

Modélisation de la néphropathie à IgA

V.1. Introduction

Dans la seconde partie des résultats, nous avons tenté de modéliser la N-IgA dans les souris $\alpha 1\text{KI}$ générées au laboratoire (Duchez 2010). Cette lignée de souris a été créée par insertion du segment génique $C\alpha 1$ humain dans la région $S\mu$ conduisant à une production constitutive d'IgA1 humaines chimériques dont les chaînes légères, la région V des chaînes lourdes et les glycosylations sont murines alors que la région C des chaînes lourdes a la séquence humaine. Bien que les souris ne puissent plus faire, en théorie, de CSR, elles produisent aussi, en petite quantité, des IgG et des IgA murines dont les taux circulants augmentent avec l'âge (Duchez 2010). Dans cette lignée, des dépôts mésangiaux d'IgA1 se forment spontanément mais aucun autre signe de la N-IgA n'apparaît : ni protéinurie, ni hématurie, ni lésions glomérulaires (Berthelot 2012, Oruc 2016). Lorsque ces souris, sur fond génétique C57BL/6, sont croisées avec des souris CD89Tg sous le contrôle du promoteur CD11b qui induit l'expression de CD89 essentiellement sur les monocytes et leurs cellules dérivées, la maladie se manifeste chez les souris âgées de 3 mois. Les souris $\alpha 1\text{KI-CD89Tg}$ présentent une protéinurie, une hématurie, une créatininémie, un dépôt mésangial de C3, et des lésions glomérulaires (Berthelot 2012). Un régime alimentaire sans gluten limite l'apparition des signes de la N-IgA (Papista 2015). Ces résultats s'expliquent par la formation de complexes gluten-IgA-CD89 soluble et l'interaction dans la mésangium de l'IgA-CD89 soluble avec CD71 (Berthelot 2012, Papista 2015). Enfin, dans ce modèle, comme dans un autre modèle murin de dépôt mésangial d'IgA1, l'injection d'une protéase spécifique de l'IgA diminue les taux circulants des complexes contenant de l'IgA, les dépôts mésangiaux d'IgA et les signes cliniques de la N-IgA (Lechner 2016, Lamm 2008, Wang 2016a).

De notre côté, nous avons tenté différentes pistes qui sont en relation avec notre connaissance de la maladie chez l'homme et les particularités des souris, pour obtenir des signes de la N-IgA dans les souris $\alpha 1\text{KI}$ sur fond génétique BALB/c :

- comparaison mâles-femelles, âgées de 2 mois, de 6 mois et de 12 mois,
- surcharge de l'alimentation en gliadine,
- formation forcée de complexes immuns circulants contenant des IgA1,
- augmentation du travail de filtration rénale par uninephrectomie et régime riche en sel et en protéines animales,
- injection i.v. d'adriamycine,
- injection de LPS, ou de bactéries *Escherichia coli* tuées par la chaleur, par voie i.t. et par voie intrapéritonéale (i.p.),

- et croisement avec des souris exprimant CD89 humain sous le contrôle de son promoteur humain.

La surcharge en gluten a été réalisée en utilisant un protocole qui avait été publié pour obtenir un modèle murin d'IgAN (Coppo 1989). Deux stratégies ont été utilisées pour forcer l'apparition de complexes immuns circulants contenant des IgA1 : le croisement des souris α 1KI avec des souris γ 1KI qui produisent des IgG1 humaines chimériques et l'infusion *via* la voie sous-cutané (s.c.) d'une IgG monoclonale murine anti-IgA1 humaine. L'augmentation du travail de filtration rénale fragilise le rein ce qui a permis, à certaines équipes, d'obtenir des modèles de pathologies rénales (Laouari 2011, Lautrette 2005). Pour sensibiliser le rein et favoriser l'apparition des signes cliniques de la N-IgA, de l'adriamycine a été injectée aux souris ; cette molécule utilisée en chimiothérapie anticancéreuse est connue pour provoquer une protéinurie sans que le mécanisme d'action soit bien compris (Pippin 2009). L'injection de LPS par voie i.p. a été pratiquée dans l'espoir de mimer une inflammation consécutive à une infection tout en favorisant l'augmentation de la perméabilité de filtration glomérulaire, de laquelle résulte une protéinurie (Faul 2008, Pippin 2009, Wei 2008). Enfin, les souris CD89Tg diffèrent de celles utilisées par l'équipe de R MONTEIRO puisqu'elles expriment fortement CD89 à la surface des PMNs et des monocytes (van Egmond 1999). Dans ces expériences, le LPS comme les IgG murines anti-IgA1 ont été injectées à plusieurs reprises pour favoriser l'apparition des lésions glomérulaires (Semedo 2010).

En parallèle de ces expériences, nous avons étudié l'effet d'une injection i.p. ou d'injections répétées i.p. de LPS sur le dépôt mésangial des IgA dans les souris α 1KI mais également dans des souris BALB/c normales ayant reçu de l'IgA polyclonale humaine circulante purifiée.

V.2. Matériel et méthodes

Les souris

Plusieurs types de souris ont été utilisées : des souris α 1KI, des souris γ 1KI, des souris α 1KI- γ 1KI, des souris CD89Tg, des souris α 1KI-CD89Tg et des souris non génétiquement modifiées, toutes de fond génétique BALB/c et toutes élevées en animalerie dite conventionnelle (plateau Animaleries de la plateforme universitaire BISCEM). Dans une série d'expérience des mâles et des femelles ont été utilisés ; dans toutes les autres seulement des mâles l'ont été. Dans une série d'expérience, les souris ont été utilisées à trois âges : 2, 6 et 12 mois. Dans toutes les autres expériences, les souris avaient 3 mois.

Dans les expériences utilisant les souris α 1KI, γ 1KI, et α 1KI- γ 1KI, toutes ont été phénotypées en mesurant, par *enzyme-linked sorbent assay* (ELISA), la quantité d'IgA humaines, d'IgG humaines,

d'IgM murines circulantes en comparaison à des standards faits-maison (plasma de souris) : les souris $\alpha 1\text{KI}$ homozygotes ont des taux élevés d'IgA humaines mais pas d'IgG humaines ni d'IgM murines, les souris $\gamma 1\text{KI}$ homozygotes ont des taux élevés d'IgG humaines mais pas d'IgA humaines ni d'IgM murines alors que les souris $\alpha 1\text{KI}-\gamma 1\text{KI}$ ont des taux intermédiaires d'IgA et d'IgG humaines mais pas d'IgM murines.

Dans les expériences utilisant les souris $\alpha 1\text{KI}$ ou celles avec les souris $\alpha 1\text{KI-CD89Tg}$, tous les animaux ont été génotypés en utilisant la technique de la *polymerase chain reaction* (PCR). Après dissociation d'un bout de queue de souris avec de la protéinase K, 1 μL d'ADN est amplifié en utilisant les amorces suivantes pour l'IgA : amorce sens 5'-ATCCGGAAACACATTCCG-3' et amorce antisens 5'-ATCTGCCCGGGCGGCTCAGTAGC-3'. Avec 30 cycles d'amplification de 30 s à 94°C, 30 s à 57°C puis 30 s à 72°C, un amplicon d'environ 300 pb est obtenu. Pour CD89, les conditions de PCR sont les suivantes : amorce sens 5'-GAGCACAGTCAGTAGACTTC-3' et amorce antisens 5'-GATTCCGAGCGTGAGTCCA-3', 30 cycles d'amplification de 30 s à 94°C, 30 s à 60°C puis 90 s à 72°C. Un amplicon d'environ 900 pb est obtenu.

Les traitements des souris

Au total neuf protocoles ont été utilisés. Ils sont résumés dans les figures 3 supp page 99 et 4 supp page 100. L'hybridome produisant l'IgG1 murine anti IgA1 et IgA2 humaines, clone CH-EB6, a été acheté chez ATCC et cloné puis sous-cloné au laboratoire de façon à le stabiliser. Le clone 4.2 a été cultivé en grande quantité et l'IgG1 murine purifiée sur colonne d'affinité à partir du surnageant de culture. Vingt ou quarante microgrammes ont été injectés 4 fois par voie s.c. (protocole 2). L'adriamycine (Sigma Aldrich) a été injectée 4 fois en i.v. à 1 $\mu\text{g/g}$ souris (protocole 4). Après avoir été tué par la chaleur, un million de bactéries *Escherichia coli* préparé au laboratoire a été injecté 4 fois par la voie i.t. (protocole 5). Le LPS de la souche *Escherichia coli* O111 : B4 (Invivogen) a été injecté 4 fois en i.t. à 10 $\mu\text{g/souris}$ ou 4 ou 8 fois en i.p. à 1,3, 2,5, 3,3, 6,5 ou 13 $\mu\text{g/g}$ souris (protocoles 6, 7, 8 et 9). L'IgA polyclonale humaine provient d'un mélange d'IgA purifiées sur colonne d'affinité à partir des plasmas de volontaires sains. Quatre-cent microgrammes d'IgA ont été injectées en i.v. dans les protocoles 8 et 9 46h après la dernière injection de LPS et 2h avant les prélèvements. Pour tous ces protocoles, du sérum physiologique a été utilisé comme diluant et le même volume que l'IgG1 monoclonale murine, l'adriamycine, les bactéries, le LPS ou l'IgA polyclonale humaine a été injecté aux souris contrôle.

Dans le protocole 6, le régime alimentaire spécifique riche en sel et en protéines animales (Dietex) a été donné aux souris une semaine avant qu'elles ne subissent une ablation d'un rein ou une opération fantôme. Les souris ont ensuite été laissées tranquilles pendant 1 mois de façon à ce qu'elles récupèrent, avant de démarrer la série d'injections de LPS. Pendant toute la durée du protocole, les souris n'ont eu que les granulés spécifiques qui ont été donnés *ad libitum*.

La gliadine a été dissoute dans l'éthanol et mise à la concentration finale de 1 mg/mL dans l'eau de boisson. L'eau de boisson contenant la gliadine ou uniquement l'éthanol a été renouvelée tous les 7 jours pendant 14 semaines (protocole 3).

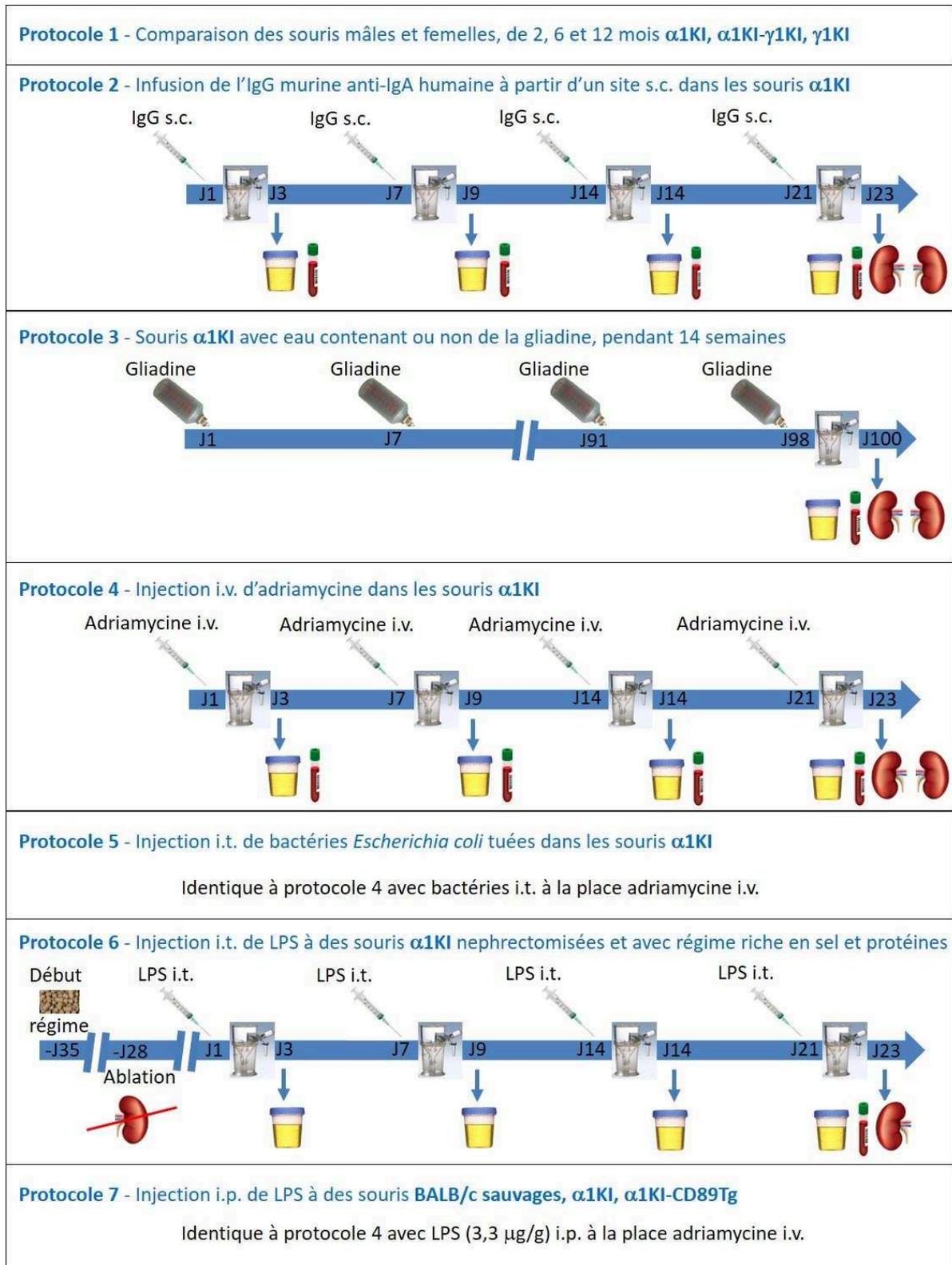


Figure 3 supp : Les différents protocoles utilisés pour modéliser la N-IgA dans les souris α 1KI (J pour Jour)

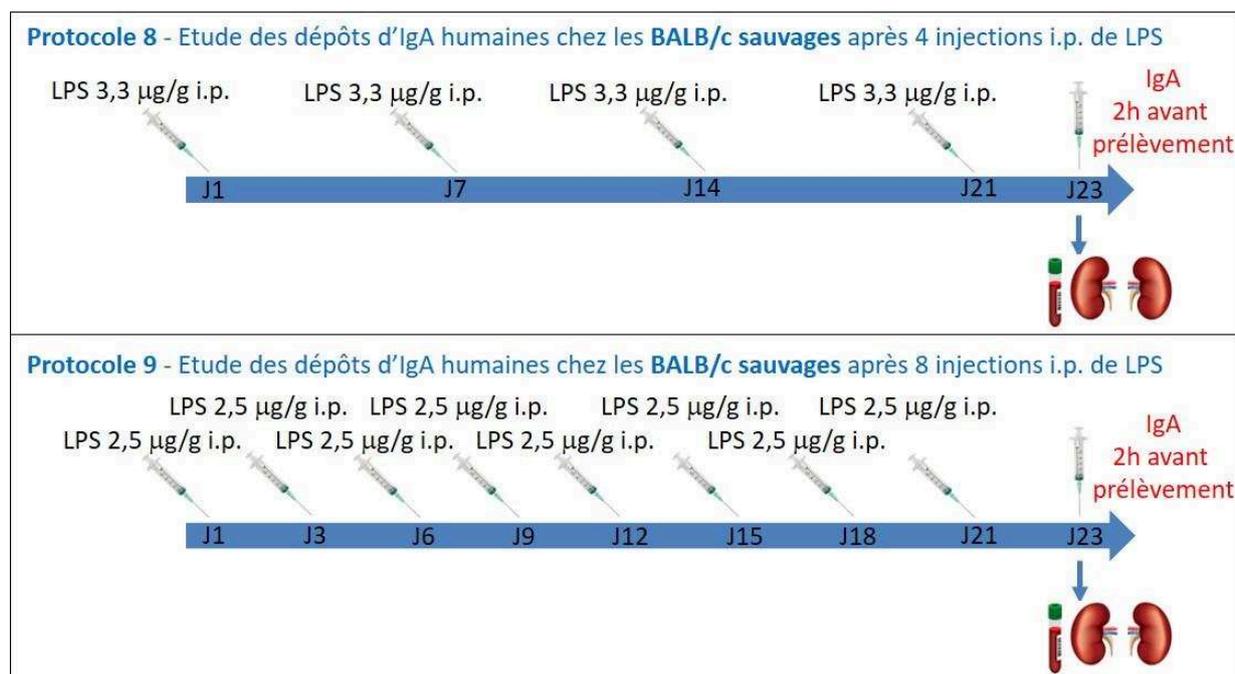


Figure 4 supp : Les protocoles utilisés sur les souris BALB/c pour l'étude des dépôts d'IgA. (J pour Jour)

Prélèvements

Le sang a été prélevé sur héparine par voie rétro-orbitale puis centrifugé et le plasma a été congelé à -20°C . La semaine précédant le premier recueil d'urine, les souris ont été placées une demi-journée en cage métabolique pour les habituer. Pour le recueil d'urine, c'est l'urine de 24 h qui a été récupérée sur glace, en sortie de cage métabolique ; dans chaque cage métabolique n'a été placée qu'une souris à la fois. L'hématurie a été évaluée directement sur l'urine fraîche puis la moitié a été centrifugée et le surnageant congelé à -20°C . L'autre moitié a été mélangé à un volume équivalent d'eau de façon à lyser les éventuels globules rouges puis après 10 min à température ambiante, le mélange a été centrifugé et le surnageant congelé à -20°C . Chaque rein a été coupé en deux ; la moitié de chaque rein a été placée dans une cupule contenant le liquide de congélation OCT (Sakura) et mis à congeler sur la carboglace puis conservé à -80°C . L'autre moitié de chaque rein a été incubée dans une solution de paraformaldéhyde à 4% dans du tampon phosphate, laissée 24 h dans le fixateur à température ambiante puis placée dans du tampon phosphate avant d'être déposée sur le plateau d'histologie de la plateforme BISCEm pour y être enrobée en paraffine, coupée et colorée avec le PAS.

Mesure des Ig circulantes

Les IgM murines, les IgA chimériques humaines, les IgG chimériques humaines, les complexes IgA chimériques humaines-IgG chimériques humaines, les IgG1 murines, les complexes IgA chimériques humaines-IgG1 murines et les IgA polyclonales humaines circulantes ont été dosées par des ELISA faits maison avec des anticorps primaires non conjugués et des anticorps secondaires couplés à la phosphatase alcaline (Southern Biotech et Beckman Coulter). Les

gammes étalon ont été faites avec des standards d'Ig murines (Southern Biotech) ou des dilutions d'un plasma humain de concentration connue pour les différentes classes d'Ig circulantes.

Dosage de l'hématurie

Un comptage des hématies a été fait au microscope avec quelques microlitres d'urine déposés dans un hématimètre appelé Kovalslide (Hycor). Dans l'urine des souris, les hématies peuvent se confondre avec des saletés. Pour vérifier certains comptages douteux, l'hémoglobine a été mesurée par un ELISA commercial (Abcam) sur l'urine mélangée à l'eau.

Mesure de la protéinurie

La protéinurie totale et l'albuminurie ont été évaluées. La protéinurie totale a été quantifiée par un dosage colorimétrique avec le kit BCA (Pierce) et en utilisant une gamme d'albumine sérique bovine. L'albuminurie a été mesurée par western blot avec un anticorps anti-albumine murine (Abcam) révélé par chimioluminescence. La quantité dans l'urine a été évaluée en comparaison d'une gamme d'albumine sérique murine déposée sur le même gel d'électrophorèse que les échantillons à analyser.

Quantification de la créatinine

La créatinine urinaire a été dosée avec le kit colorimétrique commercial *creatinin parameter assay* (R&D systems) qui utilise la réaction de Jaffe. La créatininémie a été mesurée avec un kit commercial de chez ThermoScientific pour l'automate Konelab.

Mesure des dépôts mésangiaux

Les reins congelés ont été coupés au cryostat en sections de 8 μm d'épaisseur qui ont été séchées et congelées à -80°C avant d'être marquées par immunofluorescence en utilisant les anticorps suivants : anti-IgA humaine conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (Southern Biotech), anti-IgG humaine conjugué à l'AlexaFluor488 (ThermoFisher - Invitrogen), anti-IgG murine conjugué à l'AlexaFluor488 (Invitrogen), anti-C3 murin (Abcam) révélé par un anticorps secondaire, et anti-podocine (Sigma). L'anti-podocine a été marqué au laboratoire par l'AlexaFluor546 à l'aide d'un kit de conjugaison (ThermoFisher - Molecular Probes) et a été utilisé pour détecter les podocytes et ainsi délimiter le mésangium. Les coupes ont été aussi marquées avec le fluorochrome nucléaire, le 4',6'-diamidino-2-phénylindole. Elles ont été examinées sous microscope à épifluorescence (Nikon ; plateau de microscopie de la plateforme universitaire BISCEm). L'intensité du marquage a été semi-quantifiée par un système de score où 0 représente une absence de marquage dans 1 glomérule et 3 un marquage de forte intensité équivalent à celui d'une lame référence positive. L'intensité du marquage a été évaluée pour 10 glomérules par coupe et les résultats sont exprimés en intensité moyenne par glomérule.

Analyse des lésions rénales

Les coupes colorées au PAS ont été examinées pour une recherche globale de lésions rénales (atrophie tubulaire, infiltration cellulaire, cylindres,...) mais seuls deux paramètres ont été quantifiés sur 20 glomérules par rein : la cellularité glomérulaire et la glomérulosclérose. Les lames ont d'abord été scannées (Hamamatsu). La cellularité glomérulaire a été quantifiée en comptant le nombre de noyaux par unité de surface, calculée à l'aide du logiciel d'analyse d'image Volocity (Perkin Elmer). La glomérulosclérose a été semi-quantifiée par un système de score où 0 indique une matrice extracellulaire, colorée en rose fushia avec le PAS, de taille normale et 2 correspond à une matrice très étendue par rapport à la normale.

Statistiques

Les expériences ont toutes été réalisées avec un nombre minimal de 3 animaux contrôle et de 4 animaux traités. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes +/- erreur standard à la moyenne. Les valeurs ont été transformées en log pour être analysées par des tests statistiques appropriés : test de t de Student ou analyse de variance avec la correction de Bonferroni. $P < 0,05$ est considéré comme statistiquement significatif.

Contributions

Différentes personnes ont contribué à la réalisation de ces expériences : D ARNAUD, M THOMAS, T DENIS et Z GOUDA pendant leur stage de M1, Z ORUC du laboratoire, qui a initié la comparaison des souris $\alpha 1KI$ et $\gamma 1KI$ (protocole 1) et C OBLET, aussi du laboratoire, qui a purifié l'IgG1 murine anti-IgA humaine (protocole 2) et les IgA polyclonales humaines (protocoles 8 et 9).

V.3. Résultats et discussion

Des mises au point ont été nécessaires pour choisir la dose d'IgG1 murine anti-IgA humaine à injecter et la voie d'administration pour éviter un choc de la souris dû à une formation massive de complexes immuns et une activation systémique du système du complément. Nous avons injecté 20, 40 et 80 μg d'IgG1 anti-IgA humaine par voie i.v. ou par voie s.c. Une unique souris a été utilisée par voie et par dose. Nous avons établi la cinétique d'apparition de l'IgG1 anti-IgA et de complexes immuns dans la circulation (Figure 5 supp) et nous avons surveillé l'état général des souris. Nous avons constaté, comme attendu, la formation de complexes très rapidement lorsque l'IgG1 anti-IgA humaine est injectée aux souris $\alpha 1KI$ en i.v. La voie s.c. permet d'obtenir une infusion d'IgG1 anti-IgA avec une formation des complexes circulants plus étalée dans le temps. De plus, en i.v. aux doses de 40 et 80 μg , l'anti-IgG1 est toxique en quelques jours, ce qui n'est pas le cas lorsqu'il est injecté aux mêmes doses en s.c. Pour la suite des expériences, nous avons retenu la voie s.c.

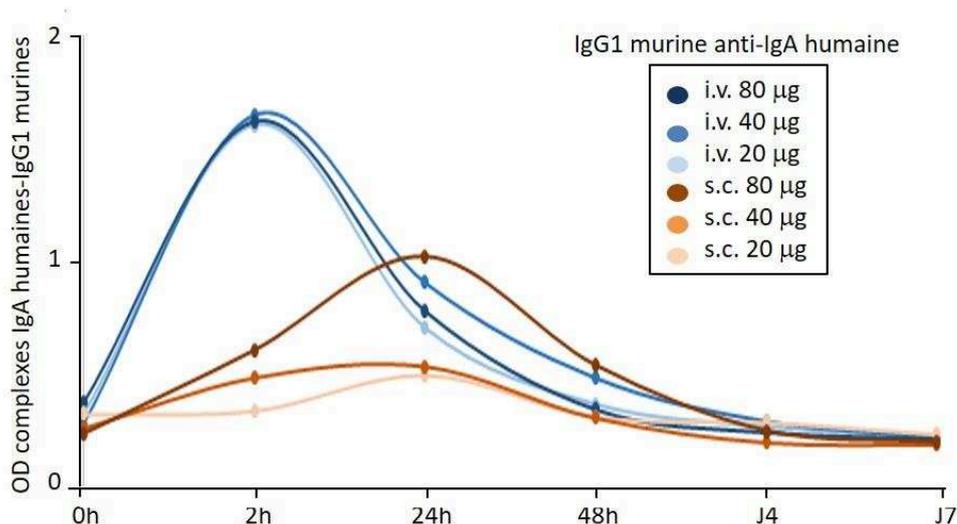


Figure 5 sup : Mesure des complexes immuns IgA humaines - IgG1 murines anti-IgA humaines dans la circulation des souris α 1KI, de quelques heures à quelques jours après l'administration en i.v. ou en s.c. de 20, 40 ou 80 μ g d'anticorps.

Nos résultats montrent que la N-IgA ne se manifestent pas chez les souris α 1KI même âgées d'un an, qu'elles soient mâles ou femelles (protocole 1). En les croisant avec les souris γ 1KI, aucun complexe n'est mesurable dans la circulation et les souris exprimant l'IgA1 chimérique humaine et l'IgG1 chimérique humaine ne développent pas la N-IgA. Dans les souris α 1KI et α 1KI- γ 1KI, des dépôts d'IgA sont présents en quantité équivalente mais l'IgG1 humaine et le C3 ne sont pas détectables dans les glomérules. L'injection répétée en s.c. d'IgG1 murine anti-IgA humaine ne révèle pas les signes cliniques de la N-IgA bien que des complexes circulants soient formés ; l'IgG1 murine et le C3 ne sont pas détectables dans les glomérules (protocole 2).

La gliadine ne fait pas non plus apparaître de protéinurie, d'hématurie, de lésions glomérulaires et ne perturbe pas les dépôts mésangiaux d'IgA (protocole 3).

La fragilisation du rein avec l'adriamycine (protocole 4) ou la surcharge de travail par l'uninephrectomie associée au régime riche en sel et en protéines animales (protocole 6) ne font pas apparaître la N-IgA et ne perturbent pas les dépôts mésangiaux d'IgA. Le LPS seul en i.t. ou associé à l'uninephrectomie et au régime alimentaire spécifique, et les bactéries tuées et injectées en i.t. (protocole 5) ne révèlent pas les signes de la N-IgA et n'altèrent pas les dépôts d'IgA mésangiaux.

Concernant le LPS en i.p., nous avons initialement utilisé la même dose que celle décrite dans les articles originaux montrant un effet du LPS sur la barrière de filtration glomérulaire (Faul 2008, Wei 2008). La dose de 13 μ g de LPS/g de souris s'est avérée létale en moins de 24h. Plusieurs doses

ont été testées et nous avons retenu 3,3 µg/g de souris qui est non toxique sur les souris α1KI mais permet d'obtenir une protéinurie (Figure 6 sup).

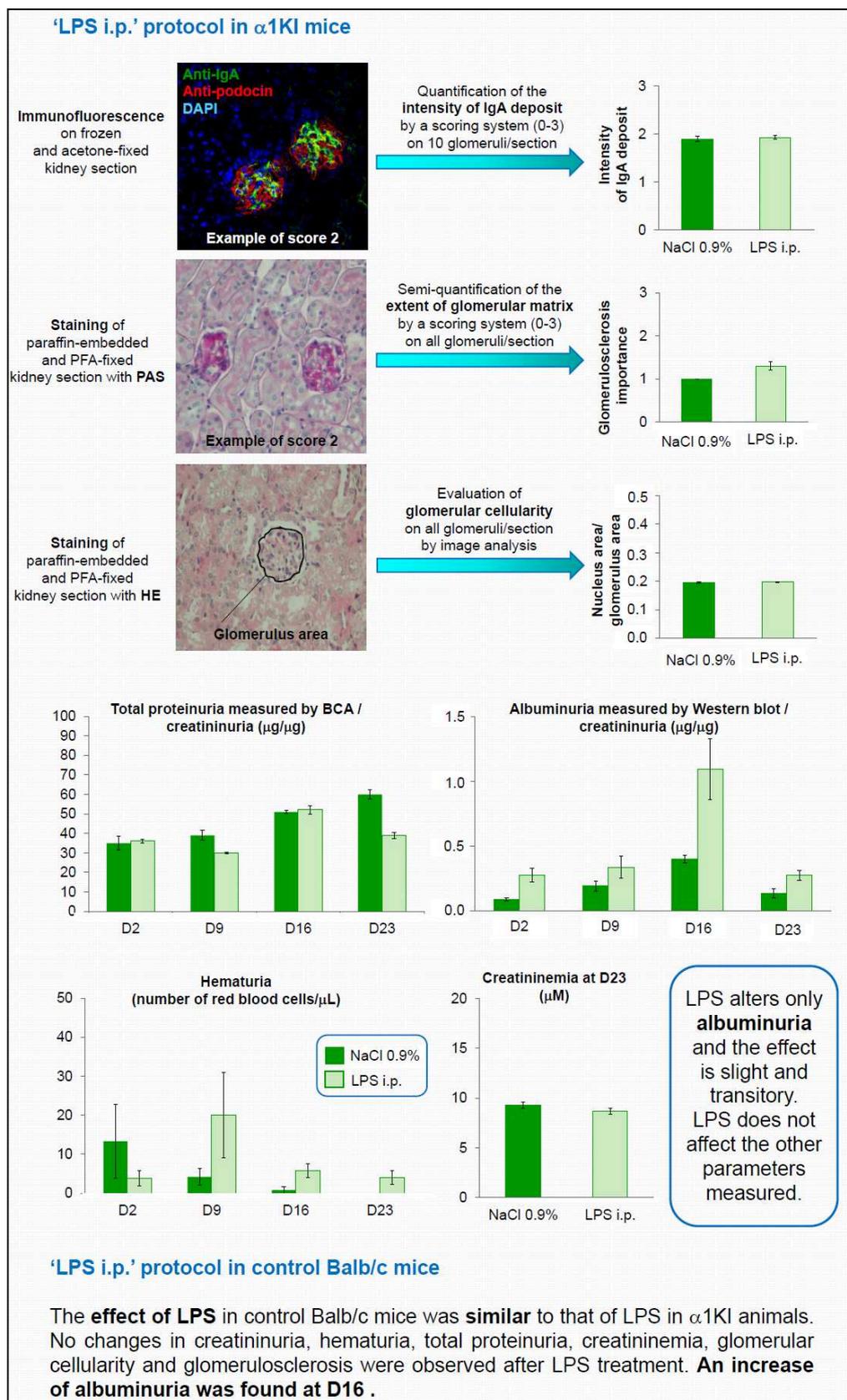


Figure 6 sup : Extrait du poster Archelus A *et al*, Modelization of IgA nephropathy in alpha-knock-in mice présenté au 14^{ème} congrès IIGANN à Tours en 2016.

Le LPS injecté par voie i.p. ne modifie pas les dépôts mésangiaux d'IgA, n'entraîne pas de lésions glomérulaires ni d'altération de la créatininémie, ni d'hématurie, et ni de protéinurie totale. Cependant une albuminurie transitoire après la 3^{ème} injection de LPS est mesurée chez les souris α 1KI comme chez les souris BALB/c normales (protocole 7, Figure 6 supp). Nous interprétons ce résultat comme une augmentation légère de la perméabilité de la barrière de filtration glomérulaire, comme décrit dans la littérature (Faul 2008, Wei 2008), suivie d'une phase de tolérance endotoxinique (Biswas 2009) avec une perte de réponse lors de l'injection suivante.

Nous avons poursuivi cette étude en injectant le LPS à 3,3 μ g/g de souris de façon répétée aux premières souris α 1KI-CD89Tg que nous avons obtenues (protocole 7). Nous avons constaté une sensibilité plus forte de ces souris au LPS avec une morbidité et une mortalité importantes. A la fin du protocole, sur 5 souris, toutes celles traitées au sérum physiologique mais seulement 2 (n°6277 et 8938) traitées au LPS étaient encore en vie au 23^{ème} jour. Au 2^{ème} jour du protocole, soit 24 h après la première injection de LPS, 1 souris (n°8938) sur les 4 restantes a eu une hématurie très élevée de près de 800 hématies/ μ L d'urine *versus* entre 0 et 10 chez les souris contrôle. Au 8^{ème} jour du protocole, soit 24 h après la seconde injection de LPS, 1 souris (n°6277) sur les 2 restantes a eu une hématurie d'environ 375 hématies/ μ L d'urine. Le dosage de l'hémoglobine a confirmé la mesure de l'hématurie. La protéinurie, l'albuminurie, la créatininémie, et l'histologie des glomérules ne sont pas altérés dans les souris α 1KI-CD89Tg traitées ou non par le LPS. Afin de reproduire ces résultats dans les meilleures conditions possibles, nous avons cherché à obtenir des souris homozygotes pour l'IgA1 humaine et pour CD89 tout en ayant des contrôles adéquats avec des fonds génétiques les plus proches des souris α 1KI-CD89Tg. Il a été montré que le fond génétique a un impact sur le développement des lésions rénales chez la souris (Laouari 2011) comme sur l'activation cellulaire, en particulier celle des PMN (Zhang 2016). Nous avons donc dérivé 3 groupes de contrôles à partir des quelques souris α 1KI-CD89Tg que nous avons : souris sauvages, souris α 1KI homozygotes, souris CD89Tg homozygotes et tenté d'obtenir des α 1KI-CD89Tg doublement homozygotes. Nous nous sommes heurtés à des problèmes de reproduction qui ne nous ont pas permis de refaire l'expérience d'injection répétée du LPS. Ces problèmes de reproduction se traduisent, dans cette lignée, par un grand nombre d'animaux potentiellement stériles car peu de portées mais aussi par des portées de petite taille ayant parfois un déséquilibre du ratio mâles/femelles. Ce constat est sûrement à mettre sur le compte de l'activation forte par les SIgA, des voies reproductrices des femelles, des PMN qui expriment CD89. En effet, certaines données de la littérature indiquent que l'activation des PMN dans les voies reproductrices femelles peut être à l'origine d'infertilité et de perte des foetus (Hahn 2012).

Bien que préliminaires, nos résultats sur les souris diffèrent de ceux publiés avec les souris α 1KI-CD89Tg C57BL/6 où CD89 est sous le contrôle du promoteur du CD11b murin (Berthelot 2012). A

la différence de ces souris, les nôtres ne développent pas spontanément de N-IgA à l'âge de 2 mois, mais ont une hématurie qui est 1) extrêmement élevée et 2) qui est induite par le LPS. Le fond génétique (BALB/c *versus* C57BL/6) et le CD89 clivé à la surface des monocytes *versus* non clivé à la surface des PMN (Grossetete 1998, Launay 2000) sont différents dans les deux modèles ce qui peut expliquer en partie les contradictions. Nous pensons cependant que ces différences s'expliquent essentiellement par la présence dans notre modèle de CD89 à la surface des PMN : la combinaison CD89 membranaire-IgA et du LPS constituent les deux stimuli dont les PMN ont besoin pour s'activer. En effet, l'activation des PMN, qui sont des cellules hautement toxiques, est très contrôlée et est déverrouillée lorsque les PMN préactivés (premier stimulus appelé *priming*) sont en contact d'un second stimulus (Miralda 2017, Partrick 1996). La pleine activation des PMN conduit à une production rapide et massive de dérivés actifs de l'oxygène et d'autres facteurs très perturbateurs de la perméabilité des endothélia et des épithélia (Camelo 2014, Di 2016, Partrick 1996). L'hématurie massive que nous observons rapidement après l'injection i.p. de LPS est certainement le résultat de l'activation des PMN dans notre modèle.

Enfin, l'administration répétée de LPS par voie i.p. (protocoles 8 et 9) sur les souris BALB/c ne permet pas aux IgA polyclonales humaines de se déposer dans le mésangium.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de mon travail de thèse était d'évaluer l'effet du LPS, et à travers ce ligand de TLR, l'effet de l'environnement microbien :

- 1) **sur la production des IgA anormales circulantes chez la souris,**
- 2) **et sur le développement de la maladie dans les souris $\alpha 1KI$.**

Bien que des expériences complémentaires mériteraient d'être faites pour atteindre les objectifs fixés, nos résultats remettent en lumière deux acteurs potentiels de la N-IgA : pIgR et les PMN.

Au début des années 2000, un groupe japonais a montré par une approche de gène-candidat que le gène de pIgR présente un polymorphisme associés à la N-IgA (Narita 2001). Deux années plus tard, un autre groupe japonais a étudié 80.000 *single-nucleotide polymorphisms* dans une population de près de 400 cas de malades et de 400 cas de témoins et seuls 6 polymorphismes ont été associés à la N-IgA, tous localisés dans le gène de pIgR sur le locus 1q31-1q41 (Obara 2003). Récemment, un autre groupe a montré, que le polymorphisme décrit en 2003 qui conduit à la substitution d'une alanine par une valine au codon 580 entraîne une diminution de la transcytose des IgA *in vitro* (Su 2011). En se basant sur ces résultats, nous émettons l'hypothèse qu'un déficit de transcytose des IgA produites dans la muqueuse digestive se traduit par un passage dans la circulation d'IgA polymériques et hypogalactosylées néphrotoxiques. L'hypogalactosylation est le résultat d'une stimulation permanente des cellules B par le microbiote intestinal. Pour démontrer cette hypothèse, nous pensons qu'il serait intéressant :

- d'étudier les reins (dépôts mésangiaux d'IgA et signes cliniques de la N-IgA) chez les souris déficientes pour pIgR,
- de comparer la glycosylation, par test lectine et par spectrométrie de masse, des SIgA de la lumière digestive et des IgA circulantes chez la souris et éventuellement chez l'homme,
- d'élargir l'étude des polymorphismes du gène de pIgR aux populations caucasiennes.

Concernant les PMNs, à la fin des années 1990 et au début des années 2000, plusieurs groupes asiatiques ont montré que les PMNs étaient pré-activés dans la circulation des sujets avec N-IgA en comparaison de ceux des sujets sains et qu'il y avait une production accrue de facteurs chimiotactiques spécifiques des PMNs dans les glomérules chez les malades (Lai 1996a, Lai 2002). Comme les PMN sont des cellules à la demi-vie très courte qui meurent immédiatement après avoir été activées, leur présence dans les glomérules reste difficile à mettre en évidence à moins de faire la biopsie rénale au moment de l'activation des PMN. Si nos résultats d'un effet des PMN sur l'hématurie étaient vérifiés, alors c'est au moment de l'hématurie macroscopique que l'on aurait le plus de chance de voir une éventuelle infiltration de PMN. Dans nos protocoles, il est certain que l'utilisation des cages métaboliques a limité la mise en évidence d'une hématurie : pour s'assurer

que les animaux se portent bien après une injection de LPS en i.p., les injections se font le matin et les animaux sont mis dans les cages métabolique, s'ils ne sont pas morbides, en fin d'après-midi et y restent 24 h. A cause de cette façon de faire, nous sommes certainement passé à côté d'hématurie. Pendant longtemps, l'hématurie a été considérée comme un facteur sans importance ou de plutôt bon pronostic pour l'évolution de la N-IgA. Récemment, des études sur la N-IgA et sur l'insuffisance rénale terminale ont contrarié cette vision de l'hématurie démontrant qu'elle peut-être problématique (Gale 2013, Sevillano 2017, Vivante 2011). Considérant cette étude, nos résultats préliminaires, et l'augmentation de la perméabilité des barrières endothéliales et épithéliales provoquée par les PMN, nous émettons l'hypothèse que l'activation continue des PMN au niveau rénal par des IgA polymériques et par d'autres facteurs présents sur place comme les fractions du complément (Mantovani 2011, van der Steen 2009), modifie la perméabilité de l'endothélium et favorise l'hématurie. Il nous paraît donc intéressant de poursuivre le travail amorcé sur les souris $\alpha 1\text{KI-CD89Tg}$:

- en changeant la stratégie d'élevage pour obtenir des animaux en nombre suffisant pour refaire des expériences,
- remplaçant le LPS par un peptide synthétique et mimétique d'un agent bactérien activateur des PMN humains et murins, le formyl-méthionine-leucine-phénylalanine (fMLP), non toxique lorsqu'il est injecté par voie systémique et ne donnant pas un phénomène de tolérance comme le LPS le fait (Polesskaya 2014, Qian 2018). Le récepteur du fMLP est une protéine couplée aux protéines G. Ce récepteur ne fait pas partie des TLR et a une expression restreinte au compartiment myéloïde chez les sujets sains et a des cellules cancéreuses (Chen 2017).
- en déplétant les neutrophiles pour s'assurer de leur effet, comme nous l'avons fait dans la première partie des résultats.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Andre PM**, Le Pogamp P, Chevet D. (1990) Impairment of jacalin binding to serum IgA in IgA nephropathy. *J Clin Lab Anal.* 4 : 115-9.
- Albrecht V**, Hofer TP, Foxwell B, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock L. (2008) Tolerance induced via TLR2 and TLR4 in human dendritic cells: role of IRAK-1. *BMC Immunol.* 24 : 9-69.
- Alexopoulos E**. (2004).= Treatment of primary IgA nephropathy. *Kidney Int.* 65 : 341-55.
- Aleyd E**, van Hout MW, Ganzevles SH, Heben KA, Everts V, Bakema JE, van Egmond M. (2014) IgA enhances NETosis and release of neutrophil extracellular traps by polymorphonuclear cells via Fc α receptor I. *J Immunol.* 192 : 2374-83.
- Allam R**, Lichtnekert J, Moll AG, Taubitz A, Vielhauer V, Hans-Joachim A. (2009) Viral RNA and DNA trigger common antiviral responses in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 20 : 1986-96.
- Allen AC**, Topham PS, Harper SJ, Feehally J. (1997) Leucocyte beta-1,3 galactosyltransferase activity in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 12 : 701-6.
- Allen AC**, Bailey EM, Brenchley PE, Buck KS, Barratt J, Feehally J. (2001) Mesangial IgA1 in IgA nephropathy exhibits aberrant O-glycosylation: observations in three patients. *Kidney Int.* 60 : 969-73.
- Alt FW**, Yancopoulos GD, Blackwell TK, Wood C, Thomas E, Boss M, Coffman R, Rosenberg N, Tonegawa S, Baltimore D. (1984) Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J.* 3: 1209–19.
- Alt FW**, Blackwell TK, Yancopoulos GD. (1987) Development of the primary antibody repertoire. *Science.* 238: 1079–87.
- Arnold JN**, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. (2007) The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol.* 25 : 21-50.
- Asea A**, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of TLR2 and TLR4. *J Biol Chem.* 277 : 15028–34.
- Aupetit C**, Drouet M, Pinaud E, Denizot Y, Aldigier JC, Bridoux F, Cogné M. (2000) Alleles of the alpha1 immunoglobulin gene 3' enhancer control evolution of IgA nephropathy toward renal failure. *Kidney Int.* 58:966-71.
- Aziz M**, Holodick NE, Rothstein TL, Wang P. (2015) The role of B-1 cells in inflammation. *Immunol Res.* 63 : 153–66.

B

- Ballardie FW**, Roberts IS. (2002) Controlled prospective trial of prednisolone and cytotoxics in progressive IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 13 : 142–8.
- Barratt J**, Bailey EM, Buck KS, Mailley J, Moayyedi P, Feehally J, Turney JH, Crabtree JE, Allen AC. (1999) Exaggerated systemic antibody response to mucosal *Helicobacter pylori* infection in IgA nephropathy. *Am J of Kidney Dis.* 33 : 1049-57.
- Batra A**, Smith AC, Feehally J, Barratt J. (2007) T-cell homing receptor expression in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 22 : 2540-8
- Beck JM**, Young VB, Huffnagle GB. (2012) The microbiome of the lung. *Transl Res.* 160:258-66.
- Bene MC**, Faure GC, Hurault de Ligny B, de March AK. (2004) Clinical involvement of the tonsillar immune system in IgA nephropathy. *Acta Otolaryngol* 555 (Supp) : 10-4.
- Benveniste J**, Lespinats G, Adam C, Salomon JC. (1971) Immunoglobulins in intact, immunized, and contaminated axenic mice: study of serum IgA. *J Immunol.* 107 : 1647-55.
- Berger J.**, Hinglais N. (1968) Les dépôts intercapillaires d'IgA1-d'IgG. *J Urol Nephrol.* 74 : 694-5.
- Berger J.** (1969) IgA glomerular deposits in renal disease. *Transplant Proc.* 1 : 939-44.
- Berger J**, Yaneva H, Nabarra B, Barbanel C. (1975) Recurrence of mesangial deposition of IgA after renal transplantation. *Kidney Int.* 7 : 232-41.
- Berthelot L**, Papista C, Maciel TT, Biarnes-Pelicot M, Tissandie E, Wang PH, Tamouza H, Jamin A, Bex-Coudrat J, Gestin A, Boumediene A, Arcos-Fajardo M, England P, Pillebout E, Walker F, Daugas E, Vrtosvnik F, Flamant M, Benhamou M, Cogné M, Moura IC, Monteiro RC. (2012) Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors. *J Exp Med.* 209:793-806.
- Berthelot L**, Robert T, Vuiblet V, Tabary T, Braconnier A, Dramé M, Toupance O, Rieu P, Monteiro RC, Touré F. (2015) Recurrent IgA nephropathy is predicted by altered glycosylated IgA, autoantibodies and soluble CD89 complexes. *Kidney Int.* 88 : 815-22.
- Berthoux F**, El Deeb S, Mariat C, Diconne E, Laurent B, Thibaudin L. (2008) Antithymocyte globulin (ATG) induction therapy and disease recurrence in renal transplant recipients with primary IgA nephropathy. *Transplantation.* 85 : 1505-7.

- Berthoux F**, Suzuki H, Thibaudin L, Yanagawa H, Maillard N, Tomino Y, Hulan BA, Novak J. (2012) Autoantibodies targeting galactose-deficient IgA1 associate with progression of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 23 : 1579-87.
- Berthoux F**, Mohey H, Maillard N, Mariat C. (2015) IgA Nephropathy: new aspects in pathology and pathogenesis. *Eur Med J Nephrol.* 3 : 97-103.
- Berthoux F**, Suzuki H, Mohey H, Maillard N, Mariat C, Novak J, Julian BA. (2017) Prognostic value of serum biomarkers of autoimmunity for recurrence of IgA nephropathy after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 28 : 1943-50.
- Bessette B**, Guglielmi L, Cogné M, Denizot Y. (2003) Nuclear factors, hs1,2 enhancer and IgA nephropathy. *Kidney Int.* 63:767.
- Biswas SK**, Tergaonkar V. (2007) Myeloid differentiation factor 88-independent toll-like receptor pathway: sustaining inflammation or promoting tolerance. *Int J Biochem Cell Biol.* 139: 1582-92.
- Biswas SK**, Lopez-Collazo E. (2009) Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* 30 : 475-87.
- Botos I**, Segal DM, Daviesa DR. (2011) The structural biology of Toll-Like Receptors. *Structure.* 19 : 447-59.
- Boumediene A**, Oblet C, Oruc Z, Duchez S, Morelle W, Huynh A, Pourrat J, Aldigier JC, Cogné M. (2011) Gammopathy with IgA mesangial deposition provides a monoclonal model of IgA nephritogenicity and offers new insights into its molecular mechanisms. *Nephrol Dial Transplant.* 26:3930-7.
- Boyd JK**, Cheung CK, Molyneux K, Feehally J, Barratt J. (2012) An update on the pathogenesis and treatment of IgA nephropathy. *Kidney Int.* 81 : 833-43.
- Brandtzaeg P**, Farstad IN, Johansen F-E, Morton HC, Norderhaug IN, Yamanaka T. (1999) The B-cell system of human mucosae and exocrine glands. *Immunol Rev.* 171 : 45–87.
- Brauninger A**, Goossens T, Rajewsky K, Küppers R. (2001) Regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements during early B cell development in the human. *Eur J Immunol.* 31 : 3631-7.
- Briganti EM**, Russ GR, McNeil JJ, Atkins RC, Chadban SJ. (2002) Risk of renal allograft loss from recurrent glomerulonephritis. *N Engl J Med.* 347:103-9.
- Buren M**, Yamashita M, Suzuki Y, Tomino Y, Emancipator S. (2007) Altered expression of lymphocyte homing chemokines in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Contrib Nephrol.* 157 : 50-5.

C

- Cai X**, Chen J, Xu H, Liu S, Jiang QX, Halfmann R, Chen ZJ. (2014) Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation. *Cell.* 156 : 1207-22.
- Camelo A**, Dunmore R, Sleeman MA, Clarke DL. (2014) The epithelium in idiopathic pulmonary fibrosis : breaking the barrier. *Front Pharmacol.* 4 : 173.
- Cavaillon JM**, Adib-Conquy M. (2006) Bench-to bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care (London, England).* 10 : 233.
- Cazac BB**, Roes J. (2000) TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity.* 13 : 443-51.
- Cerutti A**, Cols M, Puga I. (2013) Marginal zone B cells : virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat rev Immunol.* 13:118-132.
- Chen X**, Peng S, Zeng H, Fu A, Zhu Q. (2015) Toll-like receptor 4 is involved in a protective effect of rhein on immunoglobulin A nephropathy. *Indian J Pharmacol.* 47 : 27-33.
- Chen K**, Bao Z, Gong W, tang P, Yoshimura T, Wang JM. (2017) Regulation of inflammation by members of the formyl-peptide receptor family. *J Autoimmun.* 85 : 67-77.
- Cheng J**, Zhang W, Zhang XH, He Q, Tao XJ, Chen JH. (2009a) ACEI/ARB therapy for IgA-N: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Clin Pract.* 63:880-8.
- Cheng J**, Zhang X, Zhang W, He Q, Tao X, Chen J. (2009b). Efficacy and safety of glucocorticoids therapy for IgA nephropathy: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Nephrol.* 30, 315–22.
- Chintalacharuvu KR**, Raines M, Morrison SL. (1994) Divergence of human alpha-chain constant region gene sequences. A novel recombinant alpha 2 gene. *J Immunol.* 152 : 5299-304.
- Chodiker NB**, Tomasi TB. (1963) Gamma-globulins: quantitative relationships in human serum and nonvascular fluids. *Science.* 142 : 1080-1.
- Clayton P**, McDonald S, Chadban S. (2011) Steroids and recurrent IgA nephropathy after kidney transplantation. *Am J Transplant.* 11 : 1645-9.
- Coons AH**, Kaplan MH. (1950) Localization of antigen in tissue cells: improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med.* 91:1-13.
- Coppo R**, Mazzucco G, Martina G, Roccatello D, Amore A, Novara R, Bargoni A, Piccoli G, Sena LM. (1989) Gluten-induced experimental IgA glomerulopathy. *Lab Invest.* 60 : 499-506.
- Coppo R**, Roccatello D, Amore A, Quattrocchio G, Molino A, Gianoglio B, Amoroso A, Bajardi P, Piccoli G. (1990) Effects of a gluten-free diet in primary IgA nephropathy. *Clin Nephrol.* 33 : 72-86.
- Coppo R**, Amore A, Peruzzi L, Vergano L, Camilla R. (2010a) Innate immunity and IgA nephropathy. *J Nephrol.* 23 : 626–32.

- Coppo R**, Camilla R, Amore A, Peruzzi L, Dapra V, Loiacono E, Vatrano S, Rollino C, Sepe V, Rampino T, Dal Canton A. (2010b) Toll-like receptor 4 expression is increased in circulating mononuclear cells of patients with immunoglobulin A nephropathy. *Clin Exp Immunol.* 159 : 73-81. (Correction 159 : 373 ; 160 : 293).
- Coppo R**. (2018) The gut–kidney axis in IgA nephropathy: role of microbiota and diet on genetic predisposition. *Pediatr Nephrol.* 33 : 53-61.
- Corica D**, Romano C. (2016) Renal involvement in inflammatory bowel diseases. *J Crohn’s Colitis.* 10 : 226-35.
- Corr SC**, Gahan CC, Hill C. (2008). M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 52, 2-12.
- Coulon S**, Dussiot M, Grapton D, Maciel TT, Wang PH, Callens C, Tiwari MK, Agarwal S, fricot A, Vandekerchove J, Tamouza H, Zermati Y, Ribeil JA, Djedaini K, Oruc Z, Pascal V, Courtois G, Arnulf B, Alyanakian MA, Mayeux P, Leanderson T, Benhamou M, Cogné M, Monteiro RC, Hermine O, Moura IC. (2011) Polymeric IgA1 controls erythroblast proliferation and accelerates erythropoiesis recovery in anemia. *Nat Med.* 17 : 1456-65.
- Couser W**. (2005) Recurrent glomerulonephritis in the renal allograft: an update of selected areas. *Exp Clin Transplant.* 3 : 283-8.
- Cybulsky AV**, Takano T, Papillon J, McTavish AJ. (2000) Complement-induced phospholipase A2 activation in experimental membranous nephropathy. *Kidney Int.* 57 : 1052–62.

D

- D’Amico G**. (1987). The commonest glomerulonephritis in the world. *Q J Med.* 245 : 709-27.
- Davies DR**, Tighe JR. (1973) Recurrent haematuria and glomerular IgA deposition. *J Clin Pathol.* 26 : 672-7.
- Delventhal S**, Brandis A, Ostertag H, Pabst R. (1992) Low incidence of BALB in chronically inflamed human lungs. *Virchows Arch (Cell Pathol).* 62 : 271-4.
- Denizot Y**, Aupetit C, Bridoux F, Alphonse JC, Cogné M, Aldigier JC. (2000) Deregulated platelet-activating factor levels and acetylhydrolase activity in patients with idiopathic IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 15:1344-7.
- De Angelis M**, Montemurno E, Piccolo M, Vanini L, Lauriero G, Maranzano V, Gozzi G, Serrazanetti D, Dalfino G, Gobetti M, Gesualdo L. (2014) Microbiota and metabolome associated with immunoglobulin A nephropathy (IgAN). *PLoS ONE.* 9 : e0099006.
- Di A**, Mehta D, Malik AB. (2016) ROS-activated calcium signaling mechanisms regulating endothelial barrier function. *Cell Calcium.* 60 : 163-71.
- Dybdahl B**, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A., Qureshi N, Sellevold OF, Espevik T, Sundan A. (2002). Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation.* 105 : 685–90.
- Donadio JV Jr**, Bergstralh EJ, Offord KP, Spencer DC, Holley KE, Mayo Nephrology Collaborative Group. (1994) A controlled trial of fish oil in IgA nephropathy. *N Engl J Med.* 331 : 1194–9.
- Donadio JV Jr**, Larson TS, Bergstralh EJ, Grande JP. (2001) A randomized trial of high-dose compared with low-dose omega-3 fatty acids in severe IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 12 : 791–9.
- Donadio JV Jr**, Grande JP. (2002) IgA Nephropathy. *N Engl J Med.* 347 : 738-48.
- Drew PA**, Nieuwhof WN, Clarkson AR, Woodroffe AJ. (1987) Increased concentration of serum IgA antibody to pneumococcal polysaccharides in patients with IgA nephropathy. *Clin Exp Immunol.* 67 : 124-9.
- Drouet M**, Aupetit C, Denizot Y, Bois M, Bridoux F, Aldigier JC, Cogné M. (2002) Analysis of three genetic markers in IgA nephropathy patients from a single region. *Clin Nephrol.* 57:253-60.
- Droz D**. (1995) La biopsie rénale dans les glomérulopathies à dépôts mésangiaux d’IgA. In : Droz D, Lantz B (Eds), *Maladie de Berger et purpura rhumatoïde. Biopsie rénale.* Inserm, pp 151-66.
- Duchez S**, Amin R, Cogné N, Delpy L, Sirac C, Pascal V, Corthésy B, Cogné M. (2010) Premature replacement of mu with alpha immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:3064-9.

E

- Edebo L**, Lindström F, Sköldstom L, Stendahl O, Tagesson C. (1975) On the physicochemical effect of colostral antibody binding to *Escherichia coli* O 86. *Immunol Commun.* 4 : 587-601.
- Erlandsson L**, Andersson K, Sigvardsson M, Lycke N, Leanderson T. (1998) Mice with an inactivated joining chain locus have perturbed IgM secretion. *Eur J Immunol.* 28 : 2355-65.
- Erridge C**, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. (2002) Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* 4 : 837-851.

F

- Fabiano RC**, Pinheiro SV, Simões E, Silva AC. (2016) Immunoglobulin A nephropathy: a pathophysiology view. *Inflamm Res.* 65 : 757-70.

- Fan H**, Cook JA. (2004) Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res.* 10 : 71–84.
- Faul C**, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Frans S, Delfgaauw J, Chang JM, Choi HY, Campbell KN, Kim K, *Reiser J*, *Mundel P*. (2008) The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med.* 14 : 931-8.
- Feehally J**, Farrall M, Boland A, Gale DP, Gut I, Heath S, Kumar A, Peden JF, Maxwell PH, Morris DL, Padmanabhan S, Vyse TJ, Zawadzka A, Rees AJ, Lathrop M, Ratcliffe PJ. (2010) HLA has strongest association with IgA nephropathy in genome-wide analysis. *J Am Soc Nephrol.* 21 : 1791-7.
- Feehally J**, Cameron JS. (2011). IgA Nephropathy: progress before and since Berger. *Am J Kidney Dis.* 58 : 310-9.
- Feehally J**, Barratt J. (2015) The genetics of IgA nephropathy : an overview from western countries. *Kidney Dis (Basel).* 1 : 33-41.
- Fernandez MI**, Pedron T, Tournebize R, Olivo-Marin JC, Sansonetti PJ, Phalipon A. (2003) Anti-inflammatory role for intracellular dimeric immunoglobulin A by neutralization of lipopolysaccharide in epithelial cells. *Immunity.* 18 : 739-49.
- Ferraro PM**, Ferraccioli GF, Gambaro G, Fulignati P, Costanzi S. (2009) Combined treatment with renin-angiotensin system blockers and polyunsaturated fatty acids in proteinuric IgA nephropathy: a randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant.* 24 : 156–60.
- Floege J**, Feehally J. (2016) The mucosa-kidney axis in IgA nephropathy. *Nat Rev Nephrol.* 12 : 147-56.
- Fogo A**. (1999) Mesangial matrix modulation and glomerulosclerosis. *Exp Nephrol.* 7 : 147-59.
- Foster SL**, Medzhitov R. (2009) Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clin Immunol.* 130 : 7–15.
- Freedman AS**, Freeman G, Whitman J, Segil J, Daley J, Nadler LM. (1989) Studies of in vitro activated CD5+ B cells. *Blood.* 73 : 202-8.
- Freeze HH**. (2006) Genetic defects in the human glycome. *Nat Rev Genet.* 7 : 537-51.
- Frisch G**, Lin J, Rosenstock J, Markowitz G, D'Agati V, Radhakrishnan J. (2005) Mycophenolate mofetil (MMF) vs placebo in patients with moderately advanced IgA nephropathy: a double-blind randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant.* 20 : 2139-45.

G

- Gale DP**. (2013) How benign is hematuria ? Using genetics to predict prognosis. *Pediatr Nephrol.* 28 : 1183-93.
- Gallucci S**, Matzinger P. (2001) Danger signals: SOS to the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 13 : 114–19
- Gamble L**, Bagby GJ, Quinton LJ, Happel KI, Mizgerd JP, Zhang P, Nelson S. (2009) The systemic and pulmonary LPS binding protein response to intratracheal lipopolysaccharide. *Shock.* 31 : 212-7.
- Gao J**, Wei L, Wei J, Yao G, Wang L, Wang M, Liu X, Dai C, Ji T, Dai Z, Fu R. (2016) TLR1 polymorphism rs4833095 as a risk factor for IgA nephropathy in a Chinese Han population : a case-control study. *Oncotarget.* 7 : 83031-9.
- Gatto D**, Brink R. (2010) The germinal center reaction. *J Allergy Clin Immunol.* 126: 898-907.
- Geddes CC**, Rauta V, Gronhagen-Riska C, Bartosik LP, Jardine AG, Ibels LS. (2003) A tricontinental view of IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 18 : 1541-8.
- Gharavi AG**, Moldoveanu Z, Wyatt RJ, Barker CV, Woodford SY, Lifton RP, Mestecky J, Novak J, Julian BA. (2008) Aberrant IgA1 glycosylation is inherited in familial and sporadic IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 19 : 1008-14.
- Gharavi AG**, Kiryluk K, Choi M, Li Y, Hou P, Xie J, Sanna-Cherchi S, Men CJ, Julian BA, Wyatt RJ, Novak J, He JC, Wang H, Lv J, Zhu L, Wang W, Wang Z, Yasuno K, Gunel M, Mane S, Umlauf S, Tikhonova I, Beerman I, Savoldi S, Magistroni R, Ghiggeri GM, Bodria M, Lugani F, Ravani P, Ponticelli C, Allegri L, Boscutti G, Frasca G, Amore A, Peruzzi L, Coppo R, Izzi C, Viola BF, Prati E, Salvadori M, Mignani R, Gesualdo L, Bertinetto F, Mesiano P, Amoroso A, Scolari F, Chen N, Zhang H, Lifton RP. (2011) Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nat Genet.* 43: 321-7.
- Gorosito Serran M**, Fiocca Vernengo F, Beccaria CG, Acosta Rodriguez EV, Montes CL, Gruppi A. (2015) The regulatory role of B cells in autoimmunity, infections and cancer: perspectives beyond IL10 production. *FEBS Lett.* 589 : 3362-9.
- Grabar P**, Williams CA. (1953) Method permitting the combined study of the electrophoretic and the immunochemical properties of protein mixtures; application to blood serum. *Biochim Biophys Acta.* 10 : 193–4.
- Grande JP**, Walker HJ, Holub BJ, Warner GM, Keller DM, Haugen JD. (2000) Suppressive effects of fish oil on mesangial cell proliferation in vitro and in vivo. *Kidney Int.* 57 : 1027–40.
- Greene CM**, McElvaney NG. (2005) Toll-like receptor expression and function in airway epithelial cells. *Arch Immunol Ther Exp.* 53: 418-27.
- Gronwall C**, Vas J, Silverman GJ. (2012) Protective Roles of Natural IgM Antibodies. *Front Immunol.* 3 : 66.

Grossetete B, Launay P, Lehuen A, Jungers P, Bach JF, Monteiro RC. (1998) Down-regulation of Fc alpha receptors on blood cells of IgA nephropathy patients: evidence for a negative regulatory role of serum IgA. *Kidney Int.* 53 : 1321-35.

Gugler E, von Muralt G. (1959). Immuno-electrophoretic studies on human milk proteins. *Schweiz Med Wochenschr.* 89 : 925-9.

H

Haas M. (1997) Histologic subclassifications of IgA nephropathy : a clinicopathologic study of 244 cases. *Am J Kidney Dis.* 29 : 829-42.

Haas M. (2005) Histology and immunohistology of IgA nephropathy. *J Nephrol.* 18 : 676-80.

Hahn S, Giaglis S, Hoesli I, Hasler P. (2013) Neutrophil NETs in reproduction: from infertility to preeclampsia and the possibility of fetal loss. *Front Immunol.* 3 : 362.

Hajishengallis G, Nikolova E, Russell MW. (1992) Inhibition of *Streptococcus mutans* adherence to salivacoated hydroxyapatite by human secretory immunoglobulin A (SIgA) antibodies to cell surface protein antigen I/II : reversal by IgA1 protease cleavage. *Infect Immun.* 60 : 5057-64.

Halpern MS, Koshland ME. (1970) Novel subunit in secretory IgA. *Nature.* 228 : 1276-8.

Hanson, L.A.° (1959). Comparative analysis of human milk and human blood plasma by means of diffusion-in-gel methods. *Experientia.* 15 : 473-4.

Harper SJ, Pringle JH, Wicks AC, Hattersley J, Layward L, Allen A, Gillies A, Lauder I, Feehally J. (1994) Expression of J chain mRNA in duodenal IgA plasma cells in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 45 : 836-44.

Harper SJ, Allen AC, Pringle JH, Feehally J. (1996) Increased dimeric IgA producing B cells in the bone marrow in IgA nephropathy determined by in situ hybridisation for J chain mRNA. *J Clin Pathol.* 49 : 38-42.

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. (1988) The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell.* 52 : 269–79.

Haziot A, Ferrero E, Lin XY, Stewart CL, Goyert SM. (1995) CD14-deficient mice are exquisitely insensitive to the effects of LPS. *Prog Clin Biol Res.* 392 : 349–51.

Hendrickson BA, Conner DA, Ladd DJ, Kendall D, Casanova JE, Corthesy B, Max EE, Neutra MR, Seidman CE, Seidman JG. (1995) Altered hepatic transport of immunoglobulin A in mice lacking the J chain. *J Exp Med.* 182 : 1905-11.

Hiemstra PS, Gorter A, Stuurman ME, van Es LA, Daha MR. (1987) Activation of the alternative pathway of complement by human serum IgA. *Eur J Immunol.* 17 : 321-6.

Hiki Y, Tanaka A, Kokubo T, Iwase H, Nishikido J, Hotta K, Kobayashi Y. (1998) Analyses of IgA1 hinge glycopeptides in IgA nephropathy by matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Am Soc Nephrol.* 9 : 577-82.

Hiki Y, Kokubo T, Iwase H, Masaki Y, Sano T, Tanaka A, Toma K, Hotta K, Kobayashi Y. (1999). Underglycosylation of IgA1 hinge plays a certain role for its glomerular deposition in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 10 : 760-9.

Hiki Y, Odani H, Takahashi M, Yasuda Y, Nishimoto A, Iwase H, Shinzato T, Kobayashi Y, Maeda K. (2001) Mass spectrometry proves under-O-glycosylation of glomerular IgA1 in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 59 : 1077-85.

Hiki Y, Takahashi K, Shimozato S, Odani H, Yamamoto K, Tomita M, Hasegawa M, Murakami K, Nabeshima K, Nakai S, Fujita Y, Ishida I, Iwase H, Sugiyama S. (2008). Protective role of anti-synthetic hinge peptide antibody for glomerular deposition of hypoglycosylated IgA1. *Clin Exp Nephrol.* 12 : 20-7.

Honkanen T, Mustonen J, Kainulainen H, Myllymäki J, Collin P, Hurme M, Rantala I. (2005) Small bowel cyclooxygenase 2 (COX-2) expression in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int.* 67 : 2187-95.

Hornef MW, Fulde M. (2014) Ontogeny of intestinal epithelial innate immune responses. *Front Immunol.* 5 : 474.

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. (1999). Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J Immunol.* 162 : 3749–52.

Hotta O, Miyazaki M, Furuta T, Tomioka S, Chiba S, Horigome I. (2001) Tonsillectomy and steroid pulse therapy significantly impact on clinical remission in patients with IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 38 : 736-43.

Huang ZQ, Raska M, Stewart T, Reily C, King RG, Crossman DK, Crowley MR, Hargett A, Zhang Z, Suzuki H, Hall S, Wyatt RJ, Julian BA, Renfrow MB, Gharavi AG, Novak J. (2016). Somatic mutations modulate autoantibodies against galactose-deficient IgA1 in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 27 : 3278-84.

Huet O, Choukroun G, Mira JP. (2004). Récepteurs de type Toll, réponse inflammatoire et sepsis. *Réanimation.* 13 : 167-75.

I

Imai H, Nakamoto Y, Asakura K, Miki K, Yasuda T, Miura AB. (1985) Spontaneous glomerular IgA deposition in ddY mice: an animal model of IgA nephritis. *Kidney Int.* 27 : 756-61.

Inoue T, Sugiyama H, Kikumoto Y, Fukuoka N, Maeshima Y, Hattori H, Fukushima K, Nishizaki K, Hiki Y, Makino H. (2007) Downregulation of the beta1,3-galactosyltransferase gene in tonsillar B lymphocytes and aberrant lectin bindings to tonsillar IgA as a pathogenesis of IgA nephropathy. *Contrib Nephrol.* 157 : 120-4.

Itoh A, Iwase H, Takatani T, Nakamura I, Hayashi M, Oba K, Hiki Y, Kobayashi Y, Okamoto M. (2003) Tonsillar IgA1 as a possible source of hypoglycosylated IgA1 in the serum of IgA nephropathy patients. *Nephrol Dial Transplant.* 18 : 1108-14.

Iverson P, Brun C. (1951) Aspiration biopsy of the kidney. *Am J Med.* 11: 324-30.

J

Jefferis R. (2007). Les anticorps. In D Male, J Brostoff, DB Roth, I Roitt, traduction française de PL Masson (Eds), Immunologie. Elsevier Masson SAS, Issy-les-Moulineaux. pp 65-96.

Jiang S, Li X, Hess NJ, Guan Y, Tappin RI. (2016) TLR10 is a negative regulator of both MyD88-dependent and independent TLR signaling. *J Immunol.* 196 : 3834-41.

Jhee JH, Kang HY, Wu M, Nam BY, Chang TI, Jung SY, Park S, Kim H, Yun HR, Kee YK, Yoon CY, Park JT, Yoo TH, Kang SW, Han SH. (2017) Circulating CD89-IgA complex does not predict deterioration of kidney function in Korean patients with IgA nephropathy. *Clin Chem Lab Med.* 56 : 75-85.

Johansen FE, Pekna M, Norderhaug IN, Haneberg B, Hietala MA, Krajci P, Betsholtz C, Brandtzaeg P. (1999) Absence of epithelial immunoglobulin A transport, with increased mucosal leakiness, in polymeric immunoglobulin receptor/secretory component-deficient mice. *J Exp Med.* 190 : 915-22.

Johansen FE, Braathen R, Brandtzaeg P. (2000) Role of J chain in secretory immunoglobulin formation. *Scand J Immunol.* 52 : 240-8.

Ju T, Cummings RD. (2002) A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 beta 3-galactosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 : 16613-8.

Ju T, Aryal RP, Stowell CJ, Cummings RD. (2008). Regulation of protein O-glycosylation by the endoplasmic reticulum-localized molecular chaperone Cosmc. *J Cell Biol.* 182 : 531-42.

Julian BA, Waldo FB, Rifai A, Mestecky J. (1988a) IgA nephropathy, the most common glomerulonephritis worldwide; a neglected disease in the United States ? *Am J Med.* 84 : 129-32.

Julian BA, Woodford SY, Baehler RW, McMorro RG, Wyatt RJ. (1988b). Familial clustering and immunogenetic aspects of IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 12 : 366-70.

K

Kaetzel CS. (2005) The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol Rev.* 206 : 83-99.

Kaetzel CS. (2014) Cooperativity among secretory IgA, the polymeric immunoglobulin receptor, and the gut microbiota promotes host-microbial mutualism. *Immunol Lett.* 162 : 10-21.

Kajiyama T, Suzuki Y, Kihara M, Suzuki H, Horikoshi S, Tomino Y. (2011) Different pathological roles of toll-like receptor 9 on mucosal B cells and dendritic cells in murine IgA nephropathy. *Clin Dev Immunol.* 2011 : e819646.

Kanamaru Y, Arcos-Fajardo M, Moura IC, Tsuga T, Cohen H, Essig M, Vrtovnik F, Loirat C, Peuchmaur M, Beaudoin L, Launay P, Lehuen A, Blank U, Monteiro R. (2007) Fc alpha receptor I activation induces leukocyte recruitment and promotes aggravation of glomerulonephritis through the FcR gamma adaptor. *Eur J Immunol.* 37 : 1116-28.

Katafuchi R, Ninomiya T, Mizumasa T, Ikeda K, Kumagai H, Nagata M. (2008) The improvement of renal survival with steroid pulse therapy in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 23 : 3915-20.

Kawasaki Y, Mitsuaki H, Isome M, Nozawa R, Suzuki H. (2006) Renal effects of Coxsackie B4 virus in hyper-IgA mice. *J Am Soc Nephrol.* 17 : 2760-9.

Kessler M, Hiesse C, Hestin D, Mayeux D, Boubenider K, Charpentier B. (1996) Recurrence of immunoglobulin A nephropathy after renal transplantation in the cyclosporine era. *Am J Kidney Dis.* 28 : 99-104.

Kihara M, Itoh K, Nakata J, Otani M, Tran NL, Morito N, Takahashi S, Wada Y, Izui S. (2014) O-linked glycosylation determines the nephritogenic potential of IgA rheumatoid factor. *J Am Soc Nephrol.* 25 : 1282-90.

Kirylyuk 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.

Kirylyuk K, Novak J, Gharavi AG. (2013) Pathogenesis of immunoglobulin A nephropathy: recent insight from genetic studies. *Annu Rev Med.* 64 : 339-56.

Kirylyuk K, Li Y, Scolari F, Sanna-Cherchi S, Choi M, Verbitsky M, Fasel D, Lata S, Prakash S, Shapiro S, Fischman C, Snyder HJ, Appel G, Izzi C, Viola BF, Dalleria N, Del Vecchio L, Barlassina C, Salvi E, Bertinetto FE, Amoroso A, Savoldi S, Rocchietti M, Amore A, Peruzzi L, Coppo R, Salvadori M, Ravani P, Magistrini R, Ghiggeri GM, Caridi G, Bodria M, Lugani F, Allegri L, Delsante M, Maiorana M, Magnano A, Frasca G, Boer E, Boscutti G, Ponticelli C, Mignani R, Marcantoni C, Di Landro D, Santoro D, Pani A, Polci R, Feriozzi S, Chicca

S, Galliani M, Gigante M, Gesualdo L, Zamboli P, Battaglia GG, Garozzo M, Maixnerová D, Tesar V, Eitner F, Rauen T, Floege J, Kovacs T, Nagy J, Mucha K, Pączek L, Zaniew M, Mizerska-Wasiak M, Roszkowska-Blaim M, Pawlaczyk K, Gale D, Barratt J, Thibaudin L, Berthoux F, Canaud G, Boland A, Metzger M, Panzer U, Suzuki H, Goto S, Narita I, Caliskan Y, Xie J, Hou P, Chen N, Zhang H, Wyatt RJ, Novak J, Julian BA, Feehally J, Stengel B, Cusi D, Lifton RP, Gharavi AG. (2014a) Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens. *Nat Genet.* 46 : 1187-96.

Kirylyuk K, Novak J. (2014b) The genetics and immunobiology of IgA nephropathy. *J Clin Invest.* 124 : 2325-32.

Kirschning CJ, Unbehaun A, Fiedler G, Hallatschek W, Lamping N, Pfeil D, Schumann RR. (1997) The transcriptional activation pattern of lipopolysaccharide binding protein (LBP) involving transcription factors AP-1 and C/EBP beta. *Immunobiology.* 198:124-35.

Kitagawa T. (1988) Lessons learned from the Japanese nephritis screening study. *Pediatr Nephrol.* 2 : 256-63.

Knoppova B, Reilly C, Maillard N, Rizk DV, Moldoveanu Z, Mestecky J, Raska M, Renfrow MB, Julian BA, Novak J. (2016) The origin and activities of IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy. *Front Immunol.* 7 : 117.

Komatsu H, Fujimoto S, Hara S, Sato Y, Yamada K, Kitamura K. (2008) Effect of tonsillectomy plus steroid pulse therapy on clinical remission of IgA nephropathy: a controlled study. *Clin J Am Soc Nephrol.* 3 : 1301-7.

Koyama A, Sharmin S, Sakurai H, Shimizu Y, Hirayama K, Usui J, Nagata M, Yoh K, Yamagata K, Muro K, Kobayashi M, Ohtani K, Shimizu T, Shimizu T. (2004) Staphylococcus aureus cell envelope antigen is a new candidate for the induction of IgA nephropathy. *Kidney Int.* 66 : 121-32.

Kukuminato Y, Hamamoto M, Kataura A. (1993) Role of serum antibodies to streptococci in patients with IgA nephropathy. *Acta Otolaryngol.* 508 (Supp) : 6-10.

L

Lai KN. (1996a) Neutrophils in IgA nephropathy. *Nephrol.* 2 (Supp) : 7-11.

Lai KN, Shute JK, Lindley IJ, Lai FM, Yu AW, Li PK, Lai CK. (1996b) Neutrophil attractant protein-1 interleukin 8 and its autoantibodies in IgA nephropathy. *Clin Immunol Immunopathol.* 80 : 47-54.

Lai KN. (2002) Future directions in the treatment of IgA nephropathy. *Nephron.* 92 : 263-70.

Lai KN, Chan LY, Leung JC. (2005) Mechanisms of tubulointerstitial injury in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 94 (Supp) : 110-5.

Lai KN, Leung JC, Chan LY, Saleem MA, Mathieson PW, Tam KY, Xiao J, Lai FM, Tang SC. (2009) Podocyte injury induced by mesangial-derived cytokines in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 24 : 62-72.

Lai KN. (2012) Pathogenesis of IgA nephropathy. *Nature Rev Nephrol.* 8 : 275-83.

Lamm ME, Emancipator SN, Robinson JK, Yamashita M, Fujioka H, Qiu J, Plaut AG. (2008) Microbial protease removes IgA immune complexes from mouse glomeruli in vivo : potential therapy for IgA nephropathy. *Am J Pathol.* 172 : 31-36.

Laouari D, Burtin M, Phelep A, Martino C, Pillebout E, Montagutelli X, Friedlander G, Terzi F. (2011) TGF-alpha mediates genetic susceptibility to chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 22 : 327-35.

Launay P, Grossetête B, Arcos-Fajardo M, Gaudin E, Torres SP, Beaudoin L, Patey-Mariaud de Serre N, Lehuen A, Monteiro RC. (2000) 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.* 191 : 1999-2009.

Laurent-Pilonchéry B, Alamartine E. (2008) Glomérulonéphrites à dépôts mésangiaux d'IgA et purpura rhumatoïde. In : Noel LH (Eds), Atlas de pathologie rénale. Médecine Sciences / Flammarion, Paris. pp 181-90.

Lautrette A, Li S, Sunnarborg SW, Burtin M, Lee DC, Friedlander G, Terzi F. (2005) Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases : a new therapeutic approach. *Nat Med.* 11 : 867-74.

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 PGV, Monteiro RC, Berthelot L. (2016) IgA1 protease treatment reverses mesangial deposits and hematuria in a model of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 27 : 2622-9.

Lee SM, Rao VM, Franklin WA, Schiffer MS, Aronson AJ, Spargo BH. (1982) IgA nephropathy: morphologic predictors of progressive renal disease. *Hum Pathol.* 13 : 314-22.

Lee J, Kuchen S, Fischer R, Chang S, Lipsky PE. (2009) Identification and characterization of a human CD5+ pre-naive B cell population. *J Immunol.* 182 : 4116-26.

Lefranc MP, Giudicelli V, Ginestoux C, Bodmer J, Müller W, Bontrop R, Lemaitre M, Malik A. (1999) IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* 27 : 209-12.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J-M, Hoffmann JA. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/ Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 86 : 973-83.

Leung JC, Tang SC, Chan DT, Lui SL, Lai KN. (2002) Increased sialylation of polymeric lambda-IgA1 in patients with IgA nephropathy. *J Clin Lab Anal.* 16 : 11-9.