

Physiopathologie des glomérulopathies extramembraneuses

Cinquante ans de progrès, du laboratoire au patient

Pierre Ronco et Hanna Debiec

INSERM UMR_S702, UPMC Université-Paris 6, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, 75020 Paris, France

Auteur correspondant : Pierre Ronco, pierreronco@yahoo.fr

Reçu le 28 mai 2013

Résumé – Les glomérulopathies extramembraneuses (GEM) sont des maladies rénales induites par le dépôt de complexes immuns et de complément sur le versant externe de la paroi des capillaires glomérulaires. Elles sont responsables de fuites de protéines dans les urines et d'insuffisance rénale. Dans les 10 dernières années, des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension de la maladie, conduisant à la description de trois mécanismes distincts. Dans la forme allo-immune du nouveau-né, les anticorps sont dirigés contre l'endopeptidase neutre (EPN), une protéine du podocyte, absente chez les mères qui s'immunisent pendant la grossesse contre cet antigène présenté par les cellules placentaires. Cette enzyme a été le premier antigène du podocyte décrit dans les GEM. Les formes de l'adulte les plus fréquentes sont des maladies auto-immunes sans cause identifiée, caractérisées par la production d'anticorps dirigés contre un autre antigène du podocyte, le récepteur de type M de la phospholipase A2 (PLA2R1). Les anticorps anti-PLA2R1 sont détectés chez 70 à 80 % des patients avant traitement immunosuppresseur, et occasionnellement dans les formes secondaires de GEM. Des variants des gènes *PLA2R1* et *HLA-DQA1* sont associés de façon très significative à la GEM primitive chez les patients caucasiens, répondant ainsi à la définition de gènes de prédisposition. Un troisième mécanisme implique l'immunisation contre une protéine étrangère, la sérum albumine bovine (BSA) cationique, qui est responsable de rares formes de GEM chez le jeune enfant. La maladie se développe car l'antigène qui porte des charges positives se plante dans la paroi du capillaire glomérulaire chargée négativement où il sert de cible aux anticorps anti-BSA circulants. Cette observation met en lumière un rôle possible des antigènes alimentaires et de l'environnement dans les GEM.

Mots clés : Maladie auto-immune / allo-immunisation / endopeptidase neutre / récepteur de la phospholipase A2 / albumine bovine

Abstract – Pathophysiology of membranous nephropathies: fifty years of progress, from research to clinics.

Membranous nephropathy (MN) is a kidney disease characterized by deposition of immune complexes and complement on the outer aspect of the glomerular capillary wall. It is responsible for a loss of serum proteins in the urine and kidney failure. During the last ten years, considerable progress has occurred in the understanding of the molecular bases of the disease with the description of three distinct mechanisms in humans. In the neonatal allo-immune form, antibodies are directed against neutral endopeptidase (NEP), a podocyte antigen absent in the mothers who become immunized against this antigen expressed by placenta cells during pregnancy. NEP was the first podocyte antigen to be identified in MN. Most adult forms of MN are autoimmune diseases without identified etiology (*primary* MN), linked to the production of antibodies raised against another podocyte antigen, the type-M phospholipase A2 receptor (PLA2R1). Anti-PLA2R1 antibodies are detected in 70 to 80% of patients

before any immunosuppressive treatment, and only occasionally in secondary forms of MN, variants of *PLAR1* and *HLA-DQA1* genes are very significantly associated with occurrence of primary MN in Caucasians. The third mechanism is characterized by immunization against a foreign protein, cationic bovine serum albumin (BSA), which is involved in rare forms of MN during early childhood. This finding points to a possible role of food and environmental antigens in membranous nephropathy.

Key words: Auto-immunity / allo-immunisation / neutral endopeptidase / phospholipase A2 receptor / bovine serum albumin

Abréviations

BSA :	sérum albumine bovine
CALLA :	antigène commun des leucémies aiguës lymphoblastiques
EPN :	EndoPeptidase Neutre
GEM :	Glomérulopathie ExtraMembraneuse
GWAS :	<i>Genome Wide Association Study</i>
MBG :	Membrane Basale Glomérulaire
PLA2R1 :	Récepteur de la PhosphoLipase A2
SAH :	sérum albumine humaine
SNP :	<i>single nucleotide polymorphism</i>

Introduction

Les glomérulopathies extramembraneuses (GEM) sont des maladies immunologiques caractérisées par l'accumulation de dépôts sur le versant externe de la membrane basale glomérulaire (MBG) qui s'épaissit (figure 1). Ces dépôts sont composés d'IgG, principalement IgG4 et IgG1, d'antigènes dont certains ont été identifiés récemment, et du complexe d'attaque membranaire du complément C5b-9. La formation de dépôts immuns sous-épithéliaux et l'activation du complément sont responsables de l'augmentation de perméabilité du capillaire glomérulaire à l'origine de la protéinurie.

La GEM représente la cause la plus fréquente de syndrome néphrotique (due à la fuite massive de protéines dans les urines) chez les Caucasiens, rendant compte de 20 % des cas de ce syndrome. Bien qu'une rémission spontanée du syndrome néphrotique survienne chez environ un tiers des patients, 30 % des patients environ atteignent le stade d'insuffisance rénale terminale après 10 ans d'évolution (Glassock *et al.*, 2003 ; Polanco *et al.*, 2010).

Quatre-vingts pour cent des cas sont considérés comme « idiopathiques » sans cause identifiée, tandis que 20 % sont étiquetés « secondaires » car ils surviennent chez des patients présentant une infection (hépatite B chez l'enfant, syphilis), un lupus ou une maladie apparentée, un cancer, ou prenant certains médicaments. Les GEM idiopathiques sont généralement considérées comme des prototypes de

maladies auto-immunes affectant un organe, alors que les formes secondaires impliquent des antigènes étrangers, de nature virale ou tumorale.

Le traitement immunosuppresseur des GEM est controversé (Waldman *et al.*, 2009), en partie à cause de l'hétérogénéité de la maladie et de l'absence de biomarqueurs sensibles résultant de l'ignorance des cibles antigéniques et des anticorps néphritogènes. La clé d'un traitement physiopathologique réside dans la compréhension des événements qui conduisent à l'immunisation, à la formation des dépôts immuns, et à l'activation du complément et des autres médiateurs de la protéinurie, ce qui requiert l'identification du ou des antigènes pathogènes.

Dans les dix dernières années, des avancées considérables ont été réalisées dans la compréhension des mécanismes moléculaires des GEM, et en particulier dans l'identification des antigènes cibles des anticorps pathogènes. Au-delà de leur intérêt physiopathologique pour la compréhension des maladies autoimmunes, ces progrès détaillés dans l'article ci-dessous vont transformer le diagnostic, la prise en charge thérapeutique, et la surveillance des patients atteints de GEM.

Avancées physiopathologiques

Identification des cibles antigéniques des GEM primitives : un succès de la recherche translationnelle

Le modèle expérimental de la néphrite de Heymann

Dans ce modèle décrit par un pédiatre dans les années 1950, les rats immunisés avec une préparation de la bordure en brosse des tubes contournés proximaux du rein développent une GEM très similaire à la maladie humaine. Les anticorps produits reconnaissent un antigène présent non seulement dans la bordure en brosse, mais aussi dans le glomérule à la surface des podocytes (figure 2).

L'autoantigène de la néphrite de Heymann a été identifié par Kerjaschki et Farquhar au début des années 1980 (Kerjaschki & Farquhar, 1982, 1983) comme étant une protéine membranaire du podocyte,

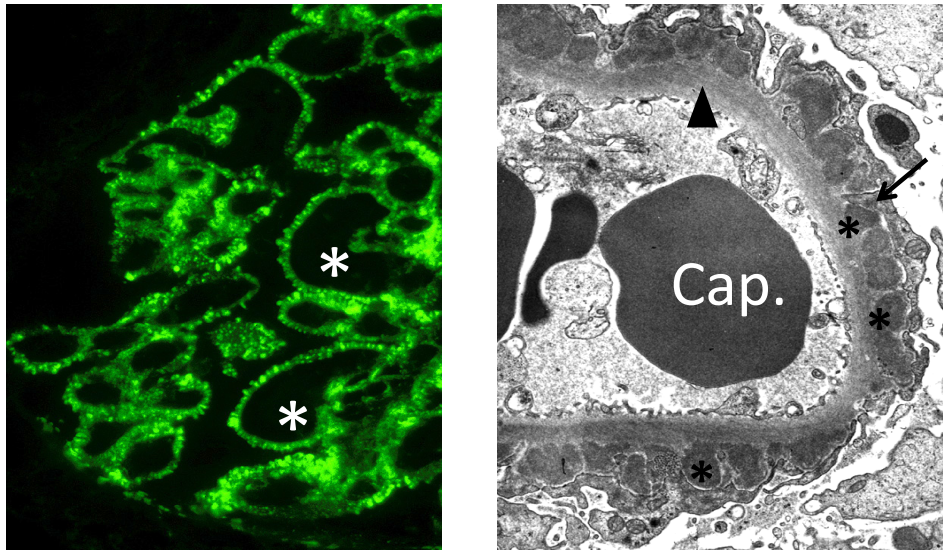


Fig. 1. Aspects morphologiques de la glomérulopathie extramembraneuse. À gauche, dépôts granuleux d'IgG détectés par des anticorps anti-IgG, localisés sur le versant externe des anses capillaires (astérisques). À droite, ces dépôts paraissent denses aux électrons en microscopie électronique. Cap., lumière capillaire; tête de flèche, membrane basale glomérulaire; astérisques, dépôts immuns extramembraneux; flèche et astérisques, podocytes « affaissés » sur la membrane basale (Ronco, 2012a).

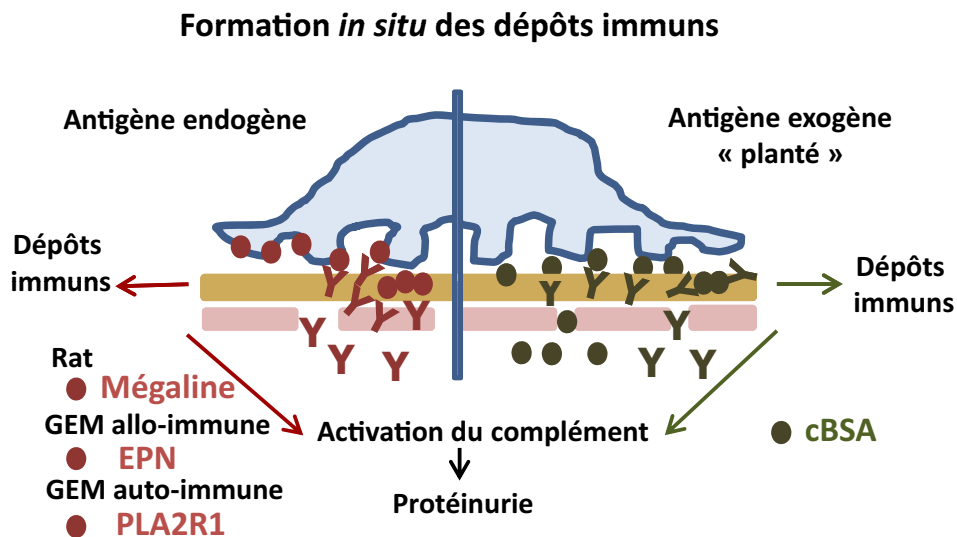


Fig. 2. Mécanisme de formation des dépôts extramembraneux. Les anticorps anti-mégaline (rat), anti-EPN ou anti-PLA2R1 (homme) traversent l'endothélium fenestré (couleur parme rose) et la membrane basale glomérulaire (MBG, couleur jaune moutarde), et atteignent leur cible antigénique (ronds rouges) à la surface des podocytes (couleur bleue, moitié gauche de la figure). La fixation de l'anticorps entraîne une redistribution de l'antigène (« clustering ») suivie du relargage des complexes immuns qui adhèrent à des composants de la MBG. Les complexes immuns augmentent en taille et activent le complément, induisant une cascade d'évènements qui augmentent la perméabilité de la paroi capillaire aux protéines et provoquent l'apparition d'un syndrome néphrotique. La moitié droite de la figure présente le cas d'un antigène circulant étranger à l'organisme (« exogène ») qui se plante dans la paroi du capillaire glomérulaire porteuse de charges négatives pour des raisons physico-chimiques (antigène chargé positivement). Cet antigène, ici la sérum albumine bovine cationique (ronds vert-bronze), sert ensuite de cible aux anticorps circulants, ce qui entraîne une protéinurie selon un mécanisme analogue à celui décrit ci-dessus pour les antigènes endogènes.

dénommée « mégaline ». C'est une protéine transmembranaire de 4600 acides aminés dont la masse moléculaire est voisine de 600 kDa. Il s'agit d'un récepteur à multiples ligands qui appartient à la superfamille des récepteurs des LDL. On le trouve avec la clathrine à la semelle des pieds des podocytes, au site de formation des complexes immuns.

Chez l'Homme, la mégaline est présente dans la bordure en brosse des tubes proximaux où, avec une autre protéine, la cubiline, elle joue un rôle considérable dans la réabsorption des protéines, des chaînes légères d'immunoglobuline, de la vitamine D et de la vitamine B12. Dans le glomérule, elle n'est pas détectée par les anticorps habituels, mais des données récentes suggèrent qu'elle pourrait être présente dans le podocyte, ce qui amènera peut-être à rediscuter son rôle éventuel dans les GEM humaines (Prabakaran *et al.*, 2011).

L'endopeptidase neutre (EPN), cible antigénique de la GEM allo-immune néonatale

Après 20 ans de recherches depuis la découverte de la mégaline, nous avons identifié un antigène équivalent de la mégaline chez l'Homme, chez un enfant né avec une GEM (figure 2). En raison du développement précoce de la GEM chez cet enfant, nous avons fait l'hypothèse que la mère s'était immunisée pendant la grossesse, transférant au fœtus des anticorps néphritogènes. L'antigène cible a été identifié par immunoprécipitation et Western blot comme étant l'endopeptidase neutre (Debiec *et al.*, 2002). Cette enzyme responsable de la dégradation de peptides ayant des propriétés biologiques importantes (enképhaline, facteurs natriurétiques, endothéline, bradykinine, substance P) est présente dans le rein à la surface des podocytes, dans la bordure en brosse, et les parois vasculaires, et dans de nombreux autres organes mais dans des localisations très spécifiques, ainsi que dans les granulocytes. Elle est identique à l'antigène commun des leucémies aiguës lymphoblastiques (CALLA) et à CD10.

Les anticorps produits par la mère sont responsables de la maladie de l'enfant car celle-ci a pu être transférée passivement au lapin adulte et aux lappes à la naissance par l'injection des IgG de la mère, alors que les IgG du père étaient sans effet. En outre, l'EPN a été localisée par microscopie confocale dans les dépôts immuns avec l'IgG et le complexe d'attaque membranaire du complément C5b-9, dans la biopsie de l'enfant et chez les lapins injectés avec les IgG maternelles (Debiec *et al.*, 2002).

Parce que la mère n'avait aucune anomalie rénale malgré des titres très élevés d'anticorps anti-EPN, nous avons fait l'hypothèse selon laquelle celle-ci pourrait être déficiente en EPN. Dans les cinq familles

analysées, des mutations tronquantes du gène de l'EPN ont été identifiées (figure 3). Le gène muté est non fonctionnel, en raison d'une instabilité de l'ARN messager ou d'une destruction prématurée de la protéine (Debiec *et al.*, 2004). L'allo-immunisation est survenue vraisemblablement au cours d'un avortement spontané précédant la grossesse, mais elle peut aussi être déclenchée par la grossesse en cours, quand le système immunitaire de la mère est exposé à l'EPN héritée du père qui se trouve sur les syncytiotrophoblastes et les cellules fœtales.

L'absence de phénotype apparent chez les individus déficients en EPN était inattendue ; elle peut probablement être expliquée par une redondance fonctionnelle avec d'autres enzymes. Les souris déficientes en EPN ont un comportement différent, manifestant entre autres une hypotension, une sensibilité accrue au choc infectieux, une forme précoce de maladie d'Alzheimer, des tumeurs prostatiques, et un goût prononcé pour l'alcool.

Après la naissance, l'insuffisance rénale et le syndrome néphrotique se sont rapidement amendés chez la plupart des enfants avec deux exceptions. Un nouveau-né a eu une période d'insuffisance rénale prolongée malgré des exsanguinotransfusions. Ce cas nous a permis d'établir la responsabilité des IgG1 anti-EPN car la mère ne produisait pas d'IgG4 anti-EPN. Cette constatation est en accord avec la capacité des IgG1 à activer le complément alors que les IgG4 n'ont pas cette potentialité. Le patient le plus âgé a développé de façon tardive, à l'âge adulte, une insuffisance rénale chronique sévère nécessitant le recours à la transplantation. Cette insuffisance rénale est probablement la conséquence des lésions de GEM combinées à une réduction anténatale du nombre de néphrons liée au conflit immunologique. La production par les enfants d'anticorps dirigés contre les idiotypes ou allotypes, portés par les IgG maternelles, a pu contribuer à la progression de la maladie rénale. Cette observation suggère qu'une maladie rénale anténatale, liée à l'allo-immunisation anti-EPN, peut se manifester sous la forme d'une GEM ou d'une insuffisance rénale « idiopathique » à l'adolescence ou éventuellement plus tard.

Nos travaux ont ainsi montré qu'à côté de l'incompatibilité dans le système de groupe sanguin Rhésus, des maladies par incompatibilité foeto-maternelle pouvaient également concerner des organes comme le rein, ce qui ouvre la porte à la recherche d'affections similaires dans d'autres organes.

Le récepteur de type M de la phospholipase A2 (PLA2R1), cible antigénique de la GEM « idiopathique » de l'adulte

L'identification de l'EPN comme étant l'antigène impliqué dans une population rare de patients atteints de

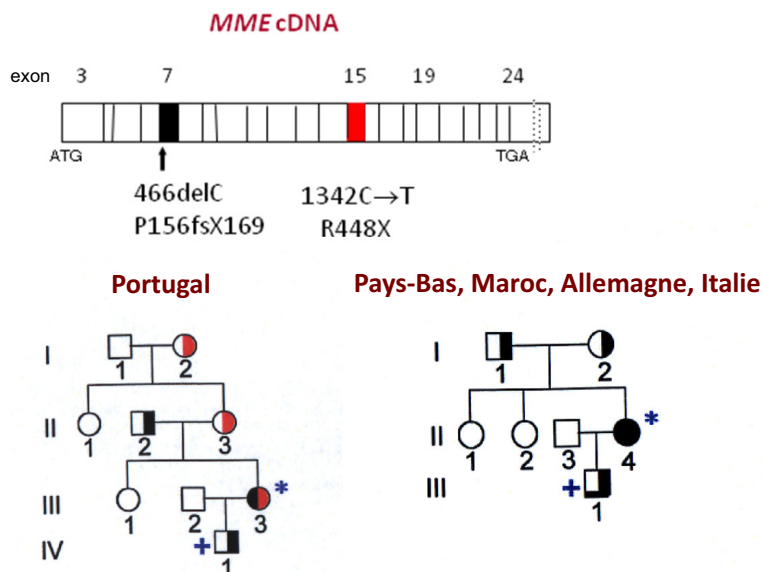


Fig. 3. Schéma du gène *MME* et des mutations identifiées dans les cinq familles. Le gène comporte 24 exons. Deux mutations ont été détectées dans les exons 7 et 15. La mutation dans l'exon 7 est une délétion d'un nucléotide qui entraîne un décalage du cadre de lecture et l'apparition prématurée d'un codon stop. La mutation dans l'exon 15 introduit un codon stop. Les mutations dans les exons 7 et 15 prédisent une protéine tronquée, qui est rapidement dégradée dans le protéasome (Ronco, 2012b). Le signe + désigne les enfants ayant une GEM à la naissance, l'astérisque les mères déficientes en EPN qui sont en bonne santé.

GEM néonatale, a apporté la preuve du concept qu'un antigène humain podocytaire pouvait servir de cible aux anticorps pathogènes circulants chez l'Homme, ouvrant ainsi la voie à l'identification du premier antigène (PLA2R1) associé aux GEM « idiopathiques » de l'adulte. Cet antigène a été caractérisé en 2009 par une équipe nord-américaine qui a utilisé comme source d'antigène des glomérules isolés de reins humains impropres à la transplantation. Soixante-dix à 80 % des sérums de patients ayant une GEM « idiopathique » reconnaissent spécifiquement un antigène d'un poids moléculaire de 185 kDa, qui a été identifié comme étant PLA2R1 par une analyse en spectrométrie de masse (Beck *et al.*, 2009). La réactivité avec les anticorps des patients disparaît après la réduction des ponts disulfures, ce qui indique que la structure reconnue est conformationnelle. Aucune réactivité n'a été observée avec les sérums des patients ayant une GEM secondaire, une autre néphropathie, une maladie auto-immune, ou avec les sérums des sujets sains.

PLA2R1 est un récepteur membranaire pour la phospholipase A2, qui est un puissant médiateur de l'inflammation. Il appartient à la famille des récepteurs du mannose dont les membres sont recyclés par endocytose. PLA2R1 est considéré comme un récepteur de clairance de la phospholipase A2 dont l'internalisation dans la cellule inhibe les effets inflammatoires. Comme la mégaline chez le rat et l'EPN chez l'Homme, PLA2R1 semble être localisé dans le

glomérule à la surface des podocytes. Chez les patients atteints de GEM « idiopathique », PLA2R1 est alors détecté dans les dépôts extramembraneux, et les immunoglobulines éluées des glomérules de ces patients reconnaissent spécifiquement PLA2R1, ce qui n'est pas le cas des immunoglobulines éluées des glomérules des patients ayant une GEM secondaire ou une autre néphropathie (Beck *et al.*, 2009).

Ces résultats suggèrent que, comme dans la néphrite de Heymann et la GEM allo-immune néonatale, les dépôts extramembraneux des GEM « idiopathiques » sont formés *in situ* à la suite de la fixation des anticorps anti-PLA2R1 à l'antigène présenté à la surface des podocytes même si d'autres sources d'antigène sont envisageables (sérum, éléments figurés du sang) (figure 2). La démonstration définitive de l'implication des anticorps anti-PLA2R1 dans la pathogénie de la GEM nécessiterait le transfert de la maladie par le sérum injecté à des primates parce que PLA2R1 n'est pas détecté dans les glomérules murins et de lapin. Cependant, le potentiel néphritogène des anticorps est suggéré par les corrélations significatives entre leur taux et le débit de protéinurie (Hofstra *et al.*, 2012; Kanigicherla *et al.*, 2013; Oh *et al.*, 2013) et par la récurrence de la GEM après transplantation qui représente la contrepartie chez l'homme du modèle de néphrite de Heymann passive chez le rat (Debiec *et al.*, 2011a). Nous avons récemment décrit un cas de GEM récurrente due à un dépôt d'anticorps

monoclonal anti-PLA2R1 de sous-classe IgG3 et d'isotype kappa qui a été détecté rétrospectivement dans les glomérules du rein natif (Debiec *et al.*, 2012). Les anticorps anti-PLA2R1 circulants sont de la même sous-classe et du même isotype. Dans ce cas, il est très vraisemblable que le même anticorps monoclonal soit responsable de la GEM initiale et de sa récurrence sur le greffon. Quoi qu'il en soit, la découverte des anticorps anti-PLA2R1 représente un progrès majeur dans la prise en charge des patients ayant une GEM « idiopathique » comme nous le verrons plus loin.

La sérum albumine bovine (BSA) cationique, cible antigénique des GEM du jeune enfant

Dans l'alimentation moderne, les ingrédients de la nourriture sont soumis à différentes conditions de préparation industrielle qui peuvent induire des modifications des protéines susceptibles d'altérer leur digestion et de permettre leur passage dans le sang (Sathe *et al.*, 2005). Étant donné que les anticorps anti-BSA sont fréquents dans la population générale (Mogues *et al.*, 2005), nous avons fait l'hypothèse selon laquelle ils pourraient être impliqués dans la pathogénie des GEM et reconnaître des épitopes spécifiques, comme c'est le cas dans la polyarthrite rhumatoïde (Pérez-Maceda *et al.*, 1991) et la sclérose en plaques (Winer *et al.*, 2001). Des taux élevés d'anticorps anti-BSA ont été trouvés chez quatre des neuf enfants (tous les quatre âgés de moins de 5 ans) et chez sept des 41 adultes atteints de GEM « idiopathique » analysés consécutivement. Les anticorps réagissaient spécifiquement avec la BSA sans reconnaître la sérum albumine humaine (SAH). Ils contenaient une proportion variable d'IgG1 et d'IgG4, alors que les anticorps impliqués dans l'allergie aux protéines du lait sont de classe IgE. Tous les anticorps anti-BSA détectés chez les patients ayant une GEM reconnaissent principalement un peptide de la BSA contenant deux épitopes linéaires absents de l'albumine humaine (Debiec *et al.*, 2011b).

La séquence de ce peptide incluant des résidus arginine et lysine, qui sont des sites de clivage de la trypsine, fait envisager une dégradation complète dans le tube digestif; le développement d'anticorps contre ce peptide suppose donc le passage dans le sang d'albumine bovine, non ou partiellement digérée. Effectivement, les quatre enfants avec des taux élevés d'anticorps anti-BSA avaient aussi des taux élevés de BSA circulante. Seuls quatre des sept adultes avec des taux élevés d'anti-BSA avaient de la BSA circulante mais à une moindre concentration que les enfants.

Les modèles expérimentaux décrits chez le lapin au début des années 1980, où seule la forme cationisée

de la BSA pouvait induire une GEM (Van Damme *et al.*, 1978), nous ont conduits à analyser la charge de la BSA circulante. Chez les enfants atteints de GEM, celle-ci migrerait dans la zone basique de pH, indiquant qu'elle portait des charges positives, alors que la BSA native migrerait dans les régions neutre ou faiblement acide. En revanche chez les adultes atteints de GEM, la BSA migrerait comme la BSA native. Comme attendu, la BSA n'a été détectée dans les dépôts glomérulaires que chez les enfants ayant à la fois l'antigène BSA cationique et l'anticorps circulant. Chez ces enfants, les dépôts ne contenaient pas l'antigène PLA2R1. En revanche, la BSA n'était pas détectée chez les patients ayant une GEM idiopathique en l'absence de BSA cationique circulante et dans les biopsies d'autres néphropathies. En outre, les Ig éluées des dépôts glomérulaires reconnaissent la BSA, et non la SAH, et cette activité était portée par les IgG1 et les IgG4.

Ces observations suggèrent fortement que le scénario de l'antigène « planté » établi chez l'animal s'applique aussi à la pathologie humaine. Seule la forme cationique de la BSA peut se déposer dans la paroi du capillaire glomérulaire porteuse de charges négatives. L'exposition à la BSA est commune; chez le jeune enfant, le lait de vache est la principale source de BSA. De petites quantités de protéines alimentaires sont absorbées sous forme non digérée ou partiellement digérée chez les sujets sains (Husby *et al.*, 2000). Les anticorps de classe IgG contre les protéines du lait de vache sont présents chez presque tous les enfants exposés au lait de vache et sont considérés comme « physiologiques » (Kletter *et al.*, 1971). Cependant la détection très fréquente des anticorps anti-BSA dans les sérums humains n'est généralement associée à aucun événement clinique, en dehors de l'allergie aux protéines du lait due aux IgE. Ces constatations suggèrent que des facteurs supplémentaires interviennent dans l'induction d'une GEM.

Le premier facteur réside dans les propriétés physico-chimiques de l'antigène et la quantité d'antigène circulant. La cause de la formation de BSA cationique chez nos patients reste inexpliquée. On peut évoquer des différences dans la préparation industrielle des laits et la composition de la flore intestinale qui pourraient conduire à des modifications pathologiques de la BSA. On sait, en effet, que le traitement de la BSA par la chaleur induit la dénaturation de la protéine à l'origine d'une protéolyse réduite (Alting *et al.*, 1997) dans les conditions de pH relativement élevé (3–4) de l'estomac des jeunes enfants (Schmidt *et al.*, 1995). En outre, la quantité de BSA intacte qui entre dans la circulation est vraisemblablement plus grande chez le jeune enfant avant la maturation complète du tractus gastro-intestinal et l'établissement définitif de la fonction de barrière

(Sreedharan *et al.*, 2004). Cette quantité peut s'accroître pendant les épisodes de gastroentérite (Torente *et al.*, 2004).

Le second facteur réside dans la prédominance de la réponse immune de type T-helper-2 (Th2) qui conduit à la production d'IgG4 à la fois dans la maladie humaine et les modèles animaux (Kuroki *et al.*, 2005).

Identification de gènes de prédisposition à la GEM « idiopathique » de l'adulte

L'association de la GEM idiopathique à certains gènes du système de compatibilité tissulaire HLA a été démontrée par les études sérologiques et de typage moléculaire, en particulier avec des allèles HLA-DR chez les Caucasiens (Klouda *et al.*, 1979; Vaughan *et al.*, 1989; Berthoux *et al.*, 1990; Ogahara *et al.*, 1992). Dès 1979, une association particulière avait été mise en évidence avec HLA-DRW3 (Klouda *et al.*, 1979).

Nous avons utilisé une autre approche reposant sur l'étude de plus de 280 000 marqueurs individuels de polymorphisme (SNP, « *single nucleotide polymorphism* ») dans l'ensemble du génome, dénommée étude pangénomique ou « *Genome Wide Association Study* » (GWAS). Pour réaliser cette étude, nous avons formé un consortium avec les Britanniques et les Hollandais. L'étude a porté sur 75 cas français, 146 cas hollandais et 335 cas britanniques, tous d'origine caucasienne. Les cas ont été comparés à des témoins (157 Français, 1832 Hollandais et 349 Britanniques) ethniquement appariés (Stanescu *et al.*, 2011). Dans une analyse globale portant sur les 556 cas (398 hommes), nous avons identifié des allèles à deux loci associés de façon très significative avec la GEM idiopathique. Le locus 2q24 sur le chromosome 2 contient le gène *PLA2R1*, une cible majeure de la réponse auto-immune décrite ci-dessus. Le locus 6p21 sur le chromosome 6 contient le gène *HLA-DQA1* codant pour un antigène de classe II du complexe HLA des antigènes leucocytaires humains, associé à l'induction de la réponse immune (présentation de l'antigène). Le risque de développer une GEM idiopathique est multiplié par 78 chez les patients homozygotes porteurs des deux allèles de prédisposition de *PLA2R1* et *HLA-DQA1* ayant la plus forte signification statistique. La description de ces associations génétiques a d'importantes implications. Nos résultats suggèrent que des variations de séquence dans *HLA-DQA1* et *PLA2R1* sont en partie responsables du développement de la GEM idiopathique chez les Caucasiens. Ils étayaient le rôle de *PLA2R1* comme antigène cible des GEM idiopathiques au terme d'une étude pangénomique systématique et non biaisée. En raison de la forte association statistique de variants de *PLA2R1* à la GEM

primitive chez les Caucasiens, nous avons fait l'hypothèse selon laquelle des variants rares de la séquence codante de *PLA2R1* pourraient induire une conformation particulière de l'antigène de *PLA2R1* à l'origine de la réponse auto-immune. L'analyse des séquences n'a permis de détecter des variants rares que chez sept patients sur 95 et chez quatre des 60 patients ayant une GEM associée à *PLA2R1* avec des anticorps circulants anti-*PLA2R1* et/ou la présence d'antigène *PLA2R1* dans la biopsie. Nous avons confirmé l'association aux variants communs identifiés dans nos études antérieures de GWAS (Coenen *et al.*, 2013). Ces résultats excluent l'hypothèse de variants rares comme étant responsables d'une maladie conformationnelle, et conduisent à rechercher d'autres explications génétiques : variants dans les séquences non codantes, régulatrices, responsables d'une expression accrue de l'antigène à la surface des podocytes ; combinaison rare de variants fréquents conduisant à une conformation particulière de *PLA2R1* ; modifications épigénétiques induites par l'environnement ou par des agressions toxiques ou microbiennes influençant le niveau d'expression de l'antigène et/ou son insertion dans la membrane.

Notre étude montre une association statistique plus forte avec les allèles de *HLA-DQA1* ($p = 8,0 \times 10^{-93}$) qu'avec ceux de *PLA2R1* ($p = 8,6 \times 10^{-29}$). Ainsi, le risque conféré par les allèles *HLA-DQA1* paraît plus élevé que le risque conféré par les allèles *PLA2R1*. Une explication possible de cette discordance est le fait que *PLA2R1* n'est pas le seul antigène cible dans les GEM idiopathiques de l'adulte, mais que *HLA-DQA1* pourrait aussi faciliter le développement d'une réponse immune dirigée contre d'autres antigènes. Des anticorps dirigés contre des antigènes cytoplasmiques des podocytes ont été décrits mais leur rôle comme biomarqueurs et dans la pathogénie de la maladie reste à déterminer (Murtas *et al.*, 2013; Ronco *et al.*, 2013).

Quoi qu'il en soit, la GEM primitive de l'adulte caucasien représente un modèle idéal de maladie auto-immune spécifique d'organe. Les outils sont disponibles pour identifier les variants génétiques impliqués dans le déclenchement et la progression ou la régression des manifestations (rémission spontanée) et des lésions rénales. Combinés aux investigations immunopathologiques, ils pourraient permettre de faire franchir un pas important à nos connaissances sur les mécanismes de l'auto-immunité.

La physiopathologie au service de la clinique

Les progrès considérables réalisés dans la connaissance des mécanismes moléculaires et génétiques des

GEM ont d'importantes retombées cliniques tant chez l'enfant que chez l'adulte.

GEM allo-immunes néonatales : surveillance des femmes allo-immunisées contre l'endopeptidase neutre

La GEM anténatale allo-immune est une maladie sévère qui menace le pronostic vital et rénal du nouveau-né. Nous avons observé que les nouveau-nés issus d'une seconde grossesse étaient plus sévèrement affectés, présentant à la naissance un syndrome néphrotique majeur, un défaut de fonctionnement du tubule proximal et une ostéopénie (Nortier *et al.*, 2006). L'aggravation des manifestations cliniques après une seconde grossesse n'était pas inattendue, étant annoncée par une augmentation majeure du titre des anticorps maternels anti-EPN résultant d'une nouvelle exposition à l'EPN placentaire. Contrairement à l'allo-immunisation foeto-maternelle anti-Rhésus, l'immunisation anti-EPN survient lors de la première grossesse quand le système immunitaire maternel reconnaît l'EPN du placenta, et les grossesses ultérieures représentent des « rappels » d'immunisation (Nortier *et al.*, 2006).

Il est important d'identifier des familles à risque de glomérulonéphrite allo-immune (syndrome néphrotique ou insuffisance rénale avec protéinurie à la naissance régressant en quelques semaines, accentuation de la symptomatologie à l'issue des grossesses ultérieures). Dès lors qu'une famille est identifiée, la déficience en EPN peut être rapidement détectée chez les membres homozygotes (mères) de la famille en mesurant l'activité enzymatique ou l'antigène dans les urines, et en recherchant les mutations du gène *MME*. La surveillance des grossesses chez les mères déficientes en EPN repose sur le dosage par ELISA des anticorps anti-EPN des sous-classes IgG1 et IgG4. La mesure répétée du taux des anticorps permet d'adapter les traitements (corticoïdes, immunoglobulines intraveineuses, échanges plasmatiques).

GEM du jeune enfant induite par la BSA cationique

L'identification d'un antigène alimentaire de l'environnement comme étant la cause de GEM du jeune enfant a d'importantes conséquences diagnostiques et thérapeutiques. Les GEM « idiopathiques » représentent une entité rare dans la population pédiatrique, rendant compte de 2 % des biopsies rénales, et leur traitement est difficile. Dans l'attente d'études épidémiologiques plus que jamais nécessaires, l'absorption de BSA alimentaire modifiée et l'immunisation contre la BSA doivent être considérées comme une cause majeure de GEM chez le jeune enfant,

et conduire à la recherche de BSA dans les dépôts immuns. Si la BSA est mise en évidence, il paraît logique d'éliminer la BSA du régime avant d'utiliser des thérapies immunosuppressives plus agressives et potentiellement toxiques. D'une façon plus générale, nos observations suggèrent que d'autres antigènes alimentaires pourraient être impliqués dans le développement des GEM.

GEM « idiopathiques » de l'adulte

Bien que le rôle exact de PLA2R1 dans la pathogénie des GEM « idiopathiques » reste inconnu, la présence dans la circulation d'anticorps anti-PLA2R1 est hautement spécifique des GEM « idiopathiques ». Une prévalence faible de ces anticorps a été observée dans les formes secondaires de GEM (Knehtl *et al.*, 2010; Qin *et al.*, 2011); cependant on ne peut exclure une coïncidence dans ces cas. Les patients ayant d'autres causes de syndrome néphrotique ou les sujets normaux n'ont pas de taux détectable d'anticorps anti-PLA2R1, si bien que leur présence peut être considérée comme absolument spécifique du diagnostic de GEM. Ces constatations remettent en cause dans certains cas l'indication de la ponction biopsie rénale. Au total, la spécificité des anticorps anti-PLA2R pour le diagnostic de GEM est de 100 %, leur sensibilité comprise entre 70 et 80 % (Ronco *et al.*, 2012).

Plusieurs études indiquent que les anticorps anti-PLA2R1 sont en corrélation avec la protéinurie et l'activité de la maladie, car ils disparaissent en cas de rémission spontanée ou induite par le traitement et réapparaissent en cas de rechute (Hofstra *et al.*, 2011, 2012; Beck *et al.*, 2011; Kanigicherla *et al.*, 2013; Oh *et al.*, 2013). Le taux des anticorps semble également avoir une valeur pronostique : un taux élevé est associé à un risque plus faible de rémission spontanée (Hofstra *et al.*, 2012) et à un risque plus élevé de détérioration de la fonction rénale (Kanigicherla *et al.*, 2013). Un test de détection de ces anticorps par immunofluorescence et un dosage ELISA sont maintenant commercialisés (Debiec & Ronco, 2011a; Dährich *et al.*, 2013); on peut penser que la surveillance du taux des anticorps permettra de titrer les traitements sur la base de l'activité immunologique de la maladie. En particulier, il semble que les anticorps disparaissent avant la protéinurie chez les malades traités par Rituximab® (Beck *et al.*, 2011), ce qui pourrait inciter à arrêter le traitement immunosuppresseur avant d'obtenir la rémission du syndrome néphrotique chez les patients n'ayant plus d'activité immunologique.

L'antigène PLA2R1 a été détecté dans les dépôts immuns chez des patients « séronégatifs », ce qui pourrait être expliqué par la clairance rapide des anticorps circulants chez certains patients, l'entrée en phase de rémission immunologique ou une biopsie

réalisée à distance du début effectif de la maladie. La détection de l'antigène PLA2R dans les dépôts glomérulaires est plus sensible que celle des anticorps sériques et elle permet le diagnostic rétrospectif dans les biopsies d'archive, ce qui est important pour la surveillance des patients qui vont bénéficier d'une greffe rénale (Svobodova *et al.*, 2013); elle est aussi utile pour confirmer le diagnostic de GEM primitive (Hoxha *et al.*, 2012). Réciproquement, la détection des anticorps n'est pas toujours associée à la présence de l'antigène dans les dépôts; il est possible, en effet, que tous les anticorps anti-PLA2R1 n'aient pas le même pouvoir pathogène (Debiec & Ronco, 2011b). Ces constatations suggèrent que la détermination conjointe des anticorps circulants et de l'antigène dans les biopsies pourrait permettre de mieux sélectionner les patients en vue d'un traitement approprié. Des études prospectives sont nécessaires pour établir la signification et l'implication thérapeutique de la persistance de l'antigène PLA2R1 dans les dépôts immuns.

Conclusions

Les avancées physiopathologiques récentes sur la physiopathologie des GEM conduisent à de profonds changements dans le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des patients atteints de cette maladie. Il reste cependant des incertitudes concernant la signification pathogénique des anticorps anti-PLA2R1, le rôle éventuel de complexes antigènes-anticorps multiples intervenant à différents stades de la maladie, et les cibles antigéniques dans les GEM secondaires. L'établissement de profils sérologiques précis, individuels pour chaque patient, répétés au cours de l'évolution de la maladie, devrait permettre d'adapter les indications et les modalités thérapeutiques dans le cadre d'une médecine personnalisée.

Conflits d'intérêt Aucun.

Remerciements. La recherche des auteurs est soutenue par l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR-07-Physio-016-01), par la Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM 2012) et par le 7^{ème} Programme Cadre de la Communauté Européenne, contrat 2012-305608 « *European Consortium for High-Throughput Research in Rare Kidney Diseases (EURenOmics)* ».

Références

Alting A.C., Meijer R.J., van Beresteijn E.C., Incomplete elimination of the ABBOS epitope of bovine serum albumin under simulated gastrointestinal conditions of infants. *Diabetes Care*, 1997, 20, 875–880.

- Beck L.H. Jr., Bonegio R.G., Lambeau G., Beck D.M., Powell D.W., Cummins T.D., Klein J.B., Salant D.J., M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med*, 2009, 361, 11–21.
- Beck L.H. Jr., Fervenza F.C., Beck D.M., Bonegio R.G., Malik F.A., Erickson S.B., Cosio F.G., Cattran D.C., Salant D.J., Rituximab-induced depletion of anti-PLA2R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22, 1543–1550.
- Berthoux F.C., Berthoux P., Hassan A.A., Vacherot C., Pomier G., Laurent B., Le Petit J.C., [Immunogenetics of primary membranous glomerulonephritis]. *Presse Med*, 1990, 19, 990–993.
- Coenen M.J., Hofstra J.M., Debiec H., Stanescu H.C., Medlar A.J., Stengel B., Boland-Augé A., Groothuismink J.M., Bockenbauer D., Powis S.H., Mathieson P.W., Brenchley P.E., Kleta R., Wetzels J.F., Ronco P., Phospholipase A2 receptor (PLA2R1) sequence variants in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24, 677–683.
- Dährnich C., Komorowski L., Probst C., Seitz-Polski B., Esnault V., Wetzels J.F., Hofstra J.M., Hoxha E., Stahl R.A., Lambeau G., Stöcker W., Schlumberger W., Development of a standardized ELISA for the determination of autoantibodies against human M-type phospholipase A2 receptor in primary membranous nephropathy. *Clin Chim Acta*, 2013, 421, 213–218.
- Debiec H., Ronco P., Nephrotic syndrome: A new specific test for idiopathic membranous nephropathy. *Nat Rev Nephrology*, 2011a, 7, 496–498.
- Debiec H., Ronco P., PLA2R autoantibodies and PLA2R glomerular deposits in membranous nephropathy. *New Engl J Med*, 2011b, 364, 689–690.
- Debiec H., Guignonis V., Mougenot B., Decobert F., Haymann J.P., Bensman A., Deschènes G., Ronco P.M., Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral endopeptidase antibodies. *N Engl J Med*, 2002, 346, 2053–2060.
- Debiec H., Nauta J., Coulet F., van der Burg M., Guignonis V., Schurmans T., de Heer E., Soubrier F., Janssen F., Ronco P., Role of truncating mutations in MME gene in feto-maternal allo-immunization and neonatal glomerulopathies. *Lancet*, 2004, 364, 1252–1259.
- Debiec H., Martin L., Jouanneau C., Dautin G., Mesnard L., Rondeau E., Mousson C., Ronco P., Autoantibodies specific for the phospholipase A2 receptor in recurrent and *de novo* membranous nephropathy. *Am J Transplant*, 2011a, 11, 2144–2152.
- Debiec H., Lefeu F., Kemper M.J., Niaudet P., Deschènes G., Remuzzi G., Ulinski T., Ronco P., Early childhood membranous nephropathy due to cationic bovine serum albumin. *New Engl J Med*, 2011b, 364, 2101–2110.
- Debiec H., Hanoy M., François A., Guerrot D., Ferlicot S., Johanet C., Aucouturier P., Godin M., Ronco P., Recurrent membranous nephropathy in an allograft caused by IgG3 κ targeting the PLA2 receptor. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23, 1949–1954.

- Glasscock R.J., Diagnosis and natural course of membranous nephropathy. *Semin Nephrol*, 2003, 23, 324–332.
- Hofstra J.M., Beck L.H. Jr., Beck D.M., Wetzels J.F., Salant D.J., Anti-phospholipase A2 receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrology*, 2011, 6, 1286–1291.
- Hofstra J.M., Debiec H., Short C.D., Pellé T., Kleta R., Mathieson P.W., Ronco P., Brenchley P.E., Wetzels J.F., Antiphospholipase A2 receptor antibody titer and subclass in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrology*, 2012, 23, 1735–1743.
- Hoxha E., Kneißler U., Stege G., Zahner G., Thiele I., Panzer U., Harendza S., Helmchen U.M., Stahl R.A., Enhanced expression of the M-type phospholipase A2 receptor in glomeruli correlates with serum receptor antibodies in primary membranous nephropathy. *Kidney Int*, 2012, 82, 797–804.
- Husby S., Normal immune responses to ingested foods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2000, 30, 13–19.
- Kanigicherla D., Gummadova J., McKenzie E.A., Roberts S.A., Harris S., Nikam M., Poulton K., McWilliam L., Short C.D., Venning M., Brenchley P.E., Anti-PLA2R antibodies measured by ELISA predict long-term outcome in a prevalent population of patients with idiopathic membranous nephropathy. *Kidney Int*, 2013, 83, 940–948.
- Kerjaschki D., Farquhar M.G., The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79, 5557–5561.
- Kerjaschki D., Farquhar M.G., Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (gp330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats. *J Exp Med*, 1983, 157, 667–686.
- Kletter B., Gery I., Freier S., Davies A.M., Immune responses of normal infants to cow milk. I. Antibody type and kinetics of production. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1971, 40, 656–666.
- Klouda P.T., Manos J., Acheson E.J., Dyer P.A., Goldby F.S., Harris R., Lawler W., Mallick N.P., Williams G., Strong association between idiopathic membranous nephropathy and HLA-DRW3. *Lancet*, 1979, 2, 770–771.
- Knehtl M., Debiec H., Kamgang P., Callard P., Cadranel J., Ronco P., Boffa J.J., A case of phospholipase A(2) receptor-positive membranous nephropathy preceding sarcoid-associated granulomatous tubulointerstitial nephritis. *Am J Kidney Dis*, 2010, 57, 140–143.
- Kuroki A., Iyoda M., Shibata T., Sugisaki T., Th2 cytokines increase and stimulate B cells to produce IgG4 in idiopathic membranous nephropathy. *Kidney Int*, 2005, 68, 302–310.
- Mogues T., Li J., Coburn J., Kuter D.J., IgG antibodies against bovine serum albumin in humans –their prevalence and response to exposure to bovine serum albumin. *J Immunol Methods*, 2005, 300, 1–11.
- Murtas C., Allegri L., Ghiggeri G.M., Circulating antipodocyte antibodies in membranous nephropathy: new findings. *Am J Kidney Dis*, 2013, 62, 12–15.
- Nortier J.L., Debiec H., Tournay Y., Mougenot B., Noël J.C., Deschodt-Lanckman M.M., Janssen F., Ronco P., Neonatal disease in neutral endopeptidase alloimmunization: lessons for immunological monitoring. *Pediatr Nephrol*, 2006, 1, 1399–1405.
- Ogahara S., Naito S., Abe K., Michinaga I., Arakawa K., Analysis of HLA class II genes in Japanese patients with idiopathic membranous glomerulonephritis. *Kidney Int*, 1992, 41, 175–182.
- Oh Y.J., Yang S.H., Kim D.K., Kang S.W., Kim Y.S., Autoantibodies against phospholipase A2 receptor in Korean patients with membranous nephropathy. *PLoS One*, 2013, 8, e62151.
- Pérez-Maceda B., López-Bote J.P., Langa C., Bernabeu C., Antibodies to dietary antigens in rheumatoid arthritis –possible molecular mimicry mechanism. *Clin Chim Acta*, 1991, 203, 153–165.
- Polanco N., Gutiérrez E., Covarsí A., Ariza F., Carreño A., Vigil A., Baltar J., Fernández-Fresnedo G., Martín C., Pons S., Lorenzo D., Bernis C., Arrizabalaga P., Fernández-Juárez G., Barrio V., Sierra M., Castellanos I., Espinosa M., Rivera F., Olié A., Fernández-Vega F., Praga M., Grupo de Estudio de las Enfermedades Glomerulares de la Sociedad Española de Nefrología., Spontaneous remission of nephrotic syndrome in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21, 697–704.
- Prabakaran T., Nielsen R., Larsen J.V., Sørensen S.S., Feldt-Rasmussen U., Saleem M.A., Petersen C.M., Verroust P.J., Christensen E.I., Receptor-mediated endocytosis of α -galactosidase A in human podocytes in Fabry disease. *PLoS One*, 2011, 6, e25065.
- Qin W., Beck L.H. Jr., Zeng C., Chen Z., Li S., Zuo K., Salant D.J., Liu Z., Anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22, 1137–1143.
- Ronco P., [Idiopathic and secondary membranous nephropathies]. *Press Med*, 2012a, 41, 290.
- Ronco P., Glomérulopathie extramembraneuse par immunisation materno-foetale. *Bull Acad Natle Med*, 2012b, 196, 1507–1508.
- Ronco P., Debiec H., Pathogenesis of membranous nephropathy: recent advances and future challenges. *Nat Rev Nephrol*, 2012, 8, 203–213.
- Ronco P., Debiec H., Imai H., Circulating antipodocyte antibodies in membranous nephropathy: Pathophysiologic and clinical relevance. *Am J Kidney Dis*, 2013, 62, 16–19.
- Sathe S.K., Teuber S.S., Roux K.H., Effects of food processing on the stability of food allergens. *Biotechnol Adv*, 2005, 23, 423–429.
- Schmidt D.G., Meijer R.J., Slangen C.J., van Beresteijn E.C., Raising the pH of the pepsin-catalysed hydrolysis of bovine whey proteins increases the antigenicity of the hydrolysates. *Clin Exp Allergy*, 1995, 25, 1007–1017.
- Sreedharan R., Mehta D.I., Gastrointestinal tract. *Pediatrics*, 2004, 113, 1044–1050.

- Stanescu H.C., Arcos-Burgos M., Medlar A., Bockenhauer D., Kottgen A., Dragomirescu L., Voinescu C., Patel N., Pearce K., Hubank M., Stephens H.A., Laundry V., Padmanabhan S., Zawadzka A., Hofstra J.M., Coenen M.J., den Heijer M., Kiemeny L.A., Bacq-Daian D., Stengel B., Powis S.H., Brenchley P., Feehally J., Rees A.J., Debiec H., Wetzels J.F., Ronco P., Mathieson P.W., Kleta R., Risk HLA-DQA1 and PLA2R1 alleles and idiopathic membranous nephropathy. *New Engl J Med*, 2011, 364,616–626
- Svobodova B., Honsova E., Ronco P., Tesar V., Debiec H., Kidney biopsy is a sensitive tool for retrospective diagnosis of PLA2R-related membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 2013, 28,1839–1844
- Torrente F., Murch S. Food allergic enteropathy., In: Walker A.W., Goulet O., Kleinman R.E. (Eds), *Pediatric gastrointestinal disease*. 2004, 4th ed. Hamilton, ON, Canada : BC Decker, pp. 944–958.
- Van Damme B.J., Fleuren G.J., Bakker W.W., Vernier R.L., Hoedemaeker P.J., Experimental glomerulonephritis in the rat induced by antibodies directed against tubular antigens. V. Fixed glomerular antigens in the pathogenesis of heterologous immune complex glomerulonephritis. *Lab Invest*, 1978, 38, 502–510.
- Vaughan R.W., Demaine A.G., Welsh K.I., A DQA1 allele is strongly associated with idiopathic membranous nephropathy. *Tissue Antigens*, 1989, 34, 261–269.
- Waldman M., Austin H.A. 3rd, Controversies in the treatment of idiopathic membranous nephropathy. *Nat Rev Nephrol*, 2009, 5, 469–479.
- Winer S., Astsaturov I., Cheung R.K., Schrade K., Gunaratnam L., Wood D.D., Moscarello M.A., O'Connor P., McKerlie C., Becker D.J., Dosch H.M., T cells of multiple sclerosis patients target a common environmental peptide that causes encephalitis in mice. *J Immunol*, 2001, 166, 4751–4756.