. N Engl J Med. 2016;374(10):992-3.
15. Cambier A, Rabant M, Peuchmaur M, Hertig A, Deschenes G, Couchoud C, et al. Immunosuppressive Treatment in Children With IgA Nephropathy and the Clinical Value of Podocytopathic Features. Kidney Int Rep. 2018;3(4):916-25.
16. Hastings MC, Moldoveanu Z, Julian BA, Novak J, Sanders JT, McGlothan KR, et al. Galactose-deficient IgA1 in African Americans with IgA nephropathy: serum levels and heritability. Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN. 2010;5(11):2069-74.
17. Pillebout E, Jamin A, Ayari H, Housset P, Pierre M, Sauvaget V, et al. Biomarkers of IgA vasculitis nephritis in children. PloS one. 2017;12(11): e0188718.
18. Fujinaga S, Ohtomo Y, Umino D, Mochizuki H, Murakami H, Shimizu T, et al. Plasma exchange combined with immunosuppressive treatment in a child with rapidly progressive IgA nephropathy. Pediatr Nephrol. 2007;22(6):899-902.
19. Matic G, Hofmann D, Winkler R, Tiess M, Michelsen A, Schneidewind JM, et al. Removal of immunoglobulins by a protein A versus an antihuman immunoglobulin G-based system: evaluation of 602 sessions of extracorporeal immunoadsorption. Artif Organs. 2000;24(2):103-7.
20. Lafayette RA, Canetta PA, Rovin BH, Appel GB, Novak J, Nath KA, et al. A Randomized, Controlled Trial of Rituximab in IgA Nephropathy with Proteinuria and Renal Dysfunction. J Am Soc Nephrol. 2017;28(4):1306-13.
21. Ring T, Pedersen BB, Salkus G, Goodship TH. Use of eculizumab in crescentic IgA nephropathy: proof of principle and conundrum? Clin Kidney J. 2015;8(5):489-91.
22. Rosenblad T, Rebetz J, Johansson M, Bekassy Z, Sartz L, Karpman D. Eculizumab treatment for rescue of renal function in IgA nephropathy. Pediatr Nephrol. 2014;29(11):2225-8.
23. Monteiro RC, Cooper MD, Kubagawa H. Molecular heterogeneity of Fc alpha receptors detected by receptor-specific monoclonal antibodies. J Immunol. 1992;148(6):1764-70.
24. Dantal J, Godfrin Y, Koll R, Perretto S, Naulet J, Bouhours JF, et al. Antihuman immunoglobulin affinity immunoadsorption strongly decreases proteinuria in patients with relapsing nephrotic syndrome. J Am Soc Nephrol. 1998;9(9):1709-15.

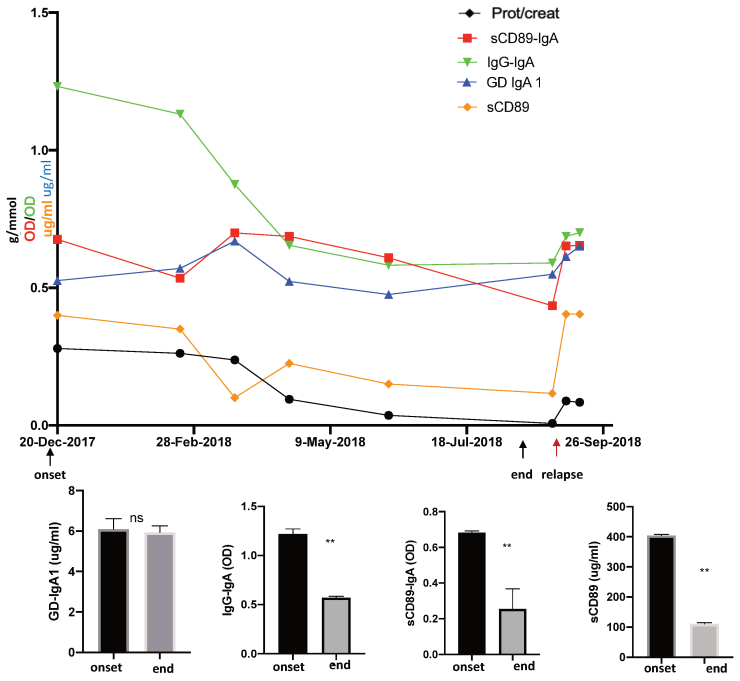


Figure 1

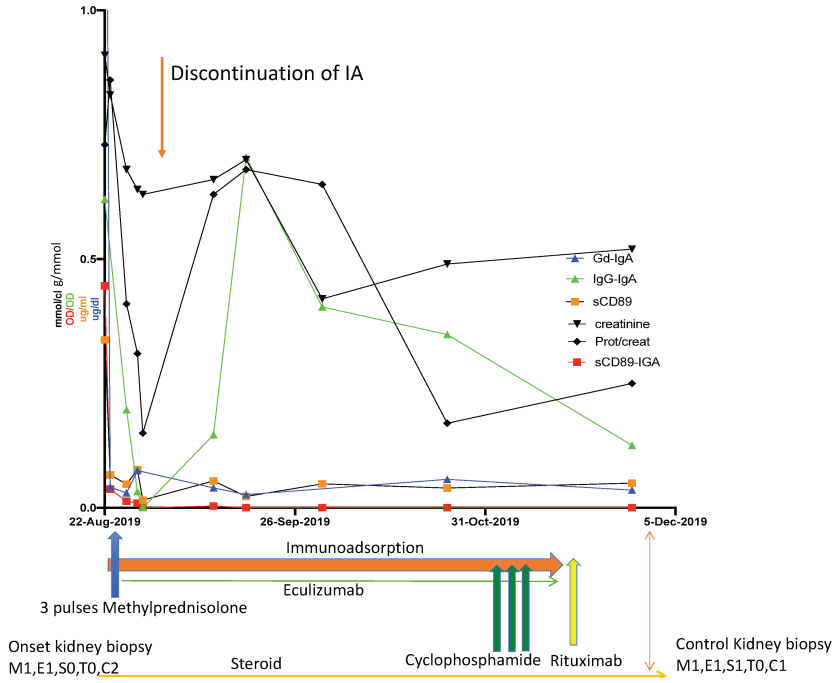
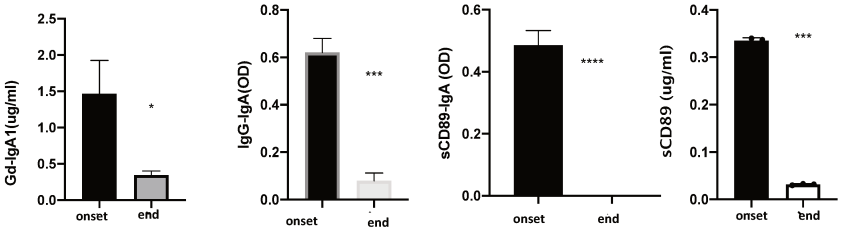


Figure 2

Figure 3

	Creatinine (µmol/l)	Cystatine C (mg/l)	Oxford Classification	proteinuria (g/mmol)
Onset	91	3	M1,E1,S0,TO,C2	0.73
End	52	1.1	M1,E1,S1,TO,C1	0.2



B. Partie 2 : L'aspect des variants du collagène dans la Néphropathie à IgA de l'enfant

1. Article 3 : Description de variants rares hétérozygotes du collagène dans la néphropathie à IgA de l'enfant

Introduction : La néphropathie à IgA (N-IgA) de l'enfant est une glomérulonéphrite primaire qui peut se présenter cliniquement par une hématurie microscopique et une protéinurie. Cette présentation clinique pourrait potentiellement se chevaucher avec le syndrome d'Alport. Des travaux antérieurs ont suggéré que des néphropathies dites familiales pourraient être en lien avec la région 2q36 du chromosome, qui est également la région codante pour COL4A3/A4.

Méthodes : Afin d'étudier une potentielle relation entre le syndrome d'Alport et la N-IgA, les exons de COL4A3, COL4A4 et COL4A5 ont été séquencés chez 36 enfants ayant une N-IgA. Les données cliniques, biologiques, immunologiques et histologiques ainsi que les traitements reçus ont été collectés rétrospectivement. Les variants de COL4A3/A4/A5 ont été classés selon les directives de l'American College of Medical Genetics et de l'Association for Molecular Pathology (ACMG / AMP).

Résultats : Nous avons rapporté 4 enfants ayant des N-IgA affectés par des variants hétérozygotes de classe ACMG 4/5 COL4A3 (COL4A3-cIgAN) dans la cohorte des 36 enfants. Nous n'avons pas trouvé de variants COL4A4 ou COL4A5. Bien que les variants retrouvés COL4A3 soient rares et délétères, 3 enfants sur 4 des COL4A3-cIgAN développèrent davantage les caractéristiques cliniques et biologiques d'une N-IgA active que d'un syndrome d'Alport. Ils ont répondu à un traitement immunosuppresseur intensif, conduisant à la diminution des lésions de prolifération endocapillaire et extracapillaire documentées sur des biopsies rénales répétées secondaires aux différentes poussées. Des niveaux élevés de complexes immuns IgA, accompagnés d'une réduction de la protéinurie et la stabilisation du DFG sous traitement immunosuppresseur ne sont pas en faveur de la description des caractéristiques classiques du syndrome d'Alport. Cependant, les patients COL4A3-cIgAN ont une présentation de N-IgA plus grave par rapport au groupe non COL4A3-cIgAN, avec plus de lésions de glomérulosclérose et un DFG plus faible au cours du temps. Une enfant COL4A3-cIgAN a nécessité une transplantation rénale avec une récidive de poussée de N-IgA sur le greffon.

Conclusion : La N-IgA de l'enfant présentant des variants hétérozygotes pathologiques COL4A3 doit être considérée comme un facteur de prédisposition quant au développement d'une N-IgA sévère, plutôt que de la considérer comme définissant un syndrome d'Alport dominant. L'observation des variants de COL4A3 habituellement responsables du syndrome d'Alport chez l'adulte, ne doit pas conduire à l'exclusion d'un traitement immunosuppresseur chez ces enfants porteurs du variant. De plus les variants pathogènes COL4A3 (ACMG classé 4 / 5) découverts au stade précoce pourraient représenter un outil utile pour stratifier la gravité de la N-IgA de l'enfant au-delà de la classification d'Oxford.

Rare collagenous heterozygote variants in children with IgA Nephropathy

Alexandra Cambier[1,7,10], Thomas Robert[9], Marion Rabant[2], Michel Peuchmaur[4], Georges Deschenes[1], Olivia Boyer[8], Tim Ulinski[1], Renato C. Monteiro[10], Laurent Mesnard[6,7, 11, 12]

1. Service de néphrologie pédiatrique, APHP, Hôpital Universitaire Robert-Debré, Paris, France
2. Service de Pathologie, Hôpital Universitaire Hôpital Necker, APHP, Paris, France
4. Service de Pathologie, Hôpital Universitaire Robert Debré APHP, Paris et Université Diderot, Paris, France
5. Service de néphrologie et transplantation rénale, Hôpital Necker, APHP, Paris, France
6. Service des urgences néphrologiques et transplantation rénales, APHP, Hôpital Tenon, Paris, France
7. Sorbonne Université, Paris, France
8. Service de néphrologie pédiatrique, APHP, Hôpital Universitaire Necker, Paris, France
9. Centre de néphrologie et transplantation rénale, APHM, Hôpital Universitaire de la Conception, Marseille, France
10. Université de Paris, Paris, France; INSERM U1149; CNRS ERL8252; Centre de recherche sur l'inflammation (CRI); Inflamex Laboratory of Excellence, Paris, France;
11. Institut des Sciences du Calcul et des Données (ISCD), Sorbonne Université
12. Inserm UMR_S1155, Paris, France

Abstract:

Introduction: Children IgAN (cIgAN) is one of the primary glomerulonephritis clinically characterized by microscopic hematuria and proteinuria that can rarely affect children. These clinical manifestations could potentially overlap with Alport syndrome. Interestingly, previous works have suggested that familial IgAN could be linked to chromosome's 2q36 region, which is also the coding region for COL4A3/A4.

Methods: To investigate a potential relationship or phenocopy between Alport Syndrome and cIgAN, COL4A3, COL4A4 as COL4A5 exons were sequenced in 36 cIgAN. Clinical data and treatment as biological, immunological, and histological characteristics were retrospectively collected. COL4A3/A4/A5 variants were classified according to the guidelines of the American College of Medical Genetics and the Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP).

Results: We reported 4 over 36 cIgAN patients affected by ACMG class 4/5 COL4A3 heterozygous variants (COL4A3-cIgAN). We did not find COL4A4 or COL4A5's variant. Despite having rare and deleterious COL4A3 variants, 3 over 4 COL4A3-cIgAN children developed the clinical and biological features of an active IgAN rather than from the Alport Syndrome. They did respond to an intensive immunosuppressive treatment, leading to the reduction over several flair of endocapillary and extracapillary proliferation lesions documented on repeated kidney biopsy. High levels of immune IgG/IgA complexes, reduction of proteinuria and stabilization eGFR over time pledge against classical features of Alport syndrome. Nevertheless, COL4A3-cIgAN patients seems to get a predisposition to more serious IgAN presentation compared to the non COL4A3-cIgAN group, with more glomerulosclerosis and a lower eGFR over time. One of the four patients got non-related kidney transplantation and did developed later on an IgAN recurrence.

Conclusion: cIgAN with COL4A3 pathological heterozygous variants should be considered as having predisposition factors to develop serious flair of cIgAN, rather than a dominant Alport Syndrome that will affect adult later in life. The observation of COL4A3 variants, usually responsible of Alport syndrome in adults, should not lead to the exclusion of immunosuppressive regimen in cIgAN. Moreover, evidence of ACMG class 4/5 COL4A3 variant at early stage of cIgAN could represent a helpful tool to stratify the severity of cIgAN beyond the Oxford classification.

Introduction:

Children IgA nephropathy (cIgAN) is one of the first glomerulonephritis worldwide. [1] Since IgA familial nephropathy have been described, [2] predisposing genetic factors have been suggested to play an important role in the development of IgA Nephropathy. IgAN usually develops in a sporadic form, although familiarly related cases have been suggested. With the application of Genome-Wide Association Studies (GWAS) on large IgAN cohorts compared to control cohorts, the understanding of IgAN genetic background has improved, despite being related to several locus. So far, GWAS showed that the identification of several susceptibility loci (among them MHC locus, HORMAD2, complement factor H cluster, Tumor Necrosis Factor ligand superfamily member 13 coding for APRIL, CARD9...). [3-8] Three loci could have genetic susceptibility for familial IgAN with IgAN 1 locus on chromosome 6q22-23, IgAN 2 locus on chromosome 4q26-31 and IgAN 3 locus on chromosome 17q12-22. [9, 10] Interestingly, another locus was identified in a Canadian cohort 2q36 [3]. This region is also the coding locus for COLA4 and COL4A3 implicated in the Alport syndrome. Whole genome or whole exome sequencing, as opposed to GWAS, aims to the discovery of rare or private variants that could be associated with rare phenotypes, such as rare diseases, copying with the idea that this approach could be of interest in familial forms of IgAN. [9-12] IgAN nephropathy and Alport syndrome could have the same clinical presentation (hematuria, proteinuria, ESRD), representing potential phenocopies. Moreover, a causal link has been recently proposed between these two diseases. [13] Intriguingly, during either IgAN or Alport syndrome, glomerular basement membrane injuries have been described (double contours, gaps, thinning with a lamellar and reticular structure, rupture). [14] [15]

The aim of this work was to study COL4A3, COL4A4, COL4A5 coding variation in a children IgAN cohort. Genetic variants were classified according to the guidelines of the American College of Medical Genetics and the Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP).

Materiel and methods:

Patients:

This longitudinal multicentric prospective study was undertaken at three university hospitals in Paris (Necker Enfants Malades, Robert-Debré Hospital and Trousseau Hospital) and included 36 consecutive cases of children and adolescents recorded between 1990 and 2019, all under 18 years-old, and newly diagnosed with primary IgAN after a renal biopsy. These 36 consecutive patients, for which genetic analysis have been performed, were issued from our cohort of 82 patients as previously described. [16] The study was approved by the ethics committee of St Antoine Hospital in Paris, France. All parents and children in this study provided informed written consent. Diagnosis of IgAN was based on immunofluorescence microscopy findings, showing mesangial deposition of IgA as the predominant or co-dominant immunoglobulin. Patients with systemic diseases,

such as systemic lupus erythematosus, Henoch-Schönlein purpura or chronic liver diseases were excluded.

Clinical data set:

The following clinical and biological parameters were collected for each patient at the time of their renal biopsy and at time of measurement of immune complexes: age, sex, weight, height, clinical presentation at disease onset, time from onset to renal biopsy, presence of a macroscopic hematuria at diagnosis, history of tonsillectomy, familial IgAN history (either proven by renal biopsy or suspected because of a medical history of microscopic and/or macroscopic hematuria in a next of kin), systolic and diastolic blood pressure, serum albumin, serum IgA levels, serum creatinine (sCreat, expressed in µmol/L), eGFR, urine protein-to- creatinine ratio ([g/mmol], used as an estimation of 24-h protein excretion adjusted for body surface area). eGFR was calculated using the updated bedside Schwartz equation: creatinine clearance (ml/min/1.73m^2) = K × L/ sCreat where L is body length (cm), and K= 41.3. [17, 18] A maximum eGFR set at 120 ml/min/1.73 m^2 was selected as the accuracy of eGFR for higher values is low and also to avoid a disproportionate impact of small variations in creatinine on the rate of renal function's variation. [18] Nephrotic syndrome (NS) was defined as urinary protein excretion ≥ 3 g/g creatinine and serum albumin < 3 g/dL. Acute renal failure was defined as eGFR below 70 ml/min/1.73m^2 with proteinuria and/or hematuria.
End stage of renal disease (ESRD) was defined as an eGFR below 15 ml/min/1.73m^2 at diagnostic or the need for renal replacement therapy at diagnostic.
Microscopic hematuria was diagnosed when more than five thousand erythrocytes per ml and macroscopic hematuria was defined as the presence of gross hematuria.
Important relapse was defined by a significant proteinuria >0,1g/mmol and/or acute renal failure (Increased creatinine>20%) with hematuria.
There are three key factors in the pathogenesis of IgAN, namely galactose-deficient IgA1 (Gd- IgA1), anti-IgA autoantibodies and soluble (s) CD89 IgA Fc receptor.[19] These molecules form circulating immune complexes that have been identified as potential markers for adult IgAN. [20, 21] To assess more precisely the IgAN diagnosis, the biomarkers Gd-IgA1, immune complexes (sCD89-IgA1, IgG-IgA) and sCD89 were measured in this cohort.

Gd-IgA1, sCD89 and IgA complex measurements.

For the Gd-IgA1 levels measurement, ELISA was performed with anti-Gd-IgA1 KM55 Assay Kit (IBL, Amsterdam, NL) according to manufacturer's instructions using 1/200 plasma dilution. For the measurement of free and unbound sCD89, MIP8a anti-human CD89 (1/500, Thermo Fisher) was used for coating overnight at 4 ˚C, followed by blocking for 4 hours at 37 C˚ and overnight incubation with 1/5 dilution of plasma at 4°C. Recognition of free sCD89 was performed using biotinylated mAb anti-sCD89 (5 µg/L, clone A77) [22] with secondary streptavidin HRP plus chromogen (TMB) solution. The optic density was read at 450 nm.

For the IgA immune complex measurements, ELISA was performed as follow: coating with goat anti-IgA cross-adsorbed antibody (1/500 in PBS, Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA) or with anti-sCD89 (5 µg/mL, clone A3) [22] for 4 h at 37 ˚C, followed by blocking for 4 h at 37 ˚C. Plasma samples (1/5 dilution) were incubated overnight at 1/10 at 4°C. Revelation was performed using an anti-IgG Ab (1/5000, Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA) coupled to HRP or an anti-IgA antibody (1/2000, BD Biosciences Le Pont de Claix, France) coupled with alkaline phosphatase, respectively for IgA-IgG or sCD89-IgA complex detection. The substrates were TMB solution or Sigma

fast P-nitrophenyl phosphate tablets (Sigma-Aldrich). The optic density was read at 405nm for AP or 450 nm for HRP.

Histopathology:

In the present analysis, all biopsy samples were re-analyzed. Some specimens were not analyzable for all histological variables. We studied variables of the Oxford classification using different definitions. We studied five variables: mesangial hypercellularity (M), scored 1 (M1) if ≥50% of glomeruli had more than three cells per mesangial area; segmental glomerulosclerosis or adhesion (S), scored as 0 (S0) if absent or as 1 (S1) if present, endocapillary hypercellularity (E), scored as 0 (E0) if absent or as 1 (E1) if present; extra- capillary proliferation (C) including cellular, fibro cellular or fibrous crescent scored as 0 (C0) if absent or as 1 (C1) if present; tubular atrophy/interstitial fibrosis (T) was modified from oxford classification, scored as 1 (T1) if present between 10 and 25 % of the relevant biopsy core and scored as 2 (T2) if present in ≥ 25% of the relevant biopsy core.

Sequencing and Genetic analysis of COL4s genes:

We sequenced COL4A3, COL4A5, COL4A4 coding sequences with targeted capture sequencing (Miseq, illumina) in cIgAN and in both their parents when available. For the exome study, genomic DNA was isolated from blood samples, and exons (33 megabases) were captured with the Twist Human Core Exome kit and sequenced on a Novaseq 6000 instrument on an Illumina platform. Data were analyzed using dedicated software (SeqOne, Montpellier, France) to identify diagnostic variants for patients' renal disease. In the current study with exome data analysis, analysis was restricted to COL4A3, COL4A5, COL4A4 genes for consistent comparison with the initial exon capture. Variants were classified, respective of guidelines of the American College of Medical Genetics and the Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP), collagen variants were classified Pathogenic or Likely Pathogenic. [23]

Statistical analysis

Median (interquartile range IQR) values and frequencies are provided for the description of continuous and categorical variables, respectively. The Shapiro-Wilk test was used to test the normality of the data distribution for T test. The mean values and proportions of two groups were compared using Mann-Whitney and Fisher's exact tests, respectively. All tests were two-sided, and values of $p<0.05$ were considered statistically significant. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism version 7 (GraphPad Software) and SPPS.

Results:

Analysis of COL4A3/A4/A5 variants in cIgAN patients

We identified pathogenic or likely pathogenic inherited COL4A3 variants in 4 patients out of 36 (11.1%). (**Figure S1**) We did not find variant in COL4A4 and COL4A5 genes. Variation in COL4A3 were defined according to the ACMG classification as shown in material and methods section. Any patients were heterozygous carrier of variants in COL4A3 gene (Family 2-4) but one patient had an additional COL4A3 variants in trans corresponding to heterozygous compound equivalent to a recessive disease (Family 1). (**Table 1 and Figure 1**).

COL4A3 protein was affected either on glycine residue (p.G1277S) affecting an G-XY-R triplet motif on the collagenous domain, or on amino-acid located in the NC1 domain as p.F1504L and p.L1474P. Patient 4/Family 4 shown inheritance of a COL4A3 p.F1504L variant from his father who have developed ESRD at 40 years-old. This variant was also present in Family 1 without history of ESRD but patient 1/family 1, despite this family presented a severe form of IgAN, like patient 4. The former COL4A3 p.G1277S variant was also present in patient 2/family 2 with a milder phenotype of the renal disease at the onset. Taken together this suggest that p.G1277S and p.F1504L could be associated with a significant part of the phenotype observed in these 4 patients shown in **Table 1** phenocopying Alport Syndrome.

At the onset of the disease, 3 patients over 4 with COL4A3 presented NS including 2 patients with low eGFR. All patient had macroscopic hematuria. Patients with NS have the full spectrum of proliferative lesions according the Oxford classification (M1, E1 and C1-C2 lesions). No patients had tubular atrophy/interstitial fibrosis (T1 lesions) and 2 patients had segmental glomerulosclerosis or adhesion (S1 lesion). No biopsy was assessed by electron microscopy. **Figure 1 and Table 1** show pedigrees and phenotype of the patients.

The patients with synpharyngitic hematuria and NS were treated with immunosuppressive regimen: Pulse steroid therapy consisted of i.v. methylprednisolone 500 mg/m^2 or 1000 mg/1.73 m^2 for 3 consecutive days then oral steroid therapy between 12 or 18 months. In presence of an important extracapillary proliferation in kidney biopsy (C1-C2), Cyclophosphamide (1,3 or 6 i.v. pulses of 600 or 700 mg/m^2) could be associated to the immunosuppressive regimen. One patient received plasma exchanges. All the patients received renin angiotensin system blockade (RASB) (i.e., with angiotensin-converting enzyme inhibitors and/or angiotensin receptor blocker). (**Table 1**)

During the follow-up, 3 patients had repeated renal biopsy. Description of evolution of kidney biopsy are in **Figure 1 and table 1**. The decision to perform a repeated biopsy has been based on clinical judgment and not on a pre-established protocol. All kidney biopsy showed IgA deposit. Evolution of biological and histological characteristic are shown in **figure 2 and Table 1**. We can observe a diminution of proteinuria (figure 2A) and an increase of serum albumin (figure 2b) in the 4 patients. For P1 and P3 eGFR remains stable or increased whereas it decreased in P2 and P4 (figure 2C). The performance of repeated kidney biopsy has shown in final a diminution of active lesion and a progression of glomerulosclerosis (Figure 2d-e)

Despite the fact that patient 1 / family 1 presented NS and acute renal failure at onset and COL4A3 heterozygous compound mutation, equivalent to recessive disease, eGFR significantly improved after immunosuppressive therapy (oral steroid, 3 perfusions of methylprednisolone and 1 injection of cyclophosphamide). The first renal biopsy showed (M1, E1, S0, T0, C1). A second kidney biopsy was performed for persistent mild proteinuria (0.1 g/mmol) without hematuria (0 cpm/ml). Optical microscopy showed S1 lesion according Oxford classification (M0, E0, S1, T0, C0). He was eventually treated by RASB. During the follow up, he did not present any other relapses, and the proteinuria stayed low. At last follow up, he has no microscopic hematuria, with minimal proteinuria (0.07 g/mmol) with an eGFR 50 ml/min/1.73m$^{2.}$

Patient 2 presented the least severe presentation. She had at least one COL4A3 variant similar to family 1 (p.G1277S), with clearly a different evolution of the renal disease. The first kidney biopsy was performed due to the recurrence of macroscopic hematuria with normal eGFR and few proteinuria

(0.021g/mmol). The kidney biopsy showed only M1. She received only RASB treatment. At last follow up the eGFR was normal with no proteinuria and no hematuria.

Patient 3 presented a more severe clinical (included NS with acute renal failure) and histological (M1, E1, S1(15%), T0, C2) compared to other family presented here. She was initially treated with pulse i.v and oral steroid with cyclophosphamide and plasma exchange. The evolution of the renal disease was marked by eGFR deterioration with full spectrum of proliferative lesion persistence according oxford classification, with occurrence of S1 lesions during a second kidney biopsy (M1, E1, S1(60%), T0, C2). This leads to continuation of the treatment with in 5 additional cyclophosphamide injections and 10 plasma exchanges. A third kidney biopsy 3 months after the end of cyclophosphamide cycle for therapeutic evaluation showed persistence of M1 lesion and extensive S1 lesion and disappearance of E1 and C1 were observed (M1, E0, S1(80%), T0, C0). Due to important S1, immunosuppressive treatment was then stopped and eGFR eventually declined. Patient 3 reached ESRD and eventually received a preemptive kidney transplantation from a deceased donor 6 years after its initial diagnosis and flair of IgAN. She presented histological and clinical IgAN recurrence 8 months after kidney transplantation with acute renal failure and proteinuria (0.2 g/mmol) without hematuria. The kidney graft biopsy showed glomerulitis (g1 according Banff lesion score) and endocapillary and extracapillary proliferation. Immunofluorescence microscopy showed mesangial IgA deposits and C4d staining was negative. Patient 3 received 3 perfusions of methylprednisolone with 10 Plasma exchanges and one injection of rituximab (375 mg/m^2).

(Figure 1, table 2 and 3) At last follow up, after the IgAN recurrence, we observed an amelioration of eGFR (77 ml/min/1.73m^2) and proteinuria (0.1g/mmol).

Patient 4 which had also one COL4A3 variant similar to family 1(p.F1504L) but different than family 2. Patient 4 also had a serious evolution of the renal disease like family 1. Like patient 1 at onset, patient 4 presented important proliferative lesions (M1, E1, S1, T0, C2). She was treated initially by oral steroid and 3 perfusions of methylprednisolone. In family 4, a second biopsy was performed for NS relapse with macroscopic hematuria showing M1, E1, C1 lesions persistence with an increased proportion of S1 lesions (M1, E1, S1(50%), T0, C1) (**Table 2**). Oral steroid treatment and i.v. methylprednisolone for 3 consecutive days were performed. She eventually presented a remission of NS. Six months later, another NS relapse with gross hematuria leads to a third biopsy showing still C1 lesion with extensive S1 lesions (>50%) (M0, E0, S1, T0, C1). She was treated with 6 injections of cyclophosphamide. Current data showed no relapses with a persistence of microscopic hematuria and proteinuria (0.13g/mmol). Since the beginning eGFR decreased but remained stable secondarily (78 ml/min/1.73m^2)

Comparison COL4A3-cIgAN and non-COl4A3-cIgAN at onset.

32 children were included in the group non-COl4A3-cIgAN. Age at diagnosis was 9 [6.5-13] years in COL4A3-cIgAN and 11.10 [8.66-15.12] years in non-COL4A3-cIgAN group. 2 patients (50%) had suspected or proven family history of IgAN COL4A3-cIgAN compared to 4 patients (10%) in non-COL4A3-cIgAN group. Proteinuria was higher and serum albumin level lower in COL4A3-cIgAN group compared to the non-COL4A3-cIgAN group respectively (0.52 vs 0.125 g/mmol of creatiniuria, p=0.003; 28.5 vs 36.60 g/dl, p=0.0043). No difference was observed in eGFR and even eGFR was lower in COL4A3-cIgAN (67.2 vs 88.44 ml/min/1.73m^2 p=0,1418). (**Table 2**)
We analyzed total IgA1, immune complexes Gd-IgA1, sCD89, sCD89-IgA, IgG-IgA. [21, 24- 26] and no difference is observed between COL4A3-cIgAN and non-COL4A3-cIgAN group. (**Table 2**)

The analysis of the kidney biopsy findings reveals relatively the same proportion of M1, E1, C1, S1, T1 in COL4A3-cIgAN compared to the non-COL4A3-cIgAN group. (**Table 2**)

Comparison of COL4A3-cIgAN and non-COl4A3-cIgAN at last follow up

We compared the evolution at last follow up of COL4A3-cIgAN (before P3'kidney transplantation) and the 32 non-COL4A3cIgAN. With a median of follow up of 5,5 years and 6,88 years respectively, we can observe that eGFR was lower in COL4A3-cIgAN compare to the 32 non-COL4A3-cIgAN (90 vs 105.4 ml/min/1.73m^2 p=0.027). The degree of proteinuria, (0.041 vs 0.03 g/mmol p=0.3315), and serum albumin (42.45 vs 36 g/l p=0.0696) were not different between these 2 groups. (**Table 2**)

Comparison COL4A3-cIgAN and non-COL4A3-cIgAN with repeated kidney biopsy (RKB group).

We decided to compare COL4A3-cIgAN to severe non COL4A3-cIgAN who got repeated kidney biopsy (RKB group). Group RKB was composed of 5 cIgAN who received repeated biopsy for important relapses (defined above). There were no biological differences between these 2 groups (**Table 3**). Two children of RKB presented SN initially and 2 presented acute renal failure whereas 3 patients of COL4A3-cIgAN presented SN and 2 acute renal failure.
The first biopsy between these 2 groups were not histologically different. The proportion of M1, E1, C1 and S1 was the same, except for T1 (absent in COL4A3-cIgAN) (**Table 3**).
A difference was observed in the last kidney biopsy. COL4A3-cIgAN presented a disappearance of M1, E1 and a diminution of C1 whereas in group 2 the proportion of M1 increased with the same proportion of E1 and a diminution of C1.
COL4A3-cIgAN presented a more important progression to glomerulosclerosis compared to group 2. 1 patient in COL4A3-cIgAN group reach ESRD and 2 reached ESRD in RKB group. (**Table 3**) One COL4A3-cIgAN and one cIgAN from RKB group got a kidney transplantation.

Discussion:

To our knowledge, this is the first report of collagen variants sequencing in cIgAN in pediatric patients. We found 11 % of collagen variants in this cohort of 36 patients. Since Alport syndrome can phenocopy IgAN, [27] it seems important to distinguish these two disease entities to allow better treatments and avoid potential aggressive immunosuppressive treatments in Alport patients. Recently, type IV collagen mutation was described in adult familial IgAN underlying the possibility of description of Alport family with IgA deposits. [28] Unfortunately, detailed histopathology was not available in this family.

Here we described 4 cIgAN with ACMG class 4/5 COL4A3 heterozygous variants with clinical, biological, biomarkers and histological characteristics that in retrospect, and given their genetic status, have been treated with heavy immunosuppressive regimen.
In COL4A3-cIgAN, the clinical, biological and most of all the histological description cohort corresponded to the clinical presentation of IgAN for 3 patients with a very active disease. The cIgAN patient 2/family 2 with p.G1277S had a presentation that could be compatible with Alport syndrome, featured by macroscopic hematuria and slight proteinuria. No important histologic proliferation, a low Gd-IgA1 and no plasma immune complexes were observed. At the last follow-up, she presented only a microscopic hematuria with a normal eGFR. This will not rule out worse renal function outcome in the adult life. For Family 1, 3 and 4, these patients had an important proportion of endocapillary and extra-capillary proliferation which is not usually described in Alport syndrome. Patients with COL4A3

ACMG class 4/5 variant obviously responded to aggressive immunosuppressive regimen with the reverse of endocapillary and extra-capillary proliferation in kidney biopsy and a diminution of proteinuria with an increase of albumin serum and eGFR stabilization. The evolution and the variation of the histological proliferation lesions in repeated kidney biopsy and the response to immunosuppression does not support Alport syndrome where the form is indolent. Moreover, detection of high level of Gd-IgA1, IgG-IgA, sCD89-IgA and free sCD89 was observed and supported the IgAN diagnosis. These immune complexes are specific of IgAN. [21, 26]

A cautious interpretation of COL4A3 variant needs to be done in such clinical circumstances. Even though these patients carry COL4A3 variant classify pathogen and in others circumstance with the described phenotype, these children would have classified in Alport Syndrome category with a simple treatment of ISRA; given our results, in the light of the evolution of proliferative lesion in repeated kidney biopsy and the response after immunosuppressive therapy, it appears that these patients belong more to the cIgAN category and need to be treated with immunosuppressive treatments. Acute renal failure with many relapses and the relatively good evolution after immunosuppressive therapy (except patient 3) suggest that the immune response is a significant part of the disease that should be treated and do not support balanced Alport syndrome evolution.

Moreover, cIgAN COL4A3 heterozygous variants seem to get a predisposition to a serious IgAN presentation. The clinical presentation of COL4A3-cIgAN was more severe at onset compared to non-COl4A3-cIgAN of the cohort, with heavier nephrotic syndrome, a lower eGFR and superimposed acute renal failure. COL4A3-cIgAN had many relapses and got repetitive kidney biopsy with an important part of glomerulosclerosis at the last follow-up and lower eGFR. In comparison with cIgAN in RKB group, the COL4A3-cIgAN presented more glomerulosclerosis at last kidney biopsy follow-up. COL4A3 heterozygous variants in cIgAN seem to get more chronical lesions after the various relapses of cIgAN. We already shown that cIgAN presented more histological inflammation than adults IgAN with more chronical lesions. [29] The monitoring of repeated kidney biopsy is essential especially in cIgAN. It allowed us to follow the response of immunosuppressive treatment and the advancement of glomerulosclerosis. It could help us to monitor these severe patients with the help of the knowledge status of the collagen variant. Integrative analysis of oxford classification with collagenous variant may help to understand the wide spectrum of IgAN presentation and prognosis. Due to these results, it can be interested to research COL4A3 variant at the onset of the disease and during cIgAN severe form of IgAN.

A risk stratification could be based on the existence of rare genetic variant of COL4A3 gene. In this cohort, the majority of cases shown an autosomal inheritance with heterozygous COL4A3 variants as it was described in familial focal segmental glomerulosclerosis. [30] We believe that, COL4A3 heterozygous variants in cIgAN should be considered more as a predisposition factor to develop serious flair of cIgAN rather than considered per se as an authentic dominant Alport Syndrome. Sequencing COL4A3 variant at the beginning of cIgAN can stratify the risk for severe flair, especially with nephrotic syndrome at presentation.

The role of these collagenous variants affecting COL4A3, despite being classified as potentially pathogenic, is still unknown but confirms the heterogeneous nature of IgAN. While a proportion of families who present IgAN may carry a disease-causing variant in COL4A3, the majority does not. Due to these observations, it seems logical in case of kidney transplantation to choose a living or unrelated cadaveric donor without the collagenous variant. Nevertheless, in cases of living donor with COL4A3 variation, a relapse could still happen due to the trigger COL4A3.[31]

Based on this, and confirmed in larger study, similarly to newly immune biomarkers based on IgA complexes such as sCD89-IgA, free sCD89, Gd-IgA1, IgG-IgA, predictive and diagnostic factors could be foresight during initial management of cIgAN based on DNA sequencing. Indeed, ACMG evaluation of variant affecting COL4A3 could represent an indicative prognostic biomarker of cIgAN suitable for risk stratification.

DISCLOSURE

All the authors declared no competing interests

FUNDING

This work has been funded in large part by a research grant from AIRG (*Association pour l'Information et la recherche sur les maladies rénales génétiques,* https://www.airg- france.fr/resultat-de-lappel-a-projet-2017/)

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Description of 4 family COL4A3-cIgAN with the 4 cIgAN (P1-4)
(a) family trees (b) evolution of repeated kidney biopsies (KB) for P1-P4, patient 1 to 4; M1, presence of mesangial hypercellularity, E1, presence of endocapillary hypercellularity; C1, presence of extracapillary proliferation; S1, presence of segmental glomerulosclerosis or adhesion; T1, presence of tubular atrophy/interstitial fibrosis. FGS Focal segmental glomerulosclerosis

Table 1. Genetic, clinical, biological and histological description of 4 patients COl4A- cIgAN at onset and last follow up
Gene description of variants according their p.hgvs for NP_000082.2, M1, presence of mesangial hypercellularity,, E1, presence of endocapillary hypercellularity; C1, presence of extracapillary proliferation; S1, presence of segmental glomerulosclerosis or adhesion; T1, presence of tubular atrophy/interstitial fibrosis. eGFR, estimated glomerular filtration rate; RASB, renin angiotensin system blockade; IV, Intraveinous.

Figure 2. Evolution of biological and histological characteristics COL4A3-cIgAN (P1- P4) between onset and last follow up (before kidney transplantation)
(a) Serum Albumine at onset and last follow-up (b) Proteinuria at onset and last follow-up (c) and eGFR, estimated glomerular filtration rate at onset and last follow-up (d) Evolution of histological lesions. M1, presence of mesangial hypercellularity, E1, presence of endocapillary hypercellularity; C1/C2, presence of extracapillary proliferation; S1, presence of segmental glomerulosclerosis or adhesion; T1, presence of tubular atrophy/interstitial fibrosis. (e) table of clinical, biological and histological characteristic of COL4A3 cIgAN. For quantitative variables, values are expressed as median [interquartile ranges]. For qualitative variables, values are expressed as n (%).

Table 2. Comparison of clinical, biological and immunological characteristics between COL4A3-cIgAN and non COL4A3-cIgAN at onset and last follow up (Before kidney transplantation)
cIgAN, children IgA Nephropathy; Gd-IgA1, galactose-deficient IgA1; sCD89-IgA and IgG- IgA, anti-IgA autoantibodies; sCD89, soluble (s) CD89 IgA Fc receptor; eGFR, estimated glomerular filtration rate . M1, presence of mesangial hypercellularity, E1, presence of endocapillary hypercellularity; C1, presence of extracapillary proliferation; S1, presence of segmental glomerulosclerosis or adhesion; T1,

presence of tubular atrophy/interstitial fibrosis. For quantitative variables, values are expressed as median [interquartile ranges]. For qualitative variables, values are expressed as n (%).

Table 3. Comparison of clinical, biological characteristics between COL4A3-cIgAN and non COL4A- cIgAN RKB at onset and last follow up (Before kidney transplantation) cIgAN, children IgA Nephropathy; eGFR, estimated glomerular filtration rate. M1, presence of mesangial hypercellularity, E1, presence of endocapillary hypercellularity; C1, presence of extracapillary proliferation; S1, presence of segmental glomerulosclerosis or adhesion; T1, presence of tubular atrophy/interstitial fibrosis. For quantitative variables, values are expressed as median [interquartile ranges]. For qualitative variables, values are expressed as n (%).

S1: Description of families COL4A3-cIgAN

CADD, Combined Annotation Dependent Depletion; D, damaging; PP-2, Polyphen-2; gnomAD AF, allele frequency (AF) in gnomAD controls database; †Classification criteria are detailed in the associated American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) guidelines (doi: 10.1038/gim.2015.30.)

REFERENCES

1. Wyatt, R.J., et al., *IgA nephropathy: long-term prognosis for pediatric patients*. J Pediatr, 1995. **127**(6): p. 913-9.
2. Kiryluk, K., et al., *Genetic studies of IgA nephropathy: past, present, and future*. Pediatr Nephrol, 2010. **25**(11): p. 2257-68.
3. Paterson, A.D., et al., *Genome-wide linkage scan of a large family with IgA nephropathy localizes a novel susceptibility locus to chromosome 2q36*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(8): p. 2408-15.
4. Gharavi, A.G., et al., *Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy*. Nat Genet, 2011. **43**(4): p. 321-7.
5. Yu, X.Q., et al., *A genome-wide association study in Han Chinese identifies multiple susceptibility loci for IgA nephropathy*. Nat Genet, 2011. **44**(2): p. 178-82.
6. Sallustio, F., et al., *Genome-wide scan identifies a copy number variable region at 3p21.1 that influences the TLR9 expression levels in IgA nephropathy patients*. Eur J Hum Genet, 2015. **23**(7): p. 940-8.
7. Kiryluk, K., et al., *Geographic differences in genetic susceptibility to IgA nephropathy: GWAS replication study and geospatial risk analysis*. PLoS Genet, 2012. **8**(6): p. e1002765.
8. Feehally, J., et al., *HLA has strongest association with IgA nephropathy in genome- wide analysis*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(10): p. 1791-7.
9. Gharavi, A.G., et al., *IgA nephropathy, the most common cause of glomerulonephritis, is linked to 6q22-23*. Nat Genet, 2000. **26**(3): p. 354-7.
10. Bisceglia, L., et al., *Genetic heterogeneity in Italian families with IgA nephropathy: suggestive linkage for two novel IgA nephropathy loci*. Am J Hum Genet, 2006. **79**(6): p. 1130-4.
11. Julian, B.A., et al., *Familial IgA nephropathy. Evidence of an inherited mechanism of disease*. N Engl J Med, 1985. **312**(4): p. 202-8.
12. Scolari, F., et al., *Familial clustering of IgA nephropathy: further evidence in an Italian population*. Am J Kidney Dis, 1999. **33**(5): p. 857-65.
13. Packham, D.K., *Thin basement membrane nephropathy and IgA glomerulonephritis: can they be distinguished without renal biopsy?* Nephrology (Carlton), 2007. **12**(5): p. 481-6.
14. Savige, J., et al., *Thin basement membrane nephropathy*. Kidney Int, 2003. **64**(4): p. 1169-78.

15. Masuda, Y., et al., *Glomerular basement membrane injuries in IgA nephropathy evaluated by double immunostaining for alpha5(IV) and alpha2(IV) chains of type IV collagen and low-vacuum scanning electron microscopy*. Clin Exp Nephrol, 2015. **19**(3): p. 427-35.
16. Cambier, A., et al., *Immunosuppressive Treatment in Children With IgA Nephropathy and the Clinical Value of Podocytopathic Features*. Kidney Int Rep, 2018. **3**(4): p. 916- 925.
17. Schwartz, G.J., et al., *New equations to estimate GFR in children with CKD*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(3): p. 629-37.
18. Pottel, H., *Measuring and estimating glomerular filtration rate in children*. Pediatr Nephrol, 2016.
19. Robert, T., et al., *Molecular Insights into the Pathogenesis of IgA Nephropathy*. Trends Mol Med, 2015. **21**(12): p. 762-775.
20. Berthoux, F., et al., *Autoantibodies targeting galactose deficient IgA1 associate with progression of IgA nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(9): p. 1579-87.
21. Vuong, M.T., et al., *Association of soluble CD89 levels with disease progression but not susceptibility in IgA nephropathy*. Kidney Int, 2010. **78**(12): p. 1281-7.
22. Monteiro, R.C., M.D. Cooper, and H. Kubagawa, *Molecular heterogeneity of Fc alpha receptors detected by receptor-specific monoclonal antibodies*. J Immunol, 1992. **148**(6): p. 1764-70.
23. Richards, S., et al., *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*. Genet Med, 2015. **17**(5): p. 405-24.
24. Berthelot, L., et al., *Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors*. J Exp Med, 2012. **209**(4): p. 793-806.
25. Monteiro, R.C. and J.G. Van De Winkel, *IgA Fc receptors*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 177-204.
26. Pillebout, E., et al., *Biomarkers of IgA vasculitis nephritis in children*. PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0188718.
27. Savige, J., et al., *Expert consensus guidelines for the genetic diagnosis of Alport syndrome*. Pediatr Nephrol, 2019. **34**(7): p. 1175-1189.
28. Li, Y., et al., *Type IV Collagen Mutations in Familial IgA Nephropathy*. Kidney Int Rep, 2020. **5**(7): p. 1075-1078.
29. Cambier, A., et al., *Clinical and histological differences between adults and children in new onset IgA nephropathy*. Pediatr Nephrol, 2020.
30. Malone, A.F., et al., *Rare hereditary COL4A3/COL4A4 variants may be mistaken for familial focal segmental glomerulosclerosis*. Kidney Int, 2014. **86**(6): p. 1253-9.
31. Kashtan, C.E., *Renal transplantation in patients with Alport syndrome: patient selection, outcomes, and donor evaluation*. Int J Nephrol Renovasc Dis, 2018. **11**: p. 267-270.

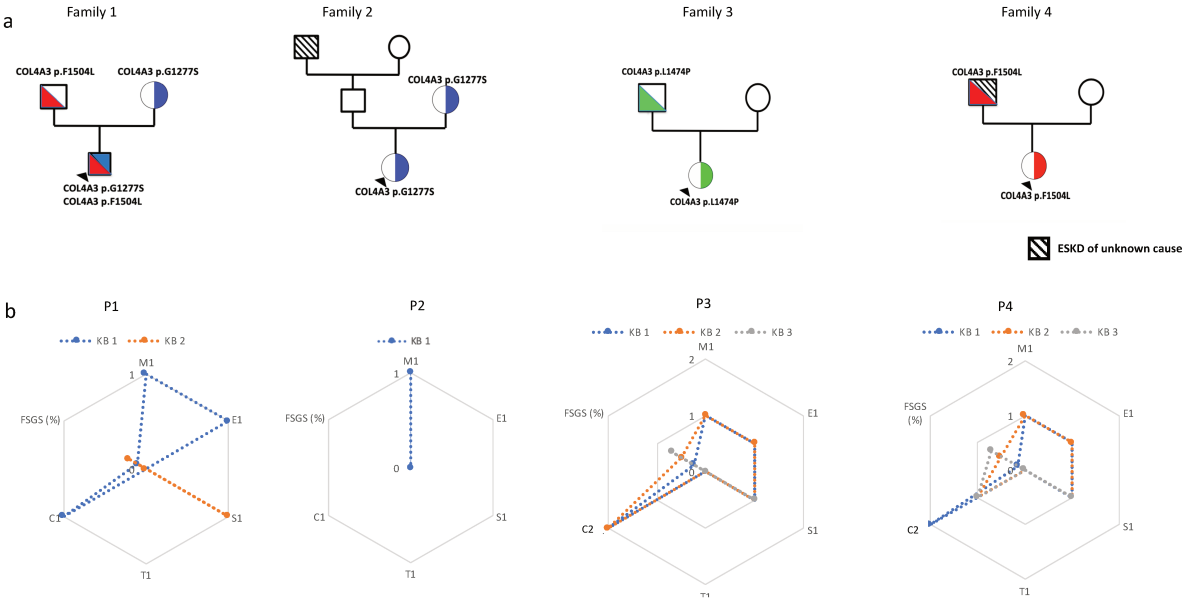
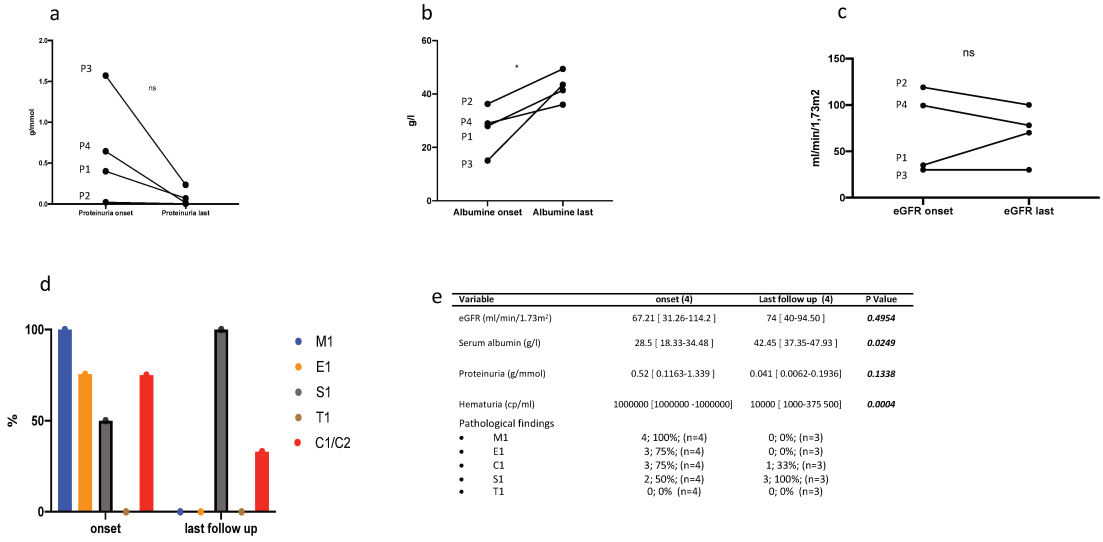


Figure 1.

Onset	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Gene P.hgvs	COL4A3 p.G1277S p.F1504L	COL4A3 p.G1277S	COL4A3 p.L1474P	COL4A3 p.F1504L
Familial history	no	Grand father ESRD	no	Father ESRD
Mother affected	yes	yes	no	no
Father affected	Yes	no	yes	yes
Age (years)	8	6	14	10
Albumin (g/l)	28	36.4	15.10	29
Proteinuria (g/mmol)	0.40	0.021	1.57	0.644
eGFR (ml/min/1,73m2)	35.02	119.08	30.00	99.40
Hematuria (cp/ml)	10^6	10^4	10^6	10^6
Oxford classification	M1,E1,S0,T0,C1	M1,E0,S0,T0,C0	M1,E1,S1,TO,C2	M1,E1,S1,TO,C2
Numbers of biopsies	2	1	3	3
Total Treatment	RASB Steroid+ IV Methylprednisolone+ IV cyclophosphamide	RASB	RASB Steroid+ IV Methylprednisolone + IV cyclophosphamide + 10 Plasma exchanges	RASB Steroid+ IV Methylprednisolone + IV cyclophosphamide
Last follow up before kidney transplantation				
Follow up (years)	8.91	5	7	4
Albumin (g/l)	41.4	49.4	43.5	36
Proteinuria (g/mmol)	0.069	0.003	0.23	0.13
eGFR (ml/min/1,73m2)	50	100	30	78
Hematuria (cp/ml)	<1000	<1000	10000	500 000
Kidney transplantation	no	no	Yes IgAN recurrence treated	no

Table 1.



e

Variable	onset (4)	Last follow up (4)	P Value
eGFR (ml/min/1.73m²)	67.21 [31.26-114.2]	74 [40-94.50]	***0.4954***
Serum albumin (g/l)	28.5 [18.33-34.48]	42.45 [37.35-47.93]	***0.0249***
Proteinuria (g/mmol)	0.52 [0.1163-1.339]	0.041 [0.0062-0.1936]	***0.1338***
Hematuria (cp/ml)	1000000 [1000000 -1000000]	10000 [1000-375 500]	***0.0004***
Pathological findings			
• M1	4; 100%; (n=4)	0; 0%; (n=3)	
• E1	3; 75%; (n=4)	0; 0%; (n=3)	
• C1	3; 75%; (n=4)	1; 33%; (n=3)	
• S1	2; 50%; (n=4)	3; 100%; (n=3)	
• T1	0; 0% (n=4)	0; 0% (n=3)	

Figure 2.

Variable[a] onset	COL4A3-cIgAN (4)	Non COL4A3-cIgAN (32)	P Value
Age (years)	9 [6.5-13]	11.10 [8.66-15.12]	
Familial IgAN history	2 (50%)	4(10%)	
eGFR (ml/min/1.73m²)	67.21 [31.26-114.2]	88.44 [78.88-104.1]	***0.1418***
Serum albumin (g/l)	28.5 [18.33-34.48]	36.60 [30.55-40]	***0.0424***
Proteinuria (g/mmol)	0.52 [0.1163-1.339]	0.125[0.04-0.3375]	***0.003***
IgA1	2.62 [2.038-3.3]	2.6 [2.038-3.300]	***0.2734***
Gd-IgA1 (ug/ml)	6.139 [1.884-6.282]	4.866 [2.856-7.378]	***0.7061***
sCD89-IgA (OD)	0.441 [0.0259-0.9377]	0.08 [0-0.2893]	***0.2758***
IgG-IgA (OD)	0.1831 [0.0636-0.2606]	0.1145 [0.04195-0.2379]	***0.6854***
Free sCD89 (ug/ml)	0.5373 [0.08-1.236]	0.4282 [0.1508-0.6710]	***0.6789***
Pathological findings			
• M1	4; 100%; (n=4)	25; 80%; (n=31)	
• E1	3; 75%; (n=4)	27; 87%; (n=31)	
• C1	3; 75%; (n=4)	15; 48%; (n=31)	
• S1	2; 50%; (n=4)	26; 80%; (n=31)	
• T1	0; 0% (n=4)	2;(6%) (n=40)	
Variable last follow up			
eGFR (ml/min/1.73m²)	90 [57-117.5]	105.4 [99.49-120.0]	***0.027***
Serum albumin (g/l)	42.45 [37.35-47.93]	36.5 [27.03-37.95]	***0.0696***
Proteinuria (g/mmol)	0.041 [0.0062-0.936]	0.03 [0.0100-0.060]	***0.3415***

Table 2.

Variable[a] onset	COL4A3-cIgAN (4)	Non COL4A3-cIgAN RKB (5)	P Value
Age (years)	9 [6.5-13]	11.10 [8.669-15.12]	
Familial IgAN history	2 (50%)	0 (0%)	
eGFR (ml/min/1.73m^2)	67.21 [31.26-114.2]	1131 [63.88-113.8]	***0.3772***
Serum albumin (g/l)	28.5 [18.33-34.48]	30 [26-44.1]	***0.5556***
Proteinuria (g/mmol)	0.52 [0.1163-1.339]	0.1074[0.049-0.1935]	***0.1905***
Pathological findings			
• M1	4; 100%; (n=4)	3; 60%; (n=5)	
• E1	3; 75%; (n=4)	5; 100%; (n=5)	
• C1	3; 75%; (n=4)	4; 80%; (n=5)	
• S1	2; 50%; (n=4)	4; 80%; (n=5)	
• T1	0; 0% (n=4)	2; 40% (n=5)	
Variable last follow up			
eGFR (ml/min/1.73m^2)	90 [57-117.5]	77 [30-85]	***0.3091***
Serum albumin (g/l)	42.45 [37.35-47.93]	32.3 [30.50-39.10]	***0.0635***
Proteinuria (g/mmol)	0.041 [0.0062-0.936]	0.2 [0.1333-0.25]	***0.3810***
Pathological findings			
• M1	0; 0%; (n=3)	4; 80%; (n=5)	
• E1	0; 0%; (n=3)	5; 100%; (n=5)	
• C1	1; 33%; (n=3)	1; 20%; (n=5)	
• S1	3; 100%; (n=3)	3; 60%; (n=5)	
• T1	0; 0% (n=4)	2; 40% (n=5)	

Table 3.

Family	Gene	C.hgvs	P.hgvs	dbSNP ID	CADD	PP-2	SIFT	MutTaster	gnomAD AF (controls)	Supporting ACMG Criteria†
1	COL4A3	c.3829G>A	p.G1277S	rs190598500	23,5	D	D	D	0,00035	PM1;PM2;PP2;PP3
		c.4510T>C	p.F1504L	rs201671013	24.5	D	D	D	0,00024	PM1;PM2;PM3;PP2;PP3
2	COL4A3	c.3829G>A	p.G1277S	rs190598500	23,5	D	D	D	0,00035	PM1;PM2;PP1;PP2;PP3
3	COL4A3	c.4421T>C	p.L1474P	rs200302125	23,4	D	D	D	0,0023	PM1;PM2;PP2;PP3;PP5
4	COL4A3	c.4510T>C	p.F1504L	rs201671013	24.5	D	D	D	0,00024	PM1;PM2;PP2;PP3

Supplementary figure S1

VIII. Discussion et perspectives

A. Discussion

La néphropathie à IgA reste à ce jour une maladie multifactorielle dont la physiopathologie reste en partie non élucidée. Si des facteurs génétiques ont bien été décrits, ils ne suffisent pas à expliquer la physiopathologie de la maladie qui semble impliquer des facteurs semblant acquis. Ces facteurs seraient donc des complexes immuns d'IgA circulants contenant les Gd-IgA1, avec les complexes IgG-IgA, [339] et les complexes sCD89-IgA. [5, 79, 143] La présence de Gd-IgA1 est la caractéristique centrale de la N-IgA de l'adulte et de l'enfant. [135] Mais ce marqueur n'est pas suffisant pour développer la maladie, et les autres complexes d'IgA1 seraient donc nécessaires à la physiopathologie et l'expression complète de la maladie. La néphropathie à IgA de l'enfant est une maladie qui va nécessiter une prise en charge au long terme avec des adaptations thérapeutiques fréquentes. Il y a donc une nécessité d'identifier des biomarqueurs spécifiques évitant ainsi les biopsies répétées. Ce fut donc le premier intérêt de ma thèse

1. La mise en évidence de marqueurs spécifiques de la N-IgA de l'enfant :

Les Gd-IgA1, les complexes sCD89-IgA et IgG-IgA pourraient être de potentiels biomarqueurs chez la N-IgA de l'adulte [318] et dans le purpura rhumatoïde avec atteinte rénale de l'enfant. [157] Nous démontrons ici que ce sont aussi des biomarqueurs spécifiques de la N-IgA de l'enfant. La particularité de ma thèse a été la mise en évidence de la forme soluble libre, le sCD89, dans le plasma des enfants atteints de la N-IgA comme un facteur diagnostique de la maladie. Le sCD89 n'avait pas été retrouvé chez les adultes ayant une N-IgA dans les études précédentes. [79]

2. Le rôle du Gd-IgA1 :

Dans notre étude nous retrouvons également le Gd-IgA1 comme un marqueur diagnostique de la N-IgA de l'enfant. [135, 136] Nous n'avons pas retrouvé de lien avec la protéinurie ni avec la fonction rénale comme cela avait été retrouvé dans d'autres études pédiatriques. [128, 137] D'un point de vue histologique il avait été montré que le taux de Gd-IgA1 était lié aux dépôts d'IgA1. [139] Dans notre étude le taux de Gd-IgA1 était plus élevé chez les enfants avec une N-IgA ayant de la prolifération endocapillaire ou extracapillaire comparés aux enfants avec une N-IgA qui n'en avaient pas. Nous avions aussi trouvé une corrélation entre le taux de Gd-IgA1 et le taux de sCD89. Un taux de Gd-IgA1 élevé était lié à un taux de sCD89 élevé. Cela sous-entend une interaction entre le degré d'hypogalactosylation des IgA1 et le CD89 qui serait à l'origine du clivage du sCD89.

Dans notre étude nous avons identifié par Western blot différentes formes de Gd-IgA1, formes monomériques, dimériques, polymériques mais également des formes tronquées vers 100 et 75 KDA. Ces formes tronquées de Gd-IgA1 pourraient être des IgA1 sécrétoires tronquées comme décrit précédemment. [340] Elle pourraient être en lien avec certaines bactéries du microbiote pouvant entrainer une hypogalactsosylation. (Résultats présentés au 15ème symposium de la néphropathie à IgA [341])

Dans notre série de cas de 2 patients, nous avons montré que le niveau de Gd-IgA1 restait stable au cours du temps même sous traitement immunosuppresseur. Le niveau de Gd-IgA1 avait déjà été retrouvé

stable pendant des années dans des cohortes de patients N-IgA pédiatriques et adultes.[140] Les immunosabsorptions entrainant une déplétion des IgA de 50% permettaient aussi de diminuer le niveau de Gd-IgA1.

Cependant les Gd-IgA1 seuls ne semblent pas suffisants pour développer la maladie mais restent indispensables dans la physiopathologie de la N-IgA impliquant d'autres marqueurs importants comme le CD89. En effet, des données d'autopsies en Asie ont montré que des dépôts d'IgA seuls et sans conséquences cliniques étaient présent dans 16% des biopsies rénales de patients asymptomatiques. [334]

3. Le rôle des IgG-IgA1 :

Dans notre étude nous retrouvons également des IgG-IgA comme facteur diagnostique de la N-IgA de l'enfant. Des études antérieures ont rapporté un taux plus élevé d'IgG-IgA dans la N-IgA chez l'adulte [152, 153] et chez les enfants. [157] Ils ont également été retrouvés augmentés dans la N-IgA de l'enfant comparé aux patients contrôles avec un lien avec la protéinurie des 24h00. [157, 158] Dans notre étude les IgG-IgA n'étaient pas des marqueurs prédictifs, ils n'étaient pas liés à la sévérité de la maladie comme déjà décrit auparavant dans des études adultes. [143] Nous ne retrouvions pas de lien avec la protéinurie comme il avait pu être rapporté dans une étude pédiatrique [158] ni avec les lésions histologiques.

Dans l'étude de notre série de cas, les IgG-IgA diminuaient au cours du temps sous immunosuppresseur chez nos 2 patients atteints de N-IgA. Au cours de la discontinuation des immunoadsorptions (IA), le taux d'IgG-IgA était le seul biomarqueur à remonter de façon concomitante avec la ré-ascension de la protéinurie du patient. Les IgG-IgA seraient donc les premiers biomarqueurs à se re-positiver dès le relâchement de l'immunosuppression.

4. Le rôle du sCD89 et du sCD89-IgA1 :

Le nouveau biomarqueur sCD89 semble avoir une meilleure sensibilité et spécificité de la maladie que les autres biomarqueurs dans notre étude. Le sCD89 et le complexe sCD89-IgA1 semblent être aussi des facteurs pronostiques de la N-IgA1 de l'enfant. En effet dans notre étude le sCD89 et le sCD89-IgA1 étaient liés à la protéinurie mais également aux lésions de prolifération de la classification de Oxford. Ils étaient liés à la prolifération mésangiale, endocapillaire, et extracapillaire mais également à la glomérulosclérose. Grace au marquage du Ki67 (marqueur nucléaire exprimé pendant la mitose) nous avons pu mettre en évidence les cellules en mitose. Le sCD89 et les complexes sCD89-IgA étaient liés à la prolifération cellulaire. De manière intéressante le pourcentage de Ki67 n'était pas toujours en lien avec la classification d'Oxford. Pour tous les facteurs étudiés le sCD89 était plus spécifique que le sCD89-IgA.

En termes de valeur prédictive les biomarqueurs sCD89 et sCD89-IgA avaient une meilleure valeur prédictive de la prolifération endocapillaire et extracapillaire que la protéinurie avec une supériorité pour le sCD89. Il serait donc plus intéressant de suivre le sCD89 libre ou lié à l'IgA que la protéinurie pour prédire les rechutes et l'inflammation histologique. Le clivage du sCD89 précédemment décrit était

soutenu par l'observation de l'expression abaissée du CD89 monocytaire dans la N-IgA en comparaison aux contrôles. [161] Cette diminution d'expression du CD89 était plus importante chez les enfants ayant une N-IgA progressive comparée aux enfants ayant une N-IgA non progressive. La baisse d'expression du CD89 monocytaire en lien avec le clivage du CD89 entrainerait donc une sécrétion de sCD89 et de complexes sCD89-IgA néphrotoxiques.

Les dépôts intra mésangiaux de CD89 avaient déjà été mis en évidence par des travaux antérieurs de notre équipe. [131] Dans cette étude nous avons également retrouvé les dépôts de CD89 au sein des biopsies rénales des enfants ayant une N-IgA. Grace à un triple marquage nous avons aussi pu voir la co-localisation des dépôts de CD89 avec l'IgA1 mais aussi les dépôts de CD89 seuls au sein du mésangium glomérulaire ne colocalisant pas avec l'IgA1. Cette observation supporte les dépôts sCD89-IgA mais aussi du sCD89 seul au sein du mésangium rénal et donc sa probable implication directe dans l'inflammation histologique.

En résumé les biomarqueurs sanguins pourraient donc être exploités pour la surveillance et l'adaptation thérapeutique de la N-IgA de l'enfant, évitant ainsi les biopsies rénales répétées.

5. Le rôle du sCD89 in vitro dans la prolifération mésangiale via le TfR1 et la voie PI3K/Akt/mTOR

Puisque le sCD89 et le sCD89-IgA ressortaient comme des facteurs pronostiques d'inflammation histologique, nous avons testé leur rôle sur la prolifération des cellules mésangiales humaines in vitro. En effet le sCD89 provenant d'une protéine recombinante ou provenant des enfants (séparé par HPLC et identifié en Western blot) était capable d'induire une prolifération mésangiale in vitro avec un effet dose dépendant. Les complexes sCD89-IgA provenant des complexes immuns des enfants ayant une N-IgA entrainaient également une prolifération mésangiale. Les enfants qui avaient une maladie active, et donc un taux de sCD89-IgA plus élevé, présentaient une prolifération mésangiale plus importante. Plus le poids moléculaire des complexes était important (les hauts complexes comprenant plus de CD89) plus on avait un index de prolifération mésangiale important. Dans de précédentes études les rôles pathogènes des pIgA et des Gd-IgA1 dans la prolifération mésangiale avaient déjà été étudié. [75, 342] Les complexes de haut poids moléculaires entrainaient aussi une prolifération mésangiale importante sans que le CD89 au sein des complexes n'ait été mis en évidence.[169, 170] Ici nous mettons en évidence le rôle inflammatoire in vitro du sCD89 et de ses complexes sCD89-IgA. Nous avons pu mettre en évidence également que l'effet du sCD89 passe par la voie de signalisation du récepteur TfR1. En effet l'inhibition de TfR1 par l'ajout d'une protéine recombinante TfR1 bloquait partiellement la prolifération mésangiale induite par le sCD89. Le TfR1 avait déjà été mis en évidence par notre équipe comme un récepteur aux pIgA et aux complexes sCD89-IgA. [105, 106, 172] Notre équipe avait aussi montré que le sCD89 entrainait la surexpression du TfR1 sur les cellules mésangiales et la sécrétion de cytokines pro inflammatoires. [79] Ici nous démontrons la capacité seule du sCD89 à se lier au TfR1.

Nous avons pu aussi montrer que le sCD89 utilise la voie PI3K/Akt/mTOR. En effet la rapamycine (inhibiteur de la voie mTOR) entrainait une baisse de la prolifération mésangiale par le sCD89. Il avait déjà été montré dans des études précédentes l'implication de la voie PI3K/Akt/mTOR dans la prolifération mésangiale. [343] Notre laboratoire avait aussi montré que les complexes IgA étaient dépendants de la voie PI3K/Akt/mTOR. [172] Nous montrons ici l'implication du sCD89 libre par cette même voie PI3K/Akt/mTOR.

6. Le rôle du sCD89 in vivo dans la prolifération mésangiale endocapillaire et extracapillaire

Nous avons voulu confirmer le rôle potentiel du sCD89 dans la prolifération mésangiale in vivo. Notre équipe avait déjà montré que le sCD89 était capable d'induire des dépôts mésangiaux d'IgA chez les souris α1-KI. [79] En utilisant le même protocole nous avons retrouvé également les dépôts mésangiaux d'IgA mais aussi la présence importante d'hypercellularité mésangiale. Nous avons aussi mis en évidence une prolifération des cellules pariétales et podocytaires pouvant suggérer le début d'une prolifération extracapillaire et d'une podocytopathie chez ces souris. Cette observation confirme bien le rôle inflammatoire et proliferatif retrouvé in vivo du sCD89. Le sCD89 par sa taille serait donc capable de passer les capillaires fenestrés et aller se déposer dans le glomérule. Il serait surement capable de passer la barrière de filtration glomérulaire. En effet nous avons été capable de le détecter dans les urines des souris α1-KI ayant reçu des doses importantes de sCD89 recombinant.

En résumé cette première partie a pu mettre en évidence le rôle pronostique du sCD89 seul ou lié aux IgA impliqués dans la prolifération histologique in vivo et in vitro via la voie TfR/PI3K/Akt/mTOR.

7. Les variants du collagène dans la cohorte de cIgAN

Nous avons retrouvé des variants du collagène COL4A3 à hauteur de 11 % dans notre cohorte. Les patients porteurs de variants du collagène IV sont associés à une hématurie parfois intermittente, et selon la variation causale, ceux-ci peuvent évoluer vers l'IRT avec parfois une grande diversité d'évolution au sein de la même famille. Les anomalies oculaires et la perte auditive sont rares et inconstantes voire absentes contrairement aux formes canoniques décrites chez le garçon avec la forme liée à l'X. A l'opposé du spectre phénotypique la maladie peut se présenter comme une hématurie intermittente associée à une protéinurie isolée minime et cette forme clinique (phénocopie) peut se voir dans plusieurs glomérulopathies comme la N-IgA.

La découverte de variants du collagène COL4A3 jugés pathogènes selon ACMG nous a amené à repenser le diagnostic de N-IgA chez 11% des patients. Étonnement, ces enfants présentaient des lésions proliferatives endocapillaires et extracapillaires, fait commun des N-IgA. Ces enfants semblent répondre à un traitement immunosuppresseur, puisqu'avec un suivi de 5 ans en moyenne, la protéinurie diminuait, avec disparition des syndromes néphrotiques initiaux et une amélioration des lésions histologiques, ce qui va à l'encontre de l'évolution classique d'une maladie génétique tel que conceptualisée aujourd'hui.

Comme nous l'avons déjà décrit précédemment dans l'introduction, des variants du collagène avaient déjà été retrouvés dans les cohortes familiales de N-IgA. [335]

La présence de variants du collagène semble être un facteur de mauvais pronostique d'évolution de la N-IgA de l'enfant. En effet la présentation clinique de ces enfants était plus sévère que le reste de la cohorte avec la nécessité de biopsie rénales répétées. Notre observation soulève donc la coexistence de deux pathologies, la N-IgA et le syndrome d'Alport. Bien que la présence dite de membranes basales fines était confirmée, terme aujourd'hui discuté mais déjà rapporté dans plusieurs glomérulopathies dont la N-IgA, [305] [344] nous n'étions hélas pas capable de documenter la présence d'anomalie des membranes basales sur coupes en microscopie électronique dans notre cohorte. Cependant ce critère à lui seul n'aurait à la fois pas conforté ou infirmé le diagnostic à lui seul.

Le rôle des variants du collagène de type IV reste à ce jour inexpliqué, mais suggère que des facteurs génétique puissent stratifier le risque et améliorer les classifications telle que la classification d'Oxford. Notre observation montre les limites de la description traditionnelle de la N-IgA basée sur l'histologie et la clinique. Nous soulevons la nécessité de rechercher des variants pathogènes dans les N-IgA sévères avec des groupes contrôles adéquats, voire de proposer leur recherche de manière prospective afin de clarifier leur potentiel rôle pronostic, et ce notamment chez l'enfant.

B. Perspectives

Cette étude permet de mettre en avant la nécessité d'obtenir un phénotype complet de la N-IgA de l'enfant tant sur le plan clinique, avec la protéinurie, histologique, avec la classification d'Oxford, que sur le plan des biomarqueurs sCD89, Gd-IgA1 et les complexes sCD89-IgA, IgG-IgA. Ainsi nous pourrions faire un diagnostic plus spécifique de la N-IgA qui à ce jour n'est fait que par la présence histologique de dépôts mésangiaux d'IgA à la biopsie rénale. Dans cette étude nous soulignons donc l'intérêt futur d'intégrer ces biomarqueurs pour faire le diagnostic de N-IgA.

Ces biomarqueurs ont également un intérêt pronostic pour la survie rénale puisque dans notre étude le sCD89 et les complexes sCD89-IgA1 étaient liés à la protéinurie et aux lésions d'inflammation histologique. En effet le monitoring sanguin du sCD89 et du sCD89-IgA nous permettrait donc de suivre la maladie et la réponse aux traitements immunosuppresseurs. Ce monitoring permettrait d'éviter des biopsies répétées chez ces enfants.

Le sCD89 semble être un des hits importants dans le développement de l'inflammation notamment dans la genèse des croissants. En effet, outre l'hypercellularité mésangiale retrouvée, nous retrouvions également une prolifération podocytaire ainsi que des cellules pariétales avec le marquage Ki67. La suite de ce projet serait donc de recommencer l'expérience chez les souris α1-KI en injectant du sCD89 sur une durée plus longue afin d'observer la possible apparition de prolifération extracapillaire.

Dans cette étude nous avons aussi pu mettre en évidence, en Western blot chez l'enfant ayant une N-IgA, plusieurs tailles de sCD89 pouvant correspondre à différents degrés de glycosylation du CD89. Le CD89 pourrait avoir un effet pathogène différent en fonction de son degré de glycosylation. Il serait donc intéressant de séquencer ces deux formes et de voir si l'une de ces formes entraine, in vitro, une prolifération mésangiale plus importante et une inflammation histologique plus importante qu'in vivo.

D'un point de vue génétique, il semblerait que les variants du collagène COL4A3 puissent être associés à un mauvais pronostic de la maladie. Leur recherche systématique aurait donc un intérêt au diagnostic mais également pour le suivi des patients. En cas de N-IgA persistante nécessitant des PBR de contrôle, la recherche de variants du collagène pourrait être envisagée.

D'un point de vue thérapeutique nous avons vu qu'il existait de nos jours des thérapeutiques innovantes dans la N-IgA de l'enfant. L'intérêt de cette étude a été de mettre en avant le rôle pathogène du CD89 dans la N-IgA de l'enfant. Il serait donc primordial de développer un outil permettant de cibler ces biomarqueurs en particulier le CD89.

1. Le blocage du relargage du CD89

Une des premières cibles serait d'inhiber le relargage du sCD89 et des complexes sCD89-IgA1. Des résultats non publiés de notre laboratoire (Résultats présentés au 15ème symposium de la néphropathie à IgA [345]) ont montré l'implication de la TG2 dans le relargage du sCD89 et des complexes sCD89-IgA. L'invalidation de la TG2 permettrait de limiter la libération du sCD89 et la formation des complexes sCD89-IgA circulant à partir de la surface cellulaire, tandis que sa surexpression favoriserait le clivage et la libération du récepteur. Il a été publié que la TG2 interagit avec la protéine phosphatase PP2A pouvant se lier au résidu sérine 263 de la queue intracellulaire du récepteur CD89 [346] et provoquer la déphosphorylation du résidu sérine. [84] L'expression de PP2A serait inversement corrélée avec l'expression de la TG2.

Une première cible serait donc de surexprimer PP2A réduisant ainsi le clivage et la circulation du sCD89 et donc la formation des complexes sCD89-IgA. Des données ont montré que l'activation de PP2A engendrait la phagocytose médiée par les IgA. [85] Cependant ni PP2A ni la TG2 ne sont des protéases soulignant donc une régulation indirecte dans le clivage du CD89.

Seul un inhibiteur à large spectre des métalloprotéases (MMP) ou l'utilisation de chélateurs de Ca^{2+} comme l'EDTA permettait de réduire l'excrétion du CD89. [90] Les MMP qui pourraient être impliquées seraient ADAM10 et ADAM17.[90] Bloquer ces deux MMP pourrait représenter des cibles thérapeutiques intéressantes. Une protéase intéressante comme cible thérapeutique serait la MMP9. La MMP9 a été aussi mise en évidence par notre équipe mais aussi par Koide et al montrant une augmentation de l'expression de l'ARNm de MMP-9 contrastant avec une faible expression de l'ARNm de MMP-2 dans les monocytes circulants des patients N-IgA.[347] **(Figure 23)**

La TG2 est régulée positivement par la réponse inflammatoire [348] dans la N-IgA. L'expression de la TG2 provoquerait des taux élevés de sCD89-IgA dans la N-IgA et le purpura rhumatoïde et des taux faibles chez les sujets sains. [79, 83, 157] Inhiber la TG2 serait donc une option thérapeutique intéressante.

En somme bloquer les MMP ou la TG2 (inhibiteur en phase d'essai chez la souris) pourraient être des cibles thérapeutiques potentielles pour éviter le développement de la N-IgA.

2. Le blocage du CD89 en bloquant la voie mTOR

Nous avons montré que la rapamycine était capable de bloquer l'effet proliférant du sCD89. Une des thérapeutiques envisageables serait donc d'utiliser l'évérolimus, un dérivé de la rapamycine également inhibiteur du système mTOR. [349] Un modèle de N-IgA chez le rat a montré l'efficacité de la rapamycine en diminuant la protéinurie et les dépôts d'IgA. [350, 351] Les inhibiteurs de mTOR ont aussi un intérêt dans la fibrose rénale. [352] Aussi un essai pilote contrôlé randomisé a montré l'efficacité de l'évérolimus, permettant une stabilisation de la fonction rénale et une diminution des lésions de prolifération mésangiale et endocapillaire. [353] Il a également été montré que l'évérolimus permettrait aussi de réduire les récidives de N-IgA chez les greffons. [349] L'évérolimus serait donc une option thérapeutique intéressante dans la N-IgA de l'enfant. **(Figure 23)**

3. Les inhibiteurs de protéases clivant l'IgA1

La dissociation des complexes immuns sCD89-IgA serait une arme thérapeutique cible de la N-IgA. **(Figure 23)**

Les protéases microbiennes IgA1 (IgA1-P) sont des protéines recombinantes qui permettraient d'éliminer les dépôts d'IgA1 et de dégrader les complexes immuns dans le mésangium intra-rénal. [292] Dans le modèle murin α1-KI-CD89-Tg (exprimant l'IgA1 et le CD89 humain), les IgA1-P dérivant de la bactérie H influenzae permettaient de réduire les dépôts mésangiaux d'IgA, l'inflammation et la fibrose histologique ainsi que l'hématurie. On retrouvait également une baisse du TfR1 et de la TG2. Seule la protéinurie ne diminuait pas significativement, peut-être à cause d'une durée de traitement trop courte. [293] Cette protéine avait une spécificité pour la région charnière de l'IgA1 avec un clivage spécifique sans affecter les IgA2. Cela représente une thérapie ciblée dans la N-IgA. Il est important de noter que des protéases microbiennes IgG ont déjà été utilisées chez les patients (essais IdeS) pour la

désensibilisation des patients hyperimmunisés en attente de greffe mais également dans la maladie de Goodpasture. [354]

La société Shire est en train de mettre en place un protocole clinique visant l'étude de son effet sur l'Homme. On pourrait proposer une utilisation tôt dans la maladie de l'IgA1-P afin d'éliminer rapidement les dépôts d'IgA1 et retarder le développement de la maladie. [355] Un autre intérêt de l'IgA1-P est qu'il pourrait inhiber le récepteur CD89. En effet par son effet clivant, L'IgA1 se retrouverait sous forme monomérique et induirait une réponse inhibitrice en se liant au récepteur CD89 comme décrit dans l'introduction. [39]

Cependant, l'administration à long terme d'une enzyme bactérienne exogène pourrait conduire à la génération d'anticorps contre les IgA bactériennes. Il faut aussi prendre en considération que la baisse d'IgA1 circulantes, secondaire au traitement, entrainerait un déficit immunitaire par perte de leur rôle anti-inflammatoire seulement au niveau muqueux. [356]

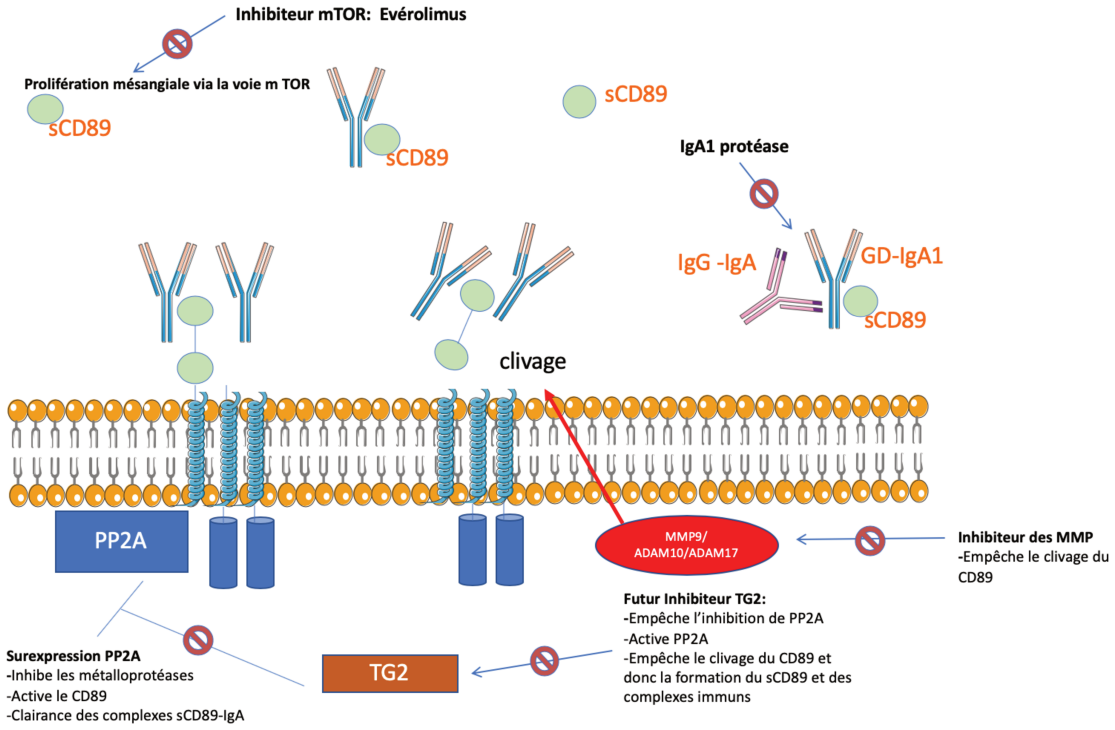


Figure 23 : Les nouvelles perspectives de thérapies ciblées

Les potentielles thérapeutiques pour bloquer le clivage du CD89 seraient d'utiliser des inhibiteurs des MMP et de la TG2 ou de pouvoir sur-exprimer PP2A. Le blocage de la voie mTOR par l'évérolimus permettrait de bloquer l'activation mésangiale par le sCD89. Enfin les IgA1-P permettraient de dégrader les complexes immuns.

Pour conclure, mon travail de thèse a permis de mettre en évidence le rôle du sCD89 libre comme un nouveau marqueur diagnostic de la N-IgA de l'enfant. Ce travail a aussi permis de mettre en évidence le rôle pro-inflammatoire intra-rénal du CD89 et de son rôle pronostique dans la progression de la maladie. Mon deuxième axe a été la mise en évidence des variants du collagène associés à un phénotype sévère de N-IgA soutenant la coexistence de 2 maladies.

Ce travail permettrait donc de pouvoir mettre en œuvre un outil diagnostique et pronostique de la N-IgA incorporant en plus des critères cliniques et histologiques connus, les biomarqueurs avec le CD89 mais aussi la recherche des variants du collagène.

IX. Bibliographie et Annexes

1. Berger, J. and N. Hinglais, *[Intercapillary deposits of IgA-IgG].* J Urol Nephrol (Paris), 1968. **74**(9): p. 694-5.
2. Berger, J., et al., *Recurrence of mesangial deposition of IgA after renal transplantation.* Kidney Int, 1975. **7**(4): p. 232-41.
3. Suzuki, H., et al., *The pathophysiology of IgA nephropathy.* J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(10): p. 1795-803.
4. Tomana, M., et al., *Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies.* J Clin Invest, 1999. **104**(1): p. 73-81.
5. Launay, P., et al., *Fcalpha receptor (CD89) mediates the development of immunoglobulin A (IgA) nephropathy (Berger's disease). Evidence for pathogenic soluble receptor-Iga complexes in patients and CD89 transgenic mice.* J Exp Med, 2000. **191**(11): p. 1999-2009.
6. Cambier, A., et al., *Clinical and histological differences between adults and children in new onset IgA nephropathy.* Pediatr Nephrol, 2020.
7. Cambier, A., et al., *Immunosuppressive Treatment in Children With IgA Nephropathy and the Clinical Value of Podocytopathic Features.* Kidney Int Rep, 2018. **3**(4): p. 916-925.
8. Cambier, A., et al., *Steroid therapy in children with IgA nephropathy.* Pediatr Nephrol, 2020. **35**(3): p. 359-366.
9. Paterson, A.D., et al., *Genome-wide linkage scan of a large family with IgA nephropathy localizes a novel susceptibility locus to chromosome 2q36.* J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(8): p. 2408-15.
10. Arnold, J.N., et al., *Mannan binding lectin and its interaction with immunoglobulins in health and in disease.* Immunol Lett, 2006. **106**(2): p. 103-10.
11. Arnold, J.N., et al., *The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins.* Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 21-50.
12. Chintalacharuvu, K.R., M. Raines, and S.L. Morrison, *Divergence of human alpha-chain constant region gene sequences. A novel recombinant alpha 2 gene.* J Immunol, 1994. **152**(11): p. 5299-304.
13. Schroeder, H.W., Jr. and L. Cavacini, *Structure and function of immunoglobulins.* J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S41-52.
14. Woof, J.M. and M.W. Russell, *Structure and function relationships in IgA.* Mucosal Immunol, 2011. **4**(6): p. 590-7.
15. Coffman, R.L., D.A. Lebman, and B. Shrader, *Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes.* J Exp Med, 1989. **170**(3): p. 1039-44.
16. Sonoda, E., et al., *Differential regulation of IgA production by TGF-beta and IL-5: TGF-beta induces surface IgA-positive cells bearing IL-5 receptor, whereas IL-5 promotes*

their survival and maturation into IgA-secreting cells. Cell Immunol, 1992. **140**(1): p. 158-72.
17. Litinskiy, M.B., et al., *DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL.* Nat Immunol, 2002. **3**(9): p. 822-9.
18. Xu, W., et al., *Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI.* Nat Immunol, 2007. **8**(3): p. 294-303.
19. He, B., et al., *Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL.* Immunity, 2007. **26**(6): p. 812-26.
20. Brandtzaeg, P. and F.E. Johansen, *Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties.* Immunol Rev, 2005. **206**: p. 32-63.
21. Monteiro, R.C. and J.G. Van De Winkel, *IgA Fc receptors.* Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 177-204.
22. Mestecky, J. and J.R. McGhee, *Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response.* Adv Immunol, 1987. **40**: p. 153-245.
23. Moreau, M.C., et al., *Increase in the population of duodenal immunoglobulin A plasmocytes in axenic mice associated with different living or dead bacterial strains of intestinal origin.* Infect Immun, 1978. **21**(2): p. 532-9.
24. Kiryluk, K., et al., *Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens.* Nat Genet, 2014. **46**(11): p. 1187-96.
25. Saint, L., M. Smith, and P.E. Hartmann, *The yield and nutrient content of colostrum and milk of women from giving birth to 1 month post-partum.* Br J Nutr, 1984. **52**(1): p. 87-95.
26. Hanson, L.A. and M. Korotkova, *The role of breastfeeding in prevention of neonatal infection.* Semin Neonatol, 2002. **7**(4): p. 275-81.
27. Mostov, K.E., M. Friedlander, and G. Blobel, *The receptor for transepithelial transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains.* Nature, 1984. **308**(5954): p. 37-43.
28. Johansen, F.E. and C.S. Kaetzel, *Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity.* Mucosal Immunol, 2011. **4**(6): p. 598-602.
29. Zickerman, A.M., et al., *IgA myeloma presenting as Henoch-Schönlein purpura with nephritis.* Am J Kidney Dis, 2000. **36**(3): p. E19.
30. Robinson, J.K., et al., *A mucosal IgA-mediated excretory immune system in vivo.* J Immunol, 2001. **166**(6): p. 3688-92.
31. Fernandez, M.I., et al., *Anti-inflammatory role for intracellular dimeric immunoglobulin a by neutralization of lipopolysaccharide in epithelial cells.* Immunity, 2003. **18**(6): p. 739-49.

32. Royle, L., et al., *Secretory IgA N- and O-glycans provide a link between the innate and adaptive immune systems.* J Biol Chem, 2003. **278**(22): p. 20140-53.
33. Corthesy, B., *Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces.* Front Immunol, 2013. **4**: p. 185.
34. Grossetete, B., et al., *Down-regulation of Fc alpha receptors on blood cells of IgA nephropathy patients: evidence for a negative regulatory role of serum IgA.* Kidney Int, 1998. **53**(5): p. 1321-35.
35. Van Epps, D.E. and R.C. Williams, Jr., *Suppression of leukocyte chemotaxis by human IgA myeloma components.* J Exp Med, 1976. **144**(5): p. 1227-42.
36. Wolf, H.M., et al., *Human serum IgA downregulates the release of inflammatory cytokines (tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6) in human monocytes.* Blood, 1994. **83**(5): p. 1278-88.
37. Wilton, J.M., H.H. Renggli, and T. Lehner, *A functional comparison of blood and gingival inflammatory polymorphonuclear leucocytes in man.* Clin Exp Immunol, 1977. **27**(1): p. 152-8.
38. Nikolova, E.B. and M.W. Russell, *Dual function of human IgA antibodies: inhibition of phagocytosis in circulating neutrophils and enhancement of responses in IL-8-stimulated cells.* J Leukoc Biol, 1995. **57**(6): p. 875-82.
39. Pasquier, B., et al., *Identification of FcalphaRI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcRgamma ITAM.* Immunity, 2005. **22**(1): p. 31-42.
40. Kerr, M.A., *The structure and function of human IgA.* Biochem J, 1990. **271**(2): p. 285-96.
41. Ben Mkaddem, S., et al., *Anti-inflammatory role of the IgA Fc receptor (CD89): from autoimmunity to therapeutic perspectives.* Autoimmun Rev, 2013. **12**(6): p. 666-9.
42. Osborne, B.A., et al., *Evolution of the IgA heavy chain gene in the genus Mus.* Genetics, 1988. **119**(4): p. 925-31.
43. Woof, J.M. and J. Mestecky, *Mucosal immunoglobulins.* Immunol Rev, 2005. **206**: p. 64-82.
44. Plaut, A.G., et al., *Neisseria gonorrhoeae and neisseria meningitidis: extracellular enzyme cleaves human immunoglobulin A.* Science, 1975. **190**(4219): p. 1103-5.
45. Mestecky, J., et al., *Role of aberrant glycosylation of IgA1 molecules in the pathogenesis of IgA nephropathy.* Kidney Blood Press Res, 2008. **31**(1): p. 29-37.
46. Robert, T., et al., *Molecular Insights into the Pathogenesis of IgA Nephropathy.* Trends Mol Med, 2015. **21**(12): p. 762-75.
47. Yoo, E.M., et al., *Structural requirements for polymeric immunoglobulin assembly and association with J chain.* J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33771-7.
48. Li, G.S., et al., *Variants of C1GALT1 gene are associated with the genetic susceptibility to IgA nephropathy.* Kidney Int, 2007. **71**(5): p. 448-53.
49. Pirulli, D., et al., *Genetic variant of C1GalT1 contributes to the susceptibility to IgA nephropathy.* J Nephrol, 2009. **22**(1): p. 152-9.

50. Wang, W., et al., *Interaction of C1GALT1-IL5RA on the susceptibility to IgA nephropathy in Southern Han Chinese.* J Hum Genet, 2013. **58**(1): p. 40-6.
51. Qin, W., et al., *Peripheral B lymphocyte beta1,3-galactosyltransferase and chaperone expression in immunoglobulin A nephropathy.* J Intern Med, 2005. **258**(5): p. 467-77.
52. Ji, L., et al., *Astragalus membranaceus up-regulate Cosmc expression and reverse IgA dys-glycosylation in IgA nephropathy.* BMC Complement Altern Med, 2014. **14**: p. 195.
53. Ju, T. and R.D. Cummings, *A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 beta 3-galactosyltransferase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16613-8.
54. Allen, A.C., et al., *Leucocyte beta 1,3 galactosyltransferase activity in IgA nephropathy.* Nephrol Dial Transplant, 1997. **12**(4): p. 701-6.
55. Raska, M., et al., *Identification and characterization of CMP-NeuAc:GalNAc-IgA1 alpha2,6-sialyltransferase in IgA1-producing cells.* J Mol Biol, 2007. **369**(1): p. 69-78.
56. Yamada, K., et al., *Down-regulation of core 1 beta1,3-galactosyltransferase and Cosmc by Th2 cytokine alters O-glycosylation of IgA1.* Nephrol Dial Transplant, 2010. **25**(12): p. 3890-7.
57. Stuchlova Horynova, M., et al., *N-Acetylgalactosaminide α2,6-sialyltransferase II is a candidate enzyme for sialylation of galactose-deficient IgA1, the key autoantigen in IgA nephropathy.* Nephrol Dial Transplant, 2015. **30**(2): p. 234-8.
58. Mestecky, J., et al., *IgA nephropathy: molecular mechanisms of the disease.* Annu Rev Pathol, 2013. **8**: p. 217-40.
59. Pirulli, D., et al., *Genetic variant of C1GalT1 contributes to the susceptibility to IgA nephropathy.* J Nephrol, 2009. **22**(1): p. 152-9.
60. Sun, Q., et al., *DNA methylation in cosmc promoter region and aberrantly glycosylated IgA1 associated with pediatric IgA nephropathy.* PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0112305.
61. Smith, A.C., et al., *O-glycosylation of serum IgD in IgA nephropathy.* J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(4): p. 1192-9.
62. Chintalacharuvu, S.R. and S.N. Emancipator, *The glycosylation of IgA produced by murine B cells is altered by Th2 cytokines.* J Immunol, 1997. **159**(5): p. 2327-33.
63. Chintalacharuvu, S.R., et al., *T cell cytokines determine the severity of experimental IgA nephropathy by regulating IgA glycosylation.* Clin Exp Immunol, 2001. **126**(2): p. 326-33.
64. De Angelis, M., et al., *Microbiota and metabolome associated with immunoglobulin A nephropathy (IgAN).* PLoS One, 2014. **9**(6): p. e99006.
65. Schmitt, R., et al., *The combined role of galactose-deficient IgA1 and streptococcal IgA-binding M Protein in inducing IL-6 and C3 secretion from human mesangial cells: implications for IgA nephropathy.* J Immunol, 2014. **193**(1): p. 317-26.

66. Harper, S.J., et al., *Increased dimeric IgA-producing B cells in tonsils in IgA nephropathy determined by in situ hybridization for J chain mRNA.* Clin Exp Immunol, 1995. **101**(3): p. 442-8.
67. Barratt, J., et al., *Immune complex formation in IgA nephropathy: a case of the 'right' antibodies in the 'wrong' place at the 'wrong' time?* Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(12): p. 3620-3.
68. Batra, A., et al., *T-cell homing receptor expression in IgA nephropathy.* Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(9): p. 2540-8.
69. Kremer, E.J., et al., *The gene for the human IgA Fc receptor maps to 19q13.4.* Hum Genet, 1992. **89**(1): p. 107-8.
70. Monteiro, R.C., H. Kubagawa, and M.D. Cooper, *Cellular distribution, regulation, and biochemical nature of an Fc alpha receptor in humans.* J Exp Med, 1990. **171**(3): p. 597-613.
71. Maliszewski, C.R., et al., *Expression cloning of a human Fc receptor for IgA.* J Exp Med, 1990. **172**(6): p. 1665-72.
72. Mota, G., et al., *Human NK cells express Fc receptors for IgA which mediate signal transduction and target cell killing.* Eur J Immunol, 2003. **33**(8): p. 2197-205.
73. Otten, M.A. and M. van Egmond, *The Fc receptor for IgA (FcalphaRI, CD89).* Immunol Lett, 2004. **92**(1-2): p. 23-31.
74. Smith, P.D., et al., *Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities.* J Immunol, 2001. **167**(5): p. 2651-6.
75. Moura, I.C., et al., *Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy.* J Exp Med, 2001. **194**(4): p. 417-25.
76. Gardiner, E.E., et al., *Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP)VI and GPIb-IX-V by ADAM family metalloproteinases.* J Thromb Haemost, 2007. **5**(7): p. 1530-7.
77. Wines, B.D., et al., *The interaction of Fc alpha RI with IgA and its implications for ligand binding by immunoreceptors of the leukocyte receptor cluster.* J Immunol, 2001. **166**(3): p. 1781-9.
78. Lu, J., et al., *Recognition and functional activation of the human IgA receptor (FcalphaRI) by C-reactive protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(12): p. 4974-9.
79. Berthelot, L., et al., *Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors.* J Exp Med, 2012. **209**(4): p. 793-806.
80. de Tymowski, C., et al., *CD89 Is a Potent Innate Receptor for Bacteria and Mediates Host Protection from Sepsis.* Cell Rep, 2019. **27**(3): p. 762-775 e5.
81. Herr, A.B., E.R. Ballister, and P.J. Bjorkman, *Insights into IgA-mediated immune responses from the crystal structures of human FcalphaRI and its complex with IgA1-Fc.* Nature, 2003. **423**(6940): p. 614-20.

82. Morton, H.C., et al., *Functional association between the human myeloid immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and FcR gamma chain. Molecular basis for CD89/FcR gamma chain association.* J Biol Chem, 1995. **270**(50): p. 29781-7.
83. Launay, P., et al., *Alternative endocytic pathway for immunoglobulin A Fc receptors (CD89) depends on the lack of FcRgamma association and protects against degradation of bound ligand.* J Biol Chem, 1999. **274**(11): p. 7216-25.
84. Bracke, M., et al., *Cytokine-induced inside-out activation of FcalphaR (CD89) is mediated by a single serine residue (S263) in the intracellular domain of the receptor.* Blood, 2001. **97**(11): p. 3478-83.
85. Bakema, J.E., et al., *Inside-out regulation of Fc alpha RI (CD89) depends on PP2A.* J Immunol, 2008. **181**(6): p. 4080-8.
86. Monteiro, R.C., et al., *Definition of immunoglobulin A receptors on eosinophils and their enhanced expression in allergic individuals.* J Clin Invest, 1993. **92**(4): p. 1681-5.
87. van Zandbergen, G., et al., *Crosslinking of the human Fc receptor for IgA (FcalphaRI/CD89) triggers FcR gamma-chain-dependent shedding of soluble CD89.* J Immunol, 1999. **163**(11): p. 5806-12.
88. Xue, J., et al., *Deglycosylation of FcalphaR at N58 increases its binding to IgA.* Glycobiology, 2010. **20**(7): p. 905-15.
89. Toyabe, S., et al., *IgA nephropathy-specific expression of the IgA Fc receptors (CD89) on blood phagocytic cells.* Clin Exp Immunol, 1997. **110**(2): p. 226-32.
90. Peng, M., et al., *Ectodomain shedding of Fcalpha receptor is mediated by ADAM10 and ADAM17.* Immunology, 2010. **130**(1): p. 83-91.
91. Papista, C., L. Berthelot, and R.C. Monteiro, *Dysfunctions of the Iga system: a common link between intestinal and renal diseases.* Cell Mol Immunol, 2011. **8**(2): p. 126-34.
92. Bracke, M., et al., *Differential effects of the T helper cell type 2-derived cytokines IL-4 and IL-5 on ligand binding to IgG and IgA receptors expressed by human eosinophils.* J Immunol, 1997. **159**(3): p. 1459-65.
93. Weisbart, R.H., et al., *GM-CSF induces human neutrophil IgA-mediated phagocytosis by an IgA Fc receptor activation mechanism.* Nature, 1988. **332**(6165): p. 647-8.
94. Ghumra, A., et al., *Structural requirements for the interaction of human IgM and IgA with the human Fcalpha/mu receptor.* Eur J Immunol, 2009. **39**(4): p. 1147-56.
95. Kaetzel, C.S., et al., *The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for IgA.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(19): p. 8796-800.
96. Jackson, L., C.T. Cady, and J.C. Cambier, *TLR4-mediated signaling induces MMP9-dependent cleavage of B cell surface CD23.* J Immunol, 2009. **183**(4): p. 2585-92.
97. Van Spriel, A.B., et al., *Mac-1 (CD11b/CD18) as accessory molecule for Fc alpha R (CD89) binding of IgA.* J Immunol, 2002. **169**(7): p. 3831-6.
98. Sakamoto, N., et al., *A novel Fc receptor for IgA and IgM is expressed on both hematopoietic and non-hematopoietic tissues.* Eur J Immunol, 2001. **31**(5): p. 1310-6.

99. Kikuno, K., et al., *Unusual biochemical features and follicular dendritic cell expression of human Fcalpha/mu receptor.* Eur J Immunol, 2007. **37**(12): p. 3540-50.
100. Kurita, N., S. Honda, and A. Shibuya, *Increased serum IgA in Fcalpha/muR-deficient mice on the (129 x C57BL/6) F1 genetic background.* Mol Immunol, 2015. **63**(2): p. 367-72.
101. McDonald, K.J., et al., *Expression of Fc alpha/mu receptor by human mesangial cells: a candidate receptor for immune complex deposition in IgA nephropathy.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **290**(1): p. 438-42.
102. Schneider, C., et al., *Primary structure of human transferrin receptor deduced from the mRNA sequence.* Nature, 1984. **311**(5987): p. 675-8.
103. Lebrón, J.A., et al., *Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor.* Cell, 1998. **93**(1): p. 111-23.
104. Enns, C.A., et al., *Acquisition of the functional properties of the transferrin receptor during its biosynthesis.* J Biol Chem, 1991. **266**(20): p. 13272-7.
105. Moura, I.C., et al., *Glycosylation and size of IgA1 are essential for interaction with mesangial transferrin receptor in IgA nephropathy.* J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(3): p. 622-34.
106. Coulon, S., et al., *Polymeric IgA1 controls erythroblast proliferation and accelerates erythropoiesis recovery in anemia.* Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1456-65.
107. Stockert, R.J., et al., *IgA interaction with the asialoglycoprotein receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(20): p. 6229-31.
108. Decot, V., et al., *Heterogeneity of expression of IgA receptors by human, mouse, and rat eosinophils.* J Immunol, 2005. **174**(2): p. 628-35.
109. Tomana, M., R. Kulhavy, and J. Mestecky, *Receptor-mediated binding and uptake of immunoglobulin A by human liver.* Gastroenterology, 1988. **94**(3): p. 762-70.
110. Rifai, A., et al., *The N-glycans determine the differential blood clearance and hepatic uptake of human immunoglobulin (Ig)A1 and IgA2 isotypes.* J Exp Med, 2000. **191**(12): p. 2171-82.
111. Baumann, J., C.G. Park, and N.J. Mantis, *Recognition of secretory IgA by DC-SIGN: implications for immune surveillance in the intestine.* Immunol Lett, 2010. **131**(1): p. 59-66.
112. McGreal, E.P., L. Martinez-Pomares, and S. Gordon, *Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system.* Mol Immunol, 2004. **41**(11): p. 1109-21.
113. Geijtenbeek, T.B., et al., *Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses.* Cell, 2000. **100**(5): p. 575-85.
114. Geijtenbeek, T.B., et al., *DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells.* Cell, 2000. **100**(5): p. 587-97.

115. Diana, J., et al., *Secretory IgA induces tolerogenic dendritic cells through SIGNR1 dampening autoimmunity in mice.* J Immunol, 2013. **191**(5): p. 2335-43.
116. Matesanz-Isabel, J., et al., *New B-cell CD molecules.* Immunol Lett, 2011. **134**(2): p. 104-12.
117. Wilson, T.J., A. Fuchs, and M. Colonna, *Cutting edge: human FcRL4 and FcRL5 are receptors for IgA and IgG.* J Immunol, 2012. **188**(10): p. 4741-5.
118. Andre, P.M., P. Le Pogamp, and D. Chevet, *Impairment of jacalin binding to serum IgA in IgA nephropathy.* J Clin Lab Anal, 1990. **4**(2): p. 115-9.
119. Trascasa, M.L., et al., *IgA glomerulonephritis (Berger's disease): evidence of high serum levels of polymeric IgA.* Clin Exp Immunol, 1980. **42**(2): p. 247-54.
120. Monteiro, R.C., et al., *Serum IgA preferentially binds to cationic polypeptides in IgA nephropathy.* Clin Exp Immunol, 1988. **73**(2): p. 300-6.
121. Allen, A.C., et al., *Mesangial IgA1 in IgA nephropathy exhibits aberrant O-glycosylation: observations in three patients.* Kidney Int, 2001. **60**(3): p. 969-73.
122. Conley, M.E., M.D. Cooper, and A.F. Michael, *Selective deposition of immunoglobulin A1 in immunoglobulin A nephropathy, anaphylactoid purpura nephritis, and systemic lupus erythematosus.* J Clin Invest, 1980. **66**(6): p. 1432-6.
123. Tomino, Y., et al., *Detection of polymeric IgA in glomeruli from patients with IgA nephropathy.* Clin Exp Immunol, 1982. **49**(2): p. 419-25.
124. Monteiro, R.C., et al., *Charge and size of mesangial IgA in IgA nephropathy.* Kidney Int, 1985. **28**(4): p. 666-71.
125. Allen, A.C., et al., *Abnormal IgA glycosylation in Henoch-Schönlein purpura restricted to patients with clinical nephritis.* Nephrol Dial Transplant, 1998. **13**(4): p. 930-4.
126. Gharavi, A.G., et al., *Aberrant IgA1 glycosylation is inherited in familial and sporadic IgA nephropathy.* J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(5): p. 1008-14.
127. Moldoveanu, Z., et al., *Patients with IgA nephropathy have increased serum galactose-deficient IgA1 levels.* Kidney Int, 2007. **71**(11): p. 1148-54.
128. Hastings, M.C., et al., *Serum galactose-deficient IgA1 level is not associated with proteinuria in children with IgA nephropathy.* Int J Nephrol, 2012. **2012**: p. 315467.
129. Zhao, N., et al., *The level of galactose-deficient IgA1 in the sera of patients with IgA nephropathy is associated with disease progression.* Kidney Int, 2012. **82**(7): p. 790-6.
130. Suzuki, H., et al., *Galactose-Deficient IgA1 as a Candidate Urinary Polypeptide Marker of IgA Nephropathy?* Dis Markers, 2016. **2016**: p. 7806438.
131. Berthelot, L., et al., *Recurrent IgA nephropathy is predicted by altered glycosylated IgA, autoantibodies and soluble CD89 complexes.* Kidney Int, 2015. **88**(4): p. 815-22.
132. Sun, Q., et al., *Aberrant IgA1 Glycosylation in IgA Nephropathy: A Systematic Review.* PLoS One, 2016. **11**(11): p. e0166700.
133. Duchez, S., et al., *Premature replacement of mu with alpha immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(7): p. 3064-9.

134. Camilla, R., et al., *Oxidative stress and galactose-deficient IgA1 as markers of progression in IgA nephropathy.* Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(8): p. 1903-11.
135. Kiryluk, K., et al., *Aberrant glycosylation of IgA1 is inherited in both pediatric IgA nephropathy and Henoch-Schonlein purpura nephritis.* Kidney Int, 2011. **80**(1): p. 79-87.
136. Wada, Y., et al., *Clinical significance of serum and mesangial galactose-deficient IgA1 in patients with IgA nephropathy.* PLoS One, 2018. **13**(11): p. e0206865.
137. Jiang, M., et al., *Serum galactose-deficient IgA1 levels in children with IgA nephropathy.* Int J Clin Exp Med, 2015. **8**(5): p. 7861-6.
138. Mizerska-Wasiak, M., et al., *Serum GDIgA1 levels in children with IgA nephropathy and Henoch-Schonlein nephritis.* Cent Eur J Immunol, 2018. **43**(2): p. 162-167.
139. Irabu, H., et al., *Clinical Significance of Serum Galactose-Deficient IgA1 Level in Children with IgA Nephropathy.* J Immunol Res, 2020. **2020**: p. 4284379.
140. Hastings, M.C., et al., *Galactose-deficient IgA1 in African Americans with IgA nephropathy: serum levels and heritability.* Clin J Am Soc Nephrol, 2010. **5**(11): p. 2069-74.
141. Valentijn, R.M., et al., *Circulating and mesangial secretory component-binding IgA-1 in primary IgA nephropathy.* Kidney Int, 1984. **26**(5): p. 760-6.
142. Yoshikawa, N., K. Iijima, and H. Ito, *IgA nephropathy in children.* Nephron, 1999. **83**(1): p. 1-12.
143. van der Boog, P.J., et al., *Fc alpha RI/CD89 circulates in human serum covalently linked to IgA in a polymeric state.* J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1252-8.
144. Kokubo, T., et al., *Protective role of IgA1 glycans against IgA1 self-aggregation and adhesion to extracellular matrix proteins.* J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(11): p. 2048-54.
145. Cisar, J.O., et al., *Lectin recognition of host-like saccharide motifs in streptococcal cell wall polysaccharides.* Glycobiology, 1995. **5**(7): p. 655-62.
146. Yang, J., et al., *Structure and molecular characterization of Streptococcus pneumoniae capsular polysaccharide 10F by carbohydrate engineering in Streptococcus oralis.* J Biol Chem, 2010. **285**(31): p. 24217-27.
147. D'Arrigo, I., et al., *Diverse IgG serum response to novel glycopeptide epitopes detected within immunodominant stretches of Epstein-Barr virus glycoprotein 350/220: diagnostic potential of O-glycopeptide microarrays.* Glycoconj J, 2013. **30**(7): p. 633-40.
148. Schmitt, R., et al., *Tissue deposits of IgA-binding streptococcal M proteins in IgA nephropathy and Henoch-Schonlein purpura.* Am J Pathol, 2010. **176**(2): p. 608-18.
149. Takahashi, A., et al., *Detection of enteroviruses in renal biopsies from patients with immunoglobulin A nephropathy.* Pediatr Nephrol, 2005. **20**(11): p. 1578-82.
150. Suzuki, S., et al., *Haemophilus parainfluenzae antigen and antibody in renal biopsy samples and serum of patients with IgA nephropathy.* Lancet, 1994. **343**(8888): p. 12-6.

151. Suzuki, H., et al., *Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity.* J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1668-77.
152. Yanagawa, H., et al., *A panel of serum biomarkers differentiates IgA nephropathy from other renal diseases.* PLoS One, 2014. **9**(5): p. e98081.
153. Berthoux, F., et al., *Autoantibodies targeting galactose-deficient IgA1 associate with progression of IgA nephropathy.* J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(9): p. 1579-87.
154. Jennette, J.C., *The immunohistology of IgA nephropathy.* Am J Kidney Dis, 1988. **12**(5): p. 348-52.
155. Bellur, S.S., et al., *Immunostaining findings in IgA nephropathy: correlation with histology and clinical outcome in the Oxford classification patient cohort.* Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(8): p. 2533-6.
156. Nasri, H., *IgG deposition in IgA nephropathy patients.* J Renal Inj Prev, 2013. **2**(1): p. 11-3.
157. Pillebout, E., et al., *Biomarkers of IgA vasculitis nephritis in children.* PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0188718.
158. Zhou, N., et al., *[Role of IgG antibody to galactose-deficient IgA1 in children with IgA nephropathy].* Zhonghua Er Ke Za Zhi, 2017. **55**(9): p. 663-667.
159. Mestecky, J., et al., *Defective galactosylation and clearance of IgA1 molecules as a possible etiopathogenic factor in IgA nephropathy.* Contrib Nephrol, 1993. **104**: p. 172-82.
160. Floege, J., I.C. Moura, and M.R. Daha, *New insights into the pathogenesis of IgA nephropathy.* Semin Immunopathol, 2014. **36**(4): p. 431-42.
161. Grossetête, B., et al., *Down-regulation of Fc alpha receptors on blood cells of IgA nephropathy patients: evidence for a negative regulatory role of serum IgA.* Kidney Int, 1998. **53**(5): p. 1321-35.
162. Kanamaru, Y., et al., *Fc alpha receptor I activation induces leukocyte recruitment and promotes aggravation of glomerulonephritis through the FcR gamma adaptor.* Eur J Immunol, 2007. **37**(4): p. 1116-28.
163. Vuong, M.T., et al., *Association of soluble CD89 levels with disease progression but not susceptibility in IgA nephropathy.* Kidney Int, 2010. **78**(12): p. 1281-7.
164. Jhee, J.H., et al., *Circulating CD89-IgA complex does not predict deterioration of kidney function in Korean patients with IgA nephropathy.* Clin Chem Lab Med, 2017. **56**(1): p. 75-85.
165. Cambier, A., et al., *New therapeutic perspectives for IgA nephropathy in children.* Pediatr Nephrol, 2020.
166. van der Boog, P.J., et al., *Injection of recombinant FcalphaRI/CD89 in mice does not induce mesangial IgA deposition.* Nephrol Dial Transplant, 2004. **19**(11): p. 2729-36.
167. Blank, U., et al., *Inhibitory ITAMs as novel regulators of immunity.* Immunol Rev, 2009. **232**(1): p. 59-71.

168. Launay, P., et al., *IgA Fc receptor (CD89) activation enables coupling to syk and Btk tyrosine kinase pathways: differential signaling after IFN-gamma or phorbol ester stimulation.* J Leukoc Biol, 1998. **63**(5): p. 636-42.
169. Novak, J., et al., *IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy differentially affect proliferation of mesangial cells.* Kidney Int, 2005. **67**(2): p. 504-13.
170. Novak, J., et al., *IgA1 immune complexes from pediatric patients with IgA nephropathy activate cultured human mesangial cells.* Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(11): p. 3451-7.
171. Lai, K.N., et al., *IgA nephropathy.* Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16001.
172. Tamouza, H., et al., *The IgA1 immune complex-mediated activation of the MAPK/ERK kinase pathway in mesangial cells is associated with glomerular damage in IgA nephropathy.* Kidney Int, 2012. **82**(12): p. 1284-96.
173. Conley, M.E., et al., *Differentiation of human B cells expressing the IgA subclasses as demonstrated by monoclonal hybridoma antibodies.* J Immunol, 1980. **125**(5): p. 2311-6.
174. Suzuki, S., et al., *Immunohistochemical characterization of glomerular IgA deposits in IgA nephropathy.* Clin Nephrol, 1990. **33**(2): p. 66-71.
175. Leung, J.C., et al., *Absence of CD89, polymeric immunoglobulin receptor, and asialoglycoprotein receptor on human mesangial cells.* J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(2): p. 241-9.
176. Bagheri, N., S.R. Chintalacharuvu, and S.N. Emancipator, *Proinflammatory cytokines regulate Fc alphaR expression by human mesangial cells in vitro.* Clin Exp Immunol, 1997. **107**(2): p. 404-9.
177. Barratt, J., et al., *Identification of a novel Fcalpha receptor expressed by human mesangial cells.* Kidney Int, 2000. **57**(5): p. 1936-48.
178. Westerhuis, R., et al., *Human mesangial cells in culture and in kidney sections fail to express Fc alpha receptor (CD89).* J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(4): p. 770-8.
179. Diven, S.C., et al., *IgA induced activation of human mesangial cells: independent of FcalphaR1 (CD 89).* Kidney Int, 1998. **54**(3): p. 837-47.
180. Radoshitzky, S.R., et al., *Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses.* Nature, 2007. **446**(7131): p. 92-6.
181. Schmidt, P.J., et al., *The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression.* Cell Metab, 2008. **7**(3): p. 205-14.
182. Lebreton, C., et al., *Interactions among secretory immunoglobulin A, CD71, and transglutaminase-2 affect permeability of intestinal epithelial cells to gliadin peptides.* Gastroenterology, 2012. **143**(3): p. 698-707 e4.
183. Haddad, E., et al., *Enhanced expression of the CD71 mesangial IgA1 receptor in Berger disease and Henoch-Schonlein nephritis: association between CD71 expression and IgA deposits.* J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(2): p. 327-37.

184. Kaneko, Y., et al., *Integrin alpha1/beta1 and alpha2/beta1 as a receptor for IgA1 in human glomerular mesangial cells in IgA nephropathy.* Int Immunol, 2012. **24**(4): p. 219-32.
185. Molyneux, K., et al., *beta1,4-galactosyltransferase 1 is a novel receptor for IgA in human mesangial cells.* Kidney Int, 2017. **92**(6): p. 1458-1468.
186. Shweke, N., et al., *Tissue transglutaminase contributes to interstitial renal fibrosis by favoring accumulation of fibrillar collagen through TGF-beta activation and cell infiltration.* Am J Pathol, 2008. **173**(3): p. 631-42.
187. Tamouza, H., et al., *The IgA1 immune complex–mediated activation of the MAPK/ERK kinase pathway in mesangial cells is associated with glomerular damage in IgA nephropathy.* Kidney international, 2012. **82**(12): p. 1284-1296.
188. Ikee, R., et al., *Involvement of transglutaminase-2 in pathological changes in renal disease.* Nephron Clin Pract, 2007. **105**(3): p. c139-46.
189. Wang, Y., et al., *Binding capacity and pathophysiological effects of IgA1 from patients with IgA nephropathy on human glomerular mesangial cells.* Clin Exp Immunol, 2004. **136**(1): p. 168-75.
190. Kim, M.J., et al., *Spleen tyrosine kinase is important in the production of proinflammatory cytokines and cell proliferation in human mesangial cells following stimulation with IgA1 isolated from IgA nephropathy patients.* J Immunol, 2012. **189**(7): p. 3751-8.
191. Leung, J.C., et al., *Synthesis of TNF-alpha by mesangial cells cultured with polymeric anionic IgA--role of MAPK and NF-kappaB.* Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(1): p. 72-81.
192. Chan, W.L., et al., *BMP-7 protects mesangial cells from injury by polymeric IgA.* Kidney Int, 2008. **74**(8): p. 1026-39.
193. Ng, W.L., et al., *Peripheral glomerular capillary wall lesions in IgA nephropathy and their implications.* Pathology, 1984. **16**(3): p. 324-330.
194. Lemley, K.V., et al., *Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy.* Kidney international, 2002. **61**(4): p. 1475-1485.
195. Hara, M., T. Yanagihara, and I. Kihara, *Cumulative excretion of urinary podocytes reflects disease progression in IgA nephropathy and Schönlein-Henoch purpura nephritis.* Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2007. **2**(2): p. 231-238.
196. Lai, K.N., et al., *Podocyte injury induced by mesangial-derived cytokines in IgA nephropathy.* Nephrology Dialysis Transplantation, 2009. **24**(1): p. 62-72.
197. Lai, K.N., et al., *Polymeric IgA1 from patients with IgA nephropathy upregulates transforming growth factor-beta synthesis and signal transduction in human mesangial cells via the renin-angiotensin system.* J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(12): p. 3127-37.

198. McGrogan, A., C.F. Franssen, and C.S. de Vries, *The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature.* Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(2): p. 414-30.
199. Coppo, R., *Clinical and histological risk factors for progression of IgA nephropathy: an update in children, young and adult patients.* J Nephrol, 2017. **30**(3): p. 339-346.
200. *Chapter 10: Immunoglobulin A nephropathy.* Kidney Int Suppl (2011), 2012. **2**(2): p. 209-217.
201. Saint-Andre, J.P., et al., *[Nephrotic syndrome in a child, with minimal glomerular lesions and mesangial IgA deposits].* Nouv Presse Med, 1980. **9**(8): p. 531-2.
202. *Association of IgA nephropathy with steroid-responsive nephrotic syndrome. A report of the Southwest Pediatric Nephrology Study Group.* Am J Kidney Dis, 1985. **5**(3): p. 157-64.
203. Shen, H., et al., *Clinical characteristics of concomitant nephrotic IgA nephropathy and minimal change disease in children.* Nephron, 2015. **130**(1): p. 21-8.
204. Herlitz, L.C., et al., *IgA nephropathy with minimal change disease.* Clin J Am Soc Nephrol, 2014. **9**(6): p. 1033-9.
205. Kidney Disease: Improving Global Outcomes, C.K.D.M.B.D.W.G., *KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD).* Kidney Int Suppl, 2009(113): p. S1-130.
206. Roccatello, D., et al., *Report on intensive treatment of extracapillary glomerulonephritis with focus on crescentic IgA nephropathy.* Nephrol Dial Transplant, 1995. **10**(11): p. 2054-9.
207. Niaudet, P., et al., *Primary IgA nephropathies in children: prognosis and treatment.* Adv Nephrol Necker Hosp, 1993. **22**: p. 121-40.
208. Kawasaki, Y., et al., *Long-term follow up of pediatric immunoglobulin A nephropathy treated with tonsillectomy plus methylprednisolone pulse therapy.* Pediatr Int, 2017. **59**(1): p. 41-47.
209. Welch, T.R., A.J. McAdams, and A. Berry, *Rapidly progressive IgA nephropathy.* Am J Dis Child, 1988. **142**(7): p. 789-93.
210. Itami, N., et al., *Does methylprednisolone pulse therapy deteriorate the course of rapidly progressive IgA nephropathy?* Am J Dis Child, 1989. **143**(4): p. 441-2.
211. Kurts, C., et al., *The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications.* Nat Rev Immunol, 2013. **13**(10): p. 738-53.
212. Shima, Y., et al., *Spontaneous remission in children with IgA nephropathy.* Pediatr Nephrol, 2013. **28**(1): p. 71-6.
213. Kamei, K., et al., *Proteinuria during Follow-Up Period and Long-Term Renal Survival of Childhood IgA Nephropathy.* PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0150885.
214. Coppo, R., et al., *Risk factors for progression in children and young adults with IgA nephropathy: an analysis of 261 cases from the VALIGA European cohort.* Pediatr Nephrol, 2017. **32**(1): p. 139-150.

215. Trimarchi, H., et al., *Oxford Classification of IgA nephropathy 2016: an update from the IgA Nephropathy Classification Working Group.* Kidney Int, 2017. **91**(5): p. 1014-1021.
216. Working Group of the International Ig, A.N.N., et al., *The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility.* Kidney Int, 2009. **76**(5): p. 546-56.
217. Edstrom Halling, S., M.P. Soderberg, and U.B. Berg, *Predictors of outcome in paediatric IgA nephropathy with regard to clinical and histopathological variables (Oxford classification).* Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(2): p. 715-22.
218. Le, W., et al., *Validation of the Oxford classification of IgA nephropathy for pediatric patients from China.* BMC Nephrol, 2012. **13**: p. 158.
219. Shima, Y., et al., *Validity of the Oxford classification of IgA nephropathy in children.* Pediatr Nephrol, 2012. **27**(5): p. 783-92.
220. El Karoui, K., et al., *Focal segmental glomerulosclerosis plays a major role in the progression of IgA nephropathy. II. Light microscopic and clinical studies.* Kidney international, 2011. **79**(6): p. 643-654.
221. Bellur, S.S., et al., *Evidence from the Oxford Classification cohort supports the clinical value of subclassification of focal segmental glomerulosclerosis in IgA nephropathy.* Kidney Int, 2016.
222. Ikezumi, Y., et al., *Histological differences in new-onset IgA nephropathy between children and adults.* Nephrol Dial Transplant, 2006. **21**(12): p. 3466-74.
223. Roberts, I.S., *Pathology of IgA nephropathy.* Nat Rev Nephrol, 2014. **10**(8): p. 445-54.
224. Gale, D.P., et al., *Galactosylation of IgA1 Is Associated with Common Variation in C1GALT1.* J Am Soc Nephrol, 2017. **28**(7): p. 2158-2166.
225. Hall, Y.N., et al., *Race/ethnicity and disease severity in IgA nephropathy.* BMC Nephrol, 2004. **5**: p. 10.
226. Koyama, A., M. Igarashi, and M. Kobayashi, *Natural history and risk factors for immunoglobulin A nephropathy in Japan. Research Group on Progressive Renal Diseases.* Am J Kidney Dis, 1997. **29**(4): p. 526-32.
227. Wyatt, R.J., et al., *IgA nephropathy: long-term prognosis for pediatric patients.* J Pediatr, 1995. **127**(6): p. 913-9.
228. Radford, M.G., Jr., et al., *Predicting renal outcome in IgA nephropathy.* J Am Soc Nephrol, 1997. **8**(2): p. 199-207.
229. Hastings, M.C., N.M. Delos Santos, and R.J. Wyatt, *Renal survival in pediatric patients with IgA nephropathy.* Pediatr Nephrol, 2007. **22**(2): p. 317-8.
230. Ronkainen, J., et al., *Long-term outcome 19 years after childhood IgA nephritis: a retrospective cohort study.* Pediatr Nephrol, 2006. **21**(9): p. 1266-73.
231. Wang, T., et al., *Comparison of clinicopathological features between children and adults with IgA nephropathy.* Pediatr Nephrol, 2012. **27**(8): p. 1293-300.
232. Haas, M., et al., *IgA nephropathy in children and adults: comparison of histologic features and clinical outcomes.* Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(8): p. 2537-45.

233. Shima, Y., et al., *Biopsy timing and Oxford classification variables in childhood/adolescent IgA nephropathy.* Pediatr Nephrol, 2015. **30**(2): p. 293-9.
234. Higa, A., et al., *Long-term outcome of childhood IgA nephropathy with minimal proteinuria.* Pediatr Nephrol, 2015.
235. Coppo, R., et al., *IgACE: a placebo-controlled, randomized trial of angiotensin-converting enzyme inhibitors in children and young people with IgA nephropathy and moderate proteinuria.* J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(6): p. 1880-8.
236. Coppo, R., et al., *Angiotensin II local hyperreactivity in the progression of IgA nephropathy.* Am J Kidney Dis, 1993. **21**(6): p. 593-602.
237. Leung, J.C., et al., *Oxidative damages in tubular epithelial cells in IgA nephropathy: role of crosstalk between angiotensin II and aldosterone.* J Transl Med, 2011. **9**: p. 169.
238. Ye, Z.C., et al., *Serum IgA1 from patients with IgA nephropathy up-regulates integrin-linked kinase synthesis and inhibits adhesive capacity in podocytes through indirect pathways.* Clin Invest Med, 2009. **32**(1): p. E20-7.
239. Zhang, B., et al., *Amiloride off-target effect inhibits podocyte urokinase receptor expression and reduces proteinuria.* Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(5): p. 1746-55.
240. Trimarchi, H., *Primary focal and segmental glomerulosclerosis and soluble factor urokinase-type plasminogen activator receptor.* World J Nephrol, 2013. **2**(4): p. 103-10.
241. Wei, C., et al., *Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor.* Nat Med, 2008. **14**(1): p. 55-63.
242. Rauen, T., et al., *Intensive Supportive Care plus Immunosuppression in IgA Nephropathy.* N Engl J Med, 2015. **373**(23): p. 2225-36.
243. Cambier, A., et al., *Steroid therapy in children with IgA nephropathy.* Pediatr Nephrol, 2019.
244. Coppo, R., *IgA Nephropathy: A European Perspective in the Corticosteroid Treatment.* Kidney Dis (Basel), 2018. **4**(2): p. 58-64.
245. Floege, J. and J. Feehally, *Treatment of IgA nephropathy and Henoch-Schonlein nephritis.* Nat Rev Nephrol, 2013. **9**(6): p. 320-7.
246. Lafayette, R.A., et al., *A Randomized, Controlled Trial of Rituximab in IgA Nephropathy with Proteinuria and Renal Dysfunction.* J Am Soc Nephrol, 2017. **28**(4): p. 1306-1313.
247. Mei, H.E., et al., *Steady-state generation of mucosal IgA+ plasmablasts is not abrogated by B-cell depletion therapy with rituximab.* Blood, 2010. **116**(24): p. 5181-90.
248. McCarthy, D.D., et al., *Mice overexpressing BAFF develop a commensal flora-dependent, IgA-associated nephropathy.* J Clin Invest, 2011. **121**(10): p. 3991-4002.
249. Zhong, W., et al., *Retracted: Association of aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphism with IgA nephropathy risk and progression of IgA nephropathy.* J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2015. **16**(3): p. 660-5.

250. Zhai, Y.L., et al., *Increased APRIL Expression Induces IgA1 Aberrant Glycosylation in IgA Nephropathy.* Medicine (Baltimore), 2016. **95**(11): p. e3099.
251. Li, W., et al., *TLR9 and BAFF: their expression in patients with IgA nephropathy.* Mol Med Rep, 2014. **10**(3): p. 1469-74.
252. Luo, R., et al., *Role of BAFF in pediatric patients with allergic rhinitis during sublingual immunotherapy.* Eur J Pediatr, 2014. **173**(8): p. 1033-40.
253. Xin, G., et al., *Serum BAFF is elevated in patients with IgA nephropathy and associated with clinical and histopathological features.* J Nephrol, 2013. **26**(4): p. 683-90.
254. Myette, J.R., et al., *A Proliferation Inducing Ligand (APRIL) targeted antibody is a safe and effective treatment of murine IgA nephropathy.* Kidney Int, 2019. **96**(1): p. 104-116.
255. Gao, W., et al., *Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling as a Promising Therapy for Inflammatory Diseases: A Journey from Molecular to Nano Therapeutics.* Front Physiol, 2017. **8**: p. 508.
256. Yang, Y.Z., et al., *Effects of Hydroxychloroquine on Proteinuria in Immunoglobulin A Nephropathy.* Am J Nephrol, 2018. **47**(3): p. 145-152.
257. Liu, L.J., et al., *Effects of Hydroxychloroquine on Proteinuria in IgA Nephropathy: A Randomized Controlled Trial.* Am J Kidney Dis, 2019.
258. Yusuf, I.H., et al., *Hydroxychloroquine retinopathy.* Eye (Lond), 2017. **31**(6): p. 828-845.
259. Coppo, R., et al., *Upregulation of the immunoproteasome in peripheral blood mononuclear cells of patients with IgA nephropathy.* Kidney Int, 2009. **75**(5): p. 536-41.
260. Hartono, C., et al., *Bortezomib for Reduction of Proteinuria in IgA Nephropathy.* Kidney Int Rep, 2018. **3**(4): p. 861-866.
261. McAdoo, S. and F.W.K. Tam, *Role of the Spleen Tyrosine Kinase Pathway in Driving Inflammation in IgA Nephropathy.* Semin Nephrol, 2018. **38**(5): p. 496-503.
262. McAdoo, S.P., et al., *Correlation of disease activity in proliferative glomerulonephritis with glomerular spleen tyrosine kinase expression.* Kidney Int, 2015. **88**(1): p. 52-60.
263. Wyatt, R.J. and R.J. Hogg, *Evidence-based assessment of treatment options for children with IgA nephropathies.* Pediatr Nephrol, 2001. **16**(2): p. 156-67.
264. Fujinaga, S., et al., *Plasma exchange combined with immunosuppressive treatment in a child with rapidly progressive IgA nephropathy.* Pediatr Nephrol, 2007. **22**(6): p. 899-902.
265. Lai, K.N., et al., *Plasma exchange in patients with rapidly progressive idiopathic IgA nephropathy: a report of two cases and review of literature.* Am J Kidney Dis, 1987. **10**(1): p. 66-70.
266. Nicholls, K., et al., *Plasma exchange in progressive IgA nephropathy.* J Clin Apher, 1990. **5**(3): p. 128-32.

267. Coppo, R., et al., *Immunological monitoring of plasma exchange in primary IgA nephropathy.* Artif Organs, 1985. **9**(4): p. 351-60.
268. Coppo, R., et al., *Plasma exchange in progressive primary IgA nephropathy.* Int J Artif Organs, 1985. **8 Suppl 2**: p. 55-8.
269. Maillard, N., et al., *Current Understanding of the Role of Complement in IgA Nephropathy.* J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(7): p. 1503-12.
270. Espinosa, M., et al., *Association of C4d deposition with clinical outcomes in IgA nephropathy.* Clin J Am Soc Nephrol, 2014. **9**(5): p. 897-904.
271. Zhu, L., et al., *Variants in Complement Factor H and Complement Factor H-Related Protein Genes, CFHR3 and CFHR1, Affect Complement Activation in IgA Nephropathy.* J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(5): p. 1195-204.
272. Ring, T., et al., *Use of eculizumab in crescentic IgA nephropathy: proof of principle and conundrum?* Clin Kidney J, 2015. **8**(5): p. 489-91.
273. Rosenblad, T., et al., *Eculizumab treatment for rescue of renal function in IgA nephropathy.* Pediatr Nephrol, 2014. **29**(11): p. 2225-8.
274. Liu, L., et al., *C3a, C5a renal expression and their receptors are correlated to severity of IgA nephropathy.* J Clin Immunol, 2014. **34**(2): p. 224-32.
275. Roos, A., et al., *Glomerular activation of the lectin pathway of complement in IgA nephropathy is associated with more severe renal disease.* J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(6): p. 1724-34.
276. McNamara, L.A., et al., *High Risk for Invasive Meningococcal Disease Among Patients Receiving Eculizumab (Soliris) Despite Receipt of Meningococcal Vaccine.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2017. **66**(27): p. 734-737.
277. Floege, J. and J. Feehally, *The mucosa-kidney axis in IgA nephropathy.* Nat Rev Nephrol, 2016. **12**(3): p. 147-56.
278. Sato, M., et al., *Glomerular deposition of food antigens in IgA nephropathy.* Clin Exp Immunol, 1988. **73**(2): p. 295-9.
279. Smerud, H.K., et al., *Gluten sensitivity in patients with IgA nephropathy.* Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(8): p. 2476-81.
280. Collin, P., et al., *Celiac disease and HLA DQ in patients with IgA nephropathy.* Am J Gastroenterol, 2002. **97**(10): p. 2572-6.
281. Papista, C., et al., *Gluten exacerbates IgA nephropathy in humanized mice through gliadin-CD89 interaction.* Kidney Int, 2015. **88**(2): p. 276-85.
282. Coppo, R., A. Amore, and D. Roccatello, *Dietary antigens and primary immunoglobulin A nephropathy.* J Am Soc Nephrol, 1992. **2**(10 Suppl): p. S173-80.
283. Fellstrom, B.C., et al., *Targeted-release budesonide versus placebo in patients with IgA nephropathy (NEFIGAN): a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2b trial.* Lancet, 2017. **389**(10084): p. 2117-2127.
284. Venettacci, O., N. Larkins, and F. Willis, *Childhood IgA Nephropathy Successfully Treated with Targeted-Release Budesonide: A Case Report.* J Paediatr Child Health, 2018. **54**(12): p. 1403.

285. Lv, J., et al., *Effect of Oral Methylprednisolone on Clinical Outcomes in Patients With IgA Nephropathy: The TESTING Randomized Clinical Trial.* JAMA, 2017. **318**(5): p. 432-442.
286. Ramezani, A. and D.S. Raj, *The gut microbiome, kidney disease, and targeted interventions.* J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(4): p. 657-70.
287. Hollon, J., et al., *Effect of gliadin on permeability of intestinal biopsy explants from celiac disease patients and patients with non-celiac gluten sensitivity.* Nutrients, 2015. **7**(3): p. 1565-76.
288. Qin, W., et al., *External suppression causes the low expression of the Cosmc gene in IgA nephropathy.* Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(5): p. 1608-14.
289. Chemouny, J.M., et al., *Modulation of the microbiota by oral antibiotics treats immunoglobulin A nephropathy in humanized mice.* Nephrol Dial Transplant, 2019. **34**(7): p. 1135-1144.
290. Juul, F.E., et al., *Fecal Microbiota Transplantation for Primary Clostridium difficile Infection.* N Engl J Med, 2018. **378**(26): p. 2535-2536.
291. Suzuki, Y., et al., *Paradigm shift in activity assessment of IgA nephropathy - optimizing the next generation of diagnostic and therapeutic maneuvers via glycan targeting.* Expert Opin Biol Ther, 2015. **15**(4): p. 583-93.
292. Lamm, M.E., et al., *Microbial IgA protease removes IgA immune complexes from mouse glomeruli in vivo: potential therapy for IgA nephropathy.* Am J Pathol, 2008. **172**(1): p. 31-6.
293. Lechner, S.M., et al., *IgA1 Protease Treatment Reverses Mesangial Deposits and Hematuria in a Model of IgA Nephropathy.* J Am Soc Nephrol, 2016. **27**(9): p. 2622-9.
294. Kiryluk, K., et al., *Genetic studies of IgA nephropathy: past, present, and future.* Pediatr Nephrol, 2010. **25**(11): p. 2257-68.
295. Masuda, J., et al., *[Identical twin sisters with IgA nephropathy].* Nihon Jinzo Gakkai Shi, 1996. **38**(1): p. 52-6.
296. Sabatier, J.C., et al., *[Intercapillary glomerulonephritis with IgA deposits in 2 HLA identical brothers].* J Urol Nephrol (Paris), 1978. **84**(9): p. 672-5.
297. Tolkoff-Rubin, N.E., et al., *IGA nephropathy in HLA-identical siblings.* Transplantation, 1978. **26**(6): p. 430-3.
298. Julian, B.A., et al., *Familial IgA nephropathy. Evidence of an inherited mechanism of disease.* N Engl J Med, 1985. **312**(4): p. 202-8.
299. Li, P.K., et al., *Familial IgA nephropathy: a study of HLA class II allogenotypes in a Chinese kindred.* Am J Kidney Dis, 1992. **20**(5): p. 458-62.
300. Schena, F.P., *Immunogenetic aspects of primary IgA nephropathy.* Kidney Int, 1995. **48**(6): p. 1998-2013.
301. Schena, F.P., et al., *Increased risk of end-stage renal disease in familial IgA nephropathy.* J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(2): p. 453-60.

302. Lin, X., et al., *Aberrant galactosylation of IgA1 is involved in the genetic susceptibility of Chinese patients with IgA nephropathy.* Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(11): p. 3372-5.
303. Gharavi, A.G., et al., *IgA nephropathy, the most common cause of glomerulonephritis, is linked to 6q22-23.* Nat Genet, 2000. **26**(3): p. 354-7.
304. Bisceglia, L., et al., *Genetic heterogeneity in Italian families with IgA nephropathy: suggestive linkage for two novel IgA nephropathy loci.* Am J Hum Genet, 2006. **79**(6): p. 1130-4.
305. Packham, D.K., *Thin basement membrane nephropathy and IgA glomerulonephritis: can they be distinguished without renal biopsy?* Nephrology (Carlton), 2007. **12**(5): p. 481-6.
306. Huang, C.C., et al., *HLA and Chinese IgA nephropathy in Taiwan.* Tissue Antigens, 1989. **33**(1): p. 45-7.
307. Lu, C., et al., *Correlation between TCRCalpha -560 C/T polymorphism and the clinical presentation of Uygur IgA nephropathy patients in XinJiang.* Asian Pac J Allergy Immunol, 2011. **29**(3): p. 236-9.
308. Li, R., et al., *TRAC variants associate with IgA nephropathy.* J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(6): p. 1359-67.
309. Liu, Z.H., et al., *Interleukin-1 receptor antagonist allele: is it a genetic link between Henoch-Schonlein nephritis and IgA nephropathy?* Kidney Int, 1997. **51**(6): p. 1938-42.
310. Wang, W., et al., *The effects of both single-locus and multi-locus interaction on the clinical manifestations of IgA nephropathy in Southern Han Chinese.* Nephrol Dial Transplant, 2014. **29**(3): p. 550-5.
311. Yong, D., et al., *Association of angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and IgA nephropathy: a meta-analysis.* Am J Nephrol, 2006. **26**(5): p. 511-8.
312. Huang, H.D., et al., *Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system in Chinese patients with end-stage renal disease secondary to IgA nephropathy.* Chin Med J (Engl), 2010. **123**(22): p. 3238-42.
313. Qin, Y.H., et al., *Association between ACE polymorphism and risk of IgA nephropathy: a meta-analysis.* J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2011. **12**(3): p. 215-23.
314. Zhu, X., et al., *Correlation analysis of angiotensin-converting enzyme, angiotensinogen, and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the progression of immunoglobulin A nephropathy/membranous nephropathy.* Hum Pathol, 2013. **44**(12): p. 2806-13.
315. Mao, S. and S. Huang, *Association of angiotensinogen gene M235T polymorphism with the risk of IgA nephropathy: a meta-analysis.* Ren Fail, 2014. **36**(3): p. 466-72.
316. Li, G.S., et al., *Variants of the ST6GALNAC2 promoter influence transcriptional activity and contribute to genetic susceptibility to IgA nephropathy.* Hum Mutat, 2007. **28**(10): p. 950-7.

317. Tanaka, Y., et al., *FcgammaRIIa-131R allele and FcgammaRIIIa-176V/V genotype are risk factors for progression of IgA nephropathy.* Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(11): p. 2439-45.
318. Vuong, M.T., et al., *Association of soluble CD89 levels with disease progression but not susceptibility in IgA nephropathy.* Kidney Int, 2010. **78**(12): p. 1281-7.
319. Narita, I., et al., *Genetic polymorphisms in the promoter and 5' UTR region of the Fc alpha receptor (CD89) are not associated with a risk of IgA nephropathy.* J Hum Genet, 2001. **46**(12): p. 694-8.
320. Maillard, N., et al., *Single nucleotidic polymorphism 844 A->G of FCAR is not associated with IgA nephropathy in Caucasians.* Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(2): p. 656-60.
321. Feehally, J., et al., *HLA has strongest association with IgA nephropathy in genome-wide analysis.* J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(10): p. 1791-7.
322. Gharavi, A.G., et al., *Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy.* Nat Genet, 2011. **43**(4): p. 321-7.
323. Sanger, F. and A.R. Coulson, *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase.* J Mol Biol, 1975. **94**(3): p. 441-8.
324. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
325. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome.* Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
326. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome.* Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
327. Quail, M.A., et al., *A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers.* BMC Genomics, 2012. **13**: p. 341.
328. Gorokhova, S., et al., *Clinical massively parallel sequencing for the diagnosis of myopathies.* Rev Neurol (Paris), 2015. **171**(6-7): p. 558-71.
329. Richards, S., et al., *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology.* Genet Med, 2015. **17**(5): p. 405-24.
330. Plon, S.E., et al., *Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results.* Hum Mutat, 2008. **29**(11): p. 1282-91.
331. Sosnay, P.R., et al., *Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene.* Nat Genet, 2013. **45**(10): p. 1160-7.
332. Birgmeier, J., et al., *AVADA: toward automated pathogenic variant evidence retrieval directly from the full-text literature.* Genet Med, 2020. **22**(2): p. 362-370.
333. Savige, J., et al., *Expert consensus guidelines for the genetic diagnosis of Alport syndrome.* Pediatr Nephrol, 2019. **34**(7): p. 1175-1189.

334. Suzuki, K., et al., *Incidence of latent mesangial IgA deposition in renal allograft donors in Japan.* Kidney Int, 2003. **63**(6): p. 2286-94.
335. Li, Y., et al., *Type IV Collagen Mutations in Familial IgA Nephropathy.* Kidney Int Rep, 2020. **5**(7): p. 1075-1078.
336. Malone, A.F., et al., *Rare hereditary COL4A3/COL4A4 variants may be mistaken for familial focal segmental glomerulosclerosis.* Kidney Int, 2014. **86**(6): p. 1253-9.
337. Li, Z., et al., *Identification of a novel COL4A5 mutation in the proband initially diagnosed as IgAN from a Chinese family with X-linked Alport syndrome.* Sci China Life Sci, 2019. **62**(12): p. 1572-1579.
338. Vischini, G., et al., *A unique evolution of the kidney phenotype in a patient with autosomal recessive Alport syndrome.* Hum Pathol, 2018. **81**: p. 229-234.
339. Blanco Quiros, A., et al., *Anti-immunoglobulin antibodies in children with Schonlein-Henoch syndrome. Absence of serum anti-IgA antibodies.* Eur J Pediatr, 1994. **153**(2): p. 103-6.
340. Crottet, P. and B. Corthesy, *Secretory component delays the conversion of secretory IgA into antigen-binding competent F(ab')2: a possible implication for mucosal defense.* J Immunol, 1998. **161**(10): p. 5445-53.
341. Gleeson PJ, C.J., Boedec E, Ben Mkaddem S, Lepage P, Monteiro R, *The Gut-Renal Axis: Pathogenic Role of Mucin-Degrading Bacteria in IgA Nephropathy.* Kidney Diseases, 2018. **4**: p. 118.
342. Moura, I.C., et al., *Engagement of transferrin receptor by polymeric IgA1: evidence for a positive feedback loop involving increased receptor expression and mesangial cell proliferation in IgA nephropathy.* J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(9): p. 2667-76.
343. McCubrey, J.A., et al., *Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance.* Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1263-84.
344. Savige, J., et al., *Thin basement membrane nephropathy.* Kidney Int, 2003. **64**(4): p. 1169-78.
345. Abbad, L.B., E.Chemouny,J.Pierre,M.Berthelot,L.Monteiro,R., *TG2-PP2A-MMP9 Axis is involved in CD89 Shedding and Affects the Generation of Pathogenic IgA1SCD89 Complexes in IgA Nephropathy.* Kidney Diseases, 2018. **18**: p. 124.
346. Satpathy, M., et al., *Tissue transglutaminase regulates matrix metalloproteinase-2 in ovarian cancer by modulating cAMP-response element-binding protein activity.* J Biol Chem, 2009. **284**(23): p. 15390-9.
347. Koide, H., et al., *Increased mRNA expression of metalloproteinase-9 in peripheral blood monocytes from patients with immunoglobulin A nephropathy.* Am J Kidney Dis, 1996. **28**(1): p. 32-9.
348. Gundemir, S., et al., *Transglutaminase 2: a molecular Swiss army knife.* Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(2): p. 406-19.
349. Cruzado, J.M., *Nonimmunosuppressive effects of mammalian target of rapamycin inhibitors.* Transplant Rev (Orlando), 2008. **22**(1): p. 73-81.

350. Guo, N., et al., *The protective effect and mechanism of rapamycin in the rat model of IgA nephropathy.* Ren Fail, 2019. **41**(1): p. 334-339.
351. Tian, J., et al., *Rapamycin ameliorates IgA nephropathy via cell cycle-dependent mechanisms.* Exp Biol Med (Maywood), 2015. **240**(7): p. 936-45.
352. Wang, S., et al., *Noncanonical TGF-beta pathways, mTORC1 and Abl, in renal interstitial fibrogenesis.* Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **298**(1): p. F142-9.
353. Cruzado, J.M., et al., *Low-dose sirolimus combined with angiotensin-converting enzyme inhibitor and statin stabilizes renal function and reduces glomerular proliferation in poor prognosis IgA nephropathy.* Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(11): p. 3596-602.
354. Yang, R., et al., *Successful treatment of experimental glomerulonephritis with IdeS and EndoS, IgG-degrading streptococcal enzymes.* Nephrol Dial Transplant, 2010. **25**(8): p. 2479-86.
355. Eitner, F. and J. Floege, *Bacterial protease for the treatment of IgA nephropathy.* Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(7): p. 2173-5.
356. Jacob, C.M., et al., *Autoimmunity in IgA deficiency: revisiting the role of IgA as a silent housekeeper.* J Clin Immunol, 2008. **28 Suppl 1**: p. S56-61.

Pediatric Nephrology
https://doi.org/10.1007/s00467-020-04475-w

REVIEW

New therapeutic perspectives for IgA nephropathy in children

Alexandra Cambier[1,2,3,4] · Patrick J. Gleeson[1,2,3] · Héloise Flament[1,2,3,5] · Marie-Bénédicte Le Stang[1,2,3] · Renato C. Monteiro[1,2,3,5]

Received: 22 August 2019 / Revised: 2 January 2020 / Accepted: 7 January 2020
© IPNA 2020

Abstract
Childhood IgA nephropathy (cIgAN) differs from the adult by having an abrupt clinical onset, often presenting as an acute attack that can progress to a chronic phase. No treatment guidelines have been established for the treatment of cIgAN. Given the severity of acute attack in children, and the number of life-years at stake, pediatricians prescribe immunosuppression in addition to renin–angiotensin system blockade. Non-specific immunosuppressors, such as corticosteroids, have systemic toxic effects, and given recent therapeutic advances in adult glomerulonephritis, new tailored strategies should be expected for children. The mucosal immune system has been highlighted as a key player in IgAN pathogenesis, and several biomarkers have been identified with a direct role in pathogenesis. In this review, we discuss current studies of conventional and novel therapeutic approaches for cIgAN.

Keywords IgA · IgA nephropathy · Treatment · Gluten · Microbiota · Antibiotics · Children

Introduction

IgA nephropathy (IgAN) is one of the most common primary glomerulonephritides in children and adolescents worldwide [1]. There is a growing body of evidence suggesting that IgAN is an immune complex-mediated glomerulonephritis, resulting from the generation of IgA1 with aberrant glycosylation [2]. IgAN is an entity defined by the histopathological finding of dominant glomerular IgA deposits. Clinical, biological, and histologic features of IgA nephropathy are highly variable, with clinical presentations fluctuating from isolated microscopic hematuria to rapidly progressive glomerulonephritis. In more than 50% of cases, patients with IgAN do not have any symptoms and the diagnosis is made after an incidental finding of microscopic hematuria, hypertension, sub-normal glomerular filtration rate (GFR), or proteinuria [3–5]. Some biomarkers (GdIgA1-immune complexes) involved in the pathophysiology of IgAN have been shown to be risk factors for progression and could become targets for new therapies. Genetic features are also involved in IgAN since genetic factors have been revealed to be involved in the level of IgA1 galactosylation [6]. Since children generally have a long remaining life expectancy at the time of diagnosis, there is a need to employ new therapies with minimal long-term side effects that target molecules known to be involved in disease pathogenesis.

Differences in IgAN between adults and children

IgA nephropathy is particularly common in young adults, with progression toward end-stage kidney disease (ESKD) over 20 years in about one third of patients: the median age of patients starting dialysis ranges from 40 to 50 years of age, clinically indicating that the disease may, in some cases, begin during childhood. There is a wide clinical spectrum of IgAN which varies across ethnic groups, particularly in Asians where it has been suggested that IgAN has a more severe course [6–8]. Physicians have long time considered cIgAN as a benign entity subject to remissions and occasionally to late relapse during adulthood [9]. In contrast, adult IgAN is considered to be a serious manifestation with 15–40% patients reaching ESKD depending on the region [10]. However, the prognosis of cIgAN is just as severe as in adults: at 10-year

✉ Renato C. Monteiro
renato.monteiro@inserm.fr

1 Université de Paris, Centre de Recherche sur l'inflammation, Laboratoire d'Excellence Inflamex, F-75018 Paris, France
2 INSERM U1149, Paris, France
3 CNRS ERL8252, Paris, France
4 Service de Néphrologie Pédiatrique, hôpital Robert Debré, Assistance Publique de Paris, Paris, France
5 Service d'Immunologie, hôpital Bichat, Paris, France

Published online: 10 February 2020

follow up, 10–13% of children will reach ESKD, and with within 20 years, 20–30% will have ESKD [9, 11, 12]. It has been reported that histological features of IgAN on diagnostic biopsy are different in children and adults. Pediatric patients are more likely to have mild histologic lesions and less advanced chronic lesions (glomerulosclerosis and/or interstitial fibrosis/tubular atrophy) compared to adults [13, 14]. Nevertheless, chronic lesions can be found in children and, although less frequent, adults can display acute proliferation. The reduction of chronic lesions in cIgAN could be possible by a rapid detection and treatment of active and proliferative lesions through early renal biopsy. In a pediatric Japanese cohort, the prolongation of waiting time before renal biopsy was associated with higher frequency of T damage and reduction in M and E lesions, underlining the importance of performing an early renal biopsy to detect active lesions and reduce chronic lesions by appropriate treatment [15]. Some cases of cIgAN can be insidious with a lack of clinical symptoms (only microscopic hematuria, proteinuria) which can remain undiagnosed for a long time until adulthood and may accord with a multi-hit hypothesis in the pathogenesis of IgAN.

In our recent study (unpublished, submitted article), cIgAN presents with more mesangial proliferation and endocapillary proliferation than adults, where more focal glomerulosclerosis (S1), tubular atrophy/interstitial fibrosis ≥25% (T1), and podocytopathic features are seen. This supports the idea that adults diagnosed with IgAN may have had undetected disease since childhood, given its asymptomatic nature. In children, proteinuria appears to be due to acute proliferation and inflammation, while in adults it correlates with chronic lesions and nephron reduction**.** When IgAN comes to clinical attention in childhood, it can be considered as an acute glomerulonephritis, whereas adult IgAN is mostly considered as a chronic glomerulonephritis that may have been progressing undetected since childhood. The challenge in children is to avoid the transformation of acute histologic lesions into chronic histologic lesions. There is an unmet medical need in cIgAN for a treatment targeting acute inflammatory and proliferative lesions before they evolve into fibrotic lesions with consequent nephron reduction. Since cIgAN is diagnosed at a young age, we can anticipate the natural progression with numerous lines of treatment throughout the patient's lifetime. Thus, therapeutic options should be carefully considered.

Immune biomarkers and pathophysiology

IgAN is an immune complex-mediated pathology, with excessive production of galactose-deficient IgA1 (GdIgA1), development of IgG autoantibodies against GdIgA1 (forming IgA–IgG complexes), complexing of the soluble form of the IgA Fc receptor (CD89) with IgA1, and renal mesangial deposition of these immune complexes involving IgA1 binding to transferrin receptors (CD71). IgA1 binds to CD71 at the hinge region, which contains up to six *O*-glycans [16]. Sialidase and beta-galactosidase treatment of IgA1 to generate GdIgA1 significantly enhances IgA1/CD71 interaction. CD71 is overexpressed in mesangial cells and translocation of transglutaminase 2 receptor to the mesangial cell surface facilitates cross-linking of IgA1-immune complexes [2]. The immune complex formation with aberrant glycosylation of IgA1 constitutes an essential factor which is involved in mesangial CD71–IgA1 interaction in IgAN pathogenesis. Nevertheless, GdIgA1 alone is not sufficient to develop the disease and variations have been described between populations. Gale et al. have shown that Caucasian IgAN exhibited significantly higher GdIgA1 levels than Chinese IgAN where the disease is known to be more frequent and mostly more severe [6].

These immune biomarkers, along with environmental factors (food, antigens, and microbiota), are linked with poor prognosis and recurrence after transplantation.

Since the 1990s [17], the presence of free *O*-linked GalNac or sialylated *O*-linked GalNac have been described in IgAN.

IgA1 is a sensitive and specific biomarker for IgAN and has also been studied in children [18, 19]. Serum GdIgA1 level may have a prognostic value in cIgAN. It has been observed that a positive correlation exists between GdIgA1 and serum creatinine levels in IgAN [20]. While GdIgA1 levels are highly heritable in pediatric patients with IgAN, genome-wide association study (GWAS) has shown that less than 10% of variation in serum GdIgA1 levels is explained by genotype [19]. GdIgA1 thus represents a key target in cIgAN, independent of genotype.

Targeting the first hit: GdIgA1

New therapeutic approaches could target the aberrant glycosylation of IgA1 formation. Suzuki et al. have shown regulation of nephritogenic GdIgA1 by using therapeutic antibodies or drugs that selectively deplete cells with defective glycogenesis, producing GdIgA1 [21]. Glycosylation is one of the most fundamental and complex post-transcriptional modifications of various biomolecules. It could be interesting to develop drugs neutralizing GdIgA1 in the early stages of cIgAN before the development of chronic lesions [21].

Recombinant IgA1 proteases (IgA1-P)

Microbial IgA1 proteases have been genetically cloned and produced as recombinant proteins. The main goal of these proteases is to remove IgA1 deposits and degrade immune complexes in the mesangium, as reported in a mouse model injected with human IgA1 complexes [22]. In a mouse model expressing human IgA1 and CD89, recombinant IgA1-P cleaved human IgA mesangial deposits in a dose-dependent manner and reduced inflammation, fibrosis, and hematuria

[23]. It is important to note that microbial IgG proteases have already been used in patients (IdeS trials) for desensitization of donor-specific antibody-positive transplant recipients and recently in Goodpasture syndrome [24], but also in refractory anti-glomerular basement membrane disease with an endopeptidase-degrading enzyme from *Streptoccocus pyogenes* [25]. Although long-term administration of an exogenous bacterial enzyme could lead to the generation of anti-protease antibodies, a one-shot treatment could be useful to clear GdIgA1 deposits before conventional therapeutic approaches associated or not with specific biotherapies to avoid GdIgA1 deposit reformation.

Conventional treatment approaches

Renin–angiotensin system blockers

Renin–angiotensin system blockers (RASB) have shown effective results in cIgAN with proteinuria <0.5 g/day/1.73 m^2, in the absence of acute kidney injury and glomerular inflammation [26]. A placebo-controlled trial conducted by Coppo et al. showed the benefit of angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACE-I) treatment in reducing disease progression in young patients with moderate proteinuric IgAN [27].

RASB is useful in the treatment of IgAN due to its hemodynamic effects, which improve important prognostic factors such as hypertension and proteinuria [28]. The nephroprotection of RASB may also result from an anti-proliferative and anti-inflammatory effect. In IgAN, there is activation of tissue-level RAS, which is involved in the development of renal fibrosis. The binding of IgA-immune complexes to mesangial cells induces local hyper-activation of RAS, resulting in the release of angiotensin II and aldosterone [29]. Local production of angiotensin II stimulates mesangial proliferation [30] and is also implied in mesangial–podocyte cross-talk by modulating $\alpha3\beta1$ integrin expression on podocytes [31]. Moreover, amiloride could be used in IgAN with focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) since it could inhibit podocyte urokinase receptor (uPAR) expression [32]. uPAR is involved in the pathogenesis of FSGS [33], and it is a key factor for foot process effacement of podocytes and podocyte damage via the integrin $\alpha5\beta3$ [34, 35]. RASB has limited side effects and is therefore the first therapeutic option at the onset of cIgAN.

Moreover, the PROTECT trial, with new drug (sparsentan) which is a dual-acting angiotensin receptor blocker and endothelin receptor antagonist, is ongoing. The active control is irbesartan. This trial is a randomized, multicenter, double-blind, parallel-group, and active-control study involving approximately 280 IgAN patients aged ≥18 years. The purpose of the study is to evaluate the potential benefit of sparsentan on kidney function by analyzing changes in proteinuria and eGFR as compared to current RASB treatment.

Steroids

The current international recommendations from the Clinical Practice Guideline for glomerular disease (KDIGO) for the treatment of IgAN in adults recommend supportive care (angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi) and/or angiotensin receptor blockers (ARBs)) alone as first-line treatment in cases of stable proteinuria (>0.5 g/day). ACEi or ARBs should be associated with steroids and/or immunosuppressive drugs in patients with proliferative forms of IgAN or with persistent proteinuria >1 g/day despite 3–6 months of optimized supportive care by ACEi or ARBs and estimated glomerular filtration rate (eGFR) >50 ml/min/1.73 m^2, in order to delay progression to ESKD [36]. In cIgAN, the indication of steroids in cIgAN is not defined, probably due to a lack of controlled studies [37]. In our cohort of 83 children with IgAN, proteinuria at the time of biopsy was strongly associated with mesangial proliferation (M0 vs. M1, 0.6 ± 0.7 vs. 2.5 ± 0.29 g/g creatininuria), endocapillary proliferation (E0 vs. E1, 0.9 ± 1.1 vs. 2.6 ± 2.9 g/g creatininuria), and extracapillary proliferation (C0 vs. C1, 1.2 ± 1.5 vs. 3.2 ± 3.3, g/g creatininuria) but not with reduced eGFR [38]. cIgAN is associated with an inflammatory phenotype probably due to acute formation of GdIgA1 immune complexes leading to mesangial cell activation. These findings could explain why steroid therapy appears more effective in cIgAN compared to adults [5, 38]. Nevertheless, systemic steroids have toxic effects, particularly in children where they affect development, which has encouraged the development of alternative formulations. A recent controlled study in adults has shown that slow-release enteric budesonide, which is poorly absorbed, decreases proteinuria and stabilizes eGFR [39]. These results give further support to the involvement of mucosal immunity in the pathogenesis of IgAN [39]. The success of mucosa-targeted corticosteroids in IgAN should reduce the need for their systemic administration.

Current trials targeting immune-complex formation

B-Cell depletion

Since autoantibodies are involved in IgAN pathogenesis, B-cell depletion could be a useful therapeutic approach. Increased circulatory levels of autoantigen or autoantibody levels and their resulting complexes (IgA–GdIgA1, IgG–GdIgA1) correlate with increased risk of disease progression in adult IgAN [40, 41].

However, in a recent randomized controlled trial of adults with IgAN, rituximab did not significantly improve renal function or proteinuria assessed over 1 year. Although rituximab effectively depletes circulating B cells, it failed to reduce serum levels of GdIgA1 and IgG–IgA1 [42]. These results suggest that rituximab may not target intestinal IgA^+ B

lymphocytes in IgAN patients due to the lack of CD20 expression by IgA^+ plasma cells [43].

B-Cell activating factors BAFF/TNF receptor with proliferation-inducing ligand APRIL

It has been suggested that TNF receptor family members such as B-cell activating factor (BAFF) and proliferation-inducing ligand (APRIL), and TACI (a receptor for both BAFF and APRIL) could be involved in IgAN pathogenesis. BAFF is necessary for B-cell maturation and survival. Overexpression of BAFF in mice induces higher levels of polymeric IgA and mesangial IgA deposition [44]. Polymorphisms in TNFSF13 molecule which encodes APRIL have been associated with IgAN in a Chinese population [45]. APRIL shares common receptors with BAFF and is necessary for B-cell maturation and survival of plasma cells generating IgA. APRIL levels have been consistently reported to be increased in IgAN, while the data concerning circulating levels of BAFF is conflicting [46, 47]. BAFF is related to oropharyngeal production of IgA in children [48]. Mucosal programming of B cells in IgAN, with the role of TOLL-like receptors (TLRs) and BAFF/APRIL, could thus play an interesting role in the development of IgAN [49].

Blisibimod (a BAFF antagonist) and atacicept (an antagonist of TACI, a dual receptor of APRIL and BAFF) are currently being evaluated in separate phase II studies in adult IgAN (Clinical Trial Nos. NCT02808429 and NCT02062684). VIS649, a humanized anti-APRIL mAb, has recently been demonstrated to safely reduce circulating IgA levels in non-human primates [50]. The BAFF/APRIL/TACI pathway holds therapeutic potential in cIgAN since this pathway is also involved in children [49]. Blisibimod and atacicept could be better tolerated in children since they target B cells' co-stimulation rather than directly depleting B cells. Targeting the BAFF/APRIL/TACI axis could be an interesting second line of treatment in cIgAN.

TOLL-like receptors (TLRs)

Apart from its antimalarial effects, hydroxychloroquine (HCQ) inhibits TLR-7, TLR-8, and TLR-9. It interferes with antigen presentation to B cells by alkalinization of proteasomes in antigen-presenting cells [51].

Yang et al. and Liu et al. have showed the benefit of HCQ in IgAN in an RCT [52, 53]. HCQ treatment was shown to significantly reduce proteinuria in IgAN in addition to RASB. To our knowledge, no trial has been performed in cIgAN, but HCQ is already administrated to children as an antimalarial and to treat children with lupus, where it appears to be well tolerated. HCQ retinopathy, which can lead to blindness, is dependent on cumulative drug exposure so it should not be given systematically to children with IgAN from a young age; patients receiving the drug should have regular ophthalmological check-ups [54]. HCQ could act as a steroid-sparing agent in cIgAN and pediatric trials are urgently needed.

Proteasome in B and T cells

Dysregulation of the proteasome–immunoproteasome axis has been found in mononuclear cells from patients with IgAN. Switching of constitutive proteasomes to immunoproteasomes in IgAN was associated with more severe manifestations including increased proteinuria in IgAN [55]. Inhibition of proteasomes and immunoproteasomes by bortezomib could significantly reduce proteinuria in subjects with IgAN who have an inflammatory proliferative pattern and normal renal function [56]. Bortezomib could thus represent an interesting option for treatment of cIgAN as children usually display an inflammatory phenotype with less chronic and sclerotic histologic lesions than adults.

Spleen tyrosine kinase inhibitors

Spleen tyrosine kinase (SYK) appears to be activated in IgAN [57, 58]. It is involved in downstream signaling, promoting B-cell maturation and survival, as well as CD89 activation in myeloid cells. SYK could be involved in glomerular inflammation in cIgAN and represents an interesting therapeutic target. Stimulation of mesangial cells in vitro with IgA1 purified from IgAN patients leads to activation of SYK by phosphorylation [57]. Furthermore, IgAN tissue with endocapillary proliferation expresses higher levels of SYK compared to E0 tissue, suggesting CD89 receptor activation on infiltrating myeloid cells in situ [58]. A phase II trial is testing fostamatinib, a selective SYK inhibitor, to evaluate its safety and efficiency in IgAN (Clinical Trial No. NCT02112838). Preliminary results show that fostamatinib does not significantly reduce proteinuria in the overall population compared to placebo. However, patients with baseline proteinuria >1 g/day had a dose-dependent reduction in proteinuria. Since children have more inflammatory lesions, targeting SYK with fostamatinib could be advantageous. Of note, however, its side-effect profile is not benign, including hypertension, so caution should be exercised when prescribing to children.

Trials targeting complement pathways

Complement activation in IgA nephropathy

Complement activation is involved in the pathogenesis of IgAN [59]. Complement dysregulation in IgAN has been implicated as complement factors are co-deposited with IgA in glomeruli. The alternative and lectin pathways are implicated; IgAN is associated with higher levels of circulating IgA1 with uncovered *N*-acetylgalactosamine, which could trigger

activation of the lectin pathway. This is underlined by glomerular deposition of ficolin, C4d without C1q, Mannose-Binding-Lectin (MBL), Mannan-binding lectin Associated Serine Protease 1 (MASP-1), and Mannan-binding lectin Associated Serine Protease 2 (MASP-2) in 24% of cases [59, 60]. Moreover, in vitro studies have demonstrated the ability of MBL to bind polymeric IgA and therefore activate the lectin pathway [61].

Espinosa et al. have proposed the presence of glomerular C4d deposition as an early biomarker for progressive IgAN [62]. The alternative pathway is also involved in IgAN pathogenesis. Properdin and factor H deposits have been observed in 75–100% and 30–90% of IgAN biopsies, respectively [63]. Degradation products of C3 (iC3b, C3c, C3dg) have been detected in the immune complexes of IgAN patients [59]. Finally, a common deletion at 1q32, including the *CFHR3* and *CFHR1* genes, encoding factor H-related protein 3 and 1, has been shown to protect against IgAN [64], with a decrease of the ability of the factor H-related proteins to inhibit the regulatory function of Complement Factor H (CFH), ultimately leading to a decrease in alternative pathway activation [65]. The setting where complement activation occurs remains to be determined. Theoretically, this can take place in the glomeruli, as mesangial cells can produce factor H under inflammatory conditions [66]. Furthermore, stimulation of mesangial cells with GdIgA1 or aggregated IgA1 induces mesangial production and secretion of C3 [67].

In children, only cases of complement inhibition therapy for IgAN have been reported.

C5 inhibitors

Ring et al. describe a 16-year-old male with IgAN who did not respond to aggressive therapy and received 900 mg eculizumab (an anti-C5 monoclonal antibody) each week for 1 month, followed by a single dose of 1200 mg leading to a rapid improvement in kidney function. However, this did not prevent the occurrence of chronic lesions and the evolution toward ESKD 2 years later [68]. Rosenblad et al. reported an adolescent with rapidly progressive IgAN refractory to aggressive therapy who was treated with eculizumab for 3 months which led to stabilization of renal function and a reduction in proteinuria—discontinuation of treatment was followed by relapse [69]. These two cases suggest that early initiation of eculizumab in patients with rapidly progressive IgA nephropathy may be beneficial. Moreover, Cemdisaran, an iRNA anti-C5, is currently being trialed in adults IgAN who excrete >1 g of protein per day despite standard-of-care treatment by ACEi (Clinical Trial No. NCT03841448), which could open new avenues for cIgAN patients.

Factor B and C3 inhibitors

Factor B promotes activation of the alternative complement pathway. Interestingly, LNP023, a new factor B inhibitor, is currently being evaluated in a phase IIa/IIb clinical trial in adult IgAN (Clinical Trial No. NCT03373461). An antisense inhibitor of Complement Factor B is also under evaluation in New Zealand (Clinical Trial No. NCT04014335). Finally, a C3 inhibitor, APL-2, is also being tested in a phase II trial in five glomerulopathies, including IgAN (Clinical Trial No. NCT03453619).

Receptor antagonist C5a receptor

C5a is generated by the cleavage of C5 following the activation of C3 convertase. It is an anaphylatoxin that attracts immune cells to the site of inflammation. C5a staining in kidney biopsies is correlated with histological severity, proteinuria, and creatinine level in adult IgAN [70].

In adults, the C5a receptor antagonist avacopan has been evaluated in an open-label phase II trial among seven adults with IgAN after 4 weeks of optimized RAS inhibitors with proteinuria >1 g/g creatinine and eGFR >60 ml/min/1.73 m^2 (Clinical Trial No. NCT02384317) [71]. After 12 weeks of follow-up, proteinuria was reduced in six of the seven patients (results presented at the 54th European Renal Association). Avacopan could be a useful therapy in cIgAN through suppression of local inflammation without blocking formation of the membrane attack complex C5b-9 that is mandatory for defense against bacterial infections. As such, controlled trials are urgently needed.

MASP-2 inhibitor

Targeting MASP-2 may reduce glomerular lectin pathway activation. The MASP-2 inhibitor OMS721 is currently being evaluated in phase II and phase III (Clinical Trial No. NCT03608033) studies in IgAN. This drug has shown promising results in severe IgAN.

Targeting complement in cIgAN could represent a good therapeutic option. Nevertheless, these treatments could increase infection rates, especially in small children where innate immunity is critical. The risk of meningococcal infections is increased with C5 inhibitors and is not completely abolished after vaccination [72]. C3 inhibitors can decrease host defense against encapsulated germs.

Novel therapies targeting the gut–mucosal immune system

The interplay between mucosal pathogens and IgA immunity

There is an increasing interest in interactions between the microbial flora and mucosal immunity in IgAN [73]. Most susceptibility loci identified by GWAS in IgAN are related to

mucosal immunity, highlighting the potential role of the gut–kidney axis in the pathophysiology of IgAN [74].

Dietary antigens

In the 1990s, food antigens were suggested to be implicated in the development of IgAN [75]. Deposition of food antigens (like soy, bean protein, casein, and rice protein) has been demonstrated in the mesangium of patients with IgAN [76]. One of the major potential antigens proposed is gluten [76]. In a healthy population, the prevalence of celiac disease is 0.5–1%, whereas it is diagnosed in approximately 4% of patients with IgAN [77]. Nevertheless, the mechanism of how gluten could trigger IgAN remains unclear. Gliadin, a mucosal antigen, is a component of gluten. In a mouse model expressing both human IgA1 and human CD89, a gluten-free diet for three generations reduced mesangial human IgA1 deposition and glomerular inflammation [78]. Feeding these mice with gluten increased mesangial IgA1 deposits and induced production of anti-gliadin IgA. In an uncontrolled prospective study, IgAN patients with a gluten-free diet had a reduction in proteinuria, hematuria, IgA-immune complex formation, and anti-gliadin IgA, but after 4 years of follow-up, there was no difference in the rate of decline in renal function [79]. However, in this study, patients with advanced renal failure were also included. A gluten-free diet could be an interesting first-line therapy in cIgAN, notably for patients with anti-gliadin Abs, as these patients usually have preserved renal function and such treatment is virtually free of side effects. However, controlled confirmatory trials will be needed to justify imposing the inconvenience of a gluten-free diet on children.

Enteric budesonide

The origin of dysregulated IgA production could be related to activation of intestinal immunity and local inflammation in the intestinal mucosa and Peyer's patches. The NEFIGAN study evaluated enteric budesonide, a corticosteroid, which targets the intestinal mucosal immune system [80]. This formulation of budesonide delivers the drug to ileocecal Peyer's patches, with minimal systemic exposure (only 10% reaches systemic

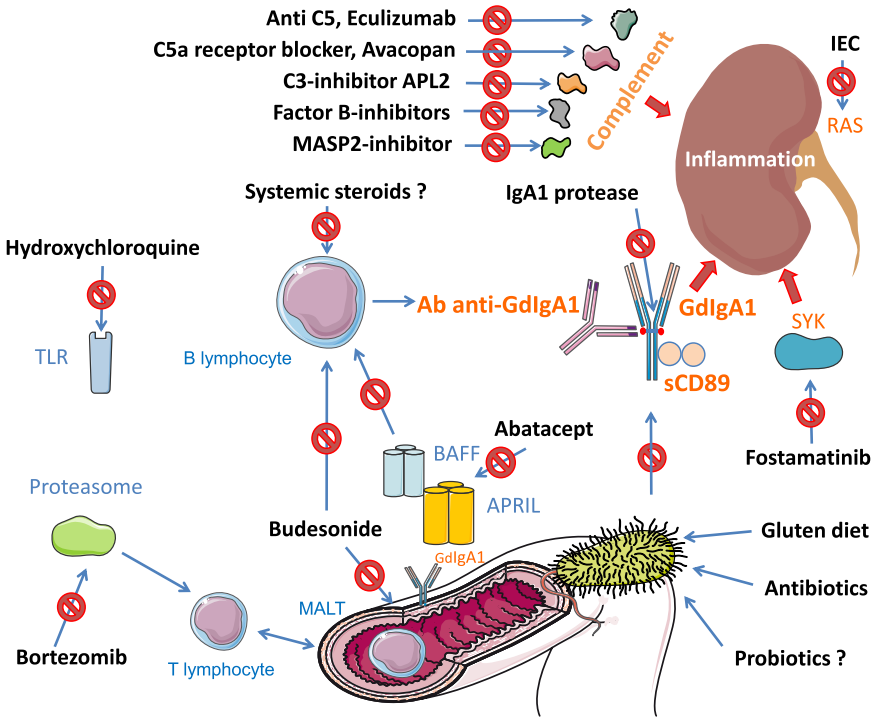


Fig. 1 New treatments targeting pathogenic factors The putative targets are renin–angiotensin system, B-cell lymphocytes, BAFF and APRIL, TOLL-like receptors, spleen tyrosine kinase (SYK), proteasome, GdIgA1, immune complexes (GdIgA1–IgG, sCD89–GdIgA1), complement activation, mucosal pathogens (food antigens and bacteria) as well as local inflammation. New drugs under clinical trial for IgAN treatment are also included

circulation) and side effects, due to first-pass metabolism. In this prospective randomized placebo-controlled trial of adult patients, after 9 months of treatment there was a significant reduction in proteinuria in patients receiving 8 mg or 16 mg budesonide a day. These results support the role of the mucosal immune system in IgAN. A phase III trial of modified-release budesonide for the treatment of IgAN is currently recruiting (NEFICON—NCT03643965).

In children, Venettacci et al. have reported the success of budesonide in treating a 12-year-old boy with IgAN and persistent nephrotic-range proteinuria [81]. Additional studies will be needed to determine if targeting the intestinal mucosa with glucocorticoids can improve renal outcomes in cIgAN without the systemic toxicity observed in STOP-IgAN [82] and TESTING adult trials [83].

Antibiotics or probiotics

IgA nephropathy relapse is often linked to an upper respiratory tract or gastrointestinal infection. An innate immune response could be triggered by translocation of bacteria themselves or their products (lipopolysaccharides, metabolites) and could aggravate IgAN [84]. Patients with gluten sensitivity or gliadine exposure have shown a higher increased intestinal permeability and local inflammation [85] possibly allowing translocation of microbiotic bacteria. Recurrent or chronic mucosal bacterial infections promote IgA production by stimulating the mucosal immune response. T-cell-dependent IgA production could be activated by bacteria. Qin et al. showed that TLR4 in B lymphocytes from healthy controls and patients with IgAN is activated by bacterial lipopolysaccharides, with methylation of the protein chaperone Cosmc, reducing the activity of galactosyltransferase, and decreasing the galactosylation of IgA1 [86].

An intestinal microbiota dysbiosis has been described in IgAN patients when compared to healthy controls [87]. Recently, a humanized mouse model of IgAN (α1KI/CD89Tg mice which spontaneously develop IgAN) was used to further understand microbiota involvement in IgAN by modulating their microbiota with antibiotics. Treatment of these mice with an antibiotic cocktail (vancomycin/amoxicillin/neomycin/metronidazole) for 8 weeks abolished mesangial IgA1 deposits and proteinuria without reducing total serum IgA1 levels. Formation of pathogenic IgA1–IgG complexes correlated significantly with mouse fecal bacterial load [88]. This suggests that an intestinal dysbiosis might be a cause, rather than a consequence, of IgA nephropathy and that nephrotoxic IgA1 originates from the gut. Further studies are needed to see if specific commensal species can be held accountable for disease pathogenesis.

There are as many microbes in the human body as there are human cells. Manipulating the gut microbiota with probiotics or antibiotics holds potential as a therapeutic strategy with a low risk of side effects. A more comprehensive approach to modifying the intestinal microbiota is fecal microbiota transplantation (FMT). This is becoming commonplace for *Clostridium difficile*–associated disease (CDAD) [89]—the most well-established dysbiosis in medicine—however, the results are variable. The technique, including donor selection procedure, has not yet been standardized and the FDA recently issued a warning after the transmission of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) *E. coli* led to the death of one FMT recipient. A clinical trial of FMT for refractory IgAN is currently underway in China (NCT03633864). This procedure is showing promising results in other autoinflammatory and autoimmune illnesses such as inflammatory bowel disease and multiple sclerosis.

Concluding remarks

There is a need for treatments targeting specific pathogenic factors (GdIgA1, GdIgA1–IgG, sCD89–GdIgA1), inflammatory processes, and proliferative lesions in cIgAN (Fig. 1). Since they are diagnosed younger, children can expect to undergo multiple lines of treatment throughout their lifetime, so safer treatment options with fewer side effects should be chosen initially. The intestinal mucosal immune system appears to play an important role in the pathogenesis of IgAN. Given the promising results seen in a phase II trial of steroids with local enteric effects among adults, budesonide should be studied in clinical trials for cIgAN as it has fewer side effects than systemic steroids. Other therapeutic interventions targeting the mucosal immune system, such as specific diet regimens, could provide a good adjunctive therapeutic option, in addition to RASB treatment. Hydroxychloroquine should also be investigated further as a steroid-sparing option for children. Targeting immune complex formation or complement activation should be considered as second-line treatment, and the associated risk of infection should be given special consideration in children with under-developed acquired immunity. The value and safety of recent developments in the treatment of adult IgAN need to be confirmed in children.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Coppo R, Gianoglio B, Porcellini MG, Maringhini S (1998) Frequency of renal diseases and clinical indications for renal biopsy in children (report of the Italian National Registry of renal biopsies in children). Group of Renal Immunopathology of the Italian Society of Pediatric Nephrology. Nephrol Dial Transplant 13: 293–297
2. Robert T, Berthelot L, Cambier A, Rondeau E, Monteiro RC (2015) Molecular insights into the pathogenesis of IgA nephropathy. Trends Mol Med 21:762–775

3. Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the Renal Pathology Society, Cattran DC, Coppo R, Cook HT, Feehally J, Roberts IS, Troyanov S, Alpers CE, Amore A, Barratt J, Berthoux F, Bonsib S, Bruijn JA, D'Agati V, D'Amico G, Emancipator S, Emma F, Ferrario F, Fervenza FC, Florquin S, Fogo A, Geddes CC, Groene HJ, Haas M, Herzenberg AM, Hill PA, Hogg RJ, Hsu SI, Jennette JC, Joh K, Julian BA, Kawamura T, Lai FM, Leung CB, Li LS, Li PK, Liu ZH, Mackinnon B, Mezzano S, Schena FP, Tomino Y, Walker PD, Wang H, Weening JJ, Yoshikawa N, Zhang H (2009) The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. Kidney Int 76:534–545
4. Kamei K, Harada R, Hamada R, Sakai T, Hamasaki Y, Hataya H, Ito S, Ishikura K, Honda M (2016) Proteinuria during follow-up period and long-term renal survival of childhood IgA nephropathy. PLoS One 11:e0150885
5. Coppo R (2017) Clinical and histological risk factors for progression of IgA nephropathy: an update in children, young and adult patients. J Nephrol 30:339–346
6. Gale DP, Molyneux K, Wimbury D, Higgins P, Levine AP, Caplin B, Ferlin A, Yin P, Nelson CP, Stanescu H, Samani NJ, Kleta R, Yu X, Barratt J (2017) Galactosylation of IgA1 is associated with common variation in C1GALT1. J Am Soc Nephrol 28:2158–2166
7. Hall YN, Fuentes EF, Chertow GM, Olson JL (2004) Race/ethnicity and disease severity in IgA nephropathy. BMC Nephrol 5:10
8. Koyama A, Igarashi M, Kobayashi M (1997) Natural history and risk factors for immunoglobulin a nephropathy in Japan. Research group on progressive renal diseases. Am J Kidney Dis 29:526–532
9. Wyatt RJ, Kritchevsky SB, Woodford SY, Miller PM, Roy S 3rd, Holland NH, Jackson E, Bishof NA (1995) IgA nephropathy: long-term prognosis for pediatric patients. J Pediatr 127:913–919
10. Radford MG Jr, Donadio JV Jr, Bergstralh EJ, Grande JP (1997) Predicting renal outcome in IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol 8: 199–207
11. Hastings MC, Delos Santos NM, Wyatt RJ (2007) Renal survival in pediatric patients with IgA nephropathy. Pediatr Nephrol 22:317–318
12. Ronkainen J, Ala-Houhala M, Autio-Harmainen H, Jahnukainen T, Koskimies O, Merenmies J, Mustonen J, Ormala T, Turtinen J, Nuutinen M (2006) Long-term outcome 19 years after childhood IgA nephritis: a retrospective cohort study. Pediatr Nephrol 21: 1266–1273
13. Wang T, Ye F, Meng H, Zhang L, Jin X (2012) Comparison of clinicopathological features between children and adults with IgA nephropathy. Pediatr Nephrol 27:1293–1300
14. Haas M, Rahman MH, Cohn RA, Fathallah-Shaykh S, Ansari A, Bartosh SM (2008) IgA nephropathy in children and adults: comparison of histologic features and clinical outcomes. Nephrol Dial Transplant 23:2537–2545
15. Shima Y, Nakanishi K, Hama T, Sato M, Mukaiyama H, Togawa H, Tanaka R, Kaito H, Nozu K, Iijima K, Yoshikawa N (2015) Biopsy timing and Oxford classification variables in childhood/adolescent IgA nephropathy. Pediatr Nephrol 30:293–299
16. Moura IC, Arcos-Fajardo M, Sadaka C, Leroy V, Benhamou M, Novak J, Vrtovsnik F, Haddad E, Chintalacharuvu KR, Monteiro RC (2004) Glycosylation and size of IgA1 are essential for interaction with mesangial transferrin receptor in IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol 15:622–634
17. Kiryluk K, Novak J (2014) The genetics and immunobiology of IgA nephropathy. J Clin Invest 124:2325–2332
18. Hastings MC, Afshan S, Sanders JT, Kane O, Eison TM, Lau KK, Moldoveanu Z, Julian BA, Novak J, Wyatt RJ (2012) Serum galactose-deficient IgA1 level is not associated with proteinuria in children with IgA nephropathy. Int J Nephrol 2012:315467
19. Kiryluk K, Moldoveanu Z, Sanders JT, Eison TM, Suzuki H, Julian BA, Novak J, Gharavi AG, Wyatt RJ (2011) Aberrant glycosylation of IgA1 is inherited in both pediatric IgA nephropathy and Henoch–Schonlein purpura nephritis. Kidney Int 80:79–87
20. Mizerska-Wasiak M, Gajewski L, Cichon-Kawa K, Maldyk J, Dziedzic-Jankowska K, Leszczynska B, Rybi-Szuminska A, Wasilewska A, Pukajlo-Marczyk A, Zwolinska D, Bienias B, Sikora P, Szczepanska M, Stelmaszczyk-Emmel A, Gorska E, Panczyk-Tomaszewska M (2018) Serum GDIgA1 levels in children with IgA nephropathy and Henoch–Schonlein nephritis. Cent Eur J Immunol 43:162–167
21. Suzuki Y, Suzuki H, Yasutake J, Tomino Y (2015) Paradigm shift in activity assessment of IgA nephropathy—optimizing the next generation of diagnostic and therapeutic maneuvers via glycan targeting. Expert Opin Biol Ther 15:583–593
22. Lamm ME, Emancipator SN, Robinson JK, Yamashita M, Fujioka H, Qiu J, Plaut AG (2008) Microbial IgA protease removes IgA immune complexes from mouse glomeruli in vivo: potential therapy for IgA nephropathy. Am J Pathol 172:31–36
23. Lechner SM, Abbad L, Boedec E, Papista C, Le Stang MB, Moal C, Maillard J, Jamin A, Bex-Coudrat J, Wang Y, Li A, Martini PG, Monteiro RC, Berthelot L (2016) IgA1 protease treatment reverses mesangial deposits and hematuria in a model of IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol 27:2622–2629
24. Yang R, Otten MA, Hellmark T, Collin M, Bjorck L, Zhao MH, Daha MR, Segelmark M (2010) Successful treatment of experimental glomerulonephritis with IdeS and EndoS, IgG-degrading streptococcal enzymes. Nephrol Dial Transplant 25:2479–2486
25. Soveri I, Molne J, Uhlin F, Nilsson T, Kjellman C, Sonesson E, Segelmark M (2019) The IgG-degrading enzyme of Streptococcus pyogenes causes rapid clearance of anti-glomerular basement membrane antibodies in patients with refractory anti-glomerular basement membrane disease. Kidney Int 96:1234–1238
26. Higa A, Shima Y, Hama T, Sato M, Mukaiyama H, Togawa H, Tanaka R, Nozu K, Sako M, Iijima K, Nakanishi K, Yoshikawa N (2015) Long-term outcome of childhood IgA nephropathy with minimal proteinuria. Pediatr Nephrol 30:2121–2127
27. Coppo R, Peruzzi L, Amore A, Piccoli A, Cochat P, Stone R, Kirschstein M, Linne T (2007) IgACE: a placebo-controlled, randomized trial of angiotensin-converting enzyme inhibitors in children and young people with IgA nephropathy and moderate proteinuria. J Am Soc Nephrol 18:1880–1888
28. Coppo R, Amore A, Gianoglio B, Cacace G, Picciotto G, Roccatello D, Peruzzi L, Piccoli G, De Filippi PG (1993) Angiotensin II local hyperreactivity in the progression of IgA nephropathy. Am J Kidney Dis 21:593–602
29. Lai KN, Tang SC, Guh JY, Chuang TD, Lam MF, Chan LY, Tsang AW, Leung JC (2003) Polymeric IgA1 from patients with IgA nephropathy upregulates transforming growth factor-beta synthesis and signal transduction in human mesangial cells via the renin–angiotensin system. J Am Soc Nephrol 14:3127–3137
30. Leung JC, Chan LY, Tang SC, Lam MF, Chow CW, Lim AI, Lai KN (2011) Oxidative damages in tubular epithelial cells in IgA nephropathy: role of crosstalk between angiotensin II and aldosterone. J Transl Med 9:169
31. Ye ZC, Wang C, Tang Y, Liu X, Peng H, Zhang H, Lou TQ (2009) Serum IgA1 from patients with IgA nephropathy up-regulates integrin-linked kinase synthesis and inhibits adhesive capacity in podocytes through indirect pathways. Clin Invest Med 32:E20–E27
32. Zhang B, Xie S, Shi W, Yang Y (2012) Amiloride off-target effect inhibits podocyte urokinase receptor expression and reduces proteinuria. Nephrol Dial Transplant 27:1746–1755
33. Trimarchi H (2013) Primary focal and segmental glomerulosclerosis and soluble factor urokinase-type plasminogen activator receptor. World J Nephrol 2:103–110
34. Wei C, Moller CC, Altintas MM, Li J, Schwarz K, Zacchigna S, Xie L, Henger A, Schmid H, Rastaldi MP, Cowan P, Kretzler M, Parrilla R, Bendayan M, Gupta V, Nikolic B, Kalluri R, Carmeliet P,