Thèse de doctorat

Université de Limoges

COMUE Léonard de Vinci
Université de Limoges
Ecole Doctorale Sciences Biologiques et Santé
Laboratoire CRIBL - CNRS UMR 7276 / INSERM U 1262 / Université de Limoges

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Discipline : Sciences de la Vie & Santé – Spécialité : Immunologie, Oncologie, Infectiologie

Présentée et soutenue par
Anderson Archelus

Le 4 mai 2018

Rôle de l'environnement microbien dans la régulation de l'immunoglobuline A mucosale et dans le développement de la maladie de Berger

Thèse dirigée par Anne Druilhe (co-directrice) et Jean-Claude Aldigier (directeur)

JURY :

Président du jury
Mme Marie Essig, PU-PH, Inserm U1248, Université de Limoges

Rapporteurs
M. Renato Monteiro, PU-PH, Inserm U1149, Université Paris-Diderot
M. Stéphane Paul, PU-PH, GIMAP, Université Jean Monnet Saint-Etienne

Examinateurs
M. Nicolas Maillard, PH, CHU de Saint-Etienne

Invités
Mme Anne Druilhe, CR Inserm, CNRS UMR 7276, Inserm U1262, Université de Limoges
M. Jean-Claude Aldigier, PR ém., CNRS UMR 7276, Inserm U1262, Université de Limoges

Remerciements

J'aimerais tout d'abord témoigner ma gratitude au Dr. Anne Druilhe pour ton encadrement, ta disponibilité, ton accessibilité, ton esprit de discussion et tes conseils. Merci pour les nombreux congrès auxquels tu m'as permis de participer et pour ton soutien lors de mon hospitalisation.

J'adresse mes sincères remerciements à mon directeur de thèse, le Pr. Jean-Claude Aldigier, pour votre accessibilité et votre gentillesse. J'exprime aussi ma gratitude au Pr. Michel Cogné pour m'avoir permis de faire mon M2 et de poursuivre en thèse au sein de son laboratoire.

Toute ma reconnaissance va au Pr. Renato Monteiro et au Pr. Stéphane Paul qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse, au Pr. Marie Essig d'être présidente du jury, et au Dr. Nicolas Maillard d'être examinateur.

Je remercie Joëlle Sommé pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à Paris pour que j'apprenne à réaliser l'injection intratrachéale et pour m'avoir hébergé. Merci pour votre accueil et cette soirée très sympa avec votre mari. Mes remerciements vont aussi à Séverine Létuvé, collègue de Joëlle Sommé, pour les cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques. Merci également à Jean-Philippe Guillaumin qui a fabriqué ce support hyper-pratique pour l'injection intratrachéale, c'est l'un des outils que j'ai le plus utilisé au cours de la thèse. Merci aussi à la petite Elina Guillaumin (maintenant plus grande !) pour les dessins et le super gâteau au chocolat en forme d'IgM pentamérique qui m'avaient fait beaucoup de bien à un moment où j'en avais besoin.

J'exprime mes remerciements à tous mes collègues passés et présents du laboratoire CRIBL. Merci Christelle de m'avoir initié aux techniques de biochimie des protéines au cours de mon M2, Claire pour ton aide en cytométrie et en immunofluorescence, Cendrine pour les ELISA et les coupes d'organes et Amélie pour les ELISPOTs. Je pense aussi aux membres de l'équipe IgA dont je fais partie : Ahmed, Christelle, Florence, François et Marie. Merci en particulier à toi Batoul ; j'ai apprécié pendant le peu de temps où nous avons partagé un bureau, ton calme et ton attitude toujours sympathique à mon égard. Je tiens à remercier tous les autres collègues avec qui j'ai partagé les différents bureaux : Cendrine, Jeanne, Nicolas et Sophie pour votre bonne humeur au quotidien et nos discussions non scientifiques. Merci d'avoir pris le temps de me rendre visite pendant mon hospitalisation. Merci à Sandrine ; tes crêpes vont me manquer ! Je remercie également mes voisines de bureau, Claire, Mylène et Zeliha, pour votre joie de vivre et les petites pauses dans votre bureau qui est une vraie « grotte » : c'est pratique, il y a toujours à manger et c'est proche de mon bureau et de ma paillasse. Merci en particulier Zeliha pour ta gentillesse (« Anderson, si t'as besoin, n'hésite pas, on est là… ») et pour les supers madeleines au chocolat. Merci à toi Stef pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ta joie de vivre et une pensée aux membres de la CARAT team, Armand, Audrey, Jérémy, Julie, Magali, Marie. Mes pensées vont aussi à mes collègues doctorants et post-doctorants : Alexis, Anne, Audrey, Aurélien, Brice, Fabien, Faten, Hend, Hussein, Iman, Jean-Marie, Leena, Nivine, Nour, Omar, Ophélie, Pauline, Sébastien, Victoria, Zeinab. Je pense aux chercheurs de l'équipe de Michel : Eric, Faraj, Laurent et Yves. Merci à part à Christophe pour tes conseils sur les aspects plasmocyte de mon projet et comme tuteur pédagogique. Mes pensées sont aussi pour les membres de l'équipe de Jean : Ahmad, Catherine, Chantal, Emilie, Hazar, Héloïse, Nathalie, Nicolas, Oussama, Racha (ma collègue de travail le week-end), Robin et Valeria. Merci en particulier à Christelle pour m'avoir passé tes cours de physiologie pendant mon poste d'ATER. Merci aux gestionnaires du labo : Anne-Marie, Aurore, Christian et Sarah.

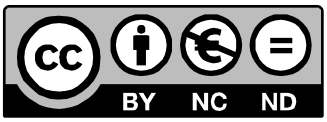
Un grand merci aux personnels de l'animalerie, notamment à Bernadette, Sylvie et David, sans qui ce travail n'aurait pas pu être réalisé.

Je tiens aussi à remercier mes ami(e)s Samuel dit maître Dess, David, Rose-Michelle, Guerlande, Matthieu, Chevelie, Daniola, Wilgens, et tous les autres. Merci pour votre soutien et votre amitié.

Enfin, je remercie mes parents pour leur amour inconditionnel, pour m'avoir toujours soutenu dans mes choix, et pour tous vos appels pendant ces années loin de vous, parfois pour savoir seulement si je mange à l'heure, si je me repose... Merci à mes frères, Andersen, Darlens et Alan, et à ma petite sœur Sonia ; merci tout simplement pour ce que vous êtes ! Merci à mes tantes et mes oncles tout particulièrement à Sœur Edouard et Frère Edouard pour m'avoir reçu chez vous pendant les examens d'entrée à l'ENS et mes années de fac à Port-au-Prince, à Mon pè et à mes cousins et cousines, Emad, Nyanza, Van, et les autres. Merci pour votre soutien.

Droits d’auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :
« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »
disponible en ligne : *http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/*



Abréviations, acronymes et sigles

Nota bene : Dans un certain nombre de cas, une même protéine est trouvée avec différents noms dans la littérature ; le nom retenu dans ce mémoire est celui recommandé dans UniProt (www.uniprot.org).

A ou α	Relatif à l'immunoglobuline A
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AID	*Activating Induced cytidine Deaminase*
AP-1	*Activator Protein-1* (hétérodimère composé de membres des familles c-Fos, c-Jun, ATF, JDP)
APRIL	*A Proliferation-Inducing Ligand* (appelée aussi TNFSF13)
ARA2	Antagoniste des Récepteurs de l'Angiotensine II
ARN	Acides RiboNucléique
ASGPR	*ASialoGlycoProtein Receptor*
ATER	Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche
ATG	*Anti-Thymocyte Globulin*
B	cellule B, qui mature dans la Bourse de Fabricius (organe des oiseaux) d'où le B
BAFF	*B-cell Activating Factor belonging to the TNF Family* (appelée aussi TNFSF13B)
BAL	*BronchoAlveolar Lavage*
BALT	*Bronchus-Associated Lymphoid Tissue*
BCR	*B Cell Receptor*
BLIMP-1	*B Lymphocyte-Induced Maturation Protein-1*
C1GALT1	*Core 1 β1,3-GALactosylTransferase 1* (appelée aussi Beta3Gal-T8)
C1GALT1C1	*C1GALT1 specific Chaperone 1*
C	1-région ou segment génique codant la région Constante d'une chaîne d'immunoglobuline 2- fragment du Complement (Ex. C5a)
CARD	*Caspase Activation and Recuitment Domain*
CASPASE	*Cysteinyl-ASPartate-cleaving proteaSE* (Ex. CASPASE-4, CASPASE-5, CASPASE-11)
CD	*Cluster of Differentiation* (Ex. CD5, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD38, CD40, CD40L, CD43, CD71, CD79a, CD79b, CD89, CD138, CD209, CD274, CD351)
CDR	*Complementary Determining Region*
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité (MHC en anglais)
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
CpG	ADN riche en nucléotides Cytosine et Guanine non méthylés liés par pont phosphodiester (p)
CRIBL	Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoprolifération s
CSR	*Class Switch Recombination* (appelée aussi commutation de classe)
d	dimérique, en référence aux Ig (dIg)
D	segment génique Diversité codant une partie d'une chaîne d'immunoglobuline
DAMP	*Damage Associated Molecular Pattern*
DC	*Dendritic Cell*
DC-SIGN	*DC-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-Integrin*
DAF	*Decay Accelerating Factor*
DFG	Débit de Filtration Glomérulaire
E	*Endocapillar*, en référence au score de prolifération endocapillaire dans la classification d'Oxford
EBV	*Epstein-Barr Virus*
ELISA	*enzyme-linked sorbent assay*
EPO	Erythropoïétine
FAE	*Follicle-Associated Epithelium*
Fc	Fraction dite cristallisable de la région C des Ig, obtenue par clivage protéolytique. Cette partie de la région C est celle qui reconnaît les récepteurs des immunoglobulines appelé FcR.
FcRL	Fc Receptor Like (Ex. FcRL4)
FDC	*Follicular Dendritic Cells*
fMLP	formyl-méthionine-leucine-phénylalanine
FO	cellule B FOlliculaire
FR	région *FRamework*
Gal	sucre Galactose
GalNAc	sucre N-Acétyl-D-Galactosamine
Gal-T	*GalactosylTransferase* (Ex. Beta3Gal-T8 appelée aussi C1GALT1, Beta4Gal-T1)
GC	*Germinal Center*
Gd	Gal deficient, en reference aux IgA1 hypogalactosylées
GlcNAc	sucre N-Acétyl-D-Glucosamine

Glu	sucre Glucose
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GWAS	*Genome-Wide Association Study*
H ou h	Fait référence à la chaîne lourde (heavy en anglais) des immunoglobulines
HAA	*Helix Aspersa Agglutinin*
HSP	*Heat Shock protein* (Ex. HSP60, HSP70 ; le nombre correspond à la taille en kDa)
i.p.	voie intrapéritonéale
i.t.	voie intratrachéale
i.v.	voie intraveineuse
IBD	*Inflammatory Bowel Diseases* (MICI en français)
IEC	Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion
IFN	InterFeroN
IG ou *Ig*	locus des gènes d'immunoglobulines (tout en majuscule et italique = convention d'écriture des gènes et loci chez l'homme, sinon chez la souris) ou Immunoglobuline (Ex IgA)
IGANN	*International IgA Nephropathy Network*
IL	Interleukine (Ex. IL-1, IL-6, IL-10, IL-17, IL-21)
ILF	*Isolated Lymphoid Follicle*
INSERM	Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale
IRF	*IFN Regulatory Factor* (Ex. IRF3)
ITAM	*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*
J	1-segment génique Jonction codant une partie d'une chaîne d'immunoglobuline 2-protéine appelée chaîne Joining
K ou *k*	Fait référence à la chaîne légère kappa des immunoglobulines
KDIGO	consortium "Kidney Disease : Improving Global Outcomes"
Kdo	sucre acide Kéto-déoxyoctanate
KI	*Knock-In*
KO	*Knock-Out mouse*
L ou λ	Fait référence à la chaîne légère lambda des immunoglobulines
LBP	*Lipopolysaccharide Binding Protein*
LIGHT	homologous to Lymphotoxin; exhibits Inducible expression and competes with HSV Glycoprotein D for Herpes virus entry mediator; a receptor expressed onT cells
LPS	LipoPolySaccharide bactérien
LRR	*Leucin Rich Repeat motif*
m	1-messager, en référence aux ARN (ARNm) 2-monomérique, en référence aux Ig (mIg)
M	1-*Microfold cell* 2-*Mesangial*, en référence au score de prolifération mésangiale dans la classification d'Oxford
MA	lectine de *Maackia Amurensis*
MAC	*Membrane Attack Complex*
MAL	*MyD88 -for Myeloid Differentiation primary response 88- Adaptor-Like molecule* (appelée aussi TIRAP)
MALT	*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*
MBL	*Mannan Binding Lectin*
MD	*Myeloid Differentiation* (Ex. MD2)
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (IBD en anglais)
miR	Micro-ARN
MyD88	*Myeloid Differentiation primary response protein 88*
MZ	cellule B de la *Marginal Zone*
NET	*Neutrophil Extracellular Trap*
NF-κB	*Nuclear Factor kappa B*
N-IgA	Néphropathie à IgA
NK	*Natural Killer cell*
NLR	*NOD - for Nucleotide Oligomerization domain Receptor - Like Receptor*
NO	*Nitric Oxide*
O	antigène *Ohne Kapsel* (sans capsule en Allemand)
p	polymérique, en référence aux Ig
PAF	Platelet-Activating Factor
PAMP	*Pathogen-Associated Molecular Pattern*
PAS	coloration dite *Periodic Acid Schiff*
PD-L1	*Programmed Death-Ligand 1, aussi appelé CD274*
PMN	cellule PolyMorphonucléaire Neutrophile
PCR	*Polymerase chain reaction*
PP	Plaque de Peyer

PRR	*Pattern Recognition Receptor*
R	Récepteur (Ex. pIgR)
RAG	*Recombination Activating Gene protein* (Ex. RAG1, RAG2)
REG	cellule régulatrice, en référence aux cellules B_{REG} et cellules T_{REG}
RLR	*RIG –for Retinoic acid Inducible Gene receptor - Like Receptor*
s.c.	voie sous-cutané
S	1-séquence d'ADN dite *Switch* en amont des segments C dans le locus *IGH* / *Igh* *2-Sclerosis*, en référence au score de sclérose segmentaire dans la classification d'Oxford
SARM	Sterile Alpha and heat - Huntingtin Elongation factor 3 protein phosphatase 2A and the yeast kinase Tor1 - /ARmadillo Motif
SC	*Secretory Component*
SIg	Immunoglobuline Sécrétoire
SHM	*Somatic HyperMutation*
supp	supplémentaire
T	1-cellule T, qui mature dans le Thymus d'où le T 2-Tubular, en référence au score d'atrophie tubulaire/fibrose interstitielle dans la classification d'Oxford
TACI	*Transmembrane Activator and CAML - for CAlcium Modulator and cyclophilin Ligand - Interactor* (appelée aussi TNFRSF13)
TCR	*T Cell Receptor*
TD	réponse T-Dépendante
T_{FH}	*Follicular Helper T cell*
TfR	*Transferrin Receptor*
Tg	Transgénique
TGF	*Transforming Growth Factor* (Ex. TGF-β)
TI	réponse T-Indépendante
TICAM	*TIR domain-Containing Adaptor Molecule* (Ex. TICAM-1 appelé aussi TRIF, TICAM-2)
TIR	*Toll/IL-1 Receptor*
TIRAP	*TIR domain-containing Adaptor Protein* (appelée aussi MAL)
TH	*Helper T cell*
TLR	*Toll - signifie "formidable" en allemande - Like Receptor* (Ex. TLR1, TLR4, TLR9)
TNF	*Tumor Necrosis Factor* (Ex. TNF-α)
TNFSF	*TNF SuperFamily member* (Ex. TNFSF13, appelée aussi APRIL, TNFSF13B, appelée aussi BAFF, TNFSF14, appelée aussi LIGHT)
TNFRSF	*TNF Receptor SuperFamily member* (Ex. TNFRSF13, appelée aussi TACI)
TRIF	*TIR domain-containing adaptor inducing InterFeron-β* (appelée aussi TICAM-1)
UMR	Unité Mixte de Recherche
V	région ou segment génique codant la région Variable d'une chaîne d'immunoglobuline

Table des matières

INTRODUCTION 11

Chapitre I. Le lipopolysaccharide bactérien 13

I.1. Interaction environnement microbien et hôte 13

I.1.1. Le microbiote 13

I.1.2. Composition et rôle d'une muqueuse 14

I.2. Les molécules microbiennes et leurs récepteurs eucaryotes 16

I.2.1. Les *pathogen-associated molecular patterns* et leurs récepteurs 16

I.2.2. Exemple des *toll-like receptors* 17

I.3. Focus sur le lipopolysaccharide 19

I.3.1. Structure 20

I.3.2. Récepteurs 21

I.3.3. Tolérance endotoxinique 23

Chapitre II. L'immunoglobuline A 24

II.1. Le système immunitaire 24

II.2. Les lymphocytes B 26

II.2.1. Structure des immunoglobulines 26

II.2.2. Organisation germinale et réorganisation des gènes d'immunoglobulines 27

II.2.3. Développement des lymphocytes B jusqu'au B immature 31

II.2.4. Du B immature au plasmocyte et à la cellule B mémoire 32

II.2.5. Les cellules B atypiques 35

II.3. L'immunoglobuline A 36

II.3.1. Structure 37

II.3.2. Activation de récepteurs et du complément 39

II.3.3. Fonctions de l'immunoglobuline A 42

II.3.4. Maladies liées à l'immunoglobuline A 44

II.3.5. Régulation de la production de l'immunoglobuline A dans la muqueuse intestinale 44

Chapitre III. La néphropathie à IgA 46

III.1. Historique de la découverte de la néphropathie à IgA 46

III.2. Caractéristiques de la néphropathie à IgA 47

III.2.1. Epidémiologie 47

III.2.2. Manifestations cliniques 48

III.2.3. Evolution de la néphropathie à IgA 49

III.2.4. Caractéristiques histopathologiques 50

III.2.5. Traitements 52

III.2.6. Traitement de suppléance lors de l'insuffisance rénale terminale 53

III.3. Physiopathologie 54

III.3.1. Les immunoglobulines A polymériques et complexées à d'autres protéines 54

III.3.2. Les complexes immunoglobuline A - CD89 soluble 56

III.3.3. Les complexes immuns avec les immunoglobulines A hypogalactosylés 57

III.3.4. Importance du système du complément 61

III.3.5. Génétique de la néphropathie à IgA 61

III.3.6. Rôle des facteurs environnementaux dans la N-IgA 63

RESULTATS 68

Chapitre IV. Régulation de l'immunoglobuline A mucosale par le lipopolysaccharide 70

IV.1. Introduction 70

IV.2. Principaux résultats 71

IV.3. Résultats supplémentaires et discussion 95
Chapitre V. Modélisation de la néphropathie à IgA 97
V.1. Introduction 97
V.2. Matériel et méthodes 98
V.3. Résultats et discussion 103
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 108
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 110
ANNEXE 126

Liste des figures et des tableaux hors ceux présentés dans les résultats

Note Bene : Les figures et tableaux listés ci-dessous n'ont pas de légende ; le texte qui les précède ou les suit fait figure de légende.

Figure 1 – Les *Toll-Like Receptors* avec leur ligands p17
Figure 2 – La signalisation par les *Toll-Like Receptors* p18
Figure 3 – Structure des LipoPolySaccharides p20
Figure 4 – Structure des Immunoglobulines p26
Figure 5 – Organisation des loci murins *Igh, Igk, Igl* p28
Figure 6– Mécanisme de la recombinaison VDJ au locus Igh p29
Figure 7 – Mécanisme de la *Class Switch Recombination* p30
Figure 8 – Les différentes étapes du développement des cellules de la lignée B p31
Figure 9 – Organisation d'un centre germinatif p34
Figure 10 – Les différentes structures des Immunoglobulines A p37
Figure 11 – Le système du complément p41
Figure 12 – Régulation de l'Immogobuline A dans la muqueuse digestive p42
Figure 13 – Structure du rein p47
Figure 14 – Dépôts mésangiaux d'Immunoglobuline A dans un glomérule, détectés par immunfluorescence (vert pour IgA, rouge pour podocine comme marqueur de podocytes) p50
Figure 15 – La région charnière de l'immunogobuline A1 et ses O-glycosylations p58

Tableau 1 – Les scores de la classification d'Oxford p51

INTRODUCTION

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein du laboratoire Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoprolifération (CRIBL) sous l'encadrement de A DRUILHE. Ce laboratoire est une Unité Mixte de Recherche du Centre National de la Recherche Scientifique, de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale et de l'Université de Limoges (CNRS UMR 7276, INSERM U1262, Université de Limoges) dont la direction est assurée par M COGNE.

Le laboratoire CRIBL est spécialisé dans la physiopathologie des lymphocytes B (appelé aussi cellule B), qui sont les cellules productrices des immunoglobulines (Ig). Cette unité de recherche mène des études fondamentales portant sur les mécanismes moléculaires régulant la production des Ig et étudie le rôle des différentes classes d'Ig membranaires dans le destin des cellules B. Le laboratoire s'intéresse aussi à des questions de médecine expérimentale *via* la réalisation de modèles murins de maladies à dépôts d'Ig et de lymphomagenèse B et d'études précliniques évaluant l'efficacité de la thérapie par anticorps.

Il existe deux grandes familles de maladies à dépôts d'Ig, celles présentant des dépôts tissulaires d'Ig monoclonales, et celles avec des dépôts d'Ig polyclonales dont la plus fréquente est la néphropathie à IgA (N-IgA). L'équipe de M COGNE s'est intéressée à cette maladie en posant d'abord la question des facteurs régulant la production des IgA et pouvant expliquer l'augmentation des IgA circulantes dans la N-IgA. Le laboratoire a montré que le médiateur lipidique *Platelet-Activating Factor* (PAF) est augmenté dans la circulation des sujets avec N-IgA en comparaison des individus contrôles (Denizot 2000) ; le PAF est un agent inflammatoire qui stimule la production des IgA par les lymphocytes B et qui est produit par les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) et les cellules mésangiales rénales suite à l'activation de ces cellules par des IgA agrégées. En parallèle, le laboratoire a étudié l'importance du polymorphisme génétique de la région régulatrice hs1,2 du locus de la chaîne lourde des Ig (*IGH*) dans le développement et l'évolution de la N-IgA (Aupetit 2000, Drouet 2002, Bessette 2003). En 2010, le groupe de M COGNE a publié des travaux décrivant la création d'une souris génétiquement modifiée par introduction du gène humain *IGHA1* dans le locus *Igh* murin (Duchez 2010). Cette souris appelée α1KI pour « gene Alpha1 *Knock-In* » produit des IgA1 chimériques humaines qui se déposent spontanément dans le mésangium rénal, mais sans provoquer de N-IgA (Oruc 2016). Le dépôt est fortement associé à la quantité circulante des IgA chimériques, qui elle-même reflète la charge de l'environnement microbien sur les souris : plus les souris sont exposées à un environnement microbien riche, plus le taux d'IgA chimérique circulant est élevé et plus les dépôts sont importants chez les animaux jeunes (Oruc 2016). La capacité d'IgA monoclonales chimériques humaines (hybridomes issus des souris α1KI) ou

humaines (purifées à partir du sang de sujets avec myélome à IgA) n'a pas permis de déterminer ce qui dans l'IgA explique son dépôt dans le mésangium rénal (Boumediene 2011, Oruc 2016). Enfin, en croisant les souris α1KI avec des souris exprimant le récepteur de l'IgA (CD89 humain) à la surface des monocytes, l'équipe de R MONTEIRO a montré que certaines souris présentaient les signes de la N-IgA : hématurie et protéinurie (Berthelot 2012).

En continuité des travaux menés par le groupe de M COGNE, j'ai étudié au cours de ma thèse le rôle de l'environnement microbien et, en particulier, du lipopolysaccharide (LPS) bactérien à la fois sur la production des IgA mucosales chez la souris sauvage et sur le développement de la N-IgA dans le modèle α1KI. Le LPS, les IgA et la N-IgA sont présentés en détail dans l'introduction de ce manuscrit.

Ces travaux ont démarré alors que j'étais en stage de M2, encadré par A DRUILHE. Les résultats du M2 ont permis de mettre en évidence un premier résultat intéressant sur la production des IgA mucosales sur lequel nous avons construit le projet de la thèse qui a consisté principalement à élucider le mécanisme d'action moléculaire et cellulaire du LPS sur la production mucosale des IgA ; il en a résulté un article actuellement soumis pour publication et présenté dans ce manuscrit. En parallèle, différentes tentatives de modélisation de la N-IgA dans la souris α1KI ont été réalisées pour aboutir dernièrement à des résultats encourageants qui sont aussi décrits dans ce manuscrit. Les travaux à finir et les perspectives qu'ouvrent les résultats obtenus sont exposés et discutés dans les perspectives dans la dernière partie du manuscrit. L'ensemble des travaux a aussi été communiqué dans différents congrès locaux, nationaux et internationaux au fur et à mesure de leur réalisation ; les communications sont indiquées dans le *curriculum vitae* en annexe.

Au cours de ma thèse, mon salaire a été assuré les trois premières années par un contrat doctoral du ministère français de l'enseignement supérieur et de la recherche et par une charge d'enseignement, et l'année suivante par un contrat d'attaché temporaire d'enseignement et de recherche (ATER) à l'Université de Limoges.

Chapitre I. Le lipopolysaccharide bactérien

I.1. Interaction environnement microbien et hôte

I.1.1. Le microbiote

L'environnement microbien est constitué de bactéries, de virus, de champignons et de parasites qui sont en perpétuelle interaction avec l'organisme *via* l'air, les aliments et l'eau que nous consommons. Ces micro-organismes peuvent être pathogènes et induisent, par conséquent, une réaction de défense immunitaire lorsqu'ils pénètrent dans l'organisme de l'hôte. Ils peuvent être également non pathogènes et entretiennent, dans ce cas, une relation de symbiose ou mutuellement bénéfique avec l'hôte ; ces micro-organismes sont dits commensaux.

Les muqueuses de la peau, des voies respiratoires, de l'appareil uro-génital et du tube digestif sont les structures qui sont en contact direct avec l'environnement microbien exogène ou endogène chez les mammifères.

L'ensemble des micro-organismes qui vivent en symbiose avec l'hôte est appelé microbiote ; sa composition varie en fonction du territoire où il se trouve comme par exemple le microbiote intestinal connu aussi sous le nom de flore intestinale.

Le microbiote intestinal qui tapisse la muqueuse de l'intestin reste le plus étudié et le plus connu, à la fois dans sa composition et dans son rôle. Il est composé de 10^{12} à 10^{14} micro-organismes chez l'adulte, ce qui représente 2-10 fois plus que de cellules de l'organisme hôte. Il se met en place à la naissance, mais la quantité des micro-organismes et la qualité du microbiote évolue tout au long de la vie. La composition exacte a été difficile à caractériser pendant de nombreuses années, car seulement une petite fraction de ses micro-organismes pouvait être cultivée *in vitro*. La mise au point des techniques de séquençage du matériel génétique à haut débit a permis récemment de s'affranchir des contraintes de la culture *in vitro*. On sait désormais que plus de mille espèces bactériennes résident dans l'intestin chez l'homme dont les plus abondantes font partie des Firmicutes et des Bactéroidetes (Qin 2010). La quantité de gènes présents dans le microbiote intestinal est estimé à cent fois supérieur aux gènes du génome humain.

Depuis longtemps, le rôle du microbiote intestinal dans la digestion des aliments et dans l'absorption des lipides complexes et des sucres non digestibles suite à l'hydrolyse de l'amidon et de la cellulose, est bien connu. Plus récemment, différentes études ont montré que le microbiote influence fortement le métabolisme général et peut être incriminé dans le développement de

maladies métaboliques comme l'obésité. Le microbiote participe également à l'intégrité et à l'immunité des muqueuses en empêchant la colonisation de la muqueuse intestinale par des pathogènes par phénomène de compétition, et par production de substances bactéricides pour les agresseurs, mais aussi en participant à l'éducation des cellules du système immunitaire et à la tolérance vis-à-vis des commensaux. Des perturbations du microbiote sont associés non seulement à des maladies intestinales, mais aussi du système immunitaire en dehors de la sphère digestive. Du fait de son importance quantitative et de son influence sur la physiologie et les pathologies de l'hôte, le microbiote intestinal est considéré comme un organe à part entière. Cette notion constitue une des découvertes majeures de ce début du 21^{ième} siècle comme exposé dans le supplément vol. 735, n°7610 de la revue Nature publié en 2016 sous le titre *Intestinal microbiota in health and disease*.

A noter que toutes les muqueuses, y compris celles des voies aériennes, longtemps considérées comme stériles (Beck 2012), possèdent un microbiote avec des caractéristiques qui lui sont propres et que l'on soupçonne influencer également le fonctionnement de la muqueuse qu'il tapisse voire de l'organisme entier.

I.1.2. Composition et rôle d'une muqueuse

Le tractus intestinal représente la surface muqueuse la plus importante chez l'homme ; la muqueuse couvre une superficie de 100 m^2 environ et est délimité par une unique couche de cellules épithéliales formant une barrière entre la lumière intestinale dans lequel se trouve le microbiote et le tissu conjonctif de l'hôte. Les cellules épithéliales intestinales sont des cellules hautement différenciées dont la membrane plasmique est constituée de deux domaines fonctionnellement et biochimiquement distincts : le domaine apical qui est situé du côté de la lumière intestinale et le domaine basolatéral constitué par le reste de la membrane de la cellule. Ces deux domaines sont délimités par des structures situées près du pôle apical appelées jonctions serrées. Les cellules épithéliales intestinales sont de quatre types différents : les entérocytes qui sont les cellules les plus nombreuses, polarisées et responsables des fonctions de transport et d'absorption de l'intestin, les cellules caliciformes (ou en gobelet – *goblet* en anglais) qui produisent du mucus recouvrant la surface de la muqueuse, les cellules de Paneth qui libèrent dans la muqueuse digestive de nombreuses molécules anti-microbiennes comme les défensines et sont ainsi impliquées dans la protection de la muqueuse vis-à-vis des pathogènes et les cellules M (pour *Microfold*). Ces cellules M sont spécialisées dans le transport des éléments (antigènes alimentaires et microbiens) de la lumière de la muqueuse vers les cellules immunitaires présentes dans le tissu conjonctif (Corr 2008, Mabbott 2013, Neutra 2001, Ohno 2016). Récemment, il a été aussi montré que le transport des antigènes à partir de la lumière de la muqueuse digestive est, pour une toute petite part, pris en charge par les cellules caliciformes (Lycke 2017).

Les cellules épithéliales intestinales ont pour mission principale d'absorber les nutriments, les électrolytes et l'eau, mais jouent également un rôle crucial dans les défenses immunitaires. La barrière physique assurée par les jonctions serrées qui empêchent le passage paracellulaire des antigènes intraluminaux et des pathogènes du pôle apical au compartiment basolatéral, et par le mucus contribue à défendre l'organisme contre les pathogènes. Le mucus fixe des microorganismes et les éliminent lorsqu'il est évacué du fait du péristaltisme digestif. Les cellules épithéliales peuvent même être considérées à part entière comme des cellules de l'immunité (Hornef 2014) puisque certaines produisent elles-mêmes ou transportent des agents antimicrobiens (peptide, anticorps) dans la lumière digestive, et d'autres, en réponse à des microbes, produisent des cytokines qui recrutent et/ou activent les globules blancs.

Les globules blancs sont présents dans la muqueuse digestive avec certains isolés et intercalés entre les cellules épithéliales ou isolés dans le tissu conjonctif ou encore rassemblés et organisés dans des structures lymphoïdes dites secondaires appelées MALT pour *mucosa-associated lymphoid tissues*. Dans l'intestin, les MALT sont en contact direct avec les cellules M au niveau du Follicle-Associated Epithelium (FAE), et sont de deux types : les Plaques de Peyer (PP) et les *Isolaled Lymphoid Follicles* (ILF). Ils sont constamment présents et se forment au cours de l'embryogénèse ou immédiatement après la naissance.

La présence permanente de MALT n'est pas vraie pour toutes les muqueuses. Les BALT, ou *bronchus-associated lymphoid tissues*, dans les bronches, ont été initialement décrits comme constitutivement présents et intégrés dans la muqueuse des grandes voies aériennes (Sminia 1989). Il est maintenant un fait connu qu'ils ne sont pas constamment présents chez la plupart des espèces de mammifères, et que leur formation est déclenchée suite à une exposition microbienne ou une inflammation des voies aériennes plutôt qu'à un processus développemental préprogrammé. Ils ne sont pas constamment présents, en particulier chez l'homme et la souris. Dans une étude de recherche systématique de BALT, il a été rapporté que ces derniers ne sont pas automatiquement retrouvés chez l'homme sain (Pabst 1992), d'autres études ont rapporté qu'ils sont présents seulement dans 8-25% des cas (Pabst 1990, Delventhal 1992, Richmond 1993). Le nombre de BALT, leur taille et la complexité de leur architecture augmentent en réponse à des stimulations microbiennes ou inflammatoires (Delventhal 1992). En effet, il a été démontré chez l'homme qu'une exposition pulmonaire à des microorganismes conduit à une augmentation de 20-40 fois plus de BALT dans le poumon que dans les situations non infectieuses.

Même en absence de BALT, la muqueuse bronchique contient des cellules immunitaires dispersées soit dans le tissu conjonctif, soit entre les cellules épithéliales. Concernant les cellules épithéliales des bronches, comme celles de l'intestin, elles sont hautement différenciées et associées les unes aux autres par des jonctions serrées. Dans les bronches, on trouve trois types majeurs de

cellules organisées en un épithélium dit pseudostratifié (Velden 1998) : les cellules basales qui sont considérées comme les cellules souches de l'épithélium, les cellules à fonction sécrétoire qui produisent différentes molécules dans la lumière des bronches et les cellules ciliées dont les cils sont en mouvement perpétuel. Les cellules sécrétoires les plus nombreuses dans l'épithélium bronchique sont les cellules caliciformes qui produisent le mucus. Le mucus, expulsé grâce à l'action des cils, entraine avec lui un certain nombre d'éléments présents dans la lumière des bronches. Les cellules sécrétoires produisent également divers éléments antimicrobiens. Les cellules épithéliales bronchiques comme celles de l'intestin produisent, en réponse à l'activation des microorganismes, des agents antimicrobiens et des cytokines qui activent les cellules du système immunitaire. Les cellules M n'ont pas été décrites dans la muqueuse des bronches ; par contre elles existent dans plus haut dans les voies aériennes, au niveau de la muqueuse nasale (Mabbott 2013, Rochereau 2016).

I.2. Les molécules microbiennes et leurs récepteurs eucaryotes

I.2.1. Les *pathogen-associated molecular patterns* et leurs récepteurs

Les micro-organismes présentent à leur surface des molécules dont certaines appelées PAMP pour *Pathogen-Associated Molecular Patterns* servent de molécules d'alerte pour les cellules du système immunitaire. Les PAMP sont le plus souvent présentes en grande quantité sur les micro-organismes et facilement accessibles. Ils sont caractérisés par les trois critères suivants (Huet 2004) :

- ils sont spécifiques des pathogènes et n'ont pas d'équivalence chez l'hôte, ce qui permet une discrimination sans ambiguïté entre le soi et le non soi,
- ils sont indispensables à la survie des micro-organismes, ce qui élimine la possibilité d'une mutation aléatoire qui peut rendre le pathogène indétectable,
- ils constituent la signature moléculaire de groupes de micro-organismes. Cela permet ainsi la reconnaissance des envahisseurs par un nombre limité de récepteurs du système immunitaire.

Les LPS des bactéries à Gram négatif, les peptidoglycanes des bactéries à Gram positif, l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) riche en nucléotides Cytosine Guanine non méthylés (CpG) des bactéries, l'Acide RiboNucléique (ARN) double brin de certains virus sont des PAMP.

Les récepteurs du système immunitaire trouvés à la surface des globules blancs comme des cellules épithéliales qui détectent les PAMP sont appelés PRR pour *Pattern Recognition Receptors.* Les PRR détectent les signaux de danger qu'ils soient des PAMP ou qu'ils proviennent de cellules de l'hôte endommagées ou mortes par apoptose. Ces signaux de danger endogènes sont appelés DAMP pour *Damage Associated Molecular Patterns* (Vidya 2017). Les PRR sont situés dans différents compartiments cellulaires (membrane plasmique, cytosol, endosomes) de manière à détecter les pathogènes extracellulaires ou intracellulaires. Il existe différentes familles de PRR

comme les NLR ou *NOD Like Receptors*, les RLR à activité hélicase ou *RIG Like Receptors* qui sont cytosoliques et les TLR ou *Toll Like Receptors* que l'on peut trouver dans plusieurs compartiments. Les cellules du système immunitaire expriment en même temps plusieurs types de PRR ce qui leur permet de reconnaître efficacement le danger.

I.2.2. Exemple des *toll-like receptors*

Les TLR ou récepteurs de type Toll ont été les premiers PRR à être identifiés et sont les mieux caractérisés (Medzhitov 1997). Le récepteur Toll (mot signifiant « formidable en Allemand) a été identifié pour la première fois chez *Drosophila melanogaster* comme un récepteur transmembranaire nécessaire à la mise en place de l'axe dorso-ventral au cours du développement embryonnaire (Hashimoto 1988). En 1996, JA HOFFMAN et son équipe ont montré que des mutations du gène codant pour le récepteur Toll engendrent une susceptibilité accrue des drosophiles à des infections fongiques (Lemaitre 1996), suggérant ainsi un rôle de ce récepteur dans le système immunitaire. Cette découverte a été une source de stimulation pour la recherche de récepteurs homologues chez les mammifères et l'étude de leur implication dans la fonction immunitaire. Dès 1997, un homologue mammifère du récepteur Toll est publié par l'équipe de CA Jr JANEWAY (Medzhitov 1997).

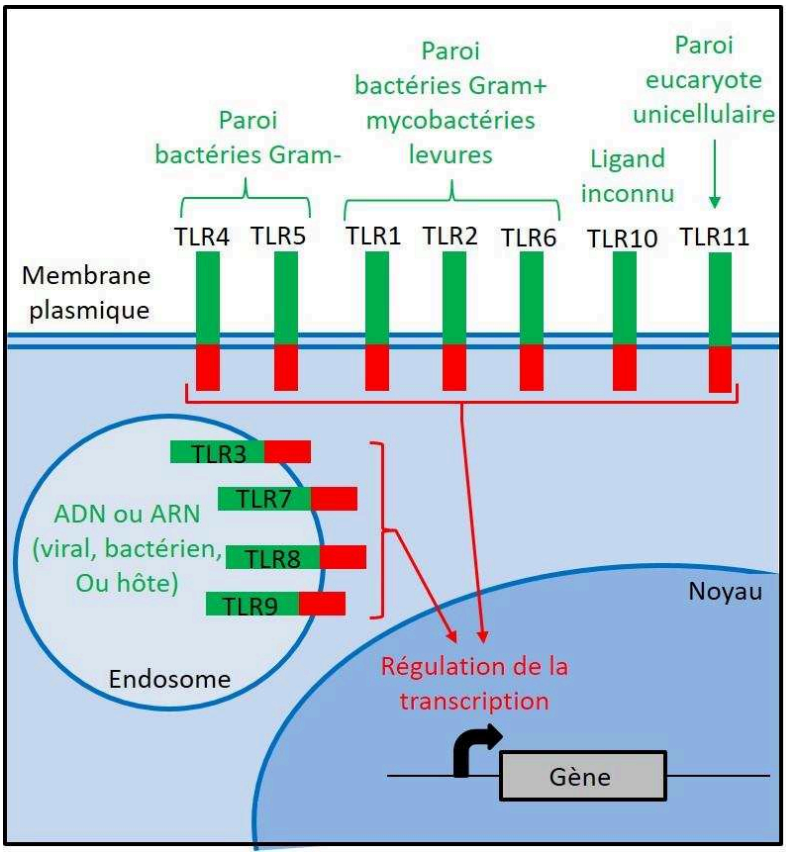


Figure 1 : Les Toll-Like Receptors avec leurs ligands. Les Toll-Like Receptors sont matérialisés dans la cellule eucaryote par les rectangles rouges et verts ; leurs ligands sont indiqués en lettres vertes.

Différentes protéines structuralement apparentées au récepteur Toll de la drosophile ont été identifiées par la suite chez les mammifères, et ont été désignées collectivement comme les «*Toll-like receptors*». La plupart des espèces ont entre dix et quinze TLR ; l'homme et la souris en ont 13. On peut les classer en deux groupes selon leur localisation (Figure 1) et le PAMP microbien reconnu : les TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10 et 11 forment le groupe des TLR de la membrane plasmique, et reconnaissent des composants microbiens de surface tels que certains composés lipidiques comme les LPS et diverses protéines comme la flagelline qui est un des éléments du filament flagellaire des bactéries filamenteuses. L'autre groupe est composé des TLR 3, 7, 8, et 9 qui sont localisés dans des vésicules intracellulaires telles que les endosomes. Ils reconnaissent principalement les acides nucléiques, ADN et ARN, microbiens. Les ligands des TLR 10, 12 et 13 sont encore inconnus.

Ils sont exprimés par les cellules classiques du système immunitaire que sont les globules blancs mais aussi par les cellules épithéliales et de la peau qui sont en contact avec le milieu extérieur (Takeda 2004). De façon surprenante, ils ont aussi été détectés sur certaines cellules non spécialisées dans la détection de pathogènes, telles que les cellules endothéliales, les cardiomyocytes et les fibroblastes.

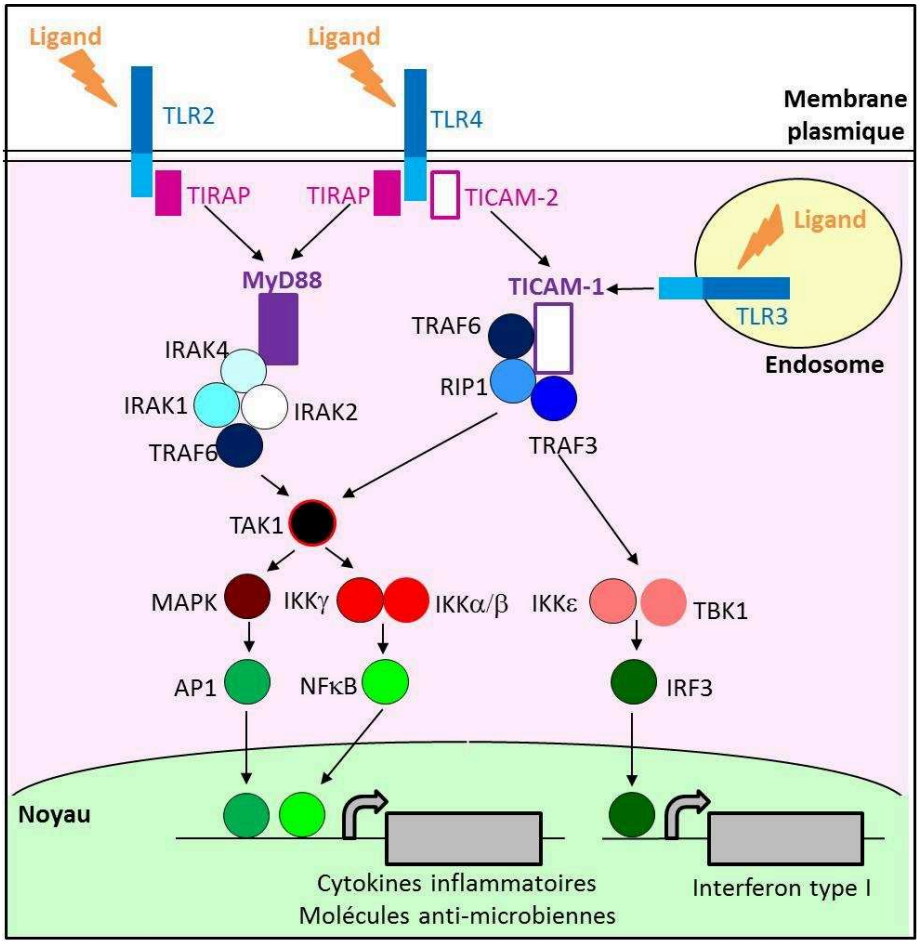


Figure 2 : La signalisation par les Toll-Like Receptors. Après activation par leur ligand respectif, les Toll-Like Receptors activent des adaptateurs (Myd88, TIRAP, TICAM1, TICAM2) qui, à leur tour, activent des cascades moléculaires conduisant à la régulation de la transcription de différents gènes. Adapté de https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC3524297_pjab-85-143-g009&req=4

Les TLR sont des glycoprotéines transmembranaires caractérisées par un domaine extracytoplasmique composé d'une succession de motifs LRR pour *Leucin rich repeats*, d'un unique domaine transmembranaire et d'un domaine intracytoplasmique comprenant environ cent cinquante acides aminés et baptisé TIR pour *Toll/IL-1 Receptor* en raison de sa similitude à celui du récepteur de l'interleukine (IL)-1. Lorsqu'un TLR entre en contact avec son ligand, ce TLR change de conformation au niveau du domaine TIR qui recrute différentes molécules adaptatrices. Ces molécules adaptatrices spécifiques des TLR sont au nombre de quatre : MyD88 (pour *Myeloid Differentiation Primary Response protein 88*), TICAM-1/TRIF et TICAM-2 (pour *TIR domain Containing-Adaptor Molecule*), TIRAP/MAL (TIR domain containing Adaptor Protein). A l'exception de TLR3 qui utilise TICAM-1, les autres TLR utilisent MyD88 comme adaptateur. Les TLR3, 5, 7, 8, 9 et 11 ont un seul adaptateur ; les autres TLR ont Myd88 et TIRAP ou les quatre adaptateurs. Il existe deux voies de signalisation des TLR en fonction de la molécule adaptatrice recrutée (Figure 2) : la voie de signalisation dépendante de MyD88 et la voie de signalisation dépendante TICAM-1 (Takeda 2004). La voie dépendante de MyD88 conduit à l'activation des facteurs de transcription NF-κB (pour *Nuclear Factor-kappa B*) et AP-1 (pour *Activator Protein-1*) et à l'induction de nombreux gènes codant pour des cytokines et des facteurs anti-microbiens. La voie dépendante de TICAM-1/TRIF connue sous le nom de voie dépendante de TRIF conduit essentiellement à l'activation des facteurs de transcription de type IRF (pour Interferon Regulatory Factor) comme l'IRF-3 qui s'accompagne de la production d'IFN de type I (pour InterFeroN) qui à son tour agit sur les cellules immunitaires (Toshchakov 2002). A noter que certains TLR agissent sous forme de hétérodimère comme TLR2-TLR6. De plus TLR10 est un récepteur inibiteur de MyD88 et de TICAM-1 (Jiang 2016).

Un cinquième adaptateur appelé SARM (pour Sterile Alpha and heat/ARmadillo Motif) a été découvert récemment ; celui-ci, en s'associant aux adaptateurs activateurs MyD88 et TICAM-1 et en bloquant leur activité, est inhibiteur de TLR4 (Vaure 2014).

I.3. Focus sur le lipopolysaccharide

Le terme « lipopolysaccharide » abrégé en LPS est entré en usage au début du 20^{ième} siècle pour désigner un composant de la paroi des bacilles à Gram- en raison de sa composition en lipides et de carbohydrates ou saccharides. Ce composant présente une activité toxique et est responsable de l'apparition d'un état de choc septique se traduisant par de la fièvre, une hypotension, des lésions tissulaires et des défaillances d'organes. Comme son activité toxique est associée au aux bactéries et non pas au surnageant de culture comme les exotoxines diphtérique, tétanique et

botulinique, le LPS a été rapidement appelé endotoxine (Erridge 2002, Szalo 2006). Les deux termes continuent de coexister.

I.3.1. Structure

La structure du LPS est donnée dans la Figure 3.

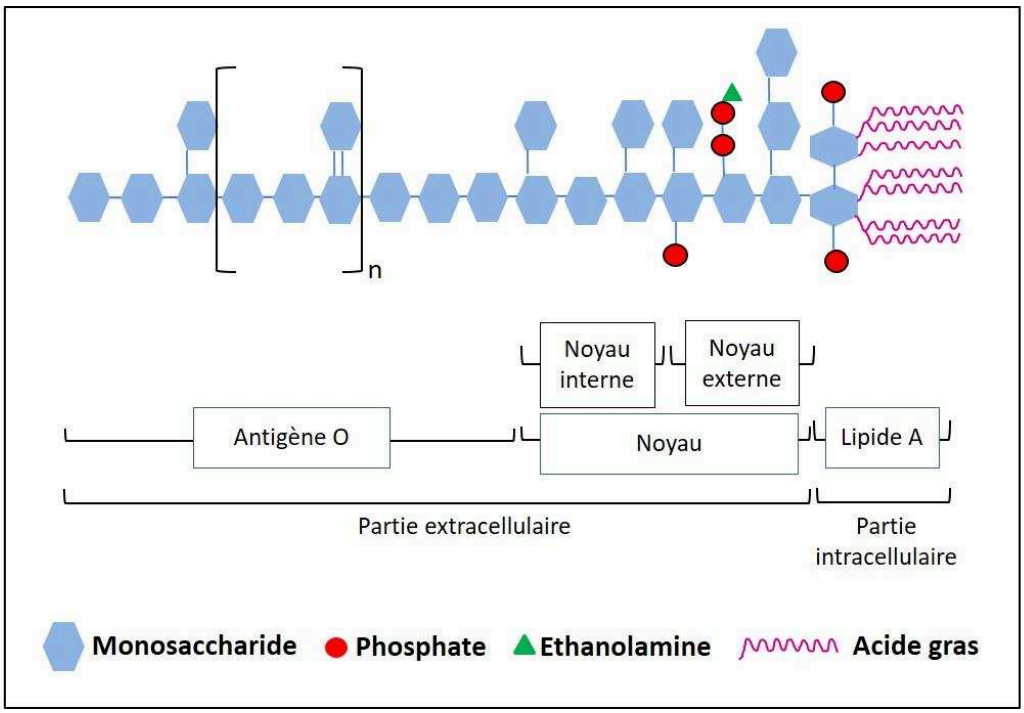


Figure 3 : Structure des LipoPolySaccharides

Le LPS est constitué de trois composants distincts synthétisés séparément :

- un composant hydrophobe localisé à la partie proximale de la molécule appelée « lipide A » qui est relativement conservé. Ce dernier est composé d'un disaccharide de D-glucosamines reliés en β-1,6 et phosphorylé par deux groupes phosphate en position 1' et 4'. Ce disaccharide est acylé par quatre acides gras dont deux fixent eux-mêmes une chaîne d'acide gras. Le lipide A contient six acides gras ayant de dix à seize carbones chacun et constitue le point d'ancrage du LPS dans la bicouche lipidique de la membrane externe de la bactérie. Le lipide A constitue l'essentiel de l'activité toxique chez l'hôte et est un élément vital pour la bactérie,
- un composant hydrophile de nature polysaccharidique situé dans la partie distale en contact avec l'environnement extérieur appelée « antigène O » pour « *Ohne Kapsel* » qui signifie sans capsule en Allemand. L'antigène O résulte de la polymérisation de blocs d'hydrates de carbone nommés « unités O ». Ces dernières sont, elles-mêmes, des oligosaccharides pouvant être constitués de un à huit monosaccharides de même type (homopolymère) ou de types différents (hétéropolymère). Certains hydrates de carbone peuvent présenter des substitutions latérales par des éléments non glucidiques comme des groupements acétyl. L'antigène O peut présenter une forte variabilité structurale due à la composition et aux arrangements des unités O ainsi qu'à leur nombre. Une bactérie donnée ne présente qu'un type d'antigène O à sa surface mais les

antigènes O varient fortement d'une souche à l'autre à l'intérieur d'une même espèce et d'une espèce à l'autre. Certains LPS sont même dépourvus d'antigène O,

- un noyau appelé « *core* » de nature polysaccharidique qui est divisé en deux parties distinctes dont l'une est hydrophobe, désignée comme le noyau interne, et l'autre plutôt hydrophile formant le noyau externe (Nikaido 1987). Le noyau interne est lié de façon covalente au lipide A par l'acide déoxyoctanate ou Kdo et présente une structure généralement conservée. Le noyau externe présente une plus grande variabilité que le noyau interne et est composé d'hexoses ordinaires tels que le Glucose (Glu), le Galactose (Gal) ou la N-Acétyl-D-Galactosamine (GalNAc). Le noyau externe s'associe à l'antigène O lorsqu'il est présent.

I.3.2. Récepteurs

Les LPS sont reconnus par TLR4 qui est le premier TLR à avoir été identifié chez les mammifères. Il a été identifié simultanément par deux groupes cherchant l'origine de l'hyposensibilité de certaines souches murines (C3H/HeJ et C57BL10/ScCR) à la toxicité du LPS (Poltorak 1998, Qureshi 1999). Le gène défectueux responsable de cette hyposensibilité a été localisé sur le chromosome 4 et identifié comme le gène codant le TLR4. La lignée murine C3H/HeJ présente une mutation ponctuelle où une proline fortement conservée est remplacée par une histidine dans la région du gène qui correspond au domaine TIR de TLR4, ce qui conduit à la synthèse d'un récepteur inactif. L'autre lignée murine, C57BL10/ScCR, présente une mutation non sens bloquant complètement la synthèse protéique de TLR4. Des souris *Knock-Out* (KO) pour TLR4 ont permis de confirmer que TLR4 est un récepteur essentiel dans l'activation de la voie de signalisation induite par le LPS (Hoshino 1999).

Il a été montré également que l'activation cellulaire par le LPS nécessite trois autres protéines en plus de TLR4 : la LBP (pour *LPS Binding Protein*), la molécule CD14 (pour Cluster of Differentiation), et la protéine MD2 (pour *Myeloid Differentiation*) (Botos 2011). La LBP est une glycoprotéine synthétisée et sécrétée par le foie, mais aussi par d'autres tissus tels que l'intestin et les cellules épithéliales pulmonaires sous l'action des cytokines comme l'IL-6, l'IL-1 et le TFN-α (pour *Tumor Necrosis Factor*) (Gamble 2009, Kirschning 1997). Elle est présente dans le sérum et augmente fortement en cas d'infection où elle se fixe au LPS pour former le complexe LPS-LBP qui est reconnu par CD14, une protéine ancrée sur le versant externe de la membrane cytoplasmique *via* une queue lipidique de glycosylphosphatidylinositol (GPI). CD14 présente le LPS au couple TLR4/MD2 qui sert de corécepteur pour la partie hydrophobe du LPS (Visintin 2006). L'importance de ces trois molécules, LBP, CD14, et MD2, a été démontré *in vivo*. Ainsi, des doses habituellement létales chez la souris sauvage n'ont aucun effet chez des souris n'exprimant pas la LBP ou le CD14 (Haziot 1995, Moore 2000). Des souris KO pour MD2 présentent une résistance au choc septique induit par le LPS, similaire aux souris KO pour TLR4 (Nagai 2002). A noter que le CD14 peut exister

aussi sous une forme soluble qui peut présenter le LPS au complexe TLR4/MD2 présent sur des cellules non immunitaires ne possédant pas la forme membranaire de CD14.

TLR4 active les quatre adaptateurs que sont MyD88, TICAM-1/TRIF, TICAM-2 et TIRAP/MAL ce qui conduit à la signalisation dépendante de MyD88 et à la signalisation dépendante de TRIF et résulte en la production de cytokines inflammatoires comme des IFN de type 1. TLR4 peut également activer SARM qui s'associe aux adaptateurs activateurs et limite leur activité (Vaure 2014) ; cet effet est probablement un mécanisme de contrôle visant à éviter l'activation excessive des cellules immunitaire et le choc septique.

En plus de l'activation de TLR4, il a été montré que le LPS active également certaines CASPASEs (pour *Cysteinyl-aspartate-cleaving protease*) à l'intérieur de la cellule de manière indépendante de TLR4. Le LPS lorsqu'il est présent dans la cellule active la CASPASE-11 murine et ses orthologues humains, les CASPASEs-4 et -5 (Shi 2014). L'effet du LPS passe par une interaction du lipide A avec le domaine CARD (pour *Caspase Activation and Recruitment Domain*) des CASPASEs -4, -5 et -11 conduisant à leur oligomérisation, un prérequis pour leur activation qui conduit à la protéolyse de différents substrats impliqués dans la production de certaines cytokines inflammatoires comme l'IL-1 et dans la mort cellulaire par apoptose (Cai 2014, Lu 2014).

En plus du LPS, d'autres activateurs du TLR4 ont été décrits : le paclitaxel qui est un alcaloïde dérivé de l'écorce de l'if et utilisé en chimiothérapie anticancéreuse chez l'homme, la protéine de fusion du virus syncytial respiratoire, la pneumolysine de *Streptococcus Pneumoniae*. Certains composants de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine, l'acide hyaluronique, et l'héparane sulfate produits au cours d'une réponse inflammatoire, ont été également rapportés comme des ligands endogènes de TLR4 mais ils activent les cellules immunitaires à de fortes concentrations contrairement aux faibles doses requises par le LPS. Enfin, des protéines normalement endogènes comme les protéines de choc thermique ou HSP (pour *Heat Shock Protein*) ont été décrites comme des ligands du TLR4 ; l'expression des HSP augmente dans différents cas de stress cellulaires et pourraient être libérées par les cellules en stress ou suite à une nécrose constituant ainsi un signal de danger (Gallucci 2001). Il a d'ailleurs été montré que HSP60 et HSP70 présente une activité immunostimulatrice et inflammatoire médiée par TLR4 (Asea 2002, Dybdahl 2002, Ohashi 2000, Vabulas 2001, Vabulas 2002**)**.

TLR4 est exprimé par de très nombreux tissus mais n'est pas retrouvé dans la peau ni dans les muscle. L'expression est très forte au niveau des globules blancs en particulier dans la lignée des monocytes où TLR4 est constitutivement exprimé à la surface de ces cellules (Vaure 2014). Dans les autres cellules, comme les cellules épithéliales bronchiques, TLR4 est exprimé à un faible niveau et il est retrouvé constitutivement dans les compartiments intracellulaires ; son expression

peut augmenter avec une localisation en surface suite à l'activation des cellules par des agents infectieux (Greene 2005).

I.3.3. Tolérance endotoxinique

La détection des composants microbiens déclenche une réponse de défense en vue d'empêcher la colonisation et la dissémination des micro-organismes pathogènes. Cependant, même si cette réponse se révèle cruciale dans la lutte contre les infections, elle doit être finement régulée afin d'éviter les complications cliniques pouvant se traduire par des états pathologiques tels que le choc septique (Biswas 2009, Foster 2009). L'un des exemples classiques de ce mécanisme protecteur est la tolérance endotoxinique (Biswas 2009). Il s'agit d'un phénomène dans lequel des cellules ou des organismes exposés à de faibles concentrations de LPS entrent dans un état d'insensibilité transitoire et sont incapables d'y répondre ultérieurement. Ce phénomène a été décrit la première fois en 1946 chez le lapin et a été ensuite observé dans d'autres espèces animales dont l'homme lors d'injections de vaccins (Cavaillon 2006, Foster 2009). Si la tolérance endotoxinique est généralement perçue comme un mécanisme bénéfique, elle peut cependant avoir un effet néfaste comme cela a été observé chez des patients ayant une infection bactérienne systémique (sepsis) où leur système immunitaire rentre dans un état latent de tolérance au LPS. Cet état est associé à de forts risque d'infections secondaires et de mortalité.

Chez la souris, il a été montré que l'injection de doses suboptimales de LPS les protège ultérieurement d'un choc septique normalement induit par l'injection de fortes doses de LPS. Dans le modèle murin, les cellules de la lignée monocyte sont reconnues comme les principales cellules impliquées dans l'induction de la tolérance endotoxinique (Cavaillon 2006). Des études *in vitro* ont confirmé que les monocytes murins et humains produisaient peu de cytokines pro-inflammatoires en réponse à une forte dose de LPS lorsque cette injection était précédée d'une incubation des cellules avec du LPS à faible concentration. La tolérance endotoxinique a également été montrée sur d'autres globules blancs et des cellules non immunitaires comme les cellules endothéliales (Albrecht 2008, Ogawa 2003, Sharabi 2008).

D'un point de vue moléculaire, des défauts dans la signalisation de TLR4 ont été observés au cours de la tolérance endotoxinique. En effet, il a été montré dans des expériences réalisées *in vitro* que les cellules de la lignée monocyte murines ou humaines présentent une diminution de formation du complexe TLR4-MyD88 et un défaut d'activation des facteurs de transcription comme NF-kB (Biswas 2007, Fan 2004).

Chapitre II. L'immunoglobuline A

II.1. Le système immunitaire

Le système immunitaire est un ensemble de tissus, cellules et molécules qui assurent la défense de l'organisme contre les agressions extérieures provenant des microorganismes pathogènes et les agressions intérieures comme les dérèglements cellulaires pouvant conduire par exemple à la formation de tumeurs (Lydyard 2007).

Les tissus comprennent les organes lymphoïdes primaires que sont la moelle osseuse et le thymus où naissent les globules blancs, les organes lymphoïdes secondaires comme la rate, les tonsilles (anciennement appelées amygdales), les ganglions lymphatiques et les MALT, et les épithélia. Les globules blancs sont issus de la division, de la différenciation et de la maturation de progéniteurs hématopoïétiques dits lymphoïdes ou myéloïdes. Les cellules lymphoïdes comprennent les lymphocytes T et B, les cellules Natural Killer (NK) avec tous leurs sous-types de cellules. Les cellules myéloides peuvent être majoritairement circulantes comme les PMN, les polymorphonucléaires éosinophiles, les polymorphonucléaires basophiles et les monocytes ou résidentes dans les tissus comme les macrophages, les cellules dendritiques (ou *Dendritic Cells* - DC) et les mastocytes. Le système immunitaire dispose de tout un panel de molécules membranaires ou solubles extracellulaires, parmi lesquelles nous citerons des récepteurs comme les PRR et les TLR, les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), les cytokines et les médiateurs lipidiques (exemple : PAF) qui recrutent et activent les globules blancs, les molécules toxiques peu spécifiques (exemple : dérivés actifs de l'oxygène) ou spécifiques à activité antimicrobienne, les Ig, les fractions du complément.

Ce système se décompose en un système d'alerte et un système effecteur. Le système d'alerte reconnait le non soi et le soi altéré et active le système effecteur qui élimine ou neutralise le non soi et le soi altéré. Les PRR participent au système d'alerte alors que les peptides antimicrobiens produits par les cellules de Paneth sont des molécules effectrices. Le système effecteur peut faire appel à des réponses dites humorales, c'est-à-dire liées à des molécules solubles, ou cellulaires quand c'est l'interaction cellule de défense-cellule à éliminer qui contribue à l'élimination de la cellule « dangereuse ».

Le système immunitaire peut aussi être défini comme inné ou adaptatif ; au contraire du système inné qui est présent chez tous les organismes pluricellaires, le système adaptatif est une évolution des vertébrés. Le système inné comprend notamment les cellules et molécules dites infllammatoires.

Le système inné est présent à la naissance et mobilisable rapidement après la pénétration d'un agent pathogène dans l'organisme. Il constitue la première ligne de défense face aux situations de danger auxquelles est confronté l'organisme. Il ne possède pas de mémoire immunitaire et induit toujours la même réponse quelque soit l'agent pathogène introduit ; il est donc peu spécifique. La réponse inflammatoire locale médiée par les PMN (Mantovani 2011) est un bon exemple de ce qu'est le système inné où, dans les heures qui suivent la pénétration d'une bactérie au niveau d'une muqueuse, il y a recrutement des PMN circulants. Ce recrutement se fait grâce à la production de divers agents chimio-attractants pour les PMN par les cellules présentes dans la muqueuse (cellules immunitaires, épithéliales, autres) et l'expression de molécules d'adhérence par les cellules endothéliales. Les PMN adhèrent à l'endothélium, d'abord de façon légère conduisant à leur roulement ou rolling à la surface de l'endothélium puis par adhérence ferme ou margination avant de ramper et de transmigrer à travers l'endothélium ; les PMN sont alors guidés jusqu'au site infectieux par le gradient d'agents chimio-attractants. Les PMN sont activés localement éliminent les bactéries soit en les phagocytant soit par un mécanisme extracellulaire appelé *Neutrophil Extracellular Trap* (NET). La phagocytose est suivie de la destruction de la bactérie dans des vésicules sous l'effet de dérivés actifs de l'oxygène que le PMN produit en grande quantité et des protéines toxiques déversées dans la vésicule à partir des granules cytoplasmiques où elles sont stockées. Les NET sont un filet d'ADN nucléaire décondensé que le PMN déverse dans le milieu extracellulaire tout en dégranulant. Les bactéries piégées dans le filet d'ADN sont neutralisées et/ou détruites par les protéines hautement toxiques provenant des granules des PMN. Les PMN meurent rapidement au site de leur action et sont eux-mêmes éliminés par les cellules phagocytaires professionnelles que sont les macrophages.

Au contraire du système inné, le système adaptatif est long à se mettre en place car il nécessite un ajustement à l'agent pathogène de façon à ne reconnaître que celui-ci. Cet ajustement passe par des modifications génétiques au niveau des globules blancs permettant de produire *de novo* des molécules effectrices très spécifiques. L'ajustement génétique se fait au cours de divisions cellulaires et s'étale sur plusieurs jours. La réponse adaptative est retardée par rapport à la réponse innée lors du premier contact avec l'agresseur mais elle est gardée en mémoire : lors d'un second ou $n^{ième}$ contact avec le même agresseur, elle se met en place rapidement. Le système adaptatif est acquis au cours de la vie et ses molécules effectrices n'ont pas les mêmes spécificités chez tous les individus d'une même espèce. La diversité des molécules effectrices de ce système dépend des rencontres que l'hôte fait avec des agents pathogènes. Les lymphocytes B décrits ci-dessous sont une des cellules majeures du système adaptatif ; ces cellules produisent des Ig dont les gènes sont fortement modifiés au cours de la vie de la cellule.

L'IgA, produit par les cellules de la lignée des lymphocytes B, est une molécule d'alerte lorsqu'elle est sous sa forme membranaire à la surface des lymphocytes B. Dans ce cas, on parle de *B Cell Receptor* (BCR) de type A. L'IgA est également une molécule effectrice du système immunitaire sous sa forme soluble. Par certains aspects de ses fonctions, elle contribue à l'immunité inné des muqueuses et quand elle agit suite à une reconnaissance spécifique d'un agent, elle participe aux mécanismes de l'immunité adaptative.

II.2. Les lymphocytes B

II.2.1. Structure des immunoglobulines

Les Ig sont des glycoprotéines hétérotétramèriques constitués de deux chaînes lourdes identiques entre elles et de deux chaînes légères identiques entre elles et ont une forme de Y (Figure 4) (Jefferis 2007). Les chaînes lourdes d'environ 50 kDa chacune et légères d'environ 25 kDa chacune sont constituées de régions dont la séquence en acide aminé est très variable (V) et de régions constantes (C). Dans une Ig, les bras du Y sont constituées par une chaîne légère et une partie d'une chaîne lourde reliées entre elles par un pont disulfure ; l'extrémité des bras du Y réunit les régions V de la chaîne légère et de la chaîne lourde en formant le site spécifique de reconnaissance de l'antigène. Une Ig peut donc reconnaitre deux molécules d'antigène en même temps. Le pied du Y associe, *via* des ponts disulfure, l'autre partie des deux chaînes lourdes dont l'extrémité contient ou non une séquence d'association à la membrane plasmique ; la présence de cette séquence conduit à l'expression du BCR alors que son absence donne l'Ig soluble. Le pied de l'Ig soluble est un site de reconnaissance et de liaison de diverses molécules comme les récepteurs aux Ig ou les fractions du complément et porte donc la fonction effectrice des Ig.

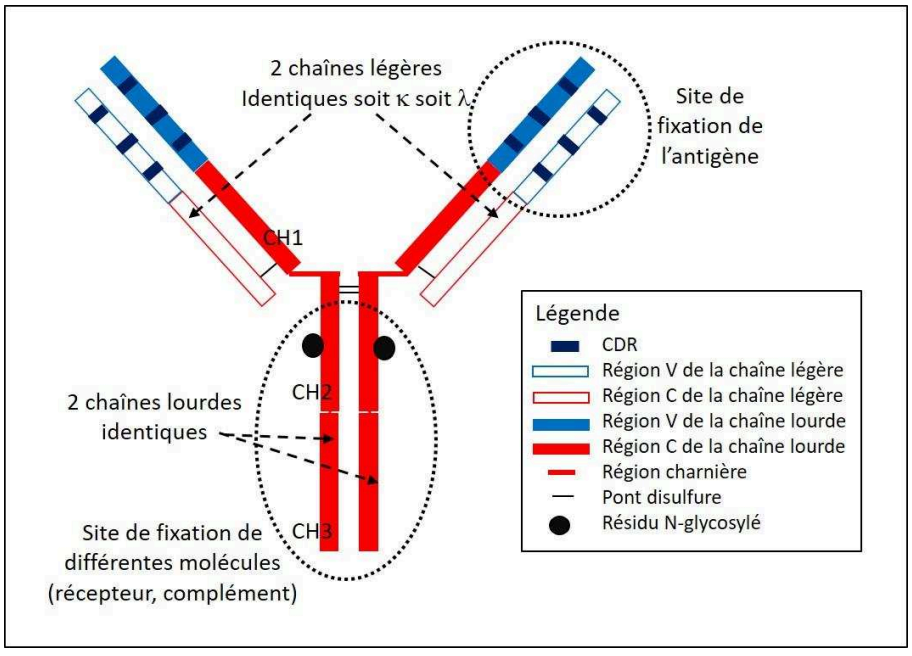


Figure 4 : Structure des Immunoglobulines

Des ponts disulfure sont aussi présents en intrachaîne et délimitent des domaines : 1 domaine V dans chaque chaîne légère et dans chaque chaîne lourde, 1 domaine C dans chaque chaîne légère et 3 à 4 domaines C (C_{H1} à C_{H4}) dans chaque chaîne lourde. A l'intérieur de chacun des domaines V, on distingue trois zones hypervariables appelées *Complementary Determining Region* (CDR) entourées de zones de « charpente » de plus faible variabilité appelée *Framework* (FR). Certaines Ig possèdent une région dite charnière située entre les domaines C_{H1} et C_{H2}, qui confère une certaine flexibilité aux bras du Y (Schroeder 2010).

Les Ig existent sous une forme membranaire, le BCR qui est le récepteur aux antigènes pour les cellules B, ou sous une forme soluble et prennent alors le nom d'anticorps. Dans sa forme membranaire, l'Ig est associée à la membrane grâce à un domaine transmembranaire qui se poursuit en intracellulaire par une région très courte ne permettant pas la transmission du signal. La transmission du signal se fait par l'interaction du BCR avec un hétérodimère Igα-Igβ (ou CD79a-CD79b) où les deux chaînes sont associées entre elles par un pont disulfure. Igα-Igβ, dans leur partie intracellulaire contiennent des *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motives (ITAM)* qui transduisent le signal intracellulaire sous forme d'une cascade d'activation de kinases et de facteurs de transcription. Les anticorps sont présents dans les fluides biologiques tels que le plasma, la lymphe, le colostrum et le lait maternel et les liquides produits par les muqueuses digestives, respiratoires et urogénitales.

II.2.2. Organisation germinale et réorganisation des gènes d'immunoglobulines

Les gènes codant pour les chaines lourdes et légères des Ig sont répartis en trois loci appelés et écrits *IGK, IGL* et *IGH* chez l'homme et *Igk, Igl, Igh* chez la souris (Lefranc 1999). Ces loci sont situés sur trois chromosomes différents chez l'homme comme chez la souris.

Le locus de la chaîne lourde (*IGH ou Igh*, pour *heavy)* est situé sur le chromosome 14 chez l'homme et sur le chromosome 12 chez la souris. Chez l'homme, ce locus comprend 123 segments V_H pour Variable, 27 segments D_H pour Diversité, 9 segments J_H pour Jonction et de 9 segments C pour Constant. Chez la souris, il est constitué de 216 segments V_H, 21 segments D_H, 4 segments J_H suivis par 8 segments C (Figure 5 page 28). Les segments V, D et J sont suivis d'un numéro dans l'ordre où ils sont placés dans le locus (exemple V_{H2}) ; les segments C sont suivis d'une lettre grecque (exemple Cα). Cα est dupliqué chez l'homme avec Cα1 et Cα2 expliquant la différence de nombre de segments C entre ces deux espèces. Tous les segments ne sont pas fonctionnels. Le locus de la chaîne légère kappa (*IGK* ou *Igk*) est situé sur le chromosome 2 chez l'homme, alors qu'il est identifié sur le chromosome 6 chez la souris. Chez l'homme, il comprend 76 segments V_k, 5 segments J_k et un seul segment C_k. Chez la souris, il comporte 161 segments V_k, 5 segments J_k suivi d'un seul segment C_k. Le locus de la chaîne légère lambda (*IGL* ou *Igl*), quant à lui, est localisé sur le chromosome 22 chez l'homme et 16 chez la souris. Chez l'homme, ce locus est constitué de

74 segments V_λ et de 7 à 11 segments C_λ. Chacun des segments C_λ fonctionnels est précédé d'un segment J_λ. Chez la souris, il y a 3 V_λ, 4 J_λ et 4 C_λ qui sont répartis sur le locus comme indiqué dans la Figure 5.

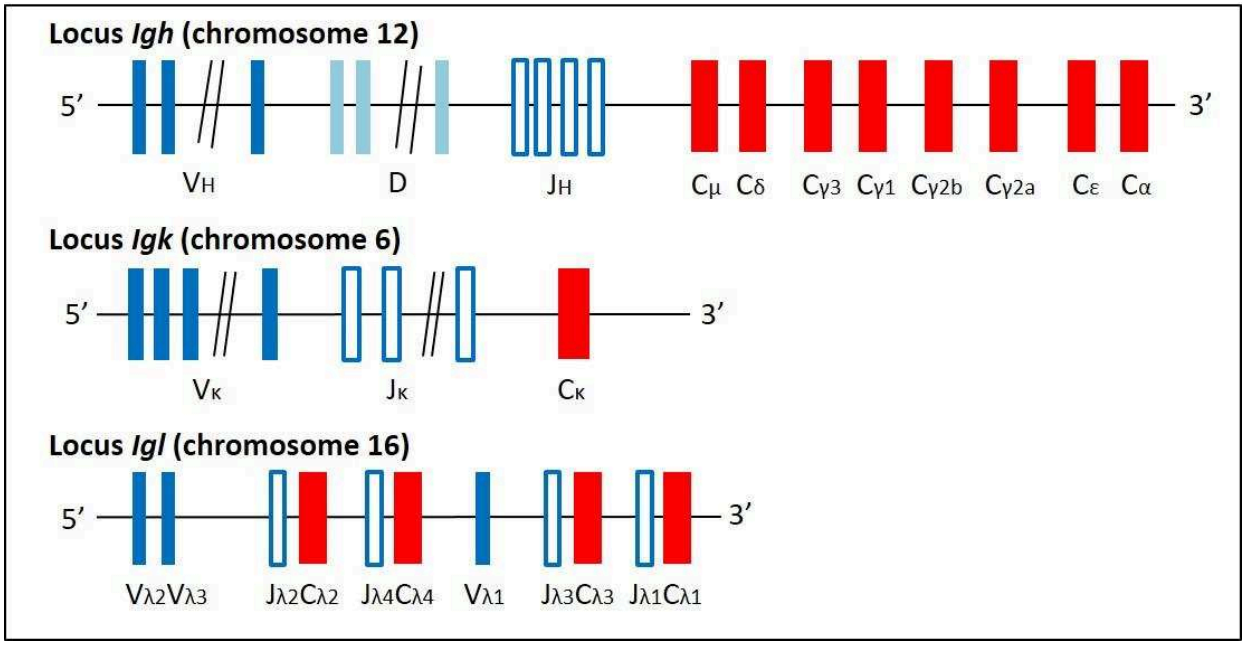


Figure 5 : Organisation des loci murins *Igh, Igk, Igl*

Les loci sont non fonctionnels dans leur configuration germinale et doivent subir des réarrangements géniques appelés recombinaisons V(D)J (Figure 6 page 29) qui donnent naissance à un exon. Ces réarrangements qui associent physiquement un segment V, (un segment D) et un segment J, dans un locus nécessitent l'excision d'ADN double brin et la recombinaison des bouts à associer, qui est assurée par les enzymes *Recombination Activating Gene* (RAG)-1 et RAG-2 spécifiques des lymphocytes et par d'autres enzymes d'expression ubiquitaire. Au niveau du locus de la chaîne lourde, les réarrangements VDJ se font en deux étapes : d'abord un segment D_H s'associe au hasard à un segment J_H puis l'ensemble D_HJ_H est joint au hasard à un segment V_H. L'exon $V_HD_HJ_H$ ainsi formé s'associe avec le segment C_H le plus proche, en l'occurrence Cμ, et donne un ARNmessager (m) prêt à être traduit en protéine. L'exon $V_HD_HJ_H$ code pour la région protéique V de la chaîne lourde tandis que l'exon Cμ code pour sa région protéique C. Il en est de même pour les exons VJ et C des chaînes légères qui codent les régions protéiques V et C. Les réarrangements V(D)J aléatoires permettent de créer une multitude de séquence appelée diversité combinatoire. A noter également que la machinerie de recombinaison ne crée pas des jonctions V_H-D_H, D_H-J_H et V-J identiques en séquence ; cette diversité jonctionnelle qui touche principalement les jonctions sur le locus *IGH/Igh* amplifie la diversité combinatoire. Enfin, la combinaison de chaînes lourdes et de chaînes légères différentes démultiplie la diversité du site de reconnaissance de l'antigène dans l'Ig.

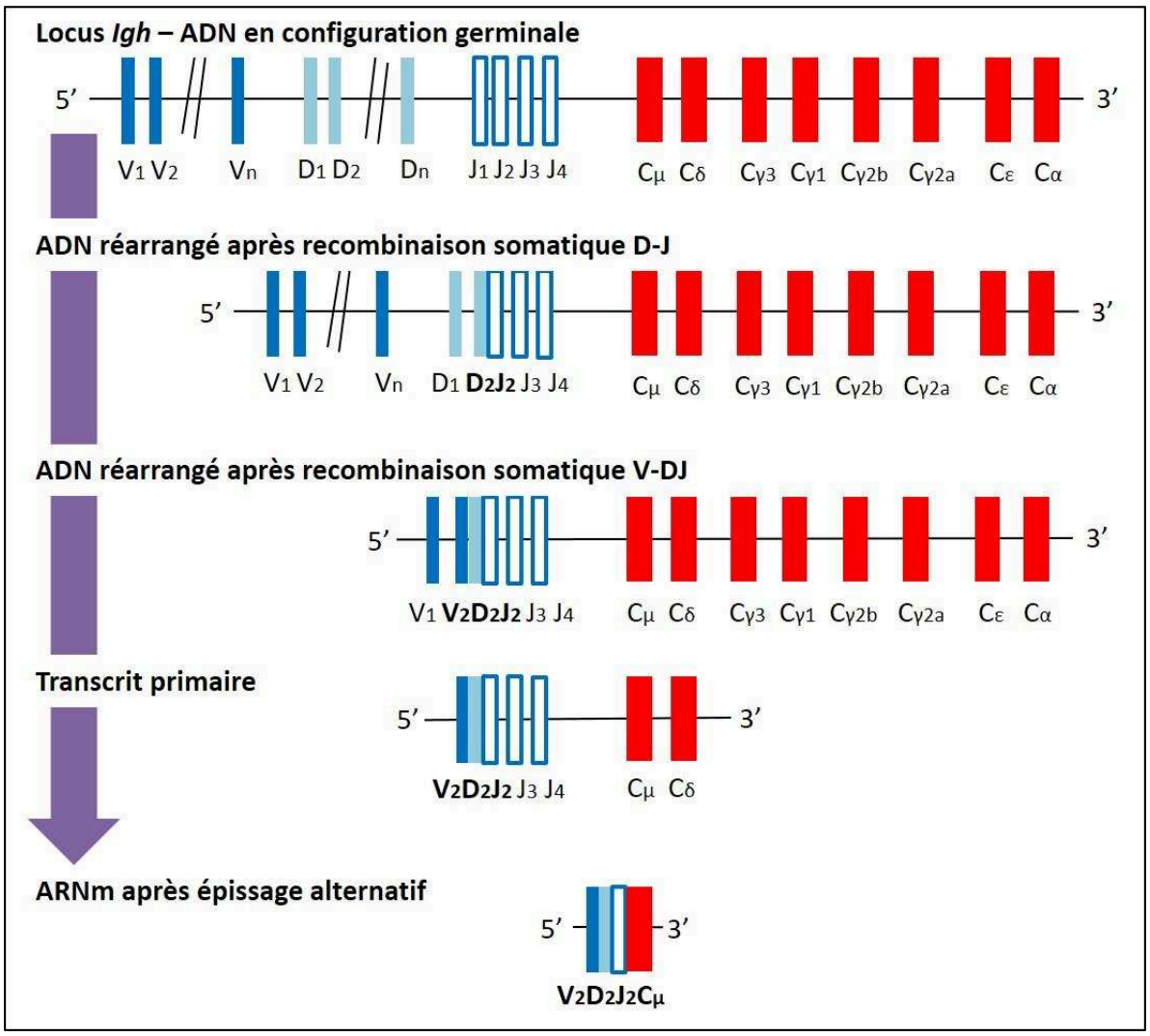


Figure 6 : Mécanisme de la recombinaison VDJ au locus *Igh*

Bien que les réarrangements se fassent de façon aléatoire, tous les segments fonctionnels ne sont pas utilisés avec la même fréquence. De plus, dans un lymphocyte B donné, seul un des loci de chaîne légère est utilisé : un même lympocyte B produit des Ig avec la chaîne légère κ ou avec la chaîne légère λ. Les loci pour les chaînes légères κ ou λ ne sont pas être utilisés de façon identique : chez l'homme environ un tiers des lymphocytes B expriment une chaine légère λ alors que chez la souris seuls 5% l'expriment.

Les loci réarrangés peuvent subir d'autres modifications au cours de la vie du lymphocytes B : la *somatic hypermutation* (SHM) et la *class switch recombination* (CSR) ou commutation de classe. Ces deux phénomènes font appel à l'activation d'une enzyme lymphocytaire spécifique appelée AID (pour *Activating-Induced cytidine Deaminase*). Lors de la transcription de l'ADN, AID transforme les paires cytidine-guanine qu'elles rencontrent en uracil-guanine par déamination de la cytidine ; il en résulte l'intervention de systèmes de réparation qui excise l'uracil ce qui crée une coupure qui est réparée. Au cours de la SHM, AID cible certaines séquences particulières dans V et la réparation réalisée par des systèmes de réparation non fidèles crée des mutations ponctuelles aléatoires. On

estime que les mutations dans V sont 10^6 plus fréquentes que dans le reste du génome. Ainsi, la résultante de la SHM est une augmentation de la variabilité du site de reconnaissance de l'antigène qui se manifestent dans des zones dites hypervariables. Dans les Ig, ces zones hypervariables constituent les zones CDR.

Dans le cas de la CSR, AID cible simultanément deux petites séquences d'ADN dites *Switch* (S) dont l'une est en amont du segment Cμ et la seconde en amont d'un autre segment C_H tel que Cγ2a comme dans l'exemple donné dans la Figure 7. A l'exception de Cδ, tous les C_H sont précédés d'une séquence S. L'action d'AID et les réparations imparfaites utilisant une machinerie moléculaire différente de celle de la SHM conduisent à l'excision de la séquence située entre les deux séquences S et à la recombinaison des séquences portant l'exon $V_HD_HJ_H$ et par exemple l'exon Cγ2a (Figure 6). Le gène ainsi reconstitué donne naissance à une IgG2a et non plus à une IgM. La CSR permet donc de changer la région C d'une Ig et ainsi sa classe pour amener à une nouvelle fonction effectrice. Chez la souris, il existe huit classes et sous-classes d'Ig (IgM, IgD, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgE, IgA) et neuf chez l'homme (IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA1 et IgA2).

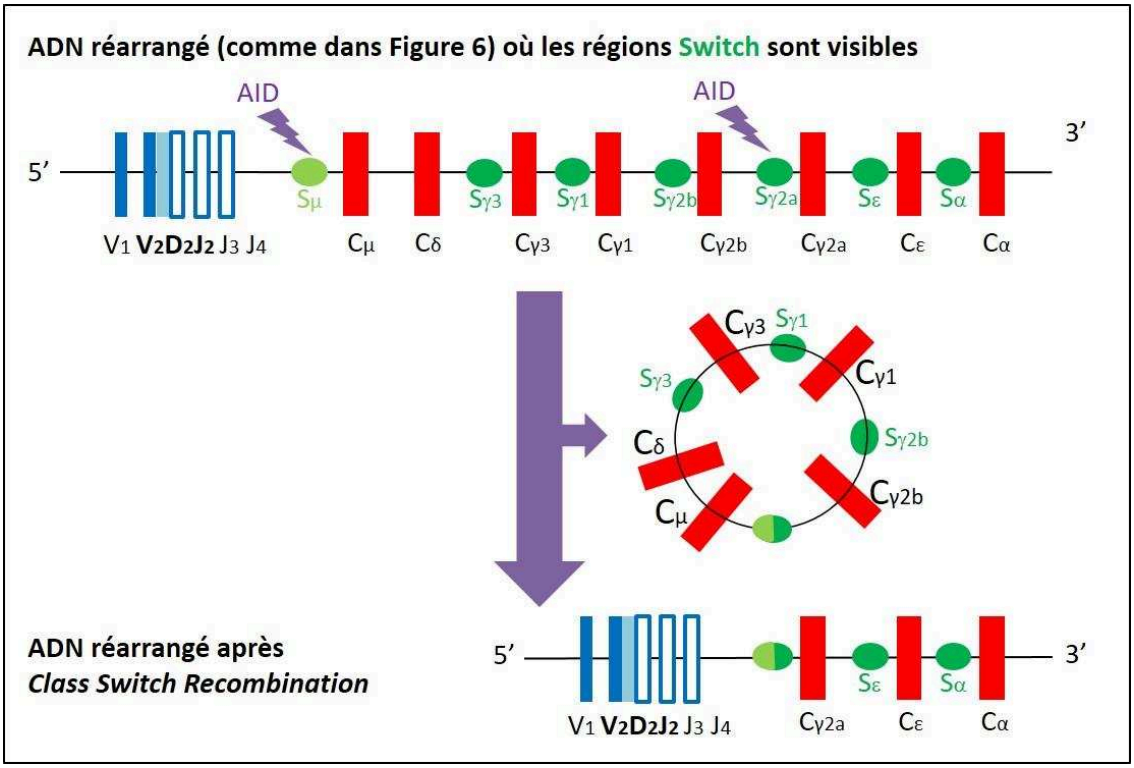


Figure 7 : Mécanisme de la *Class Switch Recombination*

L'IgD chez la souris et chez l'homme ne résulte pas de la mise en œuvre de la CSR contrairement aux autres classes d'Ig mais d'un épissage alternatif de l'ARN codant à la fois l'IgM et l'IgD. A noter aussi que l'IgD est particulier au titre de l'exclusion isotypique qui s'applique à toutes les classes d'Ig sauf à l'IgD ; en effet celui-ci est co-exprimé avec l'IgM par certains types de cellules B.

L'expression des Ig sous forme de BCR ou de protéine soluble est liée à la présence ou à l'absence d'un domaine transmembranaire et d'une région courte intracellulaire qui sont codées par deux exons présents dans les segments C. La sélection de ces deux exons se fait par épissage alternatif.

La diversité combinatoire, la diversité jonctionnelle, les combinaisons de chaînes lourdes et légères, la SHM et la CSR conduisent, à partir de quelques centaines de segments géniques, à la sytnthèse possible, en théorie, de plusieurs milliards de molécules d'Ig différentes appelé répertoire.

II.2.3. Développement des lymphocytes B jusqu'au B immature

L'ontogénie de la cellule B se fait en deux étapes majeures successives (Figure 8), dont la première étape indépendante des antigènes du non soi, se déroule dans la moelle osseuse chez l'animal adulte et conduit à la production de cellules B immatures exprimant un BCR capable de reconnaître et d'être activé par un antigène. Elle est divisée en plusieurs sous-étapes : stade pré-pro B, stade pro-B, stade pré-B et le stade B immature. Les recombinaisons V(D)J ont lieu pendant cette étape précoce du développement B.

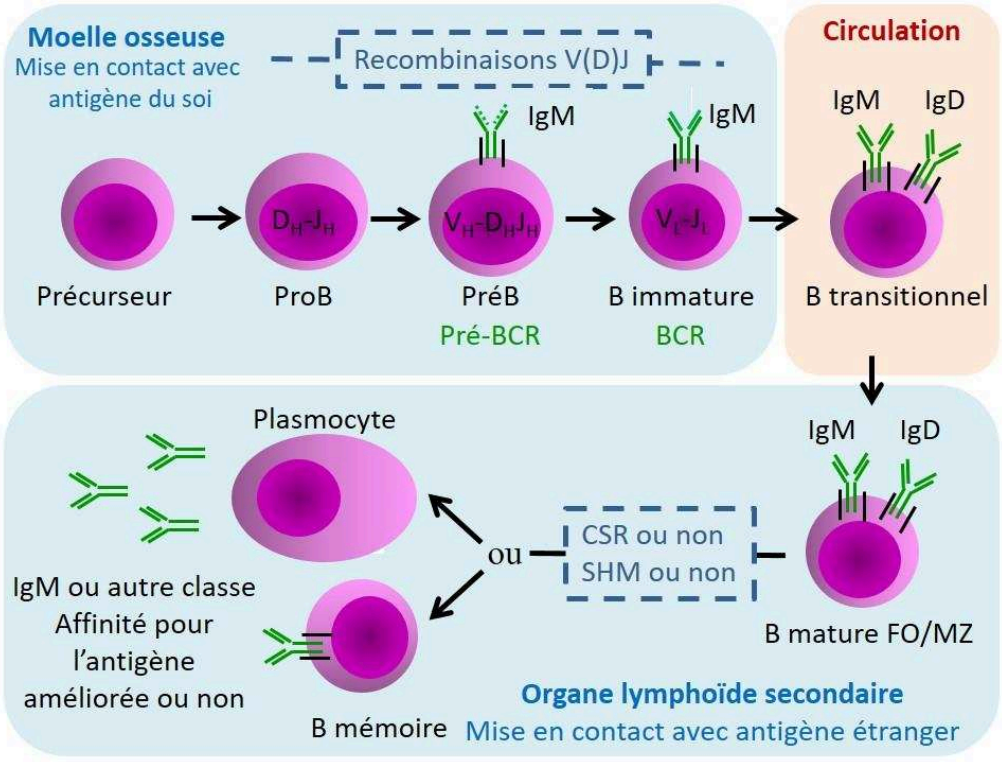


Figure 8 : Les différentes étapes du développement des cellules de la lignée B

Les cellules de l'environnement du lymphocyte B comme les cellules stromales de la moelle osseuse contribuent au développement B en apportant des facteurs qui favorisent la croissance, la différenciation, la maturation et la survie lymphocytaire. Elles participent aussi au contrôle qualité des lymphocytes B.

Les cellules du stade pré-proB constituent les précurseurs les plus immatures des cellules B. Ces cellules n'ont pas encore réarrangé les gènes des Ig, mais commencent déjà à exprimer certains marqueurs spécifiques de la lignée B telles que le B220 chez la souris et CD20 chez l'homme, le CD19 et la protéine Igα/CD79a, RAG-1 et RAG-2. Les réarrangements des gènes codant les chaines des Ig ne débutent qu'au stade proB et sur le locus IgH. La jonction entre les segments D et J a lieu au cours de ce stade de manière quasi-simultanée sur les deux allèles. Puis, le réarrangement V_H avec D_HJ_H se fait sur un des deux allèles et s'il est productif, c'est-à-dire qu'il permet la production d'une chaîne lourde μ, le second allèle n'est pas utilisé : ce phénomène est appelé exclusion allélique (Alt 1984, Tonegawa 1983). Si le réarrangement sur le premier allèle n'est pas productif, l'autre allèle est utilisé et si là encore cela aboutit à un réarrangement non productif, la cellule est éliminée par apoptose. Seulement un tiers des événements de recombinaison seraient productives (Alt 1987). Le stade suivant est baptisé stade pré-B au cours duquel la cellule associe la chaîne lourde μ avec une pseudo chaîne légère (Melchers 1993, Monroe 2007) et produit le corécepteur Igα-Igβ (ou CD79a-CD79b) ce qui conduit à l'expression de surface d'un pré-BCR. Cette expression du pré-BCR est le signal qui provoque l'amorçage des réarrangements de VJ pour la production d'une vraie chaîne légère κ ou λ. Ces réarrangements se produisent au locus *IGK/Igk* et, s'ils ne sont pas productifs, ils ont lieu au locus *IGL/Igl* (Brauninger 2001). Ce phénomène qui conduit à l'expression exclusive de l'isotype κ ou λ est appelé exclusion isotypique. La production d'une chaîne légère, son association avec la chaîne lourde μ et avec le corécepteur Igα-Igβ et l'expression d'un BCR signent le début du stage B immature. A ce stade, la cellule est soumise à un processus de sélection négative ayant pour but d'éliminer les cellules B auto-réactives, c'est-à-dire qui reconnaissent les antigènes du soi. Pour cela, des antigènes du soi portés par les molécules du CMH exprimées par les cellules stromales de la moelle osseuse sont présentés aux cellules B immatures. Les cellules B immatures dont le BCR reconnaît les antigènes du soi sont éliminées par apoptose ; près de la moitié des lymphocytes B immatures sont éliminés par sélection négative (Melchers 1995).

A noter que des clones B auto-réactifs peuvent subir de nouveaux réarrangements géniques, appelés *receptor editing*, suite à la réactivation des enzymes RAG1 et RAG2. Ceux-ci permettent l'expression d'un nouveau BCR à la surface de la cellule qui passe à nouveau le filtre de la sélection négative : si la cellule B immature garde son auto-réactivité, elle est éliminée par apoptose ou elle devient anergique c'est-à-dire que l'expression du BCR est réprimée.

II.2.4. Du B immature au plasmocyte et à la cellule B mémoire

Les cellules B immatures ayant survécu à la sélection négative, c'est-à-dire ne possédant pas de réactivité vis-à-vis du soi, quittent la moelle osseuse et rejoignent la circulation (Figure 8 page 31) ; elles prennent alors le nom de cellule B transitionnelle (1 type chez l'homme mais 2 types chez la souris) avant de démarrer la seconde phase de leur développement qui se passe dans les organes

lymphoïdes secondaires (rate, ganglions, MALT). Ces organes lymphoïdes contiennent des zones anatomiquement distinctes appelées follicules dans lesquelles s'accumulent les lymphocytes B. Ces follicules peuvent présenter des zones appelées centres germinatifs (GC pour *Germinal Center)* dans lesquels on distingue une zone sombre très dense en cellules B proliférantes et une zone claire moins dense en cellules. Lorsque les GC sont présents, la zone les entourant dans le follicule est appelée zone du manteau. Les cellules B peuvent aussi se retrouver dans une zone qui entoure les follicules et qui s'appelle zone marginale (MZ pour *Marginal Zone*). En fonction de l'endroit où les cellules B se placent, elles prennent différents noms : cellules B folliculaires (ou FO) quand elles sont dans les follicules, centroblastes dans la zone sombre, centrocytes dans la zone claire ou cellules B de la zone marginale (ou MZ).

Dans les organes lymphoïdes secondaires, les cellules B deviennent matures et sont dites naïves avant d'être mises en contact d'antigènes étrangers. Les cellules B matures naïves interagissent avec différentes cellules et molécules présentes dans les organes lymphoïdes. L'interaction avec ces cellules *via* les molécules qu'elles expriment ou présentent à leur surface ou qu'elles libèrent conditionne la localisation des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires et leur activation avec la possibilité de SHM et de CSR. Dans la zone marginale, les lymphocytes B sont au contact de DC, macrophages, PMN qui expriment tous de nombreux PRR ce qui leur permet de capter les DAMP et de les présenter aux lymphocytes B qui les reconnaissent ou non *via* leur BCR (Cerutti 2013). L'interaction DAMP-PRR conduit à l'activation des DC, macrophages, PMN qui produisent des cytokines. Les lymphocytes B s'activent sous l'effet combiné des cytokines, de l'interaction des DAMP avec leurs propres PRR et leur BCR. En s'activant, ils déclenchent ou non une CSR et donnent naissance soit à des lymphocytes B mémoires ou des plasmablastes, étape qui précède le stade de différenciation terminale qui est le stade du plasmocyte. « Plasmocyte » est le terme utilisé pour désigner les cellules de la lignée B qui sécrétent les Ig. Les lymphocytes B mémoire ne sécrètent pas d'Ig mais portent un BCR et ont une durée de vie longue pouvant atteindre plusieurs années. Il a été montré que des cellules B mémoires spécifiques peuvent être détectées dans la circulation et dans la rate chez l'homme près de 50 ans après une vaccination ou une infection (Mamani-Matsuda 2008). Elles possèdent la capacité de proliférer et de se différencier en plasmocytes lors d'une seconde exposition à l'antigène contre lequel elles sont dirigées.

Les cellules B sont des cellules présentatrices de l'antigène qui peuvent capter des molécules qu'elles digèrent sous forme d'éléments de petite taille, en général des peptides d'une vingtaine d'acides aminés, qu'elles exposent à leur surface *via* les CMH de classe II. A proximité des follicules, les cellules B présentant des antigènes sur leur CMH peuvent rencontrer des lymphocytes T_H (ou Helper) qui reconnaissent l'antigène *via* leur récepteur spécifique appelé TCR (Gatto 2010, Vinuesa 2009). Cette interaction permet celle de CD40L sur le lymphocyte T et de son récepteur CD40 exprimé par le lymphocyte B et conduit à l'activation des deux cellules. Le lymphocyte T

libère des cytokines qui vont renforcer l'effet de l'interaction CD40L-CD40 sur le lymphocyte B. Il est intéressant de noter que le virus d'Epsetin-Barr (EBV), qui a un tropisme fort pour les cellules B et les infecte, produit une protéine qui active les cellules B en mimant l'interaction CD40-CD40L. Les deux cellules entrent dans le follicule (Figure 9) où le lymphocyte T prend le nom de T_{FH} (*Follicular Helper*) et où le lymphocyte B se divise activement en donnant naissance aux centroblastes et au GC. Au cours de leur division, les centroblastes subissent la SHM avant de passer dans la zone claire où ils arrêtent leur prolifération et deviennent des centrocytes. Ceux-ci sont testés pour leur capacité à reconnaître les antigènes étrangers avec une affinité améliorée, mais aussi pour leur absence de reconnaissance des antigènes du soi, qui a pu apparaître suite à la SHM. Ce test passe par une interaction avec les cellules T_{FH} et avec les DC folliculaires (FDC). L'interaction T_{FH}-centrocyte passe par les partenaires moléculaires TCR-antigène-CMH (sur la cellule B), CD40L-CD40 et cytokines (libérées par la cellule T) - récepteurs (portées par la cellule B). L'interaction centrocyte - FDC passe par les partenaires moléculaires BCR - antigène - CMH (sur la FDC). Le contrôle qualité qui s'établit ainsi dans la zone claire conduit à l'activation du centrocyte qui peut avoir trois conséquences : l'apoptose de la cellule, le retour dans la zone sombre pour une nouvelle étape de division et de SHM ou la maturation et différenciation en lymphocyte B mémoire ou en plasmablaste puis en plasmocyte. Quelques jours après leur mise en place, les GC disparaissent.

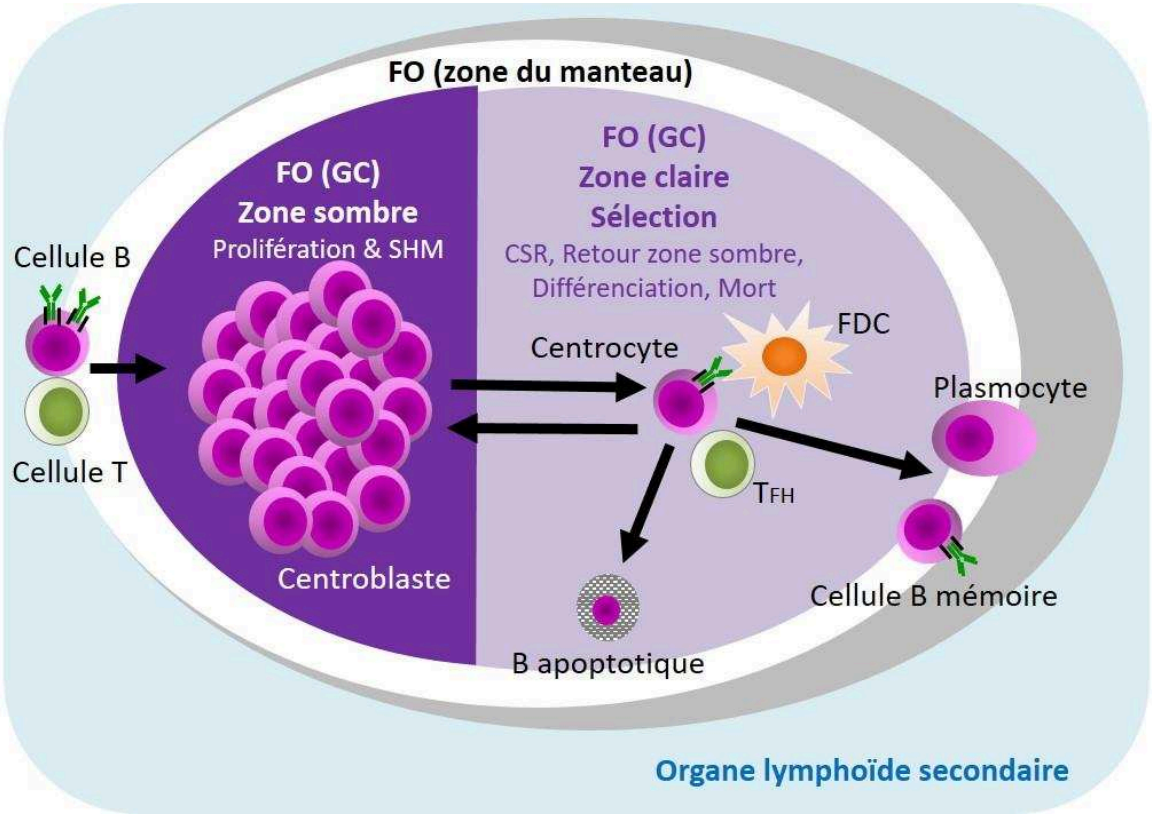


Figure 9 : Organisation d'un centre germinatif

Les Ig (membranaires ou solubles) issues de cellules passées par le GC sont de forte affinité pour les antigènes alors que ceux produites par les cellules B MZ sont de faible affinité. Tous les

antigènes ne provoquent de réaction du GC ; ceux qui le font sont dit T-dépendants (TD) et les autres T-indépendants (TI).

Les plasmocytes sortent des organes lymphoïdes secondaires. Les plasmocytes peuvent aller se loger dans la moelle osseuse où ils produisent des Ig qui passent dans la circulation ; ils peuvent également se loger dans les muqueuses où ils synthétisent les Ig mucosales dont une grande partie se retrouve dans la lumière des muqueuses. Les plasmocytes représentent le stade terminal de différenciation des cellules B, qui est précédé par un stade intermédiaire appelé plasmablaste.

Les différents stades et types de lymphocytes B décrits ci-dessus ont un phénotype particulier qui peut être mis en évidence par l'étude de l'expression d'un ensemble de marqueurs de membrane généralement réalisée par cytométrie en flux. Par exemple, les B matures naïfs sont caractérisés par la co-expression de l'IgM et de l'IgD. Les marqueurs B220 (et CD20 chez l'homme) et CD19 sont présents sur toutes les cellules de la lignée B à l'exception des plasmocytes. Ceux-ci, au contraire, expriment un marqueur qui leur est propre, CD138 chez la souris et CD38 chez l'homme.

II.2.5. Les cellules B atypiques

Toutes les cellules B décrites plus haut sont définies comme les B2. Chez la souris, il existe également les B1 dont les précurseurs proviennent du foie fœtal. Les cellules B1 matures sont principalement localisées dans la cavité péritonéale et représentent la majorité des cellules B totales de ce compartiment. Elles sont également présentes dans la rate, la cavité pleurale et la moelle osseuse, mais sont à peine détectables dans le sang et les ganglions lymphatiques (Aziz 2015, Montecino-Rodriguez 2006, Roy 2013). Elles se distinguent des cellules B2 par leur phénotype ; comme les B2 elles expriment CD19 et IgM et contrairement au B2 elles ont une faible expression de B220 et expriment CD43. Les B1 existent sous forme de B1a qui expriment CD5 et B1b qui ne l'expriment pas.

La différence de leur origine a été mise en évidence par des expériences de greffe de moelle osseuse sur souris irradiées qui ont montré la non reconstitution de la population des cellules B1 chez ces souris (Montecino-Rodriguez 2006). Un progéniteur a été identifié dans le foie fœtal et son transfert dans des souris receveuses immunodéficients a permis de reconstituer efficacement les populations cellulaires B1a et B1b (Montecino-Rodriguez 2006). Les progéniteurs de cellules B1 apparaissent d'abord dans le foie fœtal vers le 11ème jour de la gestation (d'une durée d'environ 21 jours) ; à ce moment-là aucune cellule progénitrice de B2 n'est observée dans le foie fœtal ni au 15^{ième} jour dans la moelle osseuse. Récemment, il a été montré que des cellules B1a peuvent être générées également par la moelle osseuse chez l'adulte. Contrairement aux cellules B2 dont le renouvellement se fait à partir de précurseurs dans la moelle osseuse, les cellules B1 sont dotées de capacité d'auto-renouvellement à partir de cellules B1 matures.

Les cellules B1a sont considérées comme des cellules du système immunitaire inné car elles sécrètent des Ig spontanément et non pas suite à une stimulation antigènique appelée immunisation ; ces Ig sont connus sous le terme « d'anticorps naturels » (Gronwall 2012). Les antircorps naturels forment un bouclier contre les agents infectieux en assurant une protection pendant la période de temps requise pour la formation du centre germinatif et la production d'anticorps parfaitement adaptés. Il a été estimé que 80 à 90% des IgM sériques au repos et 50% des IgA sériques sont dérivés des cellules B1a. Les cellules B1b contribueraient par contre à l'immunité adaptative et serait, avec les cellules B MZ, la source principale d'IgM dirigées contre les polysaccharides et d'autres antigènes TI dans le cadre des réponses immunes adaptatives. Elles peuvent sécréter aussi des IgA.

L'existence des cellules B1 chez l'homme reste débattue. Certaines cellules B produisant des auto-anticorps chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde et exprimant le marqueur CD5 à leur surface ont été considérées comme les homologues des cellules B1 murines (Youinou 2011). Cependant, CD5 a aussi été identifié dans d'autres populations de lymphocytes B comme les cellules B transitionnelles (Freedman 1989, Lee 2009, Sims 2005), ce qui soulève la question de l'utilisation du CD5 chez l'homme pour repérer les éventuelles B1 humaines. Différentes données suggèrent que les cellules B MZ chez l'homme sont fonctionnellement l'équivalent des cellules B1a murines (Roshstein 2015).

Les cellules B régulatrices (B_{REG}) forment une population de cellules B hétérogènes difficilement identifiables par un panel de molécules de surface mais elles sont caractérisées par leur capacité à inhiber le système immunitaire à travers la production de cytokines comme l'IL-10 ou l'expression de molécules de surface comme *Programmed Death-Ligand 1* (PD-L1), appelé aussi CD274, et indépendamment de la production d'Ig. Leur origine fait l'objet de débats ; plusieurs signaux dépendants et indépendants des cellules T pourraient conduire à leur apparition à partir de cellules B1 ou B2. Leur rôle immunosuppresseur a été mis en évidence dans des modèles murins de maladies autoimmunes, d'infections et de cancers (Gorosito Serran 2015).

II.3. L'immunoglobuline A

Elle a été découverte dans le sérum au début des années 1950 (Grabar 1953) puis a été isolée et caractérisée en 1959. A cette période, plusieurs travaux, réalisés notamment chez l'homme, ont permis de montrer qu'elle représente la classe d'Ig prépondérante dans les muqueuses et dans les fluides biologiques (Chodiker 1963, Gugler 1959, Hanson 1959). Elle est la deuxième classe d'Ig la plus abondante dans la circulation après les IgG et les IgM et la classe d'Ig la plus produite dans l'organisme chez l'homme. Sa production dans l'organisme humain est en effet estimée à 66mg/kg

de poids du corps par jour contre 34 mg/kg pour les IgG et 7,9 mg/kg pour les IgM. L'IgA représente également la classe d'Ig la plus hétérogène chez l'homme en raison de ses différentes formes moléculaires.

II.3.1. Structure

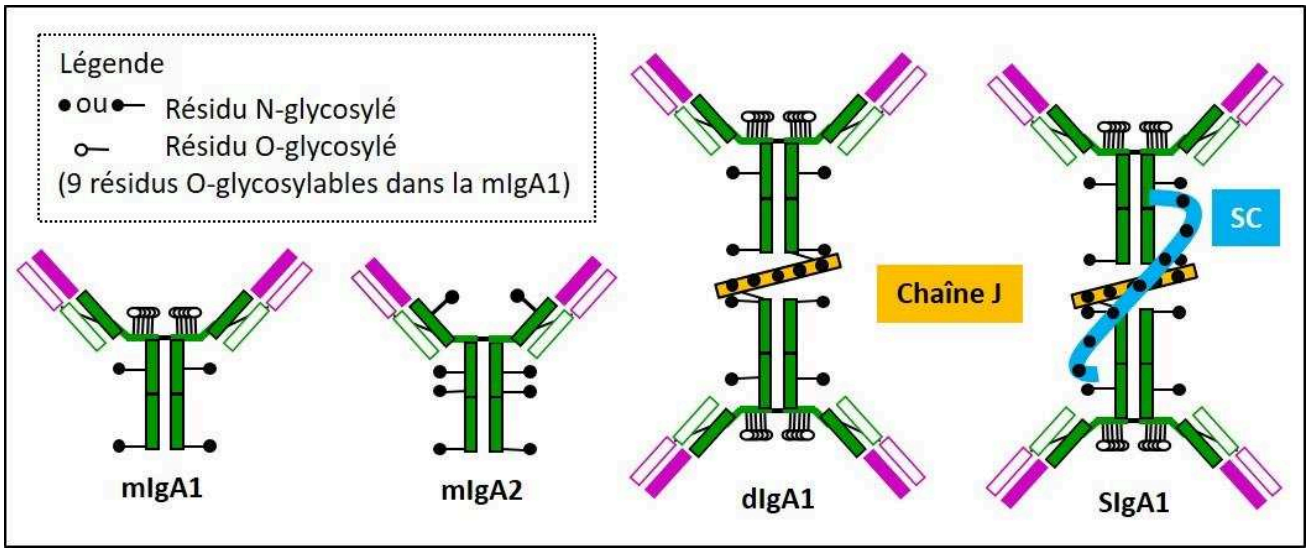


Figure 10 : Les différentes structures des Immunoglobulines A

Chez la souris, il n'existe qu'un type d'IgA alors que chez l'homme il existe deux sous-classes, IgA1 et IgA2. Sur le plan de sa structure de base, l'IgA de la souris ressemble plutôt à l'IgA2 humaine. La principale différence structurale entre l'IgA1 et l'IgA2 humaines est la présence ou l'absence d'une séquence de 18 acides aminés au niveau de la région charnière (Berthoux 2015). Cette séquence est présente dans les molécules d'IgA1 (Figure 10) auxquelles elle confère une plus grande flexibilité, mais absente dans IgA2. Elle est constituée uniquement de résidus proline, serine et de thréonine. Son absence dans les molécules d'IgA2 les rend plus résistantes à l'action de certaines protéases bactériennes clivant les liaisons spécifiques proline-sérine ou proline-thréonine (Papista 2011, Woof 2011). A noter que les bactéries produisant ces protéases colonisent fréquemment la surface des muqueuses et sont responsables de la plupart des infections du tractus génital et de la cavité orale. L'IgA2 existe sous la forme de deux variants allotypiques nommés IgA2m(1) et IgA2m(2). Ces variants diffèrent essentiellement par le mode d'association des chaines lourdes et légères. Dans l'IgA2m(2), l'interaction entre les chaînes lourdes et légères est stabilisée par des associations non covalentes et non pas par les classiques ponts disulfure comme c'est le cas pour l'IgA2m(1), l'gA1 et les autres classes d'Ig (Woof 2006). Une troisième forme de l'IgA2, l'IgA2(n), représentant probablement un troisième allotype, a été décrite en 1994 (Chintalacharuvu 1994). L'IgA1 et l'IgA2 portent des N-glycosylations au niveau de la chaîne lourde, mais seule l'IgA1 est O-glycosylée dans sa région charnière. L'IgA de souris est N-glycosylée ; elle a été considérée pendant longtemps comme non glycosylée au niveau de sa courte région charnière mais

récemment il a été montré qu'il existe plusieurs allotypes dont certains présentent quelques résidus glycosylables dans la région charnière. Les glycosylations représentent 6-10% de la masse moléculaire des IgA (Papista 2011).

La O-glycosylation est un évènement qui touche majoritairement les protéines intracellulaires où les motifs O-glycosylés peuvent servir de signalisation. Seulement quelques rares protéines libérées dans le milieu extracellulaire sont O-glycosylées ; parmi les Ig, seules les IgA1 et IgD sont O-glycosylées et dans la circulation, en plus de l'IgA1, on trouve certains facteurs de coagulation et une protéine du système du complément. La O-glycosylation consiste à ajouter un sucre sur l'oxygène des résidus sérine, thréonine, tyrosine, ou hydrolysine alors que la N-glycosylation permet l'ajout d'un sucre sur l'azote de l'asparagine (Arnold 2007, Freeze 2006, Spiro 2002). Dans l'IgA1, la O-glycosylation se fait au niveau de la région charnière qui présente une succession de dix-huit acides aminés qui sont des prolines, des sérines et des thréonines. Les neuf sérines et thréonine de la région charnière des IgA1 sont en théorie O-glycosylables mais seules trois à six le sont réellement avec des chaînes de sucre constituées maximum de trois sucres : GalNAc, Gal et acide syalique. Le premier sucre à être fixé sur les sérines ou les thréonines est le GalNAc grâce à l'action d'une transférase spécifique, puis un Gal est fixé au GalNAc sous l'effet de la Beta3 Galactose-Transferase 8 (Beta3Gal-T8, appelée aussi C1GALT1) aidée par la chaperone C1GALT1C1 (Ju 2002, Ju 2008). Enfin, un acide sialique peut être ajouté sur le GalNAc ou sur le Gal ou sur les deux.

Les IgA existent sous différentes formes (Figure 10 page 37) : monomériques (m) ou polymériques (p). Les polymères sont essentiellement des dimères d'IgA (dIgA) associés à la chaîne J (pour *Joining*). Les pIgA peuvent ou non former un complexe avec une protéine appelée pièce sécrétoire ou *Secretory Component* (SC) et dans ce cas l'IgA prend le nom d'IgA secrétoire ou SIgA. Comme les autres classes d'Ig, la mIgA est un hétérotétramère composé de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères. Les chaînes lourdes ont trois CH et dans la forme soluble de l'Ig et possèdent en C-terminal une séquence de dix-huit acides aminés appelée *tailpiece*. La mIgA a une taille d'environ 160 kDa et une forme de T plus que de Y.

La chaine J a été découverte par MS HALPERN et ME KOSHLAND dans l'IgA isolée à partir du colostrum humain et de lapin en 1970 (Halpern 1970). Elle a été détectée ultérieurement chez la souris, le bovin, la poule, le xénope et même chez les invertébrés (Johansen 2000). Ces derniers ne possèdent pas de système immunitaire adaptatif et n'ont pas d'Ig mais possèdent un système inné en particulier au niveau des muqueuses. Chez les mammifères, la chaîne J est un polypeptidique de 15 KDa contenant huit cystéines parfaitement conservées dont six sont impliqués dans la formation de ponts disulfure intracaténaires et 2 dans celle de ponts disulfure avec la *tailpiece* les chaînes lourdes des IgA et des IgM (Max 1985). La chaîne J ne s'associe pas aux

autres classes d'Ig qui ne possèdent pas de *tailpiece*. Certaines études anciennes avaient suggéré que la dIgA contient deux chaînes J ; cependant il est actuellement admis que la dIgA n'a qu'une molécule de chaîne J. L'expression de la chaîne J a été détectée également dans les plasmocytes à IgD, IgG ou IgE mais sa fonction dans ces cellules n'est pas connue ; dans ces cellules, la chaîne J serait principalement dégradée dans le compartiment intracellulaire (Brandzaeg 1999). La chaîne J régule la fonction et la formation des dIgA, sans pour autant être indispensable à leur structure. Des pIgA, incluant des dIgA, dépourvues de chaîne J ont été détectées dans des cas de myélome chez des patients. Par ailleurs, dans un modèle murin KO pour la chaîne J, quelques dIgA sont retrouvés dans le plasma et le ratio mIgA / dIgA est fortement augmenté (Hendrickson 1995). Ces souris présentent aussi une diminution d'un facteur quatre des taux d'IgM circulantes et des pIgM de taille variable qui est probablement la conséquence d'une dérégulation du processus de polymérisation en absence de la chaîne J (Erlandson 1998).

Le SC est une glycoprotéine de 80 KDa qui est la partie extracellulaire du récepteur aux pIg (pIgR). Ce récepteur est exprimé par les cellules épithéliales dans les muqueuses ; initialement son expression est au niveau basolatéral où il reconnaît les pIgA associés ou non à des antigènes. Le complexe pIgA - pIgR est endocyté et transporté au travers de la cellule épithéliale jusqu'au pôle apical par un mécanisme appelé transcytose. Un clivage protéolytique de pIgR prend place au pôle apical ce qui libère, dans la lumière de la muqueuse, SC qui reste associé à pIgA donnant une SIgA. SC protège l'IgA contre la dégradation par les protéases dans les sécrétions. La chaîne J augmente l'affinité de pIgA pour pIgR et SC. L'intéraction de pIgR avec pIgA se fait par des interactions covalentes avec l'extrémité C-terminale de la chaîne J et les domaines C_{H2} de l'IgA, mais aussi par des liaisons non covalentes avec les domaines C_{H3} de l'IgA (Kaetzel, 2005).

Les IgA1 et les IgA2 sont produites par les plasmocytes situés dans la moelle osseuse comme ceux dans les muqueuses. Le ratio IgA1 : IgA2 est globalement de 3 : 2 dans les muqueuses mais cette proportion varie d'une muqueuse à l'autre ; l'IgA1 est prédominante dans le plasma avec un ratio IgA1 : IgA2 de 10 : 1 (Papista 2011, Woof 2006). L'IgA murin est également produit par les cellules B1. La mIgA est prédominante dans le plasma alors que la pIgA est majoritaire dans les muqueuses. La SIgA est spécifique des liquides biologiques sécrétés dans la lumière des muqueuses.

II.3.2. Activation de récepteurs et du complément

Comme les autres Ig, l'IgA est une molécule bifonctionnelle capable de fixer spécifiquement un antigène grâce à ses régions V et d'activer différentes molécules (récepteurs et complément) par sa région C.

Actuellement, sept types de récepteur de la région C (appelée Fc) des IgA sont connus (Mkaddem 2014, Papista 2011) :

- pIgR présenté plus haut,
- le récepteur Dectin-1 et son corécepteur Siglec-5, exprimé par les cellules M et permettant la rétro-transcytose des IgA (Rochereau 2013),
- le récepteur FcαRI, appelé aussi CD89,
- le récepteur à la transferrine (TfR), connu aussi comme CD71, et exprimé de façon ubiquitaire à l'exception des érythrocytes, reconnaît les pIgA (Moura 2001),
- le récepteur Fcα/μR, correspondant à CD351, présent essentiellement sur quelques cellules du système immunitaire dont certains lymphocytes B, reconnaît avec une forte affinité les IgM et moins fortement les IgA,
- le récepteur Fc Receptor Like (FcRL)4, présent à la surface des cellules B mémoire dans les muqueuses, lie les IgA et inhibe l'activation du BCR,
- le récepteur *DC-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-Integrin* (DC-SIGN), connu comme CD209, présent à la surface de macrophages et de DC lie les SIgA,
- et le récepteur des ASialoGlycoProtéines (ASGPR) qui est exprimé par le foie et intervient dans la clairance hépatique de différentes molécules circulantes dont les IgA.

CD89 est une glycoprotéine transmembranaire identifiée pour la première fois comme récepteur de la région C de l'IgA humaine en 1996 (Morton, 1996). Elle est composée d'une partie extracellulaire, d'une région transmembranaire et d'une région intra-cytoplasmique de petite taille. Cette dernière ne posséde pas de motifs de signalisation mais est associée à un polypeptide homodimérique de transduction du signal appelé chaîne FcRγ qui porte un ITAM (Woof 2006). CD89 reconnaît l'IgA dans la région comprise entre C_{H2} et C_{H3}. Il a été montré que CD89 fixe la mIgA avec une faible avidité et est inhibé par cette fixation alors qu'il fixe avec une forte avidité et est activé par la pIgA (Papista 2011, Wines 2006). Cette dualité fonctionnelle du récepteur CD89 serait dépendante du niveau de phosphorylation de la chaîne FcRγ associée. CD89 existe chez l'homme, les primates, les chevaux, les bovins et le rat, mais pas chez la souris (Maruoka 2004, Morton 2005). Il est exprimé de manière constitutive à la surface des cellules de la lignée myéloïde incluant les monocytes, les macrophages, les PMN neutrophiles et les PMN éosinophiles. Lorsqu'il est activé sur ces cellules, il peut induire la phagocytose, la dégranulation et la production de dérivés actifs de l'oxygène ou de diverses cytokines (Wines, 2006). CD89 est aussi exprimé par certaines DC où il permet à la capture de complexes associant l'IgA et son antigène en vue de la digestion de l'antigène et sa présentation aux lymphocytes T pour leur éducation. CD89 existe sous forme soluble et résulte du clivage de la forme membranaire.

Le système du complément est constitué par un ensemble de protéines synthétisées majoritairement par le foie et qui existent dans le plasma sous la forme soluble et de récepteurs membranaires exprimés à la surface de nombreux types cellulaires (Maillard 2015). Ce système peut directement détruire des agents pathogènes mais également en les recouvrant c'est-à-dire en

les opsonisant, peut faciliter leur reconnaissance puis leur destruction par des cellules immunitaires, le recrutement et l'activation des cellules immunitaires et l'élimination des complexes immuns circulants. Les protéines solubles du complément sont constitutivement présentes mais inactives dans la circulation où elles représentent environ 5% des protéines plasmatiques. L'activation des protéines du complément peut se faire par trois voies majeures qui sont dans l'ordre de découverte: la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines (Figure 11) (Maillard 2015). La voie classique est activée par des complexes immuns associant Ig et antigène qui reconnaissent le composé soluble C1q qui clive les composés C2 et C4 permettant la formation de la C3 convertase C4b-C2a. La voie alterne est activée directement par interaction de certains micro-organismes avec le composé soluble C3b (produit par hydrolyse spontanée du C3) et les cofacteurs properdine, facteur B et facteur D ; il en résulte le clivage du facteur B et la formation d'une C3 convertase sous la forme C3b-Bb. La voie des lectines est activée par interaction de certains sucres comme les résidus mannose présents à la surface de bactéries par la protéine soluble *Mannan Binding Lectin* (MBL) ce qui, comme la voie classique, conduit au clivage des composés C2 et C4 et la formation de la C3 convertase C4b-C2a. La C3 convertase sous la forme C4b-C2a ou C3b-Bb, clive elle-même le composé C3 et il s'en suit une cascade d'activation moléculaire commune aux trois voies qui aboutit à la production de protéines solubles régulatrices de la réponse immunitaire comme C5a *via* l'activation de récepteurs membranaires et à la formation d'un complexe dit d'attaque membranaire (ou *Membrane Attack Complex* - MAC). Le MAC se loge dans la bicouche lipidique de l'enveloppe bactérienne ou dans la membrane plasmique de cellules eucarytotes et se conduit en canal ; la perturbation de l'équilibre osmotique provoque la cytolyse (Cybulsky 2000, Qiu 2014).

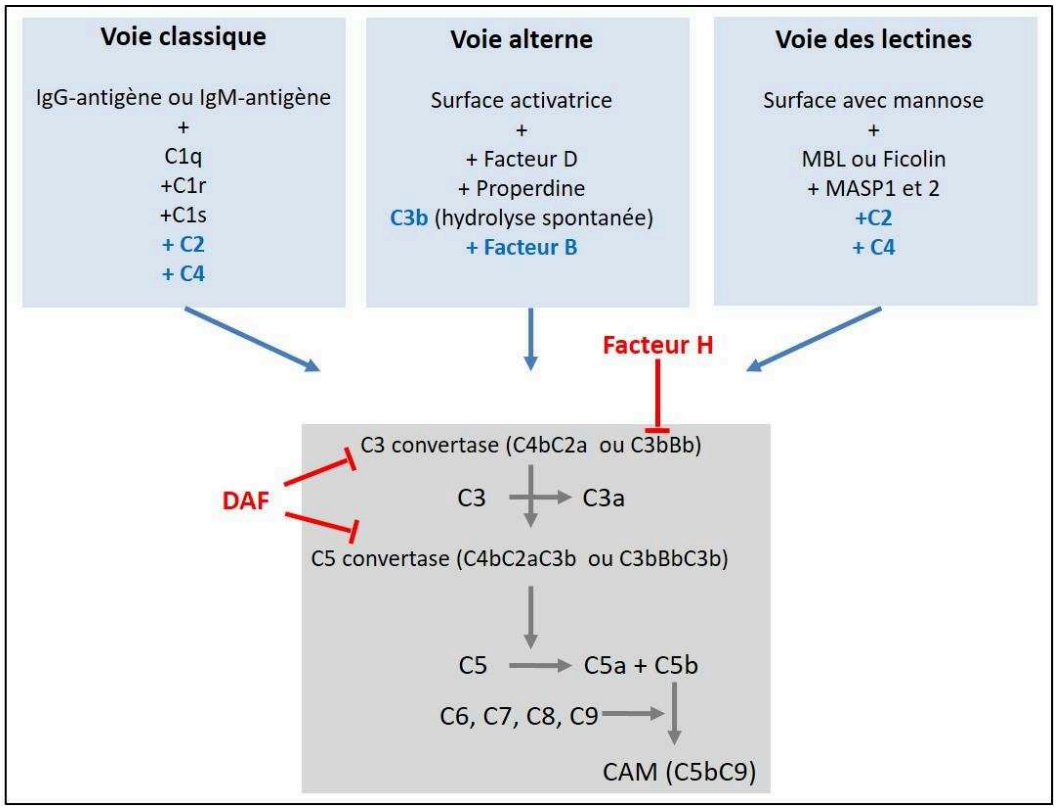


Figure 11 : Le système du complément

Contrairement aux IgG, les IgA sont incapables d'activer le complément par la voie classique. Il a cependant été montré que les pIgA pouvaient activer la voie alterne et la voie des lectines (Hiemstra 1987, Pascal 2012, Roos 2001).

II.3.3. Fonctions de l'immunoglobuline A

Dans les muqueuses, l'IgA participe à la défense de l'organisme contre les agents infectieux en contribuant au mécanisme défini comme l'exclusion immune. L'exclusion immune empêche la colonisation et l'invasion par les microorganismes pathogènes. Ce phénomène est essentiellement dû aux SIgA dans la lumière des muqueuses. Les SIgA possèdent différents sites de liaisons permettant de bloquer les déterminants d'adhérence des microorganismes aux cellules épithéliales et de les agglutiner, facilitant ainsi leur élimination dans le mucus qui est évacué par le péristaltisme digestif ou les battements ciliaires dans les voies aériennes (Hajishengallis 1992, Reinholdt 1987, Williams 1972). Les glycanes du SC et des IgA, plus que la reconnaissance antigénique par les régions V, sont les principaux éléments permettant l'exclusion immune (Edebo 1995, Phalipon 2002). Ce mécanisme conduit aussi à l'élimination de toxines produites par les microorganismes dans la lumière des muqueuses ou d'allergènes alimentaires, c'est-à-dire d'antigènes provenant du bol alimentaire et pouvant être à l'origine d'allergie.

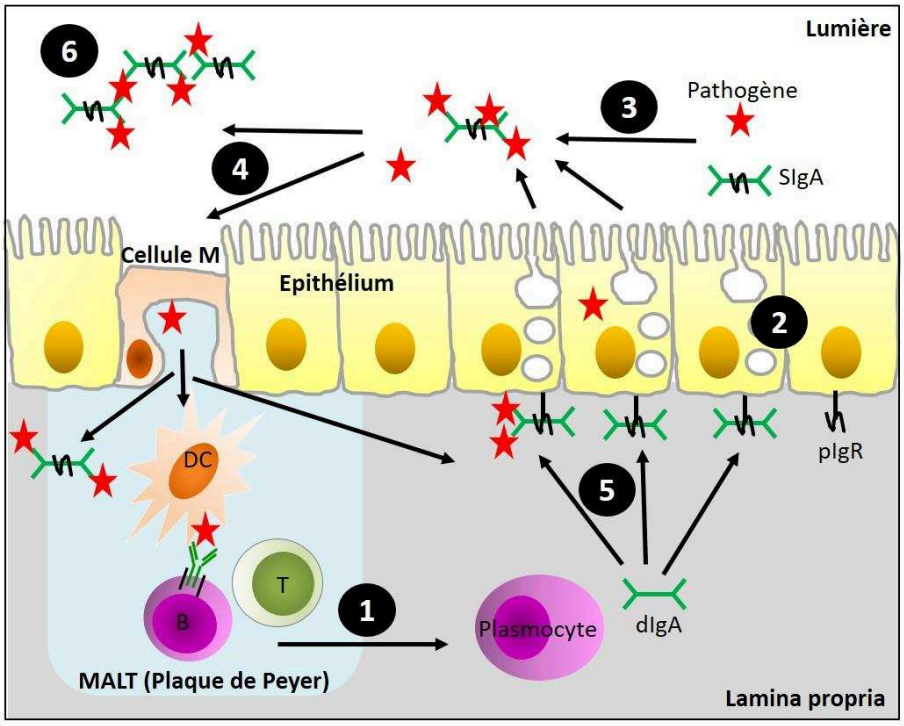


Figure 12 : Régulation de l'Immunoglobuline A dans la muqueuse digestive. 1-Différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et migration dans la *lamina propria*. 3- Passage des dIgA par transcytose dans la lumière de la muqueuse. 3-Neutralisation d'antigènes dans la lumière. 4- Passage des antigènes ou des SIgA-antigènes *via* les cellules M dans la sous-muqueuse. 5-Neutralisation d'antigènes dans la sous-muqueuse puis transcytose, ou neutralisation en intracellulaire lors de la transcytose. 6- Elimination des complexes SIgA-antigènes dans les fécès.

En plus du rôle dans l'exclusion immune, il a aussi été décrit que les pIgA au cours de leur transcytose peuvent neutraliser, à l'intérieur des cellules épithéliales, des virus et des éléments bactériens pro-inflammatoires comme le LPS (Fernandez 2003, Mazanec 1992, Mazanec 1993). De plus, la transcytose d'IgA associé à un antigène peut contribuer à l'élimination de molécules inflammatoires ou toxiques qui ont atteint la sous-muqueuse (Kaetzel 2005). Dans les tissus, les complexes immuns contenant des pIgA et des antigènes sont chimiattractant pour les PMN (van der Steen 2009) et peuvent activer les cellules immunitaires qui expriment CD89 et conduire ainsi à la destruction de microorganismes ou de cellules tumorales (Aleyd 2014, Pascal 2012). *Via* leur rétrotransport par les cellules M de la lumière des muqueuses à la sous-muqueuse, les SIgA associées à un antigène peuvent contribuer à éduquer et à réactiver le système immunitaire adaptatif (Mantis 2002, Weltzin 1989).

Les IgA contribuent à la mise en place et à l'homéostasie du microbiote : en effet, chez la souris, plusieurs études ont montré que la déficience en IgA ou en SIgA dû à un déficit d'expression de pIgR conduit à une modification de la qualité du microbiote (Kaetzel 2014). Il est également démontré que l'allaitement et en particulier les IgA contenus dans le lait maternel contribue à la mise en place du microbiote (Levi Mortera 2016, Rogier 2014). L'effet de l'allaitement est durable et a un impact sur le microbiote chez les souris adultes (Rogier 2014).

Les IgA peuvent également avoir un effet immunomodulateur. Ainsi, les IgA circulantes qui sont majoritairement monomériques sont considérées comme des éléments anti-inflammatoires plus que comme des molécules de défense contre les pathogènes. Cet effet régulateur de la réponse inflammatoire est certainement à attribuer à l'effet inhibiteur des mIgA sur CD89 porté notamment par les PMN neutrophiles qui sont, chez l'homme, la population de globules blancs la plus importante en quantité dans le sang. Cette population nécessite d'être constitutivement inhibée pour éviter l'activation des PMN et la production et la libération dans la circulation de produits hautement toxiques. L'effet immumodulateur de l'IgA peut aussi résulter au niveau mucosal de l'interaction de l'IgA avec le récepteur inhibiteur du BCR, le FcRL4, à la surface des cellules B mémoire, et de la reconnaissance de SIgA amenées par les cellules M au contact des DC portant DC-SIGN. Les DC activées par ce biais induisent une expansion de lymphocytes T_{REG} pouvant favoriser l'immunosuppression (Mkaddem 2014).

Récemment un rôle inattendu des pIgA a été démontré sur l'érythropoïèse (Coulon 2011). Cet effet résulte d'une interaction des pIgA sur CD71 à la surface des érythroblastes qui conduit à une plus grande sensibilité de ces cellules à l'érythropoïétine (EPO) et à leur prolifération.

II.3.4. Maladies liées à l'immunoglobuline A

L'IgA est incriminée dans quelques pathologies :

- le déficit sélectif en IgA qui est le déficit immunitaire primitif le plus fréquent en Europe et en Amérique du Nord avec une prévalence de 1/600. Elle est généralement asymptomatique mais peut, chez certains sujets, conduire à des infections récidivantes des voies aériennes, intestinales, uro-génitales et à des allergies.
- le myélome multiple à IgA qui résulte de l'accumulation principalement dans la moelle osseuse de plasmocytes tumoraux monoclonaux qui produisent une IgA. L'incidence du myélome multiple (à IgA ou à IgG) est de 5 nouveaux cas / 100 000 habitants et par an et touche l'adulte âgé.
- la dermatose bulleuse à IgA (ou dermatose à IgA linéaire) est une maladie auto-immune sous-épidermique rare (1 cas/10^6 personnes) causée par des auto-anticorps IgA produits contre un antigène de la membrane basale dermo-épidermique. Elle se manifeste essentiellement chez les enfants. Cliniquement, elle est caractérisée par des vésicules ou bulles tendues, qui, à l'examen histopathologique, démontrent des ampoules sous-épidermiques avec un infiltrat de neutrophiles,
- le purpura rhumatoïde (ou purpura d'Henoch-Schönlein ou vascularite à IgA) est une vascularite systémique affectant les petits vaisseaux où des complexes immuns à IgA se déposent. Des neutrophiles sont retrouvés dans les lésions cutanées. L'origine de la maladie est inconnue. Elle est caractérisée cliniquement par un purpura, c'est-à-dire des tâches rouges liées à un épanchement de sang dans la peau, associé à une arthralgie et à des douleurs abdominales et/ou à une atteinte rénale. Elle est diagnostiquée chez 1 enfant/5500 et est plus rare chez les adultes (1 cas/10^6).
- la N-IgA est une cause majeure de maladie rénale. Elle fera l'objet du chapitre suivant.

II.3.5. Régulation de la production de l'immunoglobuline A dans la muqueuse intestinale

Dans la muqueuse intestinale, la CSR et la production des IgA est initiée dans les MALT au niveau des PP (Plaque de Peyer) et des ILF (*Isolated Lymphoid Follicle*) selon des mécanismes dépendants ou indépendants des cellules T (Sutherland 2012) (Figure 12 page 42). Les plasmocytes sortent des MALT et se logent dans la *lamina propria* où ils produisent des IgA de très hautes affinités provenant de cellules ayant subi la SHM ou peu affins appelés anticorps naturels. Différentes études se sont intéressées au rôle des cellules B1 dans la production des IgA de la muqueuse digestive et ont suggéré qu'elles y participent (Meyer-Bahlburg 2015).

Des études dans différents modèles murins ont montré que de nombreuses cellules et facteurs sont impliqués dans la production des IgA à commencer par le microbiote intestinal (Lycke 2017). Ainsi, les souris élevées en condition dite *germ-free* ont une déficience dans la production d'IgA par rapport aux souris présentant une flore intestinale normale ; les taux d'IgA augmentent suite à l'introduction d'un microbiote. La colonisation de la muqueuse digestive par une unique souche

bactérienne conduit aussi à l'augmentation de la production des IgA et le taux d'IgA varie avec la souche introduite. L'absence quasi-complète des cellules sécrétrices d'IgA chez les nouveaux-nés avant la colonisation de leur intestin par la flore commensale montre également que le microbiote influence la production de l'IgA (Benveniste 1971). Les cellules épithéliales qui transportent les antigènes depuis la lumière du tube digestif, particulièrement les cellules M, et les DC sont essentielles à la mise en place de la réponse IgA dans la muqueuse digestive (Lycke 2017). La déficience en facteur nécessaires à la différenciation des cellules M se traduit par un déficit de production d'IgA mucosale.

Outre le transport des antigènes, les cellules épithéliales, dont les PRR sont activés par des DAMP, produisent des cytokines et des facteurs qui peuvent influencer la production des IgA. Ainsi, l'expression d'un TLR4 constitutivement activé au niveau des cellules épithéliales de l'intestin se traduit par une augmentation de la production par l'épithélium de facteurs favorisant la production d'IgA, par un recrutement des cellules B et une augmentation des niveaux d'IgA dans les fécès (Shang 2008). Ces facteurs peuvent provenir aussi des cellules immunitaires qui se trouvent à proximité ou dans les MALT comme les TH, les TFH, les DC, les FDC mais aussi les PMN et les macrophages.

Parmi les facteurs incriminés dans la production des IgA, certains agissent directement sur la CSR et d'autres sur la survie des cellules B ou des plasmocytes ou sur les deux phénomènes. Le facteur majeur pour la mise en place de la CSR est le *Transforming Growth Factor* (TGF)β qui active directement le lymphocyte B, ce qui conduit à la CSR vers la classe IgA (Lycke 2017). Chez la souris, l'absence de récepteurs de TGF-β sur les cellules B entraine une diminution drastique de la CSR vers la classe IgA, la présence seulement de quelques plasmocytes positifs pour les IgA dans la *lamina propria* de l'intestin et l'incapacité de répondre à des immunisations orales (Cazac 2000). De nombreux signaux dont les plus connus sont l'activation de CD40, l'acide rétinoïque qui dérive de la vitamine A, le *Nitric Oxide* (NO) et l'IL-21 agissent en synergie avec le TGF-β sur le lymphocyte B pour favoriser la CSR ; leur action se fait à différents niveaux comme par exemple l'IL-21 qui augmente la synthèse de l'enzyme AID (Lycke 2017). L'IL-21 est produit majoritairement par les cellules T_{H17} qui libèrent aussi la cytokine IL-17. La déficience en IL-17 limite fortement la production d'IgA dans la muqueuse digestive mais cette cytokine n'agit pas sur la CSR. Les cytokines *TNF Super Family member* (TNSF)13 / APRIL et TNFSF13B / BAFF qui se fixent au même récepteur *TNF Receptor SF* (TNFRSF)13 / TACI présent sur les lymphocytes B active directement la CSR vers la classe IgA tout en favorisant la survie des cellules B ; APRIL et BAFF sont aussi des facteurs importants de survie des plasmocytes (Lycke 2017).

Chapitre III. La néphropathie à IgA

III.1. Historique de la découverte de la néphropathie à IgA

Les maladies à dépôt d'Ig sont caractérisées par une production anormale d'Ig qui se déposent dans certains tissus et provoquent leur dysfonctionnement. La néphropathie à IgA ou N-IgA est une maladie à dépôts d'IgA qui se localisent spécifiquement dans la partie appelée mésangium des glomérules du rein (Figure 13 page 47) ; c'est cette caractéristique qui a été à l'origine de sa découverte en 1968 par deux Français, l'anatomopathologiste J BERGER et la spécialiste de microscopie électronique N HINGLAIS (Berger, 1968, Feehally 2011). Il s'agit véritablement d'une découverte puisqu'en 1968, la seule classe d'Ig connue pour être impliquée dans des maladies rénales est l'IgG. En plus de sa publication dans le journal francophone « Journal d'Urologie et de Néphrologie », le travail est présenté la même année à l'oral lors du congrès de la Société Française de Néphrologie. Dans l'article intitulé « Les dépôts intercapillaires d'IgA-d'IgG », J BERGER et N HINGLAIS décrivaient la présence de dépôts d'IgA, parfois accompagnés de dépôts d'IgG, dans le mésangium glomérulaire dans un groupe de patients peu clairement définis. Ce travail était innovant aussi au niveau technique en associant la biopsie rénale développée en 1951, l'immunofluorescence, mise au point en 1950 et appliquée pour le diagnostic des maladies du tissu rénal en 1957, et un anticorps anti-IgA humaine nouvellement produit (Coons 1950, Iverson 1951, Mellors 1957). En 1969, un groupe plus important et mieux caractérisé de patients est étudié et les résultats sont publiés en 1969 (Berger 1969). Dans cette étude, les patients présentent une glomérulonéphrite focale avec protéinurie modérée et hématurie persistante ; pour un sujet ayant eu une transplantation rénale, la récidive des dépôts d'IgA est observée. Jusqu'en 1972, seuls des français décrivent ces dépôts mésangiaux d'IgA, ce qui laisse penser qu'il pourrait s'agir d'une particularité d'une population. La communauté internationale de la néphrologie se montre sceptique et réticente à l'idée de considérer la description de dépôts mésangiaux d'IgA comme une entité clinico-pathologique distincte de glomérulonéphrite. L'opinion change à partir de 1972, où d'autres cas sont rapportés par d'autres équipes que celle de J BERGR et dans d'autres pays, en particulier en Australie, aux Etats-Unis, au Japon, aux Pays-Bas et au Royaume-Uni (Davies 1973, Maintz 1972, McEnery 1973, Ueda 1975, Woodroffe 1975). L'intérêt grandit pour cette nouvelle entité et, au cours de la décennie suivante, on compte plus de six cents publications qui s'y rapportent. D'ailleurs dès 1983, se mettent en place des symposia internationaux dédiés à la N-IgA. Ils réunissent les spécialites du domaine (néphrologues, immunologistes, pathologistes, biochimistes, biologistes cellulaires, généticiens), et ont lieu tous les 2 à 4 ans dans divers pays. Un groupe informel baptisé « *IgA Nephropathy Club* » a été formé lors du deuxième symposium international qui a eu lieu à Bahri en Italie en 1987, dans l'objectif de mieux faire connaître l'importance clinique de la maladie et d'encourager la collaboration nationale et internationale dans la recherche clinique

et fondamentale. En 2000, ce club a connu des restructurations et a choisi de prendre le nom d'*International IgA Nephropathy Network* (IGANN) pour lui donner une image plus vaste et plus englobante. Le dernier symposium en date organisé par IGANN a eu lieu en septembre 2016, à Tours en France.

Par le passé, la N-IgA a été appelée maladie de Berger, glomérulonéphrite à dépôts intercapillaires d'IgA, néphropathie primitive à dépôts d'IgA et glomérulonéphrite à dépôts mésangiaux d'IgA-IgG (Pillebout 2016). Le terme consacré actuellement au niveau mondial est IgA Nephropathie ou IgAN ; en France il est encore appelé communément maladie de Berger et N-IgA.

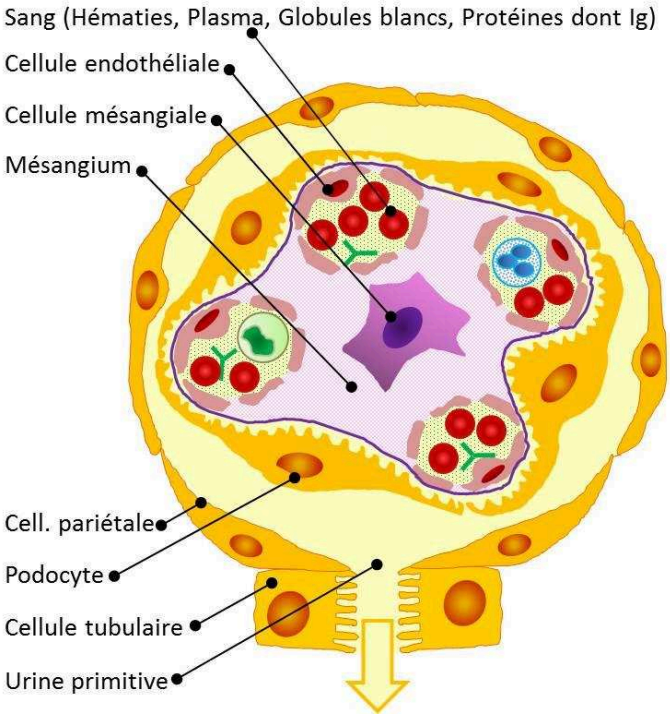


Figure 13 : Structure du glomérule.

III.2. Caractéristiques de la néphropathie à IgA

III.2.1. Epidémiologie

La N-IgA, qui toucherait globalement 1% de la population mondiale, est la glomérulonéphrite la plus répandue dans le monde, mais avec une fréquence qui est très variable en fonction des origines ethniques et géographiques (D'Amico 1987, Julian 1988a). En effet, sa prévalence est plus forte chez les asiatiques avec un pic observé au Japon et en Corée que chez les caucasiens et est très faible chez les noirs (Donadio, 2002). En Europe, un gradient est observé du Sud vers le Nord avec l'Islande qui présente la plus forte prévalence. Cette différence peut être expliquée par des facteurs génétiques et environnementaux mais elle a également été attribuée à la politique de dépistage des anomalies urinaires qui est différente d'une région à une autre et peut conduire à la révélation de la maladie.

Elle atteint plus fréquemment les hommes que les femmes, mais, là-encore avec une certaine variabilité en fonction des régions. Ainsi, le ratio homme : femme touché est environ de 2 : 1 au Japon et passe à 6 : 1 en Europe du Nord et aux Etats-Unis. Elle peut être diagnostiquée à tout âge, chez les enfants, les adultes et les personnes âgées de plus de 60 ans. Son diagnostic se fait cependant plus fréquemment chez les jeunes adultes âgés de 20 à 40 ans.

En France, environ 1500 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année ainsi que 500 nouvelles insuffisances rénales terminales liées à cette pathologie. En France comme en Allemagne, au Danemark, aux Etats-Unis, en Italie et aux Pays-Bas, l'incidence varie de 10 à 40 nouveaux cas par million d'habitants et par an. La prévalence de la maladie, exprimée en pourcentage de biopsies rénales, est de 29% en Asie, 12% en Australie, 10,7% en Europe et de moins de 5%-38% aux Etats-Unis. Aux Etats-Unis, une grande disparité est observée en fonction de la proportion des différentes ethnies : asiatiques, causasiens, noirs mais également amérindiens (Donadio 2002, Pillebout 2016, Smith, 1985).

III.2.2. Manifestations cliniques

L'hématurie et la protéinurie sont les signes les plus fréquents de la maladie, mais la protéinurie n'est pas visible pour le malade et l'hématurie peut être microscopique et dans ce cas passer inaperçue ou au contraire elle peut-être macroscopique. Ainsi, la présentation clinique de la maladie est très variable : elle est d'ailleurs asymptomatique, dans environ un tiers des cas. La révélation de la maladie est alors faite de façon fortuite suite à la détection d'une hématurie microscopique et de protéinurie lors d'examens urinaires faits à titre systématique, qui, en France, sont réalisés dans le cadre de la médecine du travail, universitaire ou sportive et de surveillance de la grossesse, ou lors de recherche ou de suivi pour une autre pathologie, en particulier le purpura rhumatoïde qui peut s'accompagner d'une N-IgA. La N-IgA peut aussi être secondaire du lupus érythémateux, de la cirrhose hépatique, du myélome à IgA et est associée aux maladies du système digestif qu'il s'agisse de la maladie coeliaque ou des Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales (MICI), appelées également IBD (pour *Inflammatory Bowel Diseases*) et comprenant notamment la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (Corica 2016, Papista 2011). En France, la détection d'une hématurie microscopique et d'une protéinurie, après avoir écarté différentes pathologies, peut conduire à une biopsie rénale qui est une condition nécessaire au diagnostic de la N-IgA. Au Japon, la recherche d'anomalies urinaires se fait obligatoirement chez tous les enfants scolarisés et chez tous les salariés (Kitagawa 1988) et la biopsie rénale est faite presque systématiquement lorsqu'une hématurie microscopique est décelée. En revanche, au Canada, aux Etats-Unis et au Royaume-Uni, la biopsie rénale n'est pas pratiquée chez les personnes présentant une hématurie isolée et une protéinurie modérée mais est réservé aux patients présentant une augmentation de la protéinurie et un développement de l'aggravation de la fonction rénale (Donadio 2002).

Dans d'autres cas, la découverte de la maladie n'est pas faite fortuitement, mais elle est diagnostiquée suite à l'apparition d'une hématurie macroscopique, souvent contemporaines d'infections des voies aériennes ou digestives ou du tractus uro-génital (Mestecky 2013). L'hématurie macroscopique apparaît dans un délai relativement court, de 1 à 3 jours, suite à l'infection, ce qui est un signe évocateur de la N-IgA. L'hématurie peut durer de quelques heures à quelques jours voire plus longtemps. Elle peut également apparaitre suite à un effort physique, souvent fait lors d'une activité sportive.

Enfin, le sujet atteint de la N-IgA peut présenter des signes cliniques peu spécifiques qui l'inquiètent comme la fatigue chronique ou l'hypertension artérielle. Ces signes sont ceux de toutes maladies des reins lorsque la fonction rénale est fortement altérée. Lorsqu'ils sont présents, les symptômes de la N-IgA (hématurie macroscopique, fatigue…) peuvent être le résultat d'une perte brutale ou très progressive sur plusieurs années de la fonction rénale. Il est donc difficile de dater le début de la maladie.

L'hypertension artérielle est aussi un signe de la N-IgA ; elle est fréquente chez les patients N-IgA même en l'absence d'insuffisance rénale. Sa prévalence au diagnostic chez les patients adultes varie de 30 à 70% selon les séries. L'association d'une hématurie, d'une protéinurie et d'une hypertension artérielle est une indication pour une biopsie rénale et la recherche de dépôts d'IgA mésangiaux. Dans ces conditions, le diagnostic de N-IgA est porté dans environ 50% des cas.

Si la protéinurie et l'hypertension artérielle sont considérées, de façon consensuelle, comme néfastes, l'impact de l'hématurie dans la N-IgA est moins clair. Seules quelques auteurs s'y sont intéressés et ont donné des avis contrastés en affirmant que l'hématurie ou au contraire que la rémission de l'hématurie serait un facteur de pronostic favorable pour la survie rénale (Rodrigues 2017, Sevillano 2017).

III.2.3. Evolution de la néphropathie à IgA

La N-IgA est une maladie à évolution variable, généralement lente, et plus ou moins sévère en fonction des patients. Elle peut rester cliniquement stable ou évoluer progressivement ou rapidement en entraînant une perte d'intensité variable du fonctionnement rénal pouvant aller jusqu'au stade d'insuffisance rénale terminale, nécessitant le remplacement de la fonction rénale par dialyse ou transplantation. On estime qu'environ un quart des patients atteints de N-gA évoluent vers le stade d'insuffisance rénale terminale en 20 ans après le diagnostic.

Le suivi des patients montre que l'hématurie peut être intermittente ou persistante. Certaines études ont rapporté que l'association d'une hématurie microscopique permanente, d'une protéinurie

supérieure à 1g/24h et d'une hypertension artérielle est un facteur de mauvais prognostic et de progression vers l'insuffisance rénale terminale (Berthoux 2015, Tumlin 2004). Il est possible d'observer, dans certains cas, une augmentation du taux de protéine dans l'urine pouvant atteindre 3g/24h en même temps qu'une diminution du taux d'albumine sanguin, ce qui est une caractéristique du syndrome néphrotique. Ce dernier est présent dans 5 à 10% des cas chez les patients N-IgA au moment du diagnostic et peut être un élément révélateur de la maladie.

III.2.4. Caractéristiques histopathologiques

La détection des IgA dans le mésangium rénal reste la condition *sine qua non* de l'affirmation du diagnostic de N-IgA. Cela se fait couramment par immunofluorescence sur une coupe de biopsie rénale qui permet de révéler la présence des dépôts d'IgA constants dans les axes mésangiaux des glomérules. Le marquage des IgA dans les aires mésangiales présente un aspect granulaire ou filamenteux plus ou moins diffus en forme de branches d'arbres ou des doigts de la main (Figure 14) (Droz 1995, Pillebout 2016). Les dépôts sont d'abondance variable d'un patient à l'autre allant de fins dépôts filamenteux chez certains à de gros dépôts infiltrant massivement les axes mésangiaux et débordant parfois sur les parois des capillaires glomérulaires périphériques chez d'autres. Ils sont généralement définitifs. Ils sont parfois encore visibles sur quelques glomérules même lorsque l'insuffisance rénale est sévère, permettant ainsi d'établir un diagnostic même à ce stade d'évolution (Pillebout 2016).

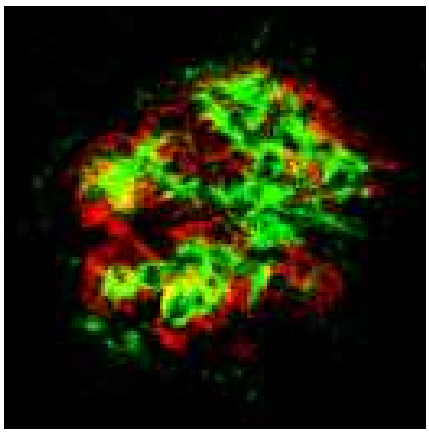


Figure 14 : Dépôts mésangiaux d'Immunoglobuline A dans un glomérule, détectés par immunfluorescence (vert pour IgA, rouge pour podocine comme marqueur des podocytes).

Il est important de noter que la présence des dépôts n'est pas nécessairement pathologique. Des dépôts d'IgA mésangiaux ont été découverts chez des sujets sains ne présentant aucun signe clinique de N-IgA. Cette observation a été réalisée sur des séries d'autopsies ou sur les biopsies pré-implantatoires avant transplantation rénale et a révélé que 2 à 16% des cas présentaient des dépôts d'IgA mésangiaux (Geddes 2003).

Les dépôts d'IgA dans le mésangium sont fréquemment associés à d'autres éléments tels que le composant C3 du complément et dans une moindre mesure l'IgG et l'IgM (Monteiro 2003). La fréquence des co-dépôts d'IgG est plus diversement appréciée. A l'inverse des autres glomérulopathies, la chaîne légère λ est plus fréquemment trouvée que la chaîne légère κ. Il a été démontré que l'IgA1 est systématiquement déposée dans le mésangium glomérulaire (Monteiro 2003). Dans certaines études, des traces d'IgA2 ont aussi été trouvés mais toujours co-déposés avec de l'IgA1. Aucun dépôt d'IgA2 sans IgA1 n'a été décrit. La néphropathie à IgA est donc une néphropathie à IgA1.

Les dépôts d'IgA1 mésangiaux peuvent être associés à différents types de lésions histologiques observables en microscopie optique sur des coupes de biopsie rénale. Ces lésions sont variables dans le rein d'un même patient et d'un patient à un autre (Haas 2005, Laurent-Pilonchéry 2008). Elles touchent les différentes parties du rein : les glomérules, les tubules et l'interstitium (Figure 13 page 47). Au niveau des glomérules, peuvent être observées une hypercellularité mésangiale notée M, une sclérose segmentaire notée S, et une hypercellularité endocapillaire notée E, et dans le reste du parenchyme rénal, peut apparaître une atrophie (c'est-à-dire une diminution du volume) tubulaire et une fibrose interstitielle, notées T. La sclérose se traduit par des plages de matière épaissie et fibreuse ; elle est dite segmentaire quand ces plages sont éparses dans le glomérule (Fogo 1999). Par le passé, d'autres lésions ont été étudiées comme la présence de hyalinose (présence d'une plage de matière homogène) ou l'infiltration du parenchyme rénal par les cellules immunitaires mais seules les quatre lésions M, E, S, et T ont été retenues comme capables collectivement de caractériser la N-IgA et de donner des marqueurs de pronostic.

Tableau 1 : Les scores de la classification d'Oxford

Variable	Définition	Score
Hypercellularité mésangiale (M)	< 4 cellules mésangiales / aire mésangiale = 0 4-5 cellules mésangiales / aire mésangiale = 1 6-7 cellules mésangiales / aire mésangiale = 2 8 cellules mésangiales / aire mésangiale = 3	Si la moyenne : < 0,5 = M0 > 0,5 = M1
Hypercellularité endocapillaire (E)	Hypercellularité par augmentation du nombre de cellules dans la lumière des capillaires glomérulaires	E0: absent E1: présent
Glomérulosclérose segmentaire (S)	Lésion fibreuse d'une partie (et non de l'ensemble) du flocculus ou présence d'une synéchie flocculocapsulaire	S0: absent S1: présent
Fibrose interstitielle/ Atrophie tubulaire (T)	Pourcentage du cortex concerné par l'atrophie tubulaire ou la fibrose interstitielle	0-25% T0 26-50% T1 >50% T2

Au fil du temps, les pathologistes ont proposé des classifications caractérisant des stades de la N-IgA : les premières classifications étaient dites en « classes » et n'utilisaient que les lésions

glomérulaires. Elles ont été longtemps utilisées comme celles de M HAAS ou celle de SM LEE (Haas 1997, Lee 1982). Un deuxième type de classification dites en « scores » est ensuite apparu ; elles reposent sur une évaluation semi-quantitative des lésions glomérulaires et du reste du parenchyme rénal. En 2009, un groupe de travail constitué de néphrologues et de pathologistes de dix pays différents s'est constitué à l'initiative conjointe de l'IGANN et de la *Renal Pathology Society*. Ce groupe a cherché un score simple, évaluable sur une section colorée avec le colorant appelé *Periodic Acid Schiff*, indépendant de l'échantillonnage, et donnant une bonne reproductibité entre les pathologistes. Pour cela, une cohorte de 265 biopsies rénales, dont 206 d'adultes et 59 d'enfants, collectées dans huit pays différents a été analysée. Cette étude a permis de définir un score dit d'Oxford qui fait actuellement consensus et s'établit sur au moins huit glomérules (Tableau 1 page 51). Le travail de ce groupe continue et le score est régulièrement affiné ; la dernière modification date de 2016 avec l'ajout d'un score supplémentaire, le score C qui tient compte de la présence de prolifération extracapillaire appelée croissant (Coppo 2010a, Robert 2013, Trimarchi 2017). Ces scores associés aux données cliniques (protéinurie, hématurie, hypertension) permettent de prévoir l'évolution de la N-IgA à 2 ans (Trimarchi 2017).

III.2.5. Traitements

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif efficace de la N-IgA, ni de traitement permettant de la prévenir. Néanmoins, un ensemble d'options thérapeutiques ont été proposées en 2012 dans le but de ralentir sa progression vers l'insuffisance rénale terminale (Boyd 2012). Il s'agit des recommandations établies par un panel d'experts appartenant à l'organisation internationale « Kidney Disease : Improving Global Outcomes » (KDIGO) en se basant sur les différentes études d'essais thérapeutiques. Ces recommandations peuvent être téléchargées sur le site http://kdigo.org/guidelines/gn/ .

Les recommandations tiennent compte, au diagnostic et lors du suivi du patient, de la présence de l'hématurie, du niveau de la protéinurie, du niveau de l'hypertension artérielle, des lésions histologiques et de la diminution du débit de filtration glomérulaire (DFG) qui apprécie la fonction rénale. L'ensemble de ces paramètres permettent de définir un risque d'évolution de la maladie, faible, intermédiaire ou fort, et d'adapter le traitement en fonction du risque. Comme pour toutes maladies rénales, les recommandations de KDIGO indiquent que tous les patients, quel que soit leur risque d'évolution, doivent être systématiquement suivis sur une base régulière pendant plusieurs années et que les patients doivent suivre, le cas échéant, des mesures hygiéno-diététiques comme le sevrage tabagique, l'adaptation de leur régime alimentaire, la correction du surpoids, et la pratique d'exercices physiques. Pour certains sujets jugés comme n'étant pas à risque faible de voir leur maladie évoluer, aucun traitement médicamenteux n'est proposé. Pour les sujets dont la maladie est à risque d'évoluer, un traitement est recommandé ; celui-ci n'est pas spécifique de la N-IgA mais est proposé dans toutes les glomérulopathies protéinuriques. Il s'agit

toujours d'un traitement néphroprotecteur, en particulier des anti-hypertenseurs comme les bloqueurs du système rénine/angiotensine, qui, en cas de risque fort d'évolution, est complété par les anti-inflammatoires de type corticostéroïdes. Les bloqueurs du système rénine/angiotensine sont soit les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) ou les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA2) et parfois les deux types sont utilisés simultanément ; ils ont montré leur efficacité sur la N-IgA en faisant diminuer la protéinurie dans de nombreuses études (Cheng 2009a, Li 2006, Magistroni 2015, Praga 2003, Russo 2001). Plusieurs équipes ont étudié l'effet de la corticothérapie et ont globalement montré un effet bénéfique sur la protéinurie et la fonction rénale (Cheng 2009b, Katafuchi 2008, Lv 2009, Manno 2009, Samuels 2004, Zhou 2011). Les huiles de poisson concentrés, qui contiennent une grande porportion de lipides ω3, sont aussi recommandés par KDIGO pour leur effet potentiellement protecteur sur le système cardiovasculaire alors que les études réalisées ont donné des résultats globalement controversés (Alexopoulos 2004, Donadio 1994, Donadio 2001, Ferraro 2009, Grande 2005).

De nombreuses études menées récemment ont évalué l'efficacité de molécules immunosuppressives comme le cyclophosphamide, l'aziathioprine, le mycophénolate mofétil et l'ablation des tonsilles qui est largement pratiquée au Japon suite au constat que la N-IgA se manifeste souvent au moment d'infections des voies aériennes supérieures et d'inflammation des tonsilles (Bene 2004, Hotta 2001, Komatsu 2008, Xie 2003). Du fait de résultats peu convaincants ou controversés avec les molécules immunosuppressives (Ballardie 2002, Frisch 2005, Maes 2004, Pozzi 2010, Stangou 2011, Tang 2010) et de l'absence d'étude d'amydalectomie en dehors du Japon, KDIGO ne recommande pas ces solutions thérapeutiques dans la N-IgA.

III.2.6. Traitement de suppléance lors de l'insuffisance rénale terminale

Dans toutes les pathologies rénales, y compris la néphropathie à IgA, l'insuffisance rénale terminale nécessite un traitement de suppléance qui est soit une dialyse, soit une transplantation rénale. Toutes les glomérulonéphrites sont sujettes à des récidives sur le greffon. La néphropathie à IgA n'échappe pas à cela. J BERGER est le premier a rapporté ce phénomène dès 1969 sur un patient puis l'a confirmé sur une population de malades en 1975 (Berger 1975). Le taux de récidive des dépôts mésangiaux d'IgA1 dans les glomérules du greffon est estimé en moyenne à 33% des cas, mais cette moyenne couvre d'énormes variations allant de 9% à 61% selon les centres (Ponticelli 2010). Ces variations dépendent de la politique du suivi des greffons par biopsie systématique ou non et de la durée de suivi après la transplantation rénale. Le taux de récidive est de 13% à 50% dans les centres qui font une biopsie seulement après apparition des signes cliniques comme l'hématurie, la protéinurie voire un syndrome néphrotique, ou la diminution du DFG. Le taux de récidive est évalué à 50-60% dans les centres qui font des biopsies systématiquement après la transplantation. La récidive des dépôts est mise en évidence entre 0,3 et 213 mois après la greffe (Kessler 1996, Ponticelli 2010). La perte du greffon est estimée de 2% à 16% sur une période de 5

ans en raison de la récidive de la maladie (Briganti 2002, Couser 2005). En cas de retransplantation, le risque de récidive devient plus élevé. Il est estimé de 20% à 100% avec un risque de perte du greffon variable selon les séries. A noter que la survie du greffon à 10 ans est similaire chez les patients greffés suite à une N-IgA ou pour d'autres néphropathies.

Différents groupes ont évalué l'effet de traitements anti-inflammatoires ou anti-suppresseurs sur l'incidence de la récidive et ont montré un effet bénéfique des corticoïdes et de traitements innovants comme des *Anti-Thymocyte Globulin* (ATG), mais pas de la cycloporine ou du mycophénolate mofétil (Berthoux 2008, Clayton 2011).

III.3. Physiopathologie

Les différentes études, sur les prélèvements de malades, sur des cellules *in vitro* ou dans les modèles animaux, menées sur la N-IgA depuis sa première description en 1968, mises bout à bout, ont permis de faire des progrès remarquables dans la compréhension de la physiopathologie de la maladie même s'il reste encore des zones d'ombre à éclaircir. Les études convergent vers l'importance des pIgA et des complexes contenant l'IgA dans la N-IgA. Certains estiment que ces complexes comprennent les IgA associées à la forme soluble de CD89 et d'autres qu'il s'agit de complexes immuns dans lesquels les IgA de la N-IgA, à cause d'anomalies de glycosylation, sont reconnues comme un antigène et sont associées à des Ig spécifiques. La mise en évidence de complexes immuns dans la N-IgA a conduit récemment à l'idée que la N-IgA est une maladie auto-immune. L'importance des complexes immuns dans la N-IgA et la présence presque systématique de fraction C3 du complément dans les dépôts d'IgA mésangiaux permettent aussi de proposer un rôle clé du système du complément dans la N-IgA. Enfin, il ne fait aucun doute qu'il existe des facteurs génétiques de susceptibilité à développer la N-IgA mais ceux-ci ne contribueraient qu'à 5% de la maladie (Kiryluk 2012). Le développement de la N-IgA serait très largement dépendant de facteurs environnementaux.

III.3.1. Les immunoglobulines A polymériques et complexées à d'autres protéines

Environ 50% des patients atteints de N-IgA présentent un taux d'IgA sérique de deux à trois fois plus élevé que les sujets sains avec un déséquilibre en faveur de la sous-classe IgA1 (Novak 2008). De plus, dans la N-IgA, il y a une augmentation du ratio pIgA1 : mIgA1 circulants où les pIgA1 peuvent être des dimères d'IgA1 ou des IgA1 agrégées probablement entre elles ou avec d'autrres protéines ou incluses dans des complexes protéiques. Les complexes circulants contenant des IgA1 peuvent être divisés en deux groupes chez les patients N-IgA en fonction de leur poids moléculaire : les complexes à haut poids moléculaire, supérieur ou égal à 800 kDa, et les complexes à faible poids moléculaire, inférieur à 800 kDa (Knoppova 2016). Dans les agrégats et complexes contenant des IgA1, différentes molécules ont été trouvées comme la fibronectine, des

antigènes de micro-organismes ou alimentaires tels que la gliadine, la forme soluble de CD89 ou d'autres Ig (van der Boog 2005).

Afin d'établir l'importance des pIgA1 et des complexes contenant des IgA1 dans la N-IgA, leur taux a été évalué dans la circulation et comparé à l'activité de la N-IgA et à la récidive post-transplantation. Les pIgA1 et les complexes ont aussi été recherchés dans d'autres pathologies et chez les sujets sains. Il ressort de ces études qu'aucun paramètre, que ce soit les pIgA1, les IgA1 anormalement glycosylées, les IgG anti-IgA anormalement glycosylées et les IgA associée au CD89 soluble, n'est spécifique de la N-IgA (Gharavi 2008, Tissandié 2011, van der Boog 2003). Des résultats controversés ou négatifs ont été obtenus lorsqu'une corrélation a été recherchée entre l'activité de la N-IgA et les taux d'un paramètre soit les pIgA1, soit les IgA1 anormalement glycosylées ou encore les IgA associées au CD89 soluble (Jhee 2017, Vuong 2010). Par contre, la combinaison des taux d'IgA1 anormalement glycosylées et d'anticorps anti-IgA anormalement glycosylée avec ou non les taux d'IgA associées au CD89 soluble a une valeur pronostique sur l'évolution de la N-IgA et sur la récidive post-transplantation (Berthoux 2012, Berthelot 2015, Berthoux 2017, Placzek 2018).

Quelques auteurs ont élué les IgA1 des glomérules de sujets avec N-IgA et ont constaté qu'ils sont enrichis en pIgA1 (Monteiro 1985). De plus, par immunohistochimie, d'autres études ont montré la présence dans certaines séries de la chaîne J et de SC dans les dépôts ainsi que de la forme soluble de CD89 et d'Ig en particulier d'IgG (Oortwijn 2007, van der Boog 2005). La recherche de la fibronectine, des antigènes de micro-organismes ou alimentaires dans les glomérules n'a pas donné de résultas convaincants (van der Boog 2005).

In vitro, il a été montré que les pIgA1, les IgA1 agrégées ou incluses dans des complexes activent puissamment les cellules mésangiales par rapport aux IgA1 monomériques (Fabiano 2016, Mestecky 2013, Suzuki 2011, van der Boog 2005). Les complexes à haut poids moléculaire, à l'inverse de ceux de faible poids moléculaire, sont capables d'activer les cellules mésangiales en induisant leur prolifération, une surproduction de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou le TNF-α, et de facteurs favorisant la production de la matrice extracellulaire comme le TGF-β (Novak 2005, Novak 2011). Les complexes immuns contenant l'IgA1 anormalement glycosylée reconnue par un IgG activent et font proliférer les cellules mésangiales humaines primaires alors que les IgA1 anormales hors complexes ou des complexes immuns dépourvus d'IgA1 anormales ne possèdent pas ces capacités (Novak 2005, Novak 2007). De plus, la prolifération des cellules mésangiales est d'autant plus marquée que les complexes contiennent des quantités importantes d'IgA1 anormales.

L'activation des cellules mésangiales par les pIgA1 anormalement glycosylées, qui est liée à l'expression du TfR/CD71 sur ces cellules (Moura 2001, Moura 2004, Moura 2005, Robert 2015),

est considérée comme l'étape initiale dans l'induction des lésions histologiques et du dysfonctionnement glomérulaire se traduisant par la protéinurie (Moura 2008). Ainsi, la prolifération des cellules mésangiales contribue à l'hypercellularité mésangiale (lésion M) et la production de facteurs favorisant la synthèse de matrice extracellulaire est certainement impliquée dans la sclérose segmentaire (lésion S). La libération de cytokines pro-inflammatoires peut recruter et activer localement des cellules immunitaires comme les monocytes et les PMN (Lai 1996a, Lai 1996b, Lai 2005, Sekikawa 1998). Les monocytes comme les PMN portent CD89 et sont activables aussi par les pIgA1 et pIgA1 peut contribuer à leur recrutement dans le mésangium (Kanamaru 2007). Le recrutement des cellules immunitaires peut expliquer en partie l'hypercellularité mésangiale (lésion M) et endocapillaire (lésion E). Les cellules mésangiales *via* les produits qu'elles libèrent comme les cellules immunitaires activées localement peuvent modifier la barrière de filtration glomérulaire en agissant sur ses composants cellulaires : les cellules endothéliales et les podocytes (Lai 2009, Lai 2012, Liang 2017). Cette modification de la barrière de filtration glomérulaire, en particulier l'altération de la perméabilité podocytaire, est connue pour provoquer la protéinurie. Récemment, une corrélation a pu être faite, sur des coupes de biopsies rénales, entre le niveau d'activation des cellules mésangiales et la protéinurie de sujets atteints de N-IgA (Tamouza 2012).

III.3.2. Les complexes immunoglobuline A - CD89 soluble

Dans la N-IgA, le CD89 soluble est retrouvé dans la circulation à un taux plus élevé que chez les sujets sains et il est aussi retrouvé plus fréquemment associé aux complexes circulants contenant l'IgA1 (Grossetete 1998, Launay 2000). Les patients N-IgA présentent une diminution de l'expression membranaire de CD89 sur les monocytes circulants mais pas sur les PMN, sans qu'il y ait de défaut transcriptionnel de CD89. L'activation avec des pIgA de cellules transfectées pour exprimer CD89 à leur surface conduit au clivage de CD89 donnant naissance au CD89 soluble. De ces résultats, les auteurs de l'étude ont conclu que le CD89 soluble retrouvé dans la circulation des sujets avec N-IgA provient de l'activation des monocytes circulants par pIgA1 (Grossetete 1998). Quelques études ont rapporté la présence de CD89 soluble dans les dépôts mésangiaux glomérulaires chez les patients atteints de N-IgA.

Le rôle du CD89 dans la pathogenèse de la N-IgA a été étudié chez la souris transgénique (Tg) pour CD89 humain où le transgène est placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la lignée myéloïde murine, celui du gène de CD11b, et conduit à une forte expression de CD89 à la surface des monocytes mais pas de PMN. Ces souris ont spontanément du CD89 soluble dans la circulation qui forme des complexes avec les IgA murines (Launay 2000). Les souris âgées de 2 ans présentent des dépôts d'IgA mésangiaux, une protéinurie modérée et une hématurie. L'injection de sérum de souris CD89Tg ou au contraire d'IgA de sujets avec N-IgA à des souris exprimant CD89 provoquent l'apparition d'une hématurie macroscopique transitoire dans les jours qui suivent

l'injection. Cet effet n'est pas retrouvé si le sérum de souris CD89Tg est préalablement déplété en CD89 ou si des IgA de sujets sains sont utilisés. Dans cette étude, l'injection de sérum de souris CD89Tg induit l'apparition de dépôt d'IgA murine dans le mésangium ; ce résultat n'a pas été reproduit lorsque du CD89 soluble humain recombinant a été injecté (van der Boog 2004), ce qui a été mis sur le compte d'une faible affinité des IgA murine pour le CD89 soluble humain recombinant. Les souris CD89Tg ont ensuite été croisées avec les souris α1KI exprimant une IgA1 chimérique humaine, ce qui a permis d'obtenir les signes cliniques de la N-IgA, y compris les lésions histologiques, précocément soit dès l'âge de deux mois (Berthelot 2012). Ces signes sont en partie dépendant de l'activation de CD71 au niveau du mésangium rénal à la fois par les IgA1 et CD89 (Berthelot 2012). Ces signes ne sont pas présents chez la souris α1KI à cet âge (Berthelot 2012, Oruc 2016). Lorsque les souris co-exprimant CD89 humain et IgA1 chimérique humaine ont été soumises à un régime sans gluten, les signes de la N-IgA se sont atténués, ce qui a été attribué à la disparition de complexes circulants néphrotoxiques entre les IgA1 chimérique, la gliadine provenant du gluten et le CD89 soluble (Papista 2015).

Un autre groupe a généré des souris exprimant CD89 humain dans les monocytes et leurs cellules dérivées sous le contrôle du promoteur du gène de CD14. Ces souris ne développent pas de signes de N-IgA à l'âge de 1 an. Elles n'ont pas été examinées au-delà de cet âge (Xu 2016). Contrairement aux souris CD89Tg sous le contrôle du promoteur de CD11b, celles-ci ont un taux circulant d'IgA très diminué amenant les auteurs à en rechercher la cause. La diminution des IgA murines circulantes s'est avérée être dû à l'expression de CD89 par les cellules de Kupffer et à leur clairance hépatique accrue. De façon intéressante, l'incubation des cellules de Kuppfer avec des IgA1 humaines de malades provoquent l'apparition de CD89 soluble dans le surnageant de culture et l'injection des IgA1 humaines de sujets avec N-IgA à des souris CD89Tg sous le contrôle du promoteur de CD14 induit l'apparition de signes de N-IgA. Ces effets ne sont pas observés avec les IgA1 de sujets sains.

III.3.3. Les complexes immuns avec les immunoglobulines A hypogalactosylés

Dès 1990, il apparaît évident que les IgA circulants des sujets avec N-IgA sont anormales, car ils se fixent moins bien à la lectine jacaline que les IgA des sujets sains (Andre 1990). Ce résultat conduit à l'hypothèse que les IgA de sujets avec N-IgA présentent un défaut de glycosylation. De nombreuses études ont ensuite été menées et il est actuellement admis que le défaut de glycosylation se situe au niveau de la région charnière et consiste en une hypogalactosylation des IgA1. Celle-ci peut être mise en évidence facilement par un dosage utilisant une lectine particulière provenant de *Helix Aspersa* et définie comme HAA (pour *Helix Aspersa Agglutinin*), qui reconnaît les O-GalNAc dès lors qu'ils ne sont pas liés à un sucre Gal. Cette lectine HAA est communément utilisée actuellement dans les études cliniques sur la N-IgA, et a permis de montrer dans de nombreuses études que les patients atteints de N-IgA présentent une forte augmentation de

molécules d'IgA1 circulantes déficientes en galactose (Gd-IgA1) par rapport à des individus sains ou atteints d'autres pathologies rénales (Hiki 1998, Hiki 1999, Magistroni 2015, Mestecky 2013, Novak 2008, Renfrow 2005, Suzuki 2011). L'hypogalactosylation a été confirmée par quelques groupes par spectrométrie de masse. L'hypogalactosylation n'est pas retrouvée sur les IgD des sujets avec N-IgA suggérant que les altérations dans le processus d'O-glycosylation ont lieu spécifiquement dans les cellules B productrices d'IgA1 (Smith 2006). Les Gd-IgA1 sont aussi retrouvées déposées dans le mésangium glomérulaire comme dans les IgA1 produites par les lymphocytes B de la périphérie, de la moelle osseuse, des MALT et dans les IgA1 extraites d'amygdales de sujets atteints de N-IgA (Allen 2001, Berthoux 2015, Hiki 2001, Itoh 2003, Suzuki 2009). Une augmentation de sialylation de l'IgA1 a été également rapportée chez les patients N-IgA (Leung 2002).

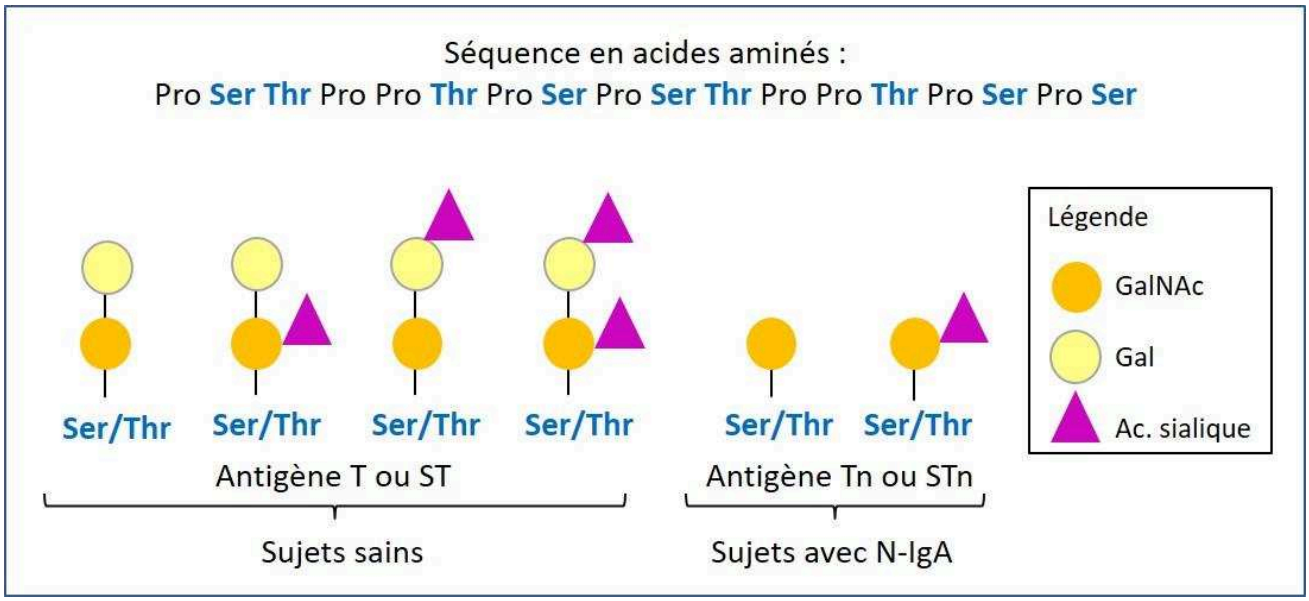


Figure 15 : La région charnière de l'immunogobuline A1 et ses O-glycosylations.

Dans les IgA1, la O-glycosylation n'est pas identique sur tous les résidus de la région charnière ; certains résidus porte un antigène T, c'est-à-dire un GalNAc-Gal, d'autres un antigène ST contenant GalNac-Gal et un acide sialique, un antigène Tn soit GalNAc, ou un antigène STn soit GalNac et un acide sialique (Figure 15). Chez les sujets atteints de N-IgA, il y a une plus forte proportion de Tn et STn que dans les IgA1 des sujets sains, ce qui se traduit par une hypogalactosylation pouvant résulter d'une diminution de l'activité du système enzymatique responsable du transfert de Gal sur GalNAc, Bet3-GalT-8/C1GALT1 et C1GALT1C1, et/ou d'une sialylation prématurée de GalNAc empêchant le transfert de Gal. Ces hypothèses ont été testées dans des lignées de cellules B provenant de malades et de sujets sains ; plusieurs équipes ont trouvé une diminution de l'activité et de l'expression de Bet3-GalT-8/C1GALT1 et de C1GALT1C1 et de sialyl-transférases (Allen 1997, Inoue 2007, Li 2007, Suzuki 2009). Récemment, différentes équipes ont étudié l'expression des micro-ARN (miR) qui sont des régulateurs puissants de l'expression de gènes (Fabiano 2016,

Serino 2012, Serino 2015). Ils ont mis en évidence une corrélation négative entre la diminution de l'expression du gène *C1GALT1* et l'expression de miR-148b, et ont rapporté une augmentation de l'expression du miR let-7b qui diminue le niveau d'expression de la GalNAc transferase, l'enzyme qui permet l'ajout de GalNAc sur les résidus sérines et thréonine de la région charnière des IgA1.

Les Gd-IgA1 sont reconnus par des anticorps de classe IgG ou IgA1 anti-glycanes qui seraient produits en réponse à des infections dans les muqueuses (Suzuki 2007, Magistroni 2015). Par réaction croisée, il apparaît alors des complexes immuns (Suzuki 2011, Yeo 2017). Les complexes immuns Gd-IgA1 / Ig anti-Gd-IgA1 ont été caractérisés en 1999 par le groupe de J MESTECKY (Tomana 1999) qui a montré que les Ig anti-Gd-IgA1 sont des IgG, principalement des IgG2, ou des IgA1. Plus tard, le même groupe a démontré que les IgG anti-Gd-IgA1 ont une particularité dans la zone hypervariable CDR3 qui présente un résidu sérine au lieu d'une alanine. La substitution de résidu sérine par l'alanine diminue la capacité de liaison de l'IgG aux Gd-IgA1. A l'inverse, l'introduction d'un résidu sérine à la place de l'alanine augmente la liaison aux Gd-IgA1 hypogalactosylées (Suzuki 2009, Knoppova 2016). L'apparition du résidu sérine dans le CDR3 de la chaîne lourde de ces auto-anticorps IgG résulte de mutations somatiques et n'est pas le résultat d'un variant rare d'un segment V_H (Huang 2016). Dans deux résumés de communication en congrès, le groupe de J MESTECKY indique que les complexes Gd-IgA1 liées par des anticorps IgG anti-glycanes ont été injectés à des souris : des dépôts mésangiaux avec C3, une prolifération mésangiale, de l'hématurie et de la protéinurie ont pu être observés (Knoppova 2016).

Certains auteurs ont proposé que la taille des complexes contenant les Gd-IgA1 limite leur passage à travers les capillaires fenestrés du foie vers les espaces de Disse où il pourrait entrer en contact avec le récepteur ASGPR porté par les hépatocytes. De plus la présence d'Ig anti-Gd-IgA1 masquerait les GalNAc libres qui seraient normalement reconnus par l'ASGPR. Le catabolisme de ces IgA1 anormales serait donc diminué, ce qui contribuerait à l'augmentation de leur taux circulant (Mestecky 2013).

Plusieurs modèles animaux ont permis de montrer que la glycosylation des IgA est importante pour le développement de la N-IgA. L'injection d'IgA polyclonales de sujets sains à des rats provoque l'apparition de dépôt mésangial d'IgA si les IgA humaines ont été préalablement désialylées ou désialylées et dégalactosylées (Sano 2002).

L'importance de la glycosylation pour le dépôt a aussi été mis en évidence dans des études chez la souris. L'injection d'IgA1 humain conduit à des dépôts mésangiaux dans des souris qui n'ont pas été préalablement immunisées par un peptide synthétique de la région charnière, puis par des rappels avec l'IgA1 désialylée et dégalactosylée (Hiki 2008). Cette étude suggère, cependant, que les Ig anti-région charnière seraient protecteur vis-à-vis du dépôt plutôt que néphrotoxiques. Dans

une autre étude, des hybridomes produisant des IgA murin anti-IgG2a ont été greffés dans le péritoine de souris ; les dépôts mésangiaux et les lésions et l'histologie rénales ont été analysées deux à trois semaines après la greffe (Kihara 2014, Otani 2012). Des dépôts d'IgA ont été détectés pour tous les hybridomes, mais le dépôt était particulièrement intense pour l'hybridome 6-19 dont la région charnière est la plus O-glycosylée, enrichie en Gal, et qui présente des N-glycosylations plus complexes. Seul l'hybridome 6-19 provoque un co-dépôt d'IgG2a et de fraction C3 du complément ainsi qu'une prolifération mésangiale, une sclérose segmentaire et une inflitration des glomérules par des PMN. L'importance de la glycosylation est illustrée aussi par le modèle murin déficient pour la Beta4-GalT-1, une enzyme qui ajoute un Gal à un N-Acétyl-D-Glucosamine (GlcNAc) de O- ou de N-glycanes. L'absence de cette enzyme provoque le dépôt mésangial d'IgA murine, une protéinurie chez toutes les souris et une hématurie chez certaines (Nishie 2007).

Enfin, le modèle de souris ddY suggère aussi que la glycosylation peut jouer un rôle dans l'évolution de la N-IgA. En 1985, le groupe de AB MIURA montre que les souris ddY développent spontanément une glomérulonéphrite avec des dépôts importants d'IgA dans le mésangium glomérulaire accompagnés d'IgG, d'IgM et de C3. Les dépôts d'IgG prédominent au début et les dépôts d'IgA ne deviennent majoritaires que vers l'âge de 1 an. Les souris présentent des taux élevés d'IgA polyclonales dans le serum, une protéinurie qui augmente avec l'âge, une prolifération des cellules mésangiales associée à une augmentation de la matrice mésangiale, mais pas d'hématurie. Elles sont caractérisées par de fortes variabilités selon l'âge d'apparition et la sévérité de la maladie (Imai 1985). Ces souris ont été classées en plusieurs catégories en fonction de la vitesse d'apparition de la maladie et les lésions histologiques : groupe à début précoce, groupe à début tardif et groupe quiescent, ne développant pas de glomérulonéphrite. Les souris ddY du groupe à début précoce ont été croisées entre elles pendant plus de vingt générations dans le but d'obtenir une lignée pure à phénotype précoce (Okasaki 2012). Les souris obtenues ont été appelées *grouped ddY* ; elles développent toutes de la protéinurie à l'âge de 2 mois et une insuffisance rénale à l'âge de 6 mois. Les examens histologiques montrent des lésions glomérulaires et tubulo-interstitielles sévères caractérisées par une prolifération cellulaire mésangiale, une glomérulosclérose et des infiltrations interstitielles. Des dépots d'IgA glomérulaires accompagnés de co-dépôts d'IgG, d'IgM et de C3 ont été également observés. Dans ce modèle de N-IgA, les mâles montrent une atteinte plus importante que les souris femelles. Chez les mâles deux sous-groupes se distinguent sur la base de la mortalité des souris. Les souris qui meurent le plus rapidement sont celles qui ont l'allotype d'IgA le moins glycosylé.

A noter que dans un modèle murin, l'importance de la glycosylation n'a pas été vérifiée pour le dépôt mésangial des IgA. En effet, l'injection d'IgA1 monoclonales chimériques humaines produites à partir d'hybridome de souris α1KI est suivie du dépôt mésangial de certaines IgA1, mais le dépôt est sans lien avec leur état de glycosylation (Oruc 2016).

III.3.4. Importance du système du complément

Plusieurs données permettent d'argumenter en faveur d'une activation du système du complément dans la N-IgA, à la fois dans la circulation et dans les glomérules (Figure 11 page 41) (Magistroni 2015, Maillard 2015). Dans la circulation, les produits dérivés de C3, qui traduisent son activation, sont augmentés chez les sujets avec N-IgA et sont retrouvés dans les complexes de haut poids moléculaire contenant la Gd-IgA1. Dans le mesangium, différents groupes ont montré la présence de la properdine, un activateur de la voie alterne, et de différents activateurs de la voie des lectines tels que la MBL, mais pas du C1q, l'activateur de la voie classique (Knoppova 2016, Magistroni 2015, Maillard 2015, Rauterberg 1987). Le C4 et un de ses dérivés d'activation sont aussi présents dans le mésangium des malades avec N-IgA ; du fait de l'absence de C1q, l'activation de C4 résulte certainement de la mise en jeu de la voie des lectines. C3 est aussi retrouvé dans le mésangium chez les malades. En dépit de la présence du facteur H, inhibiteur de la voie alterne, dans les dépôts (Wyatt 1988), le C3 est probablement activé puisque certaines études ont pu mettre en évidence le produit final de l'activation du complément, à savoir le complexe MAC C5b-C9. Celui-ci est aussi retrouvé avec une concentration élevée dans les urines des patients avec N-IgA.

Il a été rapporté que les complexes immuns contenant Gd-IgA1 peuvent induire l'expression du composant C3 par les cellules mésangiales (Schmitt 2014). Les cellules mésangiales peuvent produire le facteur H. Par ailleurs, des expériences réalisées *in vitro* ont montré que des stimuli inflammatoires, comme le C3a et le C5a, issus du clivage de C3 et C5 respectivement, induisent une augmentation des cytokines pro-inflammatoires, de composants de la matrice extracellulaire comme de l'inhibiteur du complement *Decay Accelerating Factor* (DAF) par les cellules mésangiales et les faits proliférer (Maillard 2015, Wan 2007, Zhang 2017). L'utilisation d'antagonistes des récepteurs de C3a et de C5a montre que l'effet de C3a et de C5a passe par les récepteurs sur les cellules mésangiales (Zhang 2017). Les auteurs ont ensuite étudié l'importance de l'activation du complément *in vivo* et l'ont mise en évidence dans un modèle murin de N-IgA déficient en récepteur de C3a ou de C5a. Les signes de la N-IgA induits par une infection nasale chronique de 3 mois avec le virus Sendai suivi de deux rappels intraveineux (i.v.) sont atténués chez les souris déficientes en récepteur de C3a ou de C5a (Zhang 2017). Enfin, le MAC peut agir sur les cellules mésangiales et les podocytes sans les lyser, ce qui est rarement le cas sur les cellules nucléées, mais en entrainant un stress cellulaire qui résulte en la production de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs favorisant la production de matrice extracellulaire (Cybulsky 2000, Knoppova 2016).

III.3.5. Génétique de la néphropathie à IgA

L'implication de facteurs génétiques dans la survenue de la N-IgA est suspectée assez rapidement après la première description en 1968. Cette suspicion est basée sur des observations d'ordre

clinique et épidémiologique rapportées par différentes équipes à travers le monde (Julian 1988b, Levy 1993, Schena 1995, Scolari 1992), et qui sont :

- la présence de cas multiples (au moins deux) de N-IgA avérée au sein d'une même famille ou d'un individu avec une N-IgA avérée apparenté avec des personnes ayant des signes évocateurs de N-IgA comme une protéinurie et une hématurie,
- des familles où certains membres sont atteints de la maladie et d'autres d'un purpura rhumatoïde,
- des cas de vrais jumeaux atteints conjointement de la maladie,
- mais aussi les disparités qui existent dans la prévalence de la maladie selon les régions et les origines ethniques comme décrit plus haut dans ce manuscrit.

De plus, dans différentes séries de sujets asiatiques et caucasiens, la quantité d'IgA1 anormales a été mesurée dans le serum d'un grand nombre de sujets sains asymptomatiques pour la N-IgA, mais ayant chacun des apparentés atteints de la maladie. Les résultats montrent un taux d'IgA1 anormalement glycosylées similaire chez ces sujets et leurs apparentés atteints de N-IgA alors que ce taux était moins élevé dans un groupe contrôle non apparenté vivant dans le même environnement (Gharavi 2008, Kiryluk 2011, Lin 2009).

Il est important de souligner qu'aucune caractéristique clinique ne permet de différencier les formes familliales des formes sporadiques: ni l'âge moyen d'apparition de la maladie, ni l'importance de l'hématurie, de la protéinurie ou du pronostic rénal (Julian 1988a, Julian 1998b)

De nombreuses études ont été menées dans le but d'identifier le ou les facteurs génétiques pouvant être impliqués dans le développement de la N-gA. Deux approches ont été utilisées pour parvenir à cette fin : les études de liaison génétique dans les formes familiales et les études d'association génétique soit de type cas-témoins basées sur une approche dite de gène candidat soit pangénomiques connues sous le nom de *Genome Wide Association Study* (GWAS) (Kiryluk 2013, Kiryluk 2014b). Les premières études de cas-témoins ont été menées sur des cohortes Européennes dès la fin des années 1970 et la première étude sur une population asiatique a été publiée en 1984 (Feehally 2015, Zhu 2015). Les études d'association dans la N-IgA ont porté principalement sur les gènes du système rénine-angiotensine, ceux des enzymes de la glycosylation, des récepteurs aux Ig et des cytokines ainsi que de leurs récepteurs. Au total près de 150 études ont été menées, mais la majorité sur des populations relativement restreintes comprenant moins de 150 individus. Plus des deux tiers des études ont permis d'identifier des associations positives, mais une majorité d'entre elles n'ont pas été retrouvées dans les études ultérieures. Parmi les polymorphismes décrits comme des facteurs de risque de développement de la N-IgA ou de progression, citons le polymorphisme des gènes C1GALT1 et C1GALT1C1, de celui du CD89, de pIgR (Narita 2001, Obara 2003), de TLR1 (Gao 2016), de TLR9 (Sallustio 2015), de

CD14 (Yoon 2003), le corécepteur de TLR4 pour le LPS, ou encore du gène codant le facteur majeur de la CSR vers la classe IgA, le TGF-β.

A ce jour, les résultats de trois études GWAS indépendantes ont été publiés (Feehally 2010, Gharavi 2011, Yu 2011) ainsi qu'une méta-anlyse incorporant les populations des trois GWAS (Kyriluk 2014a). Ces études incluaient des contrôles, des cas familiaux et des cas sporadiques, de populations asiatiques (Chine et Japon), européennes (Allemagne, France, Grande-Bretagne, Hongrie, Italie, République Tchèque, Pologne, Turquie) et nord-américaines (Etats-Unis). La taille des cohortes, de découverte ou de confirmation, était de 430 individus pour la plus petite à 2700 pour la plus grande. Les différentes études de GWAS montrent des fréquences alléliques cohérentes aux données épidémiologiques de la maladie. Ainsi, le nombre moyen d'allèles de risque le plus élevé est reporté chez les asiatiques de l'Est où la prévalence de la maladie est la plus élevée alors que le nombre le plus bas se trouve chez les populations d'origine africaine qui sont rarement affectées par la maladie. Ces études ont permis d'identifier des loci de susceptibilité portés au niveau des régions chromosomiques 1p13, 1q32, 6p11, 6p21, 8p23, 9q34, 17p13 et 22q12. Dans ces loci, on retrouve des gènes de l'immunité adaptative comme ceux codant les molécules du CMH, des gènes de l'immunité innée des muqueuses avec par exemple ceux codant les défensines, des gènes de facteurs régulateurs du système du complément, et enfin des gènes réguation la régulation la production des IgA comme celui de TNFSF13/APRIL. De façon étonnante, ces études n'ont pas mis en lumière des loci contenant des gènes liés à la glycosylation des IgA. Le locus de la région 6p21 avec les gènes du CMH est mis en évidence dans les trois études de GWAS et dans la méta-analyse et concerne à la fois les populations asiatiques et caucasiennes. Au contraire, l'association de l'N-IgA avec les loci des régions 6p21 et 8p23 est limitée à la population asiatique. La plupart des loci mis en évidence a été incriminé dans des maladies du système immunitaire, et en particulier dans les MICI / IBD. Certains auteurs considèrent que ces résultats sont décevants, car s'ils appuient l'importance de l'immunité dans la N-IgA, ils ne permettent pas de révéler des mécanismes qui lui sont propres. Cependant, plusieurs facteurs peuvent expliquer ces résultats : une difficulté à phénotyper correctement les malades, mais également l'existence de plusieurs maladies sous le terme N-IgA ou encore une variation du phénotype en fonction de l'environnement, et donc un rôle important des modifications épigénétiques.

III.3.6. Rôle des facteurs environnementaux dans la N-IgA

De nombreux arguments laissent penser que la N-IgA est fortement dépendante des facteurs environnementaux et, en particulier, de l'alimentation et de l'environnement microbien avec un rôle important des muqueuses. D'ailleurs, actuellement on parle de l'importance de l'axe muqueuse-rein dans le développement de la N-IgA (Floege 2016). Le premier argument fréquemment cité en faveur d'un rôle des facteurs environnementaux est la découverte de la N-IgA chez des sujets qui consultent à cause de l'apparition d'épisodes d'hématuries macroscopiques concomittantes à des

infections des voies respiratoires, gastro-intestinales, uro-génitales ou des tonsilles dans la N-IgA (Coppo 2010a, Wyatt 2013).

Les différentes études montrent que les facteurs environnementaux jouent un rôle dans toutes les étapes de la N-IgA : de la production des IgA1 anormales (polymériques et hypogalactosylées) circulantes au développement de la maladie en passant par le dépôt des IgAs. La mise en évidence d'une augmentation des pIgA1 dans la circulation chez les sujets avec N-IgA comme la présence de ces pIgA1, et dans certaines études de la chaîne J et du SC dans le mésangium ont conduit à poser la question de l'origine des IgA1 pathogéniques. L'idée retenue est que les IgA1 néphrotoxiques seraient d'origine mucosale, soit par une hyperproduction d'IgA1 dans les muqueuses dont une petite partie passe dans la circulation, soit un routage accru vers la moelle osseuse de lymphocytes T contrôlant le CSR vers les IgA de type muqueux ou de certaines cellules B mémoires et de certains plasmocytes différenciés dans les MALT. Les IgA1 de type muqueux produits dans la moelle passeraient alors dans la circulation. En accord avec cette seconde hypothèse, il a été observé une diminution des plasmocytes sécrétant les IgA1 de type muqueux dans les muqueuses au cours de la N-IgA, alors qu'une augmentation de ces plasmocytes a été observée dans les sites systémiques en particulier dans la moelle osseuse (Harper 1994, Harper 1996). De plus les lymphocytes T circulants des sujets avec N-IgA expriment plus fortement des molécules de routage ou de *homing* vers la moelle osseuse que les cellules T des sujets sains (Batra 2007, Buren 2007).

Le rôle des muqueuses dans la N-IgA est aussi mis en évidence au travers des études des tonsilles qui contiennent une muqueuse et des MALT (Xie 2004). Les tonsilles des patients avec N-IgA présentent des différences histologiques notables concernant à la fois l'épithélium et l'organisation des cellules immunitaires par rapport aux tonsilles des sujets sains ou de malades avec amydgalites chroniques, mais sans N-IgA (Xie 2004). Une augmentation des pIgA est aussi observée dans les tonsilles des malades avec N-IgA par rapport aux autres sujets. Certaines études ont rapporté la présence, dans les dépôts, d'antigènes de la bactérie à Gram négatif *Haemophilus parainfluenza* fréquemment retrouvée dans les tonsilles (Xie 2004). Les anticorps dirigés contre cette bactérie sont enrichis dans la circulation des malades avec N-IgA (Xie 2004). Enfin, une méta-analyse sur l'effet de l'ablation des tonsilles a récemment montré son effet bénéfique chez les malades avec N-IgA (Liu 2015).

Des données issues des modèles murins α1KI et des souris TNFSF13B/BAFF-Tg renforcent aussi l'idée que l'IgA pathogénique dans la N-IgA est d'origine mucosale. Ainsi, le dépôt mésangial d'IgA dans les souris α1KI produisant de l'IgA1 chimérique humaine est quantitativement proportionnel aux taux d'IgA1 chimériques circulantes qui dépendent de la charge de l'environnement microbien y compris de la flore du tube digestif (Oruc 2016). Les souris BAFF-Tg ont des taux élevés d'IgAs plasmatiques, présentent spontanément des dépôts mésangiaux d'IgA et développent des signes

de la N-IgA ; ces anomalies sont dépendantes de la présence d'une flore digestive commensale (McCarthy 2011). Dans un autre modèle murin où les lymphocytes T surexpriment TNFSF14 (appelé aussi LIGHT) qui appartient à la même famille que TNFSF13B / BAFF, une inflammation de la muqueuse digestive, une augmentation de la production des IgA dans la muqueuse digestive, une diminution de leur transport dans la lumière, une augmentation drastique des taux circulants d'IgA, un dépôt mésangial d'IgA et de C3 ainsi qu'une hématurie sévère sont observées (Wang 2004). Enfin, de nombreux modèles de N-IgA chez la souris ou chez le rat sont obtenus par immunisations répétées avec des antigènes alimentaires ou des micro-organismes des muqueuses comme le virus Sendai, un virus des voies aériennes de différentes espèces de rongeurs (Suzuki 2014a, Zhang 2017). L'injection à des souris ddY du virus Coxsackie B4, un opportuniste qui affecte les voies aériennes chez l'homme, comme l'injection intranasale de ligands de TLR accélèrent la progression de la N-IgA (Kajiyama 2011, Kawasaki 2006, Maiguma 2014). Les TLR ont aussi été incriminés dans d'autres modèles animaux de la N-IgA ou leurs ligands utilisés pour générer des modèles de cette maladie (Chen 2015, Meng 2014, Zou 2017). A noter que, dans la souris ddY, la recherche de facteurs génétiques contribuant à la progression de la N-IgA a conduit à la mise en évidence de MyD88, l'adaptateur majeur des TLR (Suzuki 2008). Des associations génétiques ont aussi été trouvées chez l'homme pour certaines molécules de la voie des TLR (Gao 2016, Sallustio 2015, Yoon 2003) et l'expression de TLR4 sur les monocytes circulants corrèle avec certains paramètres cliniques de la N-IgA (Coppo 2010b).

Concernant la O-glycosylation, elle a lieu lors des stades tardifs du développement et de maturation des cellules B et il est admis actuellement que son défaut serait fortement lié à une régulation anormale induite par des stimuli acquis, en particulier au niveau des muqueuses (Coppo 2010a, Fabiano 2016). Il a été montré que le LPS et un facteur majeur de virulence de la bactérie à Gram négatif à tropisme digestif *Helicobacter pylori* provoquent un défaut de galactosylation des IgA produites *in vitro* par des cellules B qui serait lié à une diminution de l'expression de C1GALT1C1 (Qin 2008, Xie 2010, Yang 2014). Il a également été mis en évidence que les sujets avec N-IgA présentent une séropositivité plus importante pour *Helicobacter pylori* qui est portée par des IgA et que les IgA1 circulants spécifiques anti-*Helicobacter pylori* sont enrichis en Gd-IgA1 en comparaison aux IgA1 dirigés contre des antigènes systémiques tels que la toxine tétanique (Barratt 1999, Smith 2006, Zhu 2016). Les antigènes d'*Helicobacter pylori*, en particulier son facteur majeur de virulence, ne sont pas retrouvés au niveau des glomérules, mais l'ont été dans les tubules des patients avec N-IgA (Zhu 2016). De plus l'incubation de cellules mésangiales de rats avec le facteur majeur de virulence conduit à leur prolifération et à la production de molécules de la matrice extracellulaire (Wang 2016b). Cet effet est certainement à attribuer à l'activation de TLR exprimés par les cellules mésangiales (Allam 2009, Lim 2011, Patole 2006, Yiu 2011).

D'autres bactéries ont été incriminées en particulier les bactéries à Gram positif qui sont responsables des glomérulonéphrites post-infectieuses et qui sont de la famille des streptocoques ou *Staphylococcus aureus* (Nast 2012, Stratta 2014). Une augmentation des IgA anti-streptocoques ou dirigés contre des antigènes *Staphylococcus aureus* a été décrite dans la circulation des sujets avec N-IgA (Drew 1987, Kukuminato 1993, Shimizu 2007). Des antigènes de streptocoques et de *Staphylococcus aureus* ont été trouvés dans le mésangium de sujets avec N-IgA (Koyama 2004, Schmitt 2010). Deux groupes indépendants ont décrits l'obtention de modèles murins de N-IgA à partir de souris de souche BALB/c ou C57Bl/6 infectées avec un streptocoque ou immunisées avec des antigènes de *Staphylococcus aureus* (Meng 2014, Sharmin 2004, Zhang 2010).

Récemment, quelques équipes se sont intéressées aux microbiotes des sujets avec N-IgA en comparaison de celui de sujets contrôle. Des différences ont été décrites dans les microbiotes de la salive (Piccolo 2015) et des feces (De Angelis 2014) entre individus avec N-IgA et les contrôles mais ces différences n'ont pas été retrouvées dans le microbiote des tonsilles (Watanabe 2016). Il ressort de l'étude sur le microbiote intestinal que différentes espèces bactériennes sont enrichies, dont les streptocoques, ou au contraire diminuées chez les sujets avec N-IgA et que le microbiote présentant la plus faible diversité est présent chez les patients avec une N-IgA qui évolue comparativement aux sujets avec une maladie non évolutive.

Les antigènes alimentaires, comme la gliadine, une des protéines du gluten présente dans la farine de blé, ou des protéines de soja, du lait ou des oeufs, ont aussi été mis en cause dans la N-IgA. Différents groupes ont mesuré les taux d'IgA circulantes anti-antigène alimentaire spontanément ou en réponse à une ingestion de ces antigènes, ou encore, ont recherché la présence de ces antigènes dans les glomérules des sujets avec N-IgA ; des résultats très contrastés ont été obtenus (Coppo 2018, Floege 2016). Un groupe a décrit un modèle murin de N-IgA induit par le gluten (Coppo 1989) et un régime sans gluten a conduit à limiter la N-IgA induite dans les souris coexprimant l'IgA1 chimérique humaine et CD89 humain (Papista 2015). Dans une étude, des sujets avec N-IgA ont suivi pendant 6 mois un régime sans gluten, ce qui a conduit à une diminution de la proteinurie et de l'hématurie, mais également et de façon inattendue, à une augmentation de la créatininémie (Coppo 1990).

Parmi les muqueuses, la muqueuse digestive a été la plus étudiée dans la néphropathie a IgA. Différents groupes ont montré une modification de la perméabilité intestinale décrite comme augmentée chez les sujets avec N-IgA et une inflammation de la muqueuse digestive accompagnée d'une altération du compartiment des cellules T (Floege 2016). Chez les sujets avec N-IgA, une étude montre que le degré de l'inflammation duodénale, mesuré par l'expression d'une protéine inflammatoire, corrèle avec le niveau d'IgA circulante, la protéinurie et l'hématurie (Honkanen 2005). Aucune de ces modifications n'est cependant spécifique de la N-IgA ; elles sont également décrites

dans d'autres pathologies rénales. Enfin, plusieurs études ont montré une plus forte proportion de sujets avec N-IgA dans la population des malades atteints de la maladie coeliaque ou d'IBD (Floege 2016).

RESULTATS

De nombreux arguments chez l'homme comme dans les modèles animaux de N-IgA montrent que l'environnement microbien, en particulier bactérien, influence le développement de la maladie et/ou sa progression. En effet, l'hématurie macroscopique, un des signes qui révèle la maladie, survient rapidement chez les patients N-IgA après des infections bactériennes des voies respiratoires, urogénitales ou une perturbation gastro-intestinale (Coppo 2010a, Wyatt 2013). L'infection chronique des tonsilles, à la fois muqueuse et MALT au carrefour des voies respiratoires et digestives, a été associée à la N-IgA et une méta-analyse récente montre une certaine efficacité de l'ablation des tonsilles comme thérapie de la N-IgA (Liu 2015). Le taux des anticorps de classe IgA dirigés contre des antigènes bactériens, de bactéries à Gram négatif (*Haemophilus parainfluenza, Helicobacter pylori*) ou à Gram positif (*Streptococcus, Staphylococcus aureus*) est augmenté dans la circulation des sujets avec N-IgA (Barratt 1999, Drew 1987, Kukuminato 1993, Shimizu 2007, Smith 2006, Xie 2004, Zhu 2016). Dans certaines séries de patients, les antigènes de ces mêmes bactéries ont été trouvés dans le mésangium avec les dépôts d'IgA1 (Koyama 2004, Schmitt 2010). Différentes équipes ont reproduit certaines caractéristiques de la N-IgA chez des souris suite à l'injection d'antigènes des bactéries citées plus-haut (Meng 2014, Sharmin 2004, Zhang 2010). De plus, des études du microbiote commencent à émerger et semblent indiquer des différences entre les sujets avec N-IgA et les contrôles (Piccolo 2015, De Angelis 2014).

Les résultats relatifs à l'importance de telle ou telle bactérie ou de tel virus chez l'homme n'ont pas toujours été confirmés ce qui a pu mettre le doute sur l'importance de chacun de ces agents dans la N-IgA. Cependant, les résultats, des études d'association génétique, peu reproductibles d'une population à l'autre ont mis en avant l'idée que la N-IgA pourrait être non pas une maladie mais un syndrome dans lesquels les signes cliniques ont différentes étiologies. Ce constat fait sur les gènes en cause peut certainement être aussi appliqué pour les agents infectieux.

Lorsqu'ils pénètrent dans l'organisme, les antigènes de surface pour les agents extracellulaires, ou les acides nucléiques des virus ou de certaines bactéries intracellulaires, sont des signaux forts d'alerte du système immunitaire. Ces signaux sont relayés par différents récepteurs dont les TLR qui ont aussi été incriminés dans la N-IgA. Les TLR qui semblent jouer un rôle dans la N-IgA sont les TLR4 de surface et TLR9 endosomal, dont les ligands principaux sont, respectivement, le LPS et l'ADN riche en CpG nonméthylés. Le LPS représente la signature moléculaire commune des bactéries à Gram négatif et est très présent dans la paroi de ces microorganismes et l'ADN riche en CpG nonméthylés est une caractéristique des bactéries, qu'elles soient à Gram négatif ou à Gram positif. Dans les études génétiques de cas-témoins des variants de TLR9 et de CD14, le corécepteur de TLR4 pour le LPS, ont été rapportés et les auteurs ont montré une association avec

la N-IgA (Sallustio 2015, Yoon 2003). Par ailleurs l'expression de TLR4 à la surface des monocytes circulants est augmentée et corrèle avec la protéinurie et l'hématurie chez les malades avec N-IgA (Coppo 2010b). Une analyse génétique des souris ddY a révélé que MyD88, l'adaptateur de nombreux TLR dont TLR4 et TLR9, est un facteur de progression de la maladie rénale (Suzuki 2008). L'injection intranasale de CpG ou de LPS chez les souris ddY accélère la progression de la N-IgA (Kajiyama 2011, Maiguma 2014). Le LPS donné en combinaison avec l'albumine bovine et le carbone tétrachloride est utilisé par certains auteurs pour obtenir un modèle de N-IgA chez le rat ou la souris (Chen 2015, Meng 2014). De plus, chez le rat traité par des gamma globulines bovines (mélange d'Ig circulantes), il a récemment été montré que l'activation de TLR4 est nécessaire à l'apparition des signes de la N-IgA (Zou 2017). L'effet des TLR et de leurs ligands peut s'expliquer par une activation des cellules immunitaires mais également, lorsque les ligands atteignent le glomérule, par un effet activateur des cellules mésangiales, voire des podocytes, qui expriment plusieurs TLR dont TLR4 (Allam 2009, Lim 2011, Patole 2006, Yiu 2011). Enfin, le LPS favorise l'apparition de Gd-IgA1 *in vitro* (Xie 2010).

L'objectif de mon travail de thèse était de poursuivre l'exploration du rôle de l'environnement bactérien en évaluant l'**effet du LPS** :

1) **sur la production des IgA anormales circulantes chez la souris**,
2) et **sur le développement de la maladie dans les souris α1KI** qui produisent de l'IgA1 chimérique humaine et ont des dépôts spontanés mais sans protéinurie, hématurie ou lésions histologiques de la N-IgA.

Chapitre IV. Régulation de l'immunoglobuline A mucosale par le lipopolysaccharide

IV.1. Introduction

Dans ce premier travail nous avons évalué l'effet du LPS sur la production des IgA anormales circulantes chez la souris non génétiquement modifiée de souche BALB/c. La souche BALB/c a été choisie pour rester cohérent avec le second travail qui a été mené en parallèle et qui a porté sur la modélisation de la N-IgA dans la souris BALB/c α1KI. Souhaitant tester l'effet du LPS porté par le microbiote, nous l'avons injecté directement dans la lumière de la trachée pour atteindre la muqueuse respiratoire dont le microbiote est relativement pauvre en micro-organisme en comparaison de celui de la paroi digestive. Nous n'avons pas utilisé la voie orale pour éviter que l'effet du LPS exogène ne soit masqué par celui porté par la flore commensable digestive.

Pensant naïvement que le LPS injecté par voie intratrachéale (i.t.) pouvait modifier les taux circulants d'IgA, nous les avons mesurés et en parallèle nous avons quantifié les IgA dans le lavage bronchoalvéolaire (BAL pour *BronchoAlveolar Lavage*) qui permet de récupérer les molécules et les cellules présentes dans la lumière des voies aériennes. Nous n'avons pas observé de modification des taux circulants d'IgA mais nous avons obtenu une forte augmentation des IgA dans le BAL. Ce résultat non décrit dans la littérature nous a poussé à rechercher les mécanismes conduisant à cet effet du LPS sur les IgA de la muqueuse de l'appareil respiratoire. Nous avons d'abord vérifié que l'effet du LPS n'était pas la simple conséquence d'un œdème inflammatoire avec passage passif des IgA de la circulation vers la lumière. Puis nous avons étudié les cellules de la lignée B pour évaluer si l'augmentation d'IgA résultait de l'infiltration de cellules B, y compris de B1, provenant d'autres tissus, d'une augmentation locale de CSR ou de la différenciation des plasmocytes. En parallèle, nous avons étudié la transcytose des IgA par les cellules épithéliales. Le LPS étant bien connu pour recruter différentes cellules inflammatoires, nous avons mesuré l'infiltration des poumons par les PMNs, les monocytes/macrophages et les lymphocytes T et nous avons quantifié les cytokines favorisant la production des IgA et pouvant être produites par les cellules épithéliales pulmonaires et par les cellules infiltrantes. Enfin, en utilisant différentes stratégies de déplétion cellulaire ciblée et de neutralisation et d'injection de cytokines *in vivo*, et en cultivant des cellules épithéliales bronchiques humaines primaires avec différents agents, nous avons tenté de comprendre quels éléments contribuaient aux effets du LPS sur la production et la transcytose des IgA dans les voies aériennes. L'ensemble des résultats est donné dans l'article ci-derrière, actuellement soumis pour publication.

IV.2. Principaux résultats

Lipopolysaccharide enhances immunoglobulin A production and transcytosis in airways

Authors

A Archelus, S Létuvé, S Lecardeur, C Carrion, C Oblet, JC Aldigier, M Cogné & A Druilhe

Affiliations

A Archelus, S Lecardeur, C Carrion, C Oblet, JC Aldigier & A Druilhe*: Univ. Limoges, CNRS, INSERM, CRIBL, F-87000 Limoges, France*

S Létuvé*: Université Paris Diderot, INSERM, Physiopathologie et Epidémiologie des Maladies Respiratoires, F-75018 Paris*

M Cogné*: Univ. Limoges, CNRS, INSERM, CHU Limoges, CRIBL, Institut Universitaire de France, F-87000 Limoges, France*

Corresponding author

Correspondence to A Druilhe.

Address: CBRS, 2 rue du Dr. Marcland, 87025 Limoges cedex, France.

Phone: (33) 5 19 56 42 00

Fax: (33) 5 55 4358 97

E.mail: anne.druilhe@inserm.fr

Competing interests

The authors declared no conflict of interest.

Abstract

Immunoglobulin (Ig) A production and regulation in mucosa has been mainly studied in the gut where several factors, such as lipopolysaccharide (LPS) have been incriminated. In our work, we extended the study of LPS on IgA system to the airway mucosa. We showed that a unique intratracheal injection of LPS in mice results five days later in a dramatic increase in the expression level of IgA in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluids. Using different mice and treatments and primary cultures of human bronchial epithelial cells, we showed that 1) LPS promotes the production of secreted IgA by local plasma cells and that 2) LPS augments the expression level of the polymeric Ig receptor in epithelial cells and stimulates IgA transcytosis. Moreover, our results suggest that the LPS-mediated IgA increase in BAL fluids results from a direct action on cells of B lineage and epithelial cells as well from an indirect effect requiring the intervention of monocytes. It is expected that the combined and partly redundant actions of LPS on IgA system, that our work reveal, allow for a rapid and efficient reaction of the immune system against opportunistic and pathogenic bacteria in the airways.

Introduction

Immunoglobulin (Ig)A represents the most produced Ig in the human body.[1] IgA is synthesized by plasma cells either in the bone marrow or in the mucosa. It is admitted that bone marrow-derived IgA are those that circulate while mucosal IgA are produced locally.[2] Most of the knowledge we have on mucosal IgA comes from studies on the digestive mucosa.[1,3] While the function of circulating IgA remains debated,[4] IgA in the mucosa, under the form of secretory (S)IgA, contributes to defense against the pathogens, education of adaptive immune system to pathogens and diet allergens, and shaping of microbiota.[1] SIgA is composed of dimeric (d)IgA containing the Joining (J) chain and a peptide called secretory component (SC).[1] SIgA results from a three-step phenomenon, *i.e.* (1) the production of dIgA in the submucosa that is recognized by the polymeric Ig receptor (pIgR) expressed on the basal surface of epithelial cells, (2) the transcytosis, meaning the transport across the epithelial cell, of dIgA still bound to the pIgR, and (3), at the apical surface, the cleavage and the release in the lumen of a part of pIgR called SC that remains attached to dIgA.[1] Of note, J chain is essential for pIgR-mediated epithelial transport of IgA.[5]

In the digestive mucosa, IgA are produced by plasma cells located in the lamina propria.[3,6] These plasma cells derived from B lymphocytes that have committed class switch recombination (CSR) mostly in the digestive mucosa-associated lymphoid tissues, *i.e.* Peyer's patches and isolated lymphoid follicles.[3] IgA CSR in digestive mucosa occurs in germinal centers (GC) and outside of GC

and is dependent or not of T cell activation. In mice, B1 cells, that migrate from the peritoneal cavity into the lamina propria, are believed to contribute to the production of mucosal IgA.[7,8]

IgA CSR is mainly under the control of the transforming growth factor (TGF)β.[3] The ligands of the tumor necrosis factor receptor superfamily 13 (TNFRSF13)/TACI, TNFSF13/APRIL and TNFSF13B/BAFF are also able to stimulate directly IgA CSR; in addition they favor B cell and plasma cell survival.[3] Since its deficiency in mice markedly impaired digestive IgA system, the interleukin (IL)17A, the cytokine defining the lymphocyte T_H17 (H for helper) subtype, is often described as a potent IgA regulator. It does not target cells from B lineage, but it activates both T lymphocytes, that in turn favor IgA CSR, and epithelial cells that perform IgA transcytosis.[3,9] Several activated cells, including epithelial cells and immune cells potentially present in the submucosa, such as T cells, dendritic cells (DC), monocyte/macrophages, and polymorphonuclear cells (PMN) produce these IgA-genic factors.[3,10-12]

Mucosal IgA system is also regulated by microbiota as clearly demonstrated in animals born and housed in a germ-free facility and colonized with gut microbiota collected on other animals.[13] The molecular mechanism driving IgA production by microbiota is not known ; yet it probably involves the interaction of ligands of toll-like receptors (TLR) expressed by microorganisms and TLR on the surface of epithelial cells and immune cells.[10] TLR are receptors that recognize molecules specific of microorganisms such as lipopolysaccharides (LPS) of the wall of $Gram^-$ bacteria or prokaryote unmethylated dinucleotide CpG enriched deoxyribonucleic acid (DNA).[14] Thirteen TLR have been cloned so far. Natural ligands are known for most of them ; the recognition of ligands by TLR leads to adaptor molecule-driven signaling cascade that ends up in the transcription of genes.[14] Two main adaptors are involved in TLR effects: myeloid differentiation (MyD)88 that drives activator protein (AP)-1 and nuclear factor (NF)-κB-mediated transcription and TIR-domain containing adaptor molecule (TICAM)-1/TRIF that activates IRF-dependent transcription. Except TLR3, all the other TLR use MyD88 while TLR3 uses TICAM-1. TLR4, the receptor of LPS, is unique since it activates both MyD88- and TICAM-1-dependent pathways.

It has been shown that ligands of TLR activate T cell-dependent IgA production and IgA transcytosis and both effects are under the control of MyD88.[15-17] Other works have shown that TLR ligands are potent inducer of APRIL and BAFF production and release by epithelial cells and DC.[10] Finally, TLR3 was also described as a mucosal IgA inducer; indeed viral double-stranded ribonucleic acid (RNA), the natural ligand of TLR3, provoke BAFF release and the subsequent IgA CSA by acting directly on TLR3 expressed by mucosa B lymphocytes.[18]

The regulation of IgA system is poorly understood in non-digestive mucosa such as mucosa of the respiratory tract. The aim of our study was to evaluate the effect of TLR activation on IgA system in the murine airway mucosa. In order to activate both MyD88 and TICAM-1-pathways directly in mucosa, we treated animals with LPS injected *via* the intratracheal (i.t.) route.

Results

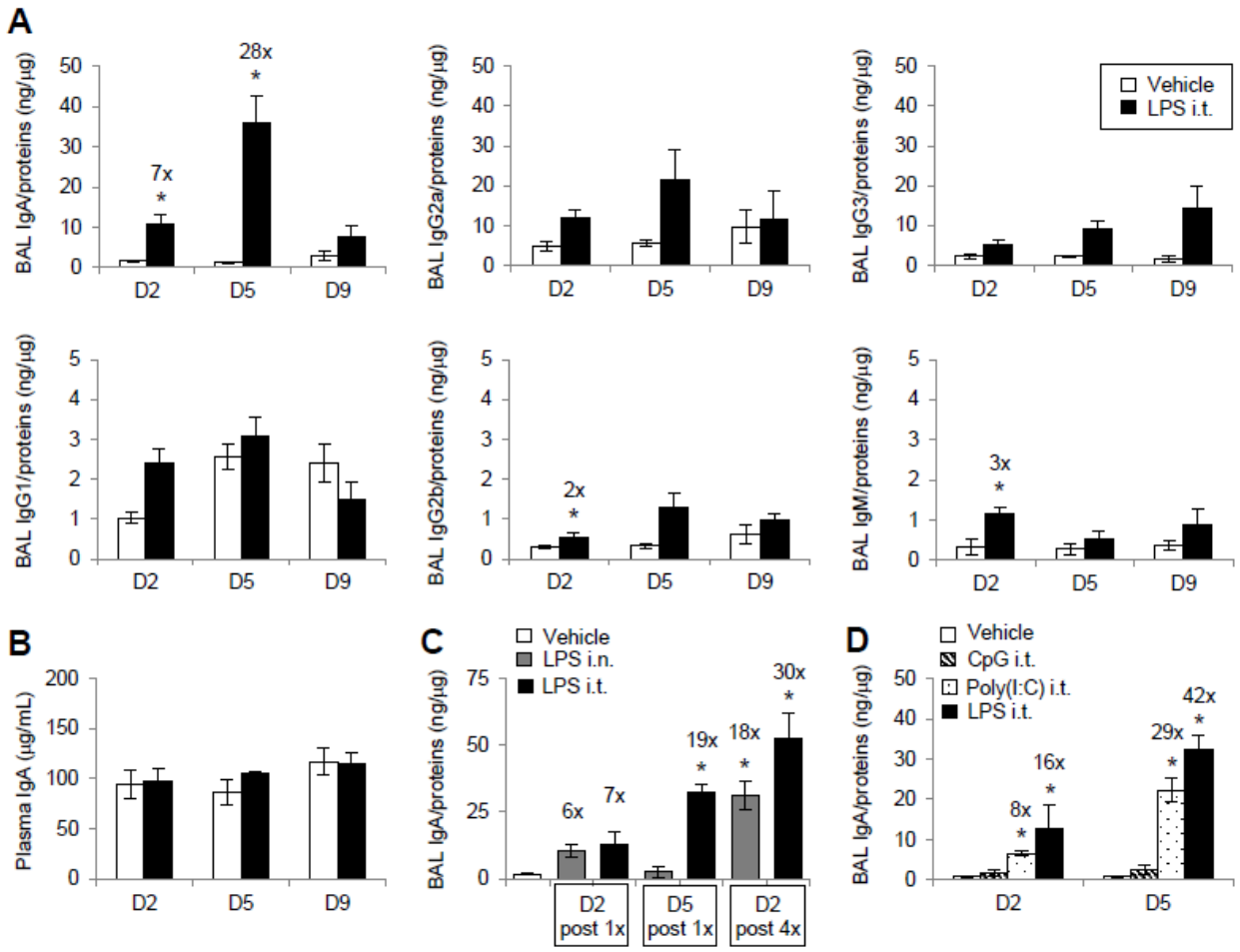


Figure 1 - Figure 1 - Ig levels in BAL fluids and in plasma after administration of TLR ligands in the airways. (A) Ig levels in BAL fluids collected at D2, D5 and D9 after vehicle or LPS i.t. injection. First lane from left to right: IgA, IgG2a, IgG3. Second lane from left to right: IgG1, IgG2b, IgM. Ig levels were normalized using protein levels measured in BAL fluids. (B) IgA expression levels in plasma harvested at D2, D5 and D9 post vehicle or LPS i.t. treatment. (C) IgA levels in BAL fluids collected after i.n. or i.t. injection of vehicle or LPS. Vehicle and LPS were administered once (1x) or 4 times (4x) and BAL were performed D2 and D5 after the last treatment. (D) IgA levels in BAL fluids obtained at D2 and D5 post i.t. treatment with vehicle, CpG, Poly(I:C) or LPS. In (A) and (B), respectively, 3 and 2 independent experiments were performed, each with 3 vehicle-treated mice and 4 LPS-treated animals. Results were pooled and presented here. In (C) and (D) one experiment was done with n=3-4 mice. **P*<0.05, as compared to vehicle-treated mice. When Ig levels in LPS-treated mice were statistically augmented as compared to those found in vehicle-treated animals, the fold increase was indicated above the corresponding column in graphs.

LPS dramatically increases IgA in BAL fluids. To evaluate the effect of LPS on airway IgA, LPS or its vehicle (physiological serum) was injected by i.t. route and BAL fluid was collected two, five and

nine days (D2, D5 and D9) later. LPS provokes 7-fold and 28-fold increases of IgA levels in BAL fluid at D2 and D5, respectively (Figure 1A). BAL fluid levels of IgG1, IgG2a and IgG3 were unaffected while those of IgG2b and IgM were increased by 2/3-fold times at D2 (Figure 1A). LPS fails to modify IgA plasma levels (Figure 1B). The effect of LPS on airway IgA is more pronounced at D5 when LPS is injected using i.t. route rather than the intranasal (i.n.) one (Figure 1C). The same BAL IgA level is obtained with one or with repeated i.t. injections of LPS (Figure 1C). Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly(I:C)), a synthetic ligand of TLR3, has a similar effect on airway IgA than LPS while CpG, a ligand of TLR9, does not alter IgA levels in BAL fluid (Figure 1D).

The effect of LPS is not the consequence of IgA leakage from blood. LPS is known to provoke lung edema[19] that could explain the increased levels of IgA in BAL fluid. To assess the impact of blood IgA leakage, we compared the amount of IgA and that of albumin, another circulating protein synthesized outside of the airways. LPS provokes a slight increase of albumin level in BAL fluid as illustrated in western blot of the figure 2A. Quantification of albumin and of total proteins in BAL fluid shows a similar increase of both (Figure 2B-D). Fold increases are similar when results are expressed as IgA or as ratios IgA/total proteins and IgA/albumin (Figures 1A, 2E, 2F) indicating that IgA found in BAL fluids after LPS treatment does not come mainly from blood compartment.

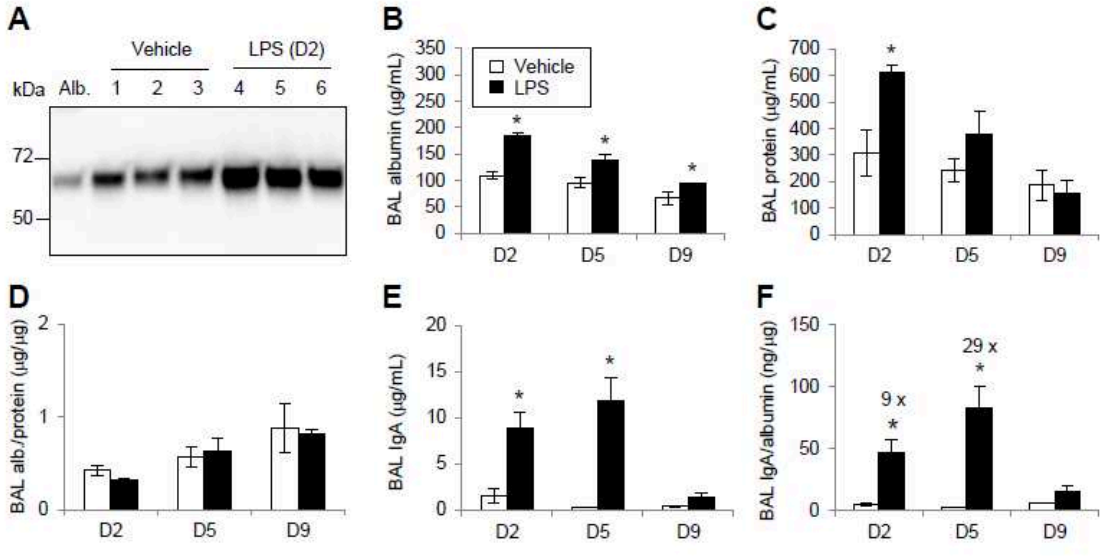


Figure 2 - Effect of LPS on albumin levels in BAL fluids, as a result of blood leakage. (A) A representative picture of albumin analysed by western blot. Samples from left to right are the albumin standard (Alb.), 3 BAL fluids (1, 2, 3) collected at D2 post vehicle injection and 3 BAL fluids (4, 5, 6) harvested at D2 post LPS treatment. (B) Albumin and (C) total protein expression levels in BAL fluids at D2, D5 and D5 post vehicle or LPS injection. (D) Levels of albumin normalized using total protein levels. (E) IgA expression levels in BAL fluids at D2, D5 and D5 post vehicle or LPS injection. (F) IgA expression levels normalized using albumin levels. 9x and 29x are the fold increases of IgA expression levels in LPS- as compared to vehicle-treated mice, respectively D2 and D5. In (A) to (F), two independent experiments were performed, each with 3-4 mice per group. Results were pooled and presented here. **P*<0.05, as compared to vehicle-treated mice.

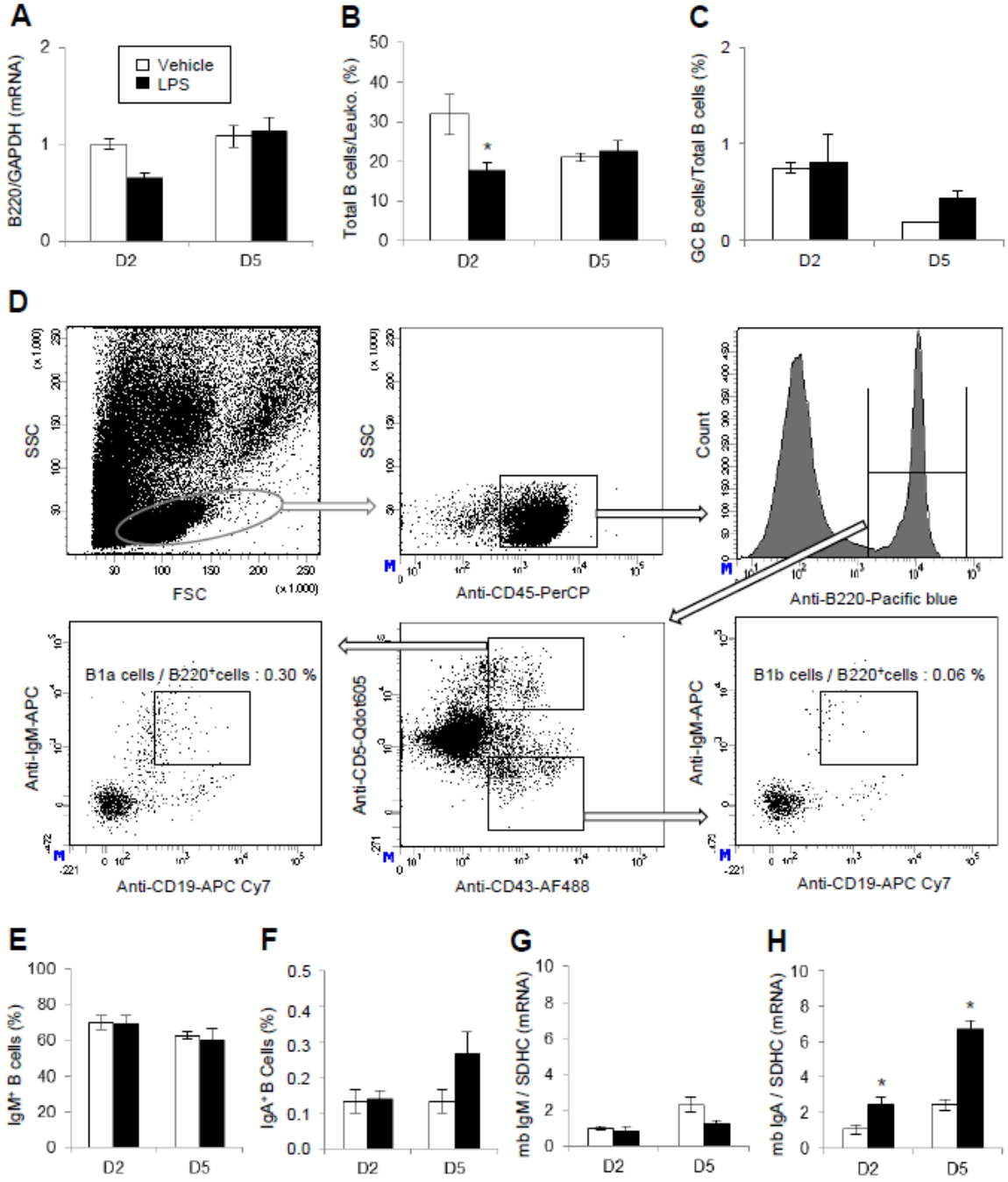


Figure 3 - IgA$^+$ B cells in lungs of LPS-treated mice. (A) Expression levels of the mRNA for B220, a B cell marker, in lungs at D2 and D5 after i.t. injection of vehicle or LPS. B220 mRNA level was normalized using the level of the housekeeping mRNA GAPDH. The PCR cycle treshold for B220 mRNA in lungs from untreated mice was 24.2 (mean from n=6). (B) Proportion of total B cells out of total leukocytes in lungs D2 and D5 post LPS administration. (C) Proportion of germinal center (GC) Ly7$^+$ B cells out of total B cells in lungs after LPS treatment. (D) Flow cytometry chart allowing to gate IgM$^+$ B1a (SSC^{low} FSC^{low} CD45$^+$ B220$^+$ CD43^{medium} CD5^{high} CD19^{medium}) and IgM$^+$ B1b (SSC^{low} FSC^{low} CD45$^+$ B220$^+$ CD43^{medium} CD5^{low} CD19^{medium}) cells. FSC stands for forward scatter and SSC for side scatter, two parameters measuring the size and the granularity of cells. PerCP, Pacific Blue, APC, APC Cy7, Qdot605 and AF488 are the fluorochromes conjugated to antibodies against the different markers. The cells shown here are from the lungs of one mouse; lungs were collected at D5 after LPS treatment. (E) Proportions of IgM$^+$ B cells and (F) of IgA$^+$ B cells in lungs of vehicle- or LPS-treated mice. (G) Lung expression levels of mb IgM mRNA and of (H) mb IgA mRNA normalized using SDHC mRNA levels. The PCR cycle tresholds of untreated lung mb IgM mRNA and mb IgA mRNA were 21.4 and 25.8, respectively (mean from n=6 mice). Results presented in figure 3 correspond to one experiment with 3 vehicle-treated animals and 4 LPS-treated mice at every time-point. *P<0.05, as compared to vehicle-treated mice.

LPS fails to recruit cells of B lineage in the airways but activates them. At D2 and D5, the number of total B cells is not augmented in the lungs of i.t. LPS-treated mice as demonstrated by the quantification of B220 messenger (m)RNA and of the proportion of $B220^+$ leukocyte (Figure 3A and 3B). The proportion of GC B cells is not affected by LPS treatment (Figure 3C) and no evidence of bronchus-associated lymphoid tissue is found when lung sections are observed (data not shown). Rare B1a and B1b cells are found in the lungs (Figure 3D); their proportion does not increase after LPS treatment (data not shown). Most B cells in the lungs express membrane (mb) IgM and only a few of them were IgA+ (Figure 3E and 3F). The proportion of IgM is unchanged at D2 and D5 post treatment while that of IgA slightly increased at D5 (Figure 3E, 3F and 3G). The amount of mb IgA mRNA doubles at in the lung of LPS- as compared to vehicle-treated mice (Figure 3H).

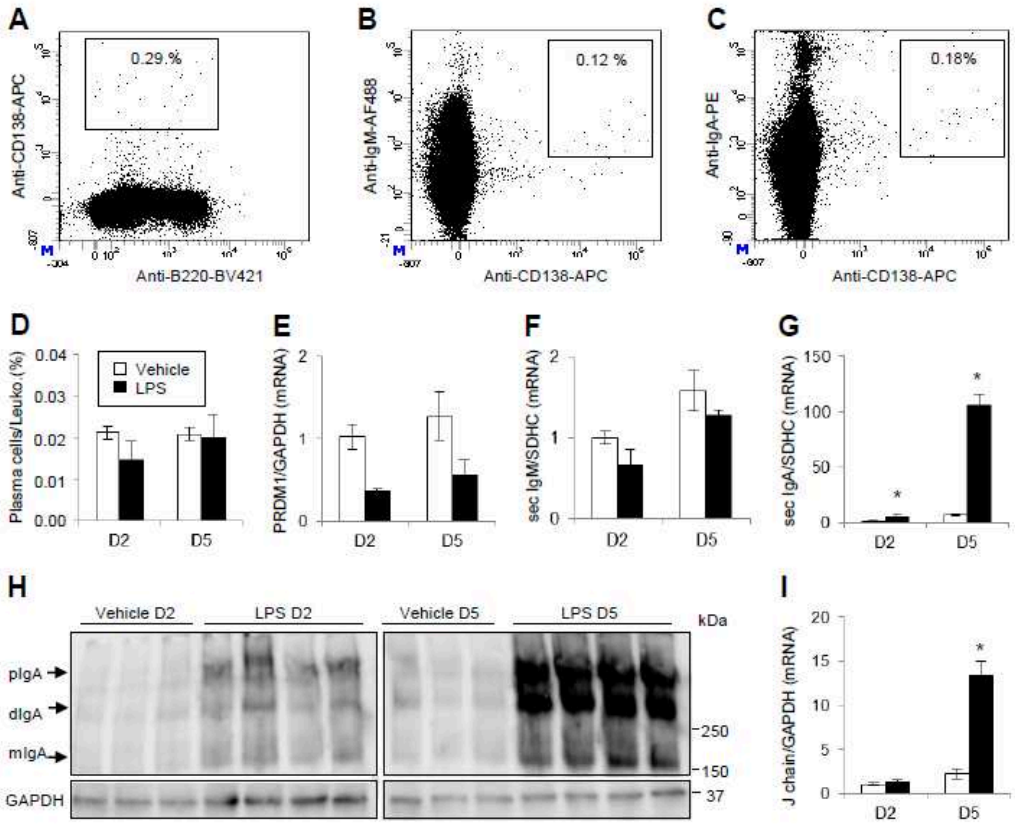


Figure 4 - Number and activation of IgA-producing plasma cells in lungs after local administration of LPS. Flow cytometry graphs showing the proportions of (A) plasma cells out of total B cells, (B) IgM^+ plasma cells and (C) IgA^+ plasma cells in the lungs of one mouse at D5 after LPS treatment. Plasma cells are defined as $CD138^{high}$, $B220^{low\ to\ medium}$ $CD45^+$ cells. APC, BV421, AF488 and PE are the fluorochromes conjugated to antibodies against the different markers. (D) Proportions of lung plasma cells out of total leukocytes at D2 and D5 after vehicle or LPS administration. Lung expression levels of (E) PRDM1 mRNA, (F) secreted IgM mRNA and (G) secreted IgA mRNA normalized using SDHC mRNA levels. The PCR cycle tresholds of untreated lung PRDM1, SIgM and SIgA mRNA were 22.4, 19.0 and 20.5, respectively (mean from n=6 animals). Normalization genes were either SDHC or GAPDH. (H) Western blot showing polymeric (p), dimeric (d) and monomeric (m) forms of IgA in lungs of 3 vehicle-treated mice and 4 LPS-treated animals at D2 and D5. The housekeeping protein GAPDH is also shown. (I) Expression levels of the mRNA for J chain, normalized with GAPDH mRNA levels, in lungs at D2 and D5 after i.t. administration of vehicle or LPS. The PCR cycle treshold for J chain mRNA in lungs from untreated mice was 24.3 (mean from n=6). Results presented in figure 4 correspond to one experiment with 3 vehicle-treated animals and 4 LPS-treated mice at every time-point. **P*<0.05, as compared to vehicle-treated mice.

A few plasma cells is found in the lungs; half of them produce IgM and the other IgA (Figure 4A, 4B and 4C). The number of total plasma cells in the lungs is not augmented by LPS treatment as illustrated in the figure 4D and in the figure 4E that shows the expression of the mRNA coding for PR-domain containing molecule (PRDM)1/BLIMP-1, a specific plasma cell marker. LPS does not modify the expression of secreted IgM mRNA in the lungs while it hugely increases the expression of secreted IgA mRNA (Figure 4F and 4G). Western blot show that lungs of LPS-treated mice contain more monomeric (m)IgA, and much more dIgA and polymeric (p)IgA than lungs from vehicle-treated animals (Figure 4H). The expression of J chain mRNA is also statistically increased at D5 post LPS treatment (Figure 4I).

Altogether these results indicate that LPS fails to recruit cells from B cell lineage but it activates, mostly at D5, local B cells and plasma cells that secrete dIgA.

LPS promotes IgA transcytosis. The expression of mRNA coding for pIgR is increased at D2 and D5 post LPS treatment and the protein pIgR is increased at D2 (Figure 5A and 5B). In western blots, the antibody anti-pIgR recognizes a band corresponding to a protein with a molecular weight > 250 kDa (Figure 5B). This band corresponds probably to the complex pIgR-IgA or to the SIgA; its expression is highly augmented in lungs at D2 post LPS treatment. SC and SIgA are increased in BAL fluid collected D2 and D5 after i.t. LPS injection (Figure 5C and 5D). To evaluate the effect of LPS on epithelial transcytosis, we first treated mice with LPS or vehicle and then, at D5, we injected by intraveinous (i.v.) route purified monoclonal human IgA (IgAm) 2 h prior to blood and BAL fluid collection. Among the monoclonal human IgA available in our laboratory, we selected two of them that present different features: IgAm1 contains equivalent amounts of mIgA, dIgA and pIgA but no J chain while IgAm6 contains mostly pIgA with J chain (Figure 5E). The same amount of IgAm1 and IgAm6 has been injected to mice as demonstrated by the measurement of circulating human IgA 2 h after their i.v. injection (Figure 5F). An increased amount of IgAm6, but not IgAm1, is measured in the BAL fluid collected on LPS-treated mice (Figure 5G). The amounts of IgAm6 in BAL fluid from vehicle- and LPS-treated mice are not statistically different ; however the fold increase of IgAm6 level 5 days after LPS treatment is in the same range as the fold increase of chimeric human IgA at D5 post LPS treatment in α1KI mice (Figure 5G and 5H). In comparison to results obtained with murine IgA (Figure 1A), the fold increases calculated in the figure 5G and 5H are low, suggesting that human IgA or chimeric human IgA (containing human heavy chain)[20] is less efficiently transported by murine pIgR than murine IgA. Altogether, these results indicate that LPS favors pIgR expression in the airways and IgA transcytosis.

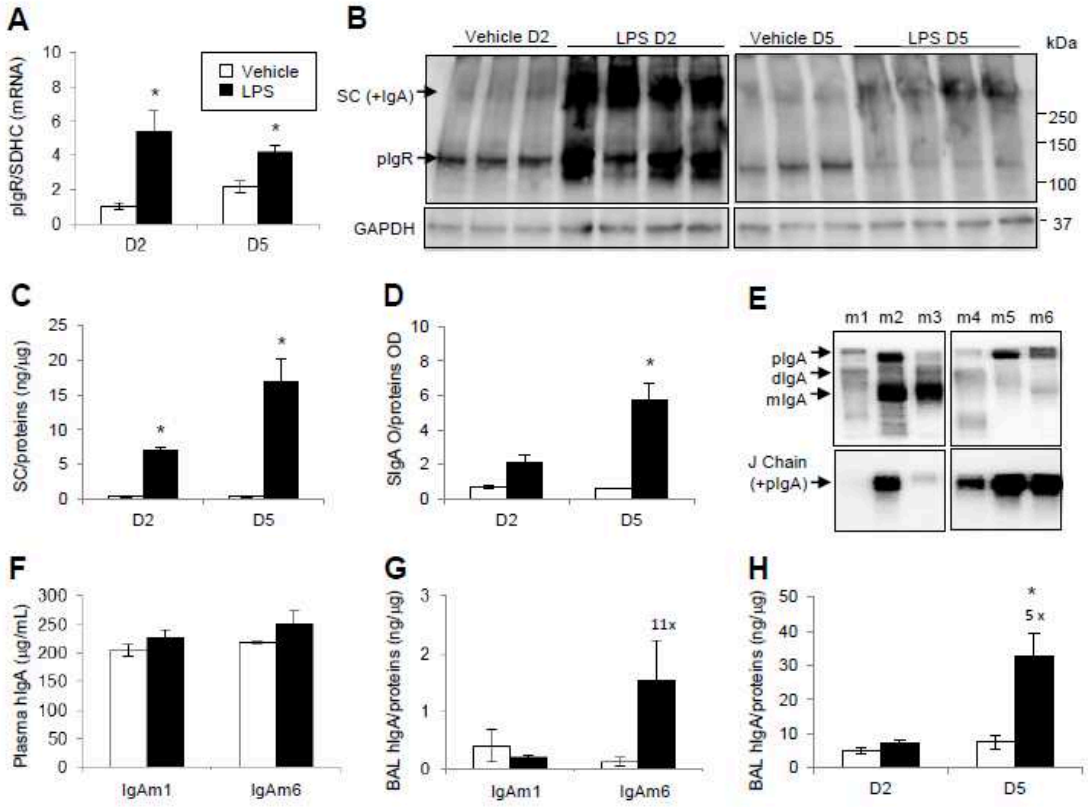


Figure 5 - Expression of pIgR and IgA transcytosis in lungs after local treatment with LPS. (A) pIgR mRNA expression levels, normalized with SDHC mRNA levels, in lungs at D2 and D5 after i.t. administration of vehicle or LPS. The PCR cycle treshold for pIgR mRNA in lungs from untreated mice was 22.3 (mean from n=6). (B) Western blot showing pIgR and SIgA (SC + IgA) in lungs of 3 vehicle-treated mice and 4 LPS-treated animals at D2 and D5. The housekeeping protein GAPDH is also shown. (C) SC levels and (D) SIgA in BAL fluids collected at D2 and D5 after vehicle or LPS i.t. injection. SC expression was normalized normalized using protein level measured in BAL fluids. In the absence of SIgA standard, SIgA expression level was expressed as SIgA OD normalized using total protein OD. (E) Western blot showing polymeric (p), dimeric (d) and monomeric (m) forms of 6 purified human blood monoclonal IgA, m1 to m6, and J chain associated to pIgA. Expression levels of m1 and m6 IgA in (F) plasma and in (G) BAL fluid of vehicle- or LPS-treated mice. Mice received an i.t. injection of LPS or of its vehicle. Plasma and BAL fluid were harvested five days later but 2 hours prior to blood and BAL fluid collection, m1 or m6 was injected by i.v. route. (H) Expression levels of human chimeric IgA in BAL fluids of α1KI mice, at D2 and D5 after vehicle or LPS i.t. injection. In (G) and (H), 11x and 5x written above the graph columns are the fold increases of IgA expression levels in LPS- as compared to vehicle-treated mice. Results presented in figure 5 correspond to one experiment with 3 vehicle-treated animals and 4 LPS-treated mice at every time-point. **P*<0.05, as compared to vehicle-treated mice.

LPS induces inflammation and expression of IgA-genic factors in lungs. A huge increase of total BAL cells is observed D2 after LPS treatment (Figure 6A) due to PMN and monocyte, but not total T cell, infiltration in the airways (Figure 6B to 6F). Inflammatory cell recruitment is accompanied by an augmentation of TGFβ, C-X-C motif containing ligand (CXCL)10, BAFF, APRIL and IL17 in the BAL fluid at D2 after LPS injection (Figure 6G to 6K). The level of TGFβ is also augmented at D5 (Figure 6G). It is admitted that IL17 is produced mainly by T_H17 cells; we quantified their presence in lungs by measuring the expression of the mRNA coding for RAR-related orphan receptor (ROR)γ that is a specific marker of T_H17 cells. LPS fails to alter the expression of RORγmRNA (Figure 6L). In lungs,

IL17 is expressed by 5-10% leukocytes and is found in T cells, PMN and monocytes (Figure 6M to 6P). The proportion of $IL17^+$ leukocytes statistically increases and that of $IL17^+$ PMN and $IL17^+$ monocytes doubles after LPS treatment (Figure 6M). Based on the figures 6D to 6F and 6N to 6P, we conclude that IL17 in LPS-treated mice comes from myeloid cells, *i.e.* PMN and monocytes, and not from T cells.

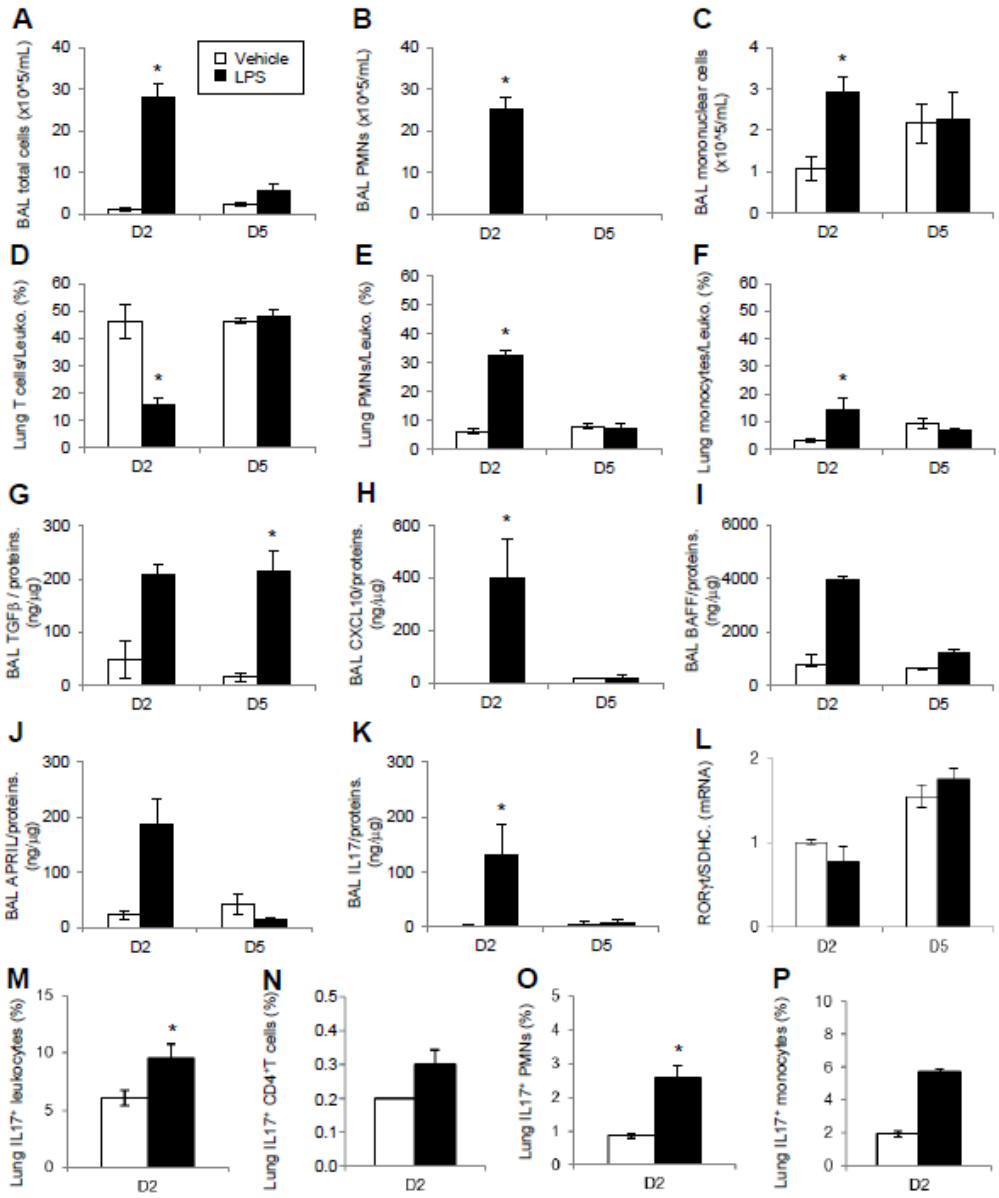


Figure 6 - Immune cell recruitment in lungs and IgA-promoting cytokine expression levels in BAL fluids at D2 and D5 post LPS treatment. Concentration of total immune cells (A), PMN (B) and immune mononuclear cells (C) in BAL fluids at D2 and D5 after vehicle or LPS treatment. Proportions of lung T cells (D), PMN (E), and monocytes (F) out of total leukocytes at D2 and D5 post vehicle or LPS injection. Expression levels of TGFβ (G), CXCL10 (H), BAFF (I), APRIL (J) and IL17 (K), normalized using total protein expression levels, in BAL fluids of mice treated with or without LPS. (L) Lung expression levels of RORγt mRNA normalized using SDHC mRNA levels. RORγt is a marker of Th17 cells. The PCR cycle treshold of untreated lung RORγt mRNA was 26.2 (mean from n=6 animals). Proportions of lung $IL17^+$ leukocytes (M), CD4+T cells (N), PMN (O), and monocytes (P) at D2 after vehicle or LPS treatment. Results presented in figure 6 are representative of three experiments (A to F and K) or correspond to one experiment (G to J and L to P) with 3 vehicle-treated animals and 4 LPS-treated mice at every time-point. **P*<0.05, as compared to vehicle-treated mice.

IL17 upregulates pIgR expression. APRIL and IL17 were injected *via* i.t. route to mice and the levels of IgA in BAL fluid and the expression of mb IgA, secreted IgA and pIgR mRNA in lungs were quantified. APRIL fails to modify these parameters while IL17 augments the expression of pIgR mRNA (Figure 7A to 7D), a finding in agreement with a previous work.[21] IL17, as well as LPS, increases the expression of the protein pIgR in differentiated human bronchial epithelial cells in primary culture (Figure 7E). Treatment of mice with a neutralizing anti-IL17 antibody fails to inhibit LPS effects, including LPS-mediated regulation of pIgR (Figure 7F to 7I). These results suggest that IL17 produced during LPS treatment 1) either does not contribute to LPS effects on airway IgA, 2) or it does participate in IgA transcytosis but its absence is compensated by other factors.

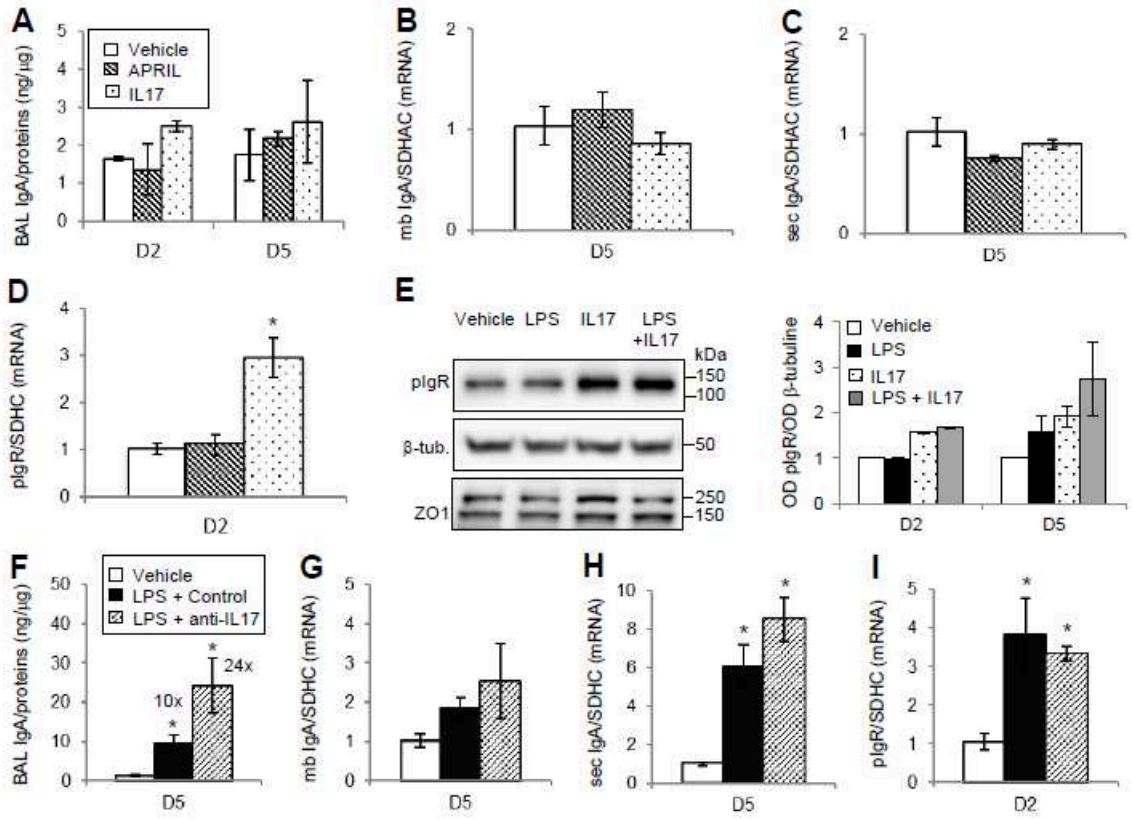


Figure 7 - Effect of APRIL and IL17 modulation on LPS-mediated IgA production and transcytosis in the airways. Expression levels of IgA in BAL fluids (A) and of mb IgA mRNA (B), secreted IgA mRNA (C) and pIgR mRNA (D) in lungs at D2 and/or D5 post i.t. injection of APRIL, IL17 or their vehicle. (E) Western blot for the quantification of pIgR in differentiated human bronchial epithelial cells treated for 2 or 5 days with LPS, IL17 or both together. The experiment was repeated with 3 independent primary cultures; a representative western blot of one batch of cells treated for 2 days is shown on left. pIgR bands were quantified and normalized using the housekeeping protein β-tubulin. Results were pooled and presented as the graph on the right. ZO1 is a marker of differentiated epithelial cells. Expression levels of IgA in BAL fluids (F) and of mb IgA mRNA (G), secreted IgA mRNA (H) and pIgR mRNA (I) in lungs at D2 or D5 post i.t. injection of LPS or its vehicle in the presence of neutralizing anti-IL17 antibody or its control isotype. In (F), 10x and 24x written above the graph columns are the respective fold increases of IgA expression levels in LPS and control isotype- and in LPS and anti-IL17 antibody- as compared to vehicle-treated mice. Results presented in (A) to (D) and in (F) to (I) correspond to one experiment with 3- 4 mice at every time-point. Expression levels of IgA in BAL fluids and of mRNA in lungs were respectively normalized using total protein and SDHC mRNA levels. **P*<0.05, as compared to vehicle-treated mice or cells.

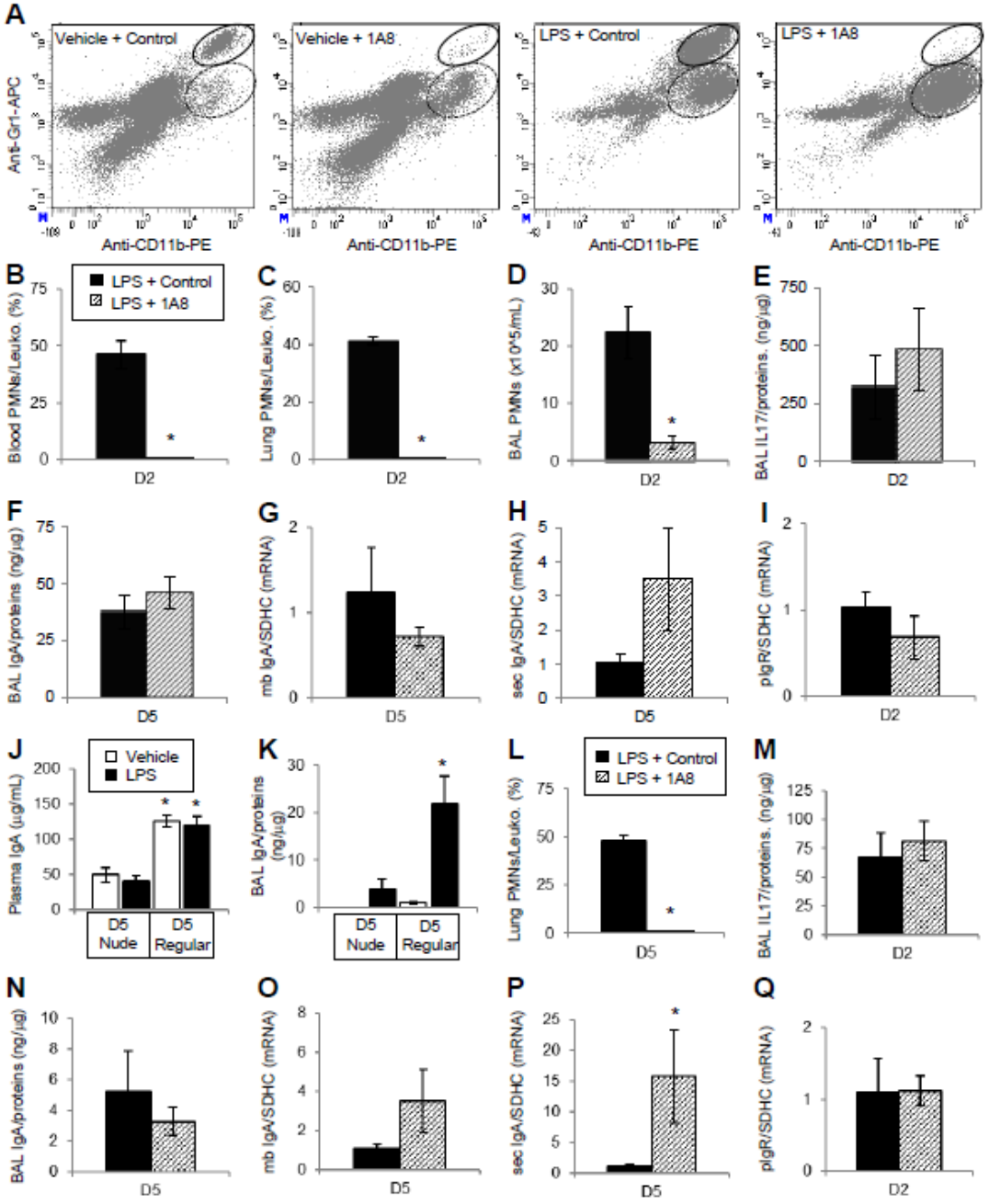


Figure 8 - Contribution of neutrophils and T cells to LPS effects on IgA production and transcytosis in the airways. (A) Flow cytometry graphs showing gated PMN (solid line) and monocytes (dashed line) in lungs at D2 post vehicle or LPS administration in the presence of neutralizing 1A8 anti-PMN antibody or of its control isotype. Each dot plot show the cells from the lungs of one mouse. PMN and monocytes are respectively defined as $GR1^{high}$ $CD11b^{+}$ $CD45^{+}$ and $GR1^{medium}$ $CD11b^{+}$ $CD45^{+}$ cells. APC and PE are the fluorochromes conjugated to antibodies against the different markers. Proportions of blood PMN out of total leukocytes (B), proportions of lung PMN out of total leukocytes (C), concentrations of BAL PMN (D), expression levels of BAL IL17 (E), expression levels of BAL IgA (F), expression levels of lung mb IgA mRNA (G), expression levels of lung secreted IgA mRNA (H) and expression levels of lung pIgR mRNA (I) at D2 or D5 post LPS treatment in the presence of neutralizing 1A8 anti-PMN antibody or of its control isotype. Expression levels of IgA in BAL fluids (J) and in plasma (K) from vehicle- or LPS-treated BALB/c nude or BALB/c regular mice, both bred in a SOPF animal facility. Proportions of lung PMN out of total leukocytes (L), expression levels of BAL IL17 (M), expression levels of BAL IgA (N), expression levels of lung mb IgA mRNA (O), expression levels of lung secreted IgA mRNA (P), and expression levels of lung pIgR mRNA (Q) in BALB/c nude mice at D5 post LPS treatment in the presence of neutralizing 1A8 anti-PMN antibody or of its control isotype. Results presented in figure 8 are representative of three (A to I) or two experiments (J to N) or correspond to one experiment (O to Q) with 3-4 mice per group. Expression levels of IgA and IL17 in BAL fluids and of mRNA in lungs were respectively normalized using total protein and SDHC mRNA levels. *P<0.05, as compared to vehicle-treated mice.

PMN are dispensable for the effect of LPS on airway IgA. LPS is a well-known activator of inflammatory cells, more particularly of PMN and monocytes.[22] To evaluate the involvement of PMN in LPS effect on airway IgA, mice were treated with the 1A8 antibody that specifically deplete PMN. As illustrated in figure 8A to 8D, PMN are depleted from the blood and the lung compartment. Of note, depletion of PMN in the lung is accompanied by a recruitment of monocytes (Figure 8A) ; this effect of 1A8 has already been reported and has been attributed to the codepletion of myeloid-derived suppressor cells.[23] Depletion of PMN does not alter the effects of LPS (Figure 8E to 8I) even though a slight increase of secreted IgA mRNA expression is observed (Figure 8H). To reveal a potential participation of PMN to the effect of LPS on airway IgA, we depleted PMN in the BALB/c nude mice producing only a few amount of IgA. The BALB/c nude mice are housed in our specific- and opportunistic-pathogen free (SOPF) animal facility ; due to a limited load of microorganisms in the environment of mice, housing in this facility affects the IgA system.[24] Before depleting PMN, we checked that BALB/c nude mice are able to respond to LPS as efficiently than BALB/c mice (defined as regular) housed in the same environment. As expected, BALB/c nude mice produce less IgA than BALB/c regular mice and present an increased level of IgA in the BAL fluid, but not the plasma (Figure 8J and 8K). Depletion of PMN in BALB/c nude mice (Figure 8L) does not modify the effect of LPS on BAL IL17 level, BAL IgA level and pIgR mRNA expression but it potentiates the effect of LPS on the expression of mb and secreted IgA mRNA (Figure 8M to 8Q). This result is consistent with data of the figure 8H but seems inconsistent with the absence of increased IgA levels in BAL (Figure 8F and 8N). To explain this discrepancy, one can argue that the slight increase of secreted IgA in the submucosa does not translate in a measurable increase of IgA in the BAL fluid. Regarding the level of BAL IL17 that is similar in mice with or without PMN in their lungs, we hypothesized that the recruitment of $IL17^+$ monocytes (Figure 8A, 8E and 8M) compensates the absence of $IL17^+$ PMN.

Monocyte number correlate positively with BAL IgA level. Finally, we attempted at depleting monocyte-derived cells using clodronate-encapsulated liposomes. As described,[25] we perform a systemic injection and a local injection of clodronate-encapsulated liposomes in order to deplete specifically monocytes and macrophages, respectively. In our hands, the systemic injection was toxic to mice and we pursued the experiments using only the i.t. route. As expected, i.t. injection of clodronate-encapsulated liposomes leads to a depletion of lung macrophages and also to a recruitment of monocytes and of PMN, but not of B cells (Figure 9A to 9E). In the absence of LPS, clodronate provokes a slight increase of BAL IL17 level and of pIgR mRNA expression (Figure 9F to

9J). Moreover, clodronate potentiates the effect of LPS on BAL IgA level, secreted IgA mRNA expression and pIgR mRNA expression (Figure 9F to 9J). These results, together with those shown in the figure 8A, 8H, and 8P suggest that monocytes contribute to the effect of LPS on IgA production and transcytosis.

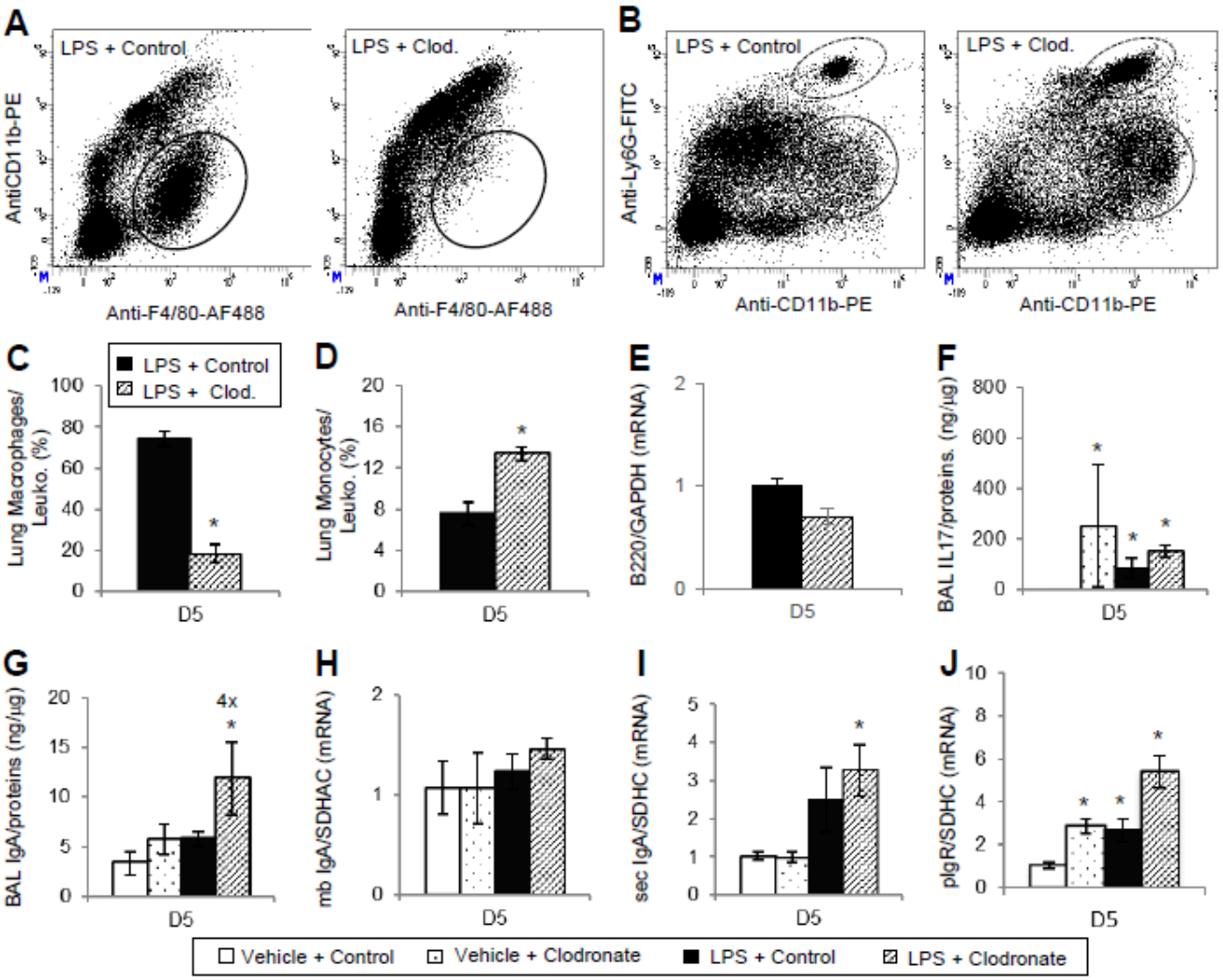


Figure 9 - Contribution of macrophages and monocytes to LPS effects on IgA production and transcytosis in the airways. Flow cytometry graphs showing (A) gated macrophages (solid line) and (B) gated PMN (dashed line) and gated monocytes (solid line) in lungs at D5 post vehicle or LPS administration in the presence of clodronate-encapsulated liposomes or their control empty liposomes. Each dot plot show the cells from the lungs of one mouse. Macrophages, PMN and monocytes are respectively defined as $CD11b^{-}$ $F4/80^{+}$ $CD68^{+}$ $CD45^{+}$ cells, $Ly6G^{high}$ $CD11b^{+}$ $CD45^{+}$ and $Ly6G^{medium}$ $CD11b^{+}$ $CD45^{+}$ cells. PE, AF488, FITC are the fluorochromes conjugated to antibodies against the different markers. Proportions of lung macrophages out of total leukocytes (C), proportions of lung monocytes out of total leukocytes (D) and expression levels of lung B220 mRNA (E) at D5 post LPS treatment in the presence or in the absence of clodronate. Expression levels of BAL IL17 (F), expression levels of BAL IgA (G), expression levels of lung mb IgA mRNA (H), expression levels of lung secreted IgA mRNA (I), and expression levels of lung pIgR mRNA (J) at D5 post vehicle or LPS treatment in the presence or in the absence of clodronate. In (G), 4x is the fold increases of IgA expression levels in mice treated with LPS plus clodronate as compared to vehicle + empty liposome. Results presented in figure 9 are representative of two experiments and correspond of means of 3-4 mice per group. Expression levels of IgA and IL17 in BAL fluids and of mRNA in lungs were respectively normalized using total protein and SDHC mRNA levels. **P*<0.05, as compared to vehicle and empty liposome-treated mice.

Discussion

In the present study, we show for the first time that LPS, the main natural ligand of TLR4, regulates both the IgA production and the IgA transcytosis in the airways leading to an increased amount of SIgA in the bronchoalveolar lavage lumen. This finding adds to the well-known effects of LPS on the synthesis and secretion of mucus[26] and on the recruitment and the activation of inflammatory cells. LPS thus mobilizes a panel of complementary defense effectors, that allows the rapid and efficient response against opportunistic or pathogenic microorganisms. The LPS-mediated upregulation of airway SIgA may explain partly the protective effect of instillation of low dose of endotoxin or heat-killed *Escherichia coli* on the rodent infection by the $Gram^-$ *Pseudomonas aeruginosa*, the $Gram^+$ *Streptococcus pneumoniae* and the extracellular protozoan *Pneumocystic carinii*.[27-29] Of note, SIgA have been shown to contribute to protection of mice from deleterious effect of *Pseudomonas aeruginosa*.[30-31] Indeed, the topical application of non specific SIgA to cornea *in vitro* reduces the binding of *Pseudomonas aeruginosa* to the mucosa and the topical ocular immunization with this bacteria leads *in vivo* to an upregulation of specific SIgA in the tears and a less severe ocular disease after bacterial challenge.[30] Moreover, a threefold increase in mortality was observed in pIgR-deficient mice infected by *Pseudomonas aeruginosa* using the i.t. route.[31] In this model, the higher mortality is likely due to the absence of SIgA since pIgR-deficient mice develop a compensatory mechanism consisting in the upregulation of the production of epithelial antimicrobial peptides, a major innate defense system.[32,33] It has also been shown that SIgA contributes to the chronic inflammation-induced resistance to *Streptococcus pneumonia* airway infection in mice.[34]

In our study, results suggest that LPS promotes upregulation of SIgA by direct and indirect effects. Based on the literature, we believe that the LPS-caused increased production of IgA we observed is mainly the consequence of the augmentation of TGFβ, APRIL and BAFF in the airways, that act together to activate B cells and IgA^+ plasma cells.[3] Deficiency of TGFβ in airway epithelial cells or inhibition of BAFF and/or APRIL, produced by epithelium, reduces considerably the production of IgA in lungs.[35-37] LPS was shown to induce the production of TGFβ but not of BAFF and APRIL, by human bronchial epithelial cells in culture.[38,39] In our model, TGFβ, APRIL and BAFF may come from LPS-activated epithelial cells but also from immune cells such as PMN, monocytes, T and B cells. In addition, the upregulation of IgA production may result from the activation of airway DC.[40] Actually, incubation of airway DC with LPS leads to increased expression of the activation markers, cluster of differentiation (CD)80 and CD86 and coculture of activated DC with B cells leads to an increased production of IgA.[40]

Regarding the effect of LPS on transcytosis, it probably results from a direct effect of LPS on the expression of pIgR by epithelial cells as shown in our *in vitro* assay, as well as from the LPS-induced release of numerous soluble factors from epithelial and immune cells. Indeed, upregulation of pIgR expression by different inflammatory cytokines and subsequent IgA transcytosis has been shown in gut epithelial cells *in vitro*, either in the human HT-29 cell line or recently in primary culture of differentiated murine intestinal epithelial cells.[9,41-43] In these papers, the authors show that IL1β, IL17 and TNFα are potent enhancers of pIgR expression. In agreement with our finding on primary culture of human bronchial epithelial cells, the gut epithelial cell cultures and an *ex vivo* chicken ileal explant model were used to demonstrate the upregulation of pIgR by LPS and other TLR4 ligands, and by TLR2 and TLR3 ligands.[41,44-46]

Our results showing that LPS provokes an augmentation of airway SIgA adds to the few works showing that TLR4 activation in gut regulates positively IgA system.[47-49] Transgenic mice expressing a constitutively active form of TLR4 in the intestinal epithelium have more B cells in the mucosa, express more APRIL and have higher fecal IgA than non transgenic mice.[47] Infection of mice with the mouse mammary tumor virus (MMTV) leads to a TLR4-dependent increase in the number of IgA+ B cells in Peyer's patches.[48] Finally, it was shown that the introduction of *Bacteroides thetaiotaomicron*, a murine commensal Gram$^-$ bacteria, into germ-free mice elicits bacteria-specific IgA response.[49] These results, together with our present work, show that the effect of TLR4 ligands is not specific of the gut or the airways, and that TLR4 ligands are potent positive regulators of SIgA in mucosa. Beyond this conclusion, we propose a model (i.t. injection) to simply assess the effect of specific TLR ligands on mucosal IgA regulation, without the confounding effect of a hugely abundant microbiota.

Methods

Mice

Mice were housed and procedures were conducted in accordance with european Directive 2010/63/EU on animals used for scientific purposes applied in France as the 'Décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques'.

Most experiments were performed with male BALB/c mice, aged eight to twelve weeks old, purchased from Janvier Labs and were housed in our conventional animal facility at least one week before starting treatments. Janvier Labs also supplied male BALB/c SOPF mice (defined as regular in the figure 8J and K) and male BALB/c nude SOPF mice (in figure 8J-Q), aged eight to twelve weeks week old, that were housed in our SOPF animal facility. For the experiment shown in the figure 5H,

we used male α1KI mice (twelve weeks old), in the BALB/c background, that produce mainly chimeric human IgA[20]; these mice were bred in our conventional animal facility.

Mice treatments

In most experiments, mice were challenged either with one i.n. injection of 10 μg LPS-EB from *E. coli* 0111:B4 (InvivoGen) diluted in 50 μL of 0.9% NaCl solution or with 50 μL of 0.9% NaCl solution, defined in results as Vehicle. Two, five or nine days later, blood, BAL fluid and lungs were collected.

In the experiment presented in figure 1C, 10 μg LPS or its vehicle (50 μL) was administered through i.n. or i.t. route. In this experiment LPS or its vehicle was injected once and blood and BAL fluid were harvested at D2 and D5, or it was given four times, each at 24 h intervals, and blood and BAL fluid were harvested two days after the last injection that corresponds to five days after the first injection.

In one experiment (see figure 1D), 10 μg LPS, 50 μg Poly(I:C) high molecular weight (InvivoGen), 10 μg class B CpG oligodeoxynucleotide 2006 (InvivoGen) or their vehicle (50 μL of 0.9% NaCl solution) were injected into trachea and blood and BAL fluid were collected at D2 and D5.

Circulating monoclonal IgA were purified from the blood of six patients with IgA myeloma using Sir22-affinity chromatography.[50] Four hundred micrograms of purified human monoclonal IgA diluted in 200 μL of 0.9% NaCl solution were injected by i.v. route 2 h prior to blood and BAL fluid collection. Collection of blood and BAL fluid was conducted five days after one i.t. injection of LPS or its vehicle. Results are presented in the figure 5E-G.

The results described in the figure 7A-D was obtained by analysing the BAL fluid and the lungs harvested at D2 and D5 after a unique i.t. administration of 2 μg recombinant murine APRIL (Peprotech) or recombinant murine 2 μg IL17 (Peprotech).

IL17 neutralization as presented in the figure 7F-I was adapted from Ferretti *et al*. and Hofstetter *et al.*[51,52] Indeed IL17 neutralization was achieved by treating mice intratracheally with 100 μg of the rat IgG2a anti-murine IL17/IL17A monoclonal antibody, clone #50104 (R&D Systems), in 50 μL of phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4, 5h after LPS i.t. injection. Some mice received a control antibody, *i.e.* 100 μg of the rat IgG2a anti-trinitrophenol monoclonal antibody, clone #2A3 (BioXCell) in 50 μL of PBS 5h after LPS administration.

The rat IgG2a anti-mouse Ly6G monoclonal antibody, clone #1A8 (BioXCell), was used to deplete neutrophils (see figure 8A-I and L-Q). The protocol described by Garraud *et al.*[53] was adapted: mice received four intraperitoneal injections, at 24 h interval each, of 100 μL of 0.25 mg/mL 1A8 antibody or its 2A3 isotype control, before LPS i.t. challenge. Blood, BAL fluid and lungs were

collected at D2. Other mice received four intraperitoneal injections of 1A8 or 2A3 antibody before LPS i.t. challenge followed by one intraperitoneal injection of 1A8 or 2A3 antibody (100 µL, 0.25 mg/mL) at 48 h and then at 96 h post LPS i.t. challenge. Blood, BAL fluid and lungs were collected five days (*i.e.* 120 h) after LPS administration.

To deplete monocytes/macrophages, the protocol described by by Zaynagetdinov *et al.*[24] was adapted. Mice received one i.t. injection of 100 µL of a ready-to-use solution containing 5mg/mL clodronate-encapsulated liposomes (ClodronateLiposomes) 24 h prior to i.t. administration of LPS or its vehicle. Some mice received empty liposomes (ClodronateLiposomes) as a control. Results are presented in the figure 9.

Tissue collection and sample preparation.

A time of tissue collection, mice were anesthesized, blood was collected on heparin, BAL was performed by four successive i.t. injection-recovery of 0.5 mL of 0.9% NaCl solution, a lung lavage was conducted by injecting 10 mL of 0.9% NaCl solution into the right heart ventricle and finally lungs were collected. Lungs were either snap-frozen by diving lungs-containing tube into liquid nitrogen and then kept at -80°C, or placed in RNAlater (ThermoFisher) for 24 h before being frozen at -80°C, or put in a medium at room temperature and, at once, mechanically dissociated to extract inflammatory and immune cells for flow cytometry analyses. After counting cells in a Malassez hemacytometer and preparing cytospinned cell slides, BAL fluids were centrifuged and supernatants were frozen at -20°C. After collection, blood was either immediately used for flow cytometry analyses or let sit for 10 min at room temperature before being centrifuged to separate plasma from cell pellet. Plasma was frozen at -20°C.

Primary culture of human bronchial epithelial cells (see figure 7E).

Human bronchial epithelial cells were obtained from remaining surgical pieces from lung donors according to a protocol approved by the local ethics committee. Surgical pieces were dissociated using pronase[54] and cells were cultured in the medium BEGM (Lonza) on collagen-I coated plastic dishes (BD Biosciences). Cultured human bronchial epithelial cells exhibited a typical cobblestone morphology at confluence. Epithelial lineage was confirmed, using immunofluorescence, by the presence of pan-cytokeratins and cytokeratin-5 and the absence of the mesenchymal marker vimentin, as previously described.[55] In case of contamination by fibroblast-like (vimentin^{+}) cells, cultures were not used for further experiments. Human bronchial epithelial cells were cultured for two passages and then were seeded on porous polyester membrane in cell culture inserts (Costar)

previously coated with type IV collagen (Sigma Aldrich) in BEGM. Cells were cultured in liquid-liquid conditions until reaching 80% confluence when medium was removed and basal compartment was filled with differentiation medium as described by LeSimple *et al*.[56] The upper compartment remained empty; this air-liquid interface maintained for twenty-eight days allowed for the full differentiation of bronchial epithelial cells. Regenerated epithelium displayed a mucociliary phenotype, as confirmed by immunofluorescent detection of the differentiation markers, □-tubulin and mucin (MUC)5AC.

Regenerated epithelial were incubated in the absence or in the presence of 1 μg/mL LPS, 10 ng/mL recombinant human IL17 (Peprotech) or 1 μg/mL LPS together with10 ng/mL IL17 for two or five days before cells were washed and lyzed for western blot analysis. LPS and IL17 were added in the basal compartment.

Differential cell counting in BAL fluids. Cells were counted in a Malassez hemacytometer after diluting a few microliters of BAL fluid in Türk solution, that lyze contaminating erythrocytes. A maximum of one hundred thousands of BAL nucleated cells were cytospinned per glass slide that were air-dried and stained with the May-Grünwald Giemsa method. The proportions of PMN and mononuclear cells was then assessed.

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Home-made ELISA assays were performed to detect murine Ig (A, M, G1, G2a, G2b, G3) in BAL fluids and plasma of BALB/c mice, BALB/c SOPF mice, BALB/c nude SOPF mice or human IgA in BAL fluids and plasma of α1KI mice or BALB/c mice after injection of human monoclonal IgA. The protocol used was previously described.[23] The primary unconjugated antibodies and the secondary alkaline phosphatase-conjugated antibodies were from Beckman Coulter, and Southern Biotech, respectively. Murine Ig standards were from Southern Biotech. A human serum with known concentrations of the different Ig isotypes was used as a standard for human IgA ELISA assay. The same protocol was used to measure SIgA levels in BAL fluids; the primary and the secondary antibodies were a goat anti-mouse pIgR (R & D Systems) and an alkaline phosphatase conjugated anti-mouse IgA (Southern Biotech). No SIgA standard was available.

Home-made ELISA was also used to measured the expression levels of SC in BAL fluids.[21] For quantification of SC levels in BAL fluids, plates were coated at 4°C overnight with either BAL fluids or recombinant free SC (R & D Systems), as standard, diluted in PBS followed by a blocking step with 3% bovine serum albumin in PBS for 1 h at 37°C. Plates were then incubated with 1/200 goat

anti-mouse pIgR diluted in PBS containing 1% bovine serum albumin for 1 h at 37°C. After washing with PBS supplemented with 0.05% Tween, 20, plates were incubated with 1/1000 rabbit anti-goat Ig-horseradish peroxidase (Dako) for 1 h at 37°C followed by horseradish peroxidase activity assay. Optical density (OD) was measured at 450 nm.

TGFβ, CXCL10, BAFF and IL17 concentrations in BALF were measured by available commercially ELISA kits (R & D Systems); APRIL was assayed with an ELISA kit from Cloud-Clone Corp., according to the manufacturer's instructions.

Measurement of total protein. The concentration of purified human monoclonal IgA and of total proteins in BAL fluids and in lung extract, prepared as described in the Western blot section, was measured using the bicinchoninic acid kit (Pierce). To determine the concentration of proteins in bronchial epithelial cell extract before Western blot, we used the DC protein assay kit (Bio-Rad). Dilutions of a solution of bovine serum albumin was used as standards.

Western blot. Lungs were thawed in the RIPA lysis buffer with protease inhibitors from Santa Cruz Biotechnology, mechanically disrupted using the IKA T10 basic ultra turrax homogenizer (Cole-Parmer). Human bronchial epithelial cells were washed in ice-cold PBS and incubated for 20 min with lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM hydroxyethyl piperazineethane sulfonic acid pH 8.0, 500 mM saccharose, 1 mM sodium ethylenediaminetetraacetic acid, 1% Nonidet P40, 0.1% sodium deoxycholate, 1% Triton X100, all from Sigma Aldrich) supplemented with complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics) on ice. Lysates (lung or human bronchial epithelial cells) were cleared by centrifugation at 12,000 g for 15 min at 4˚C before measuring their protein concentration, as described above.

The following amount of samples were loaded into polyacrylamide gels: 5 μL of BAL fluid or 0.2 μg of mouse albumin (Sigma Aldrich) used as a standard, 100 μg of proteins from lung extract, 10 μg proteins from human bronchial epithelial cells and 2 μg of purified human monoclonal IgA.

BAL fluids and the albumin standard were diluted in a buffer containing β-mercaptoethanol while lung extracts without β-mercaptoethanol. These samples were heated at 95°C for 5 min before being loaded onto gel. Monoclonal IgA were diluted in a buffer containing no reducing agent and were not heated before loading. Proteins were separated in polyacrylamide gels under denaturating conditions before being transfered on polyvinylidene difluoride membranes.

Different antibodies were used directed against mouse albumin (Abcam), mouse pIgR (R&D Systems), mouse IgA conjugated to horseradish peroxidase (Southern Biotech), mouse

glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase (GAPDH; R&D Systems), human IgA conjugated to horseradish peroxidase (Beckman Coulter) human J chain (Santa Cruz), human pIgR (R&D Systems), human zona occludens (ZO)1 (ThermoFisher-Invitrogen), β-tubulin (Abcam). Secondary antibodies used were all conjugated to horseradish peroxidase. The presence of proteins of interest was revealed by chemiluminescence that was detected using the ChemiDoc Touch imager (Bio-Rad) or, in the case of western blots for human bronchial epithelial cell proteins, the Pix4 system (Syngene). Band quantification was performed using proprietay softwares included with the imaging systems.

Reverse transcription and quantitative polymerase reaction (PCR). Total RNA was isolated from lungs using Trizol reagent (ThermoFisher). RNA samples were treated with amplification-grade DNase I (ThermoFisher) before reverse transcription was conducted using the high-capacity cDNA reverse transcription kit (ThermoFisher) on 2 μg of total RNA with random hexamers. cDNA amplification was performed with TaqMan Universal Master Mix or SYBR Green Master Mix (ThermoFisher). Transcripts were quantified using the standard $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Sequences of primers and probes were as follows: B220 sense, antisense and probe mm01293577_m1 from ThermoFisher; PRDM1 mm00476128_m1 (ThermoFisher); RORγt (fwd) 5'-ATGAGAACACAAATTGAAGTGATCC-3' and (rev) 5'-AGTAGGCCACATTACACTGCTG-3'; mb IgA (fwd) 5'-GACAAGCGTGTTGCGTGTAT-3' and (rev) 5'-TAGGAAAGTGGCTCTTGACGTT-3'; secreted IgA (fwd) 5'-GACAAGCGTGTTGCGTGTAT-3' and (rev) 5'-ACGCTGACATTGGTGGGTTTA-3'; mb IgM (fwd) 5'-ATGGAACTCCGGAGAGACCTAT-3' and (rev) 5'-AGGTGAATGCTGAGGAGGAA-3'; secreted IgM (fwd) 5'- ATGGAACTCCGGAGAGACCTAT -3' and (rev) 5'-TGCTATTGACCATGCTAGCGC-3'; J chain mm00461780_m1 (ThermoFisher); pIgR (fwd) 5'-AGAACTCCAGGTTGCCGAAG-3' and (rev) 5'-ACGGATAGTGGCAGGAAACG-3'; GAPDH mm99999915_g1 (ThermoFisher); succinate dehydrogenase complex subunit C (SDHC; fwd) 5'-AGAACATCAGAACTACGCCTAAACATG-3' and (rev) 5'-CCATTCCCCTGTCGAATGTCT-3'.

Flow cytometry. Lung cell suspensions were obtained by mechanical dissociation on cell strainers. Red blood cells were lyzed using the ammonium chloride potassium (ACK) method and cell concentration was evaluated using Cellometer automated cell counting system (Nexcelom). Lung cells (1.5 x10^6 cells) or blood (20 μL) were incubated with mouse Fc block (BD Biosciences) for 15 min at 4°C before staining of surface markers with different fluorochrome-conjugated antibodies for 1 h at 4°C. In blood samples, red blood cells were lyzed using ACK just after antibody staining and before flow cytometry analysis.

In some experiments on lung cells, surface staining was followed by intracellular staining that was performed using the IntraPrep permeabilization reagent (Beckman Coulter), according to the manufacturer's instructions. In case of surface staining followed by intracellular labelling, the starting number of lung cells was $7x10^6$.

The antibodies, all specific of murine proteins, were purchased from different suppliers: the anti-CD5 clone 53-7.3, the anti-CD19 clone 1D3, the anti-CD43 clone S7, the anti-CD45 clone 30-F11, the anti-CD138 clone 281-2, the anti-Ly7 clone GL-7 and the anti-lymphocyte antigen (Ly)6G clone 1A8 from BD Biosciences; the anti-B220 clone RA3-6B2, the anti-CD11b clone M1/70 and the anti CD68 clone FA-11 from Biolegend; the anti-CD3e clone 145-2C11, the anti-F4/80 clone BM8, the anti-granulocyte differentiation antigen (Gr)1 clone RB6-8C5, the anti-IgA clone 11-44-2, the anti-IgM clone eB121-15F9 and the anti-IL17 clone eBio17B7 from eBiosciences. Flow cytometry analyses were performed on the LSRFortessa cytometer (Becton Dickinson). Data were analyzed with the FACSDiva software (Becton Dickinson).

Statistical analyses. To limit the use of animals in accordance with regulations, three or four animals were included per group and some results were confirmed by repeating the experiment once or twice (see figure legends). Data, expressed as means ± standard error of the mean of n=3-12 (see figure legends), were analyzed using Prism software (GraphPad Software). Log-transformed values were analyzed using Student's t-test or 2-way ANOVA followed by Bonferroni's correction, to compare two groups of values and more than two groups, respectively. $P \leq 0.05$ was considered significant.

Acknowledgements

This work was supported by the grant Actions Structurantes 2012 from Région Limousin (to AD) and by CNRS, Univ. Limoges and CHU Limoges. The animal facility belongs to BISCEm, a platform of University of Limoges, funded by European Regional Development Fund and Region Nouvelle Aquitaine.

Author contributions

S. Létuvé and S. Lecardeur performed respectively the experiments on primary bronchial human cells and a part of the Ig ELISA assays. C.C. helped perform the initial flow cytometry analyses. C.O. purified monoclonal human IgA. A.A. performed all the other experiments, designed experiments, analyzed the data, interpreted the results, drafted the manuscript. J.C.A. and M.C. brought financial

support. A.D. brought financial support, planned the project, designed experiments, helped perform experiments on animals, interpreted the results, wrote the manuscript.

References

1- Corthésy, B. Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surface. *Front. Immunol.* 4, 185 (2013).
2- Tardowski, A., Moldoveanu, Z., Koopman, W.J., Radl, J., Haaijman, J.J. & Mestecky, J. Cellular origins of human polymeric and monomeric IgA: enumeration of single cells secreting polymeric IgA1 and IgA2 in peripheral blood, bone marrow, spleen, gingiva and synovial tissue. *Clin. Exp. Immunol.* 85, 341-348 (1991).
3- Lycke, N.Y. & Bemark, M. The regulation of gut mucosal IgA B-cell responses: recent developments. *Mucosal. Immunol.* 10, 13611374 (2017).
4- Lechner, S.M., Papista, C., Chemouny, J.M., Berthelot, L. & Monteiro, R.C. Role of IgA receptors in the pathogenesis of IgA nephropathy. *J. Nephrol.* 29, 5-11 (2016).
5- Johansen, F.-E., Braathen, R. & Brandtzaeg, P. The J chain is essential for polymeric Ig receptor-mediated epithelial transport of IgA. *J. Immunol.* 167, 5185-5192 (2001).
6- Gommerman , J.L., Rojas, O.L. & Fritz J.H. Re-thinking the functions of IgA+ plasma cells. *Gut Microbes.* 5, 652-662 (2014).
7- Meyer-Bahlburg, A. B-1 cells as a source of IgA. Ann. *N.Y. Acad. Sci.* 1362, 122-131 (2015).
8- Aziz, M., Holodick, N.E., Rothstein, T.L. & Wang, P. The role of B-1 cells in inflammation. *Immunol. Res.* 63, 153-166 (2015).
9- Cao, A.T., Yao, S., Gong, B., Elson, C.O. & Cong, Y. Th17 cells upregulate polymeric Ig receptor and intestinal IgA and contribute to intestinal homeostasis. J. Immunol. 189, 4666-1673 (2012).
10- Chorny, A., Puga, I. & Cerutti, C. Innate signaling networks in mucosal IgA class switching. *Adv. Immunol.* 107, 31-69 (2010).
11- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C. & Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Rev. Immunol.* 11, 519-531 (2011).
12- Beringer, A., Noack, M. & Miossec P. IL-17 in chronic inflammation : from discovery to targeting. *Trends Mol. Med.* 22, 230-241 (2016).
13- Planer, J.D., Peng, Y., Kau, A.L., Blanton, L.V., Ndao, I.M., Tarr, P.I. *et al.* Development of the gut microbiota and mucosal IgA responses in twins and gnotobiotic mice. *Nature.* 534, 263-266 (2016).
14- Kawasaki, T. & Kawai, T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* 5, 461 (2014).
15- Johansen, F.-E. & Kaetzel, C. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport : new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. *Mucosal Immunol.* 4, 598-602 (2011).
16- Frantz, A.L., Rogier, E.W., Weber, C.R., Shen, L., Cohen, D.A., Fenton, L.A. *et al.* Targeted deletion of MyD88 in intestinal epithelial cells results in compromised antibacterial immunity associated with downregulation of polymeric immunoglobulin receptor, mucin-2, and antibacterial peptides. *Mucosal Immunol.* 5, 501-512 (2012).
17- Kubinak, J.L., Petersen, C., Stephens, W.Z., Soto, R., Bake, E., O'Connell, R.M. *et al.* MyD88 signaling in T cells directs IgA-mediated control of the microbiota to promote health. *Cell Host Microbe.* 17, 153-163 (2015).
18- Xu, W., Santini, P.A., Matthews, A.J., Chiu, A., Plebani, A., He, B. *et al.* Viral double-stranded RNA triggers Ig class switching by activating upper respiratory mucosa B cells through an innate TLR3 pathway involving BAFF. *J. Immunol.* 181, 276-287 (2008).
19- Grinnell, K.L., Chichger, H., Braza, J., Duong, H. & Harrington, E.O. Protection against LPS-induced pulmonary edema through the attenuation of protein tyrosine phosphatase-1B oxidation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 46, 623-632 (2012).
20- Duchez, S., Amin, R., Cogné, N., Delpy, L., Sirac, C., Pascal, V., *et al.* Premature replacement of mu with alpha immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 3064-3069 (2010).
21- Jaffar, Z., Ferrini, M.E., Herritt, L.A. & Roberts, K. Lung mucosal Th17-mediated responses induce polymeric Ig receptor expression by the airway epithelium and elevate secretory IgA levels. *J. Immunol.* 182 : 4507-4511.
22- Su, G.L., Simmons, R.L. & Wang, S.C. Lipopolysaccharide binding protein participation in cellular activation by LPS. *Crit. Rev. Immunol.* 15, 201-214 (1995).
23- Cortney, E.H., Vidlak, D., Scherr, T.D., Kozel, J.A., Holzapfel, M., Muirhead, D.E. et al. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) contribute to S.aureus orthopedic biofilm infection. J. Immunol. 192, 3778-3792 (2014).
24- Oruc, Z., Oblet, C., Boumediene, A., Druilhe, A., Pascal, V., Le Rumeur, E., *et al.* IgA structure variations associate with immune stimulations and IgA mesangial deposition. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27, 2748-2761 (2016).

25- Zaynagetdinov, R., Sherrill, T.P., Kendall, P.L., Segal, B.H., Weller, K.P., Tighe, R.M., *et al.* Identification of myeloid cell subsets in murine lungs using flow cytometry. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 49, 180-189 (2013).
26- Yanagihara, K., Seki, M. & Cheng P.W. Lipopolysaccharide induces mucus cell metaplasia in mouse lung. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 24, 66-73 (2001).
27- Jean, D., Rezaiguia-Delclaux, S. Delacourt, C., Leclercq, R., Lafuma, C., Brun-Buisson, C. *et al.* Protective effect of endotoxin instillation on subsequent bacteria-induced lung injury in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158, 1702-1708 (1998).
28- Empey, K.M., Hollifield, M & Garvy, B.A. Exogenous heat-killed Escherichia coli improves alveolar macrophage activity and reduces Pneumocystis carinii in lung burden in infant mice. *Infect. Immun.* 75, 3382-3393 (2007).
29- Clement, C.G., Evans, S.E., Evans, C.M., Hawke, D., Kobayashi, R., Reynolds, P.R. *et al.* Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177, 1322-1330 (2008).
30- Masinick, S.A., Montgomery, C.P., Montgomery, C.P. & Hazlett, L.D. Secretory IgA inhibits Pseudomonas aeruginosa binding to cornea and protects against keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 910-918 (1997).
31- Amin, P.B., Diebel, L.N. & Liberati, D.M. Secretory immunoglobulin A abrogates inflammatory responses and improves mortality after pseudomonas pneumonia. *J. Trauma.* 68, 827-833 (2010).
32- Reikvam, D.H., Derrien, M., Islam, R., Erofeev, A., Grcic, V.Sandvik, A. *et al.* Epithelial-microbial crosstalk in polymeric Ig receptor deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 42, 2959-2970 (2012).
33- Bals, R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. Respir. Res. 1, 5 (2000).
34- Boehme, J.D., Stegemann-Koniszewski, S., Autengruber, A., Peters, N., Wissing, J., Jansch, L. *et al.* Chronic lung inflammation primes humoral immunity and augments antipneumococcal resistance. *Sci. Rep.* 7, 4972 (2017).
35- Denney, L., Byrne, A.J., Shea, T.J., Buckley, J.S., Pease, J.E., Herledan, G.M.F., *et al.* Pulmonary epithelial cell-derived cytokine TGF-β1 is a critical cofactor for enhanced innate lymphoid cell function. Immunity. 43, 945-958 (2015).
36- Wang, J., Li, Q., Xie, J & Xu, Y. Cigarette smoke inhibits BAFF expression and mucosal immunoglobulin A responses in the lung during influenza virus infection. *Respir. Res.* 16, 37 (2015).
37- Ladjemi, M.Z., Lecocq, M., Weynand, B., Bowen, H., Gould, H.J., van Snick, J. *et al.* Increased IgA production by B-cells in COPD via lung epithelial interleukin-6 and TACI pathways. *Eur. Respir.* J. 45, 980-993 (2015).
38- Mio, T., Liu, X.-D., Adachi, Y., Striz, I., Skold, C.M., Romberger, D.J. *et al.* Human bronchial epithelial cells modulate collagen gel contraction by fibroblasts. *Am. J. Physiol.* 274, L119-L126 (1998).
39- Kato, A., Truong-Tran, A.Q., Scott, A.L., Matsumoto, K. & Schleimer, P. Airway epithelial cells produce B cell-activating factor of TNF family by an IFN-γ-dependent mechanism. *J. Immunol.* 177, 7164-7172 (2006).
40- Cao, Y, Zhang, E., Yang, J., Yang, Y., Yu, J., Xiao, Y. *et al.* Nasal epithelial GM-CSF contributes to TLR5-mediated modulation of airway dendritic cells and subsequent IgA response. *J. Leuko. Biol.* 102, 575-587 (2017).
41- Moon, C., van Dussen, K.L., Myoshi, H. & Stappenbeck, T.S. Development of a primary mouse intestinal epithelial cell monolayer culture system to evaluate factors that modulate IgA transcytosis. *Mucosal. Immunol.* 7, 818-828 (2014).
42- Schjerven, H., Brandtzaeg, P. & Johansen, F.-E. A novel NF-kappa B/Rel site in intron 1 cooperates with proximal promoter elements to mediate TNF-alpha-induced transcription of the human polymeric Ig receptor. *J. Immunol.* 167, 6412-6420 (2001).
43- Hayashi, M., Takenouchi, N., Asano, M., Kato, M., Tsurumachi, T., Saito, T. *et al.* The polymeric immunoglobulin recptor (secretory component) in a human intestinal epithelial cell line is up-regulated by interleukin-1. *Immunology.* 92, 220-225 (1997).
44- Bruno M.E., Roigier, E.W., Frantz, A.L., Stefka, A.T., Thompson, S.N., & Kaetzel, C.S. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor in intestinal epithelial cells by Enterobacteriaceae: implications for mucosal homeostasis. Immunol. Invest. 39, 356-382 (2010).
45- Shneeman, T.A., Bruno, M.E., Schjerven, H., Johansen, F.-E., Chady, L., Kaetzel, C.S. Regulation of the polymeric Ig receptor by signaling through TLRs 3 and 4: linking innate and adaptive immune responses. *J. Immunol.* 175, 376-384 (2005).
46- Zhang, Q., Chen, X., Eicher, S.D., Ajuwon, A. & Applegate, T. Effect of threonine on secretory immune system using a chicken intestinal ex vivo model with lipopolysaccharide challenge. *Poult. Sci.* 96, 3043-3051 (2017).
47- Shang, L., Fukata, M., Thirunarayanan, N., Martin, A.P., Arnaboldi, P., Maussang, D. *et al.* Toll-like receptor signaling in small intestinal epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria. *Gastroenterology.* 135, 529-538 (2008).
48- Cabrera, G., Vercelli, C., Burzyn, D., Badano, N., Maglioco, A., Costa, H. *et al.* Increases in IgA(+) B cells in Peyer's patches during milk-borne mouse mammary tumor virus infection are influenced by Toll-like receptor 4 and are completely dependent on the superantigen response. J. Gen. Virol. 91, 2814-2820 (2010).
49- Peterson, D.A., McNulty, N.P., Guruge, J.L. & Gordon, J.I. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host Microbe.* 2, 328-339 (2007).
50- Sandin, C., Linse, S., Areschouq, T., Woof, J.M., Reinholdt, J. & Lindahl, G. Isolation and detection of human IgA using a streptococcal IgA-binding peptide. *J. Immunol.* 169, 1357-1364 (2002).

51- Ferretti, S., Bonneau, O., Dubois, G.R., Jones, C.E., & Trifilieff, A. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J. Immunol.* 170, 2106-2112 (2003).
52- Hofstetter, H.H., Ibrahim, S.M., Koczan, D., Kruse, N., Weishaupt, A., Toyka, K.V., *et al.* therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell. Immunol.* 237, 123-130 (2005).
53- Garraud, K., Cleret, A., Mathieu, J., Fiole, D., Gauthier, Y., Quesnel-Hellmann, A., *et al.* Differential role of the interleukin-17 axis and neutrophils in resolution of inhalational anthrax. *Infect. Immun.* 80, 131-142 (2012).
54- Karp, P.H., Moninger, T.O., Weber, S.P., Nesselhauf, T.S., Launspach, J.L., Zabner, J., *et al.* An in vitro model of differentiated humain ariway epithelia. Methods for establishing primary cultures. *Methods Mol. Biol.* 188, 115-137 (2002).
55- Dupin, C., Lhuillier, E., Létuvé, S., Pretolani, M., Thabut, G., Mal, H., *et al.* Inhibition of T cell alloreactivity by bronchial epithelium is impaired in lung transplant recipients, through pathways involving TGF-β, IL-10 and HLA-G. *Transplantation.* 101, 2192-2199 (2017).
56- LeSimple, P., van Seuningen, I., Buisine, M.P., Copin, M.C., Hinz, M., Hoffmann, W., *et al.* Trefoil factor family 3 peptide promotes human airway epithelial ciliated cell differentiation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 36, 296-303 (2007).

IV.3. Résultats supplémentaires et discussion

Le travail présenté ci-dessus montre que le LPS est un régulateur fort des IgA dans les muqueuses, *via* l'augmentation de la production des IgA par les plasmocytes et de la transcytose par les cellules épithéliales. L'augmentation de la transcytose est certainement à mettre sur le compte de l'expression accrue de pIgR par les cellules épithéliales. Pour vérifier ce point, nous avons traité avec du LPS des souris déficientes en pIgR générées par le laboratoire de P BRANDTZAEG. Les résultats sont présentés ci-dessous (Figure 1 supplémentaire – supp – page 95).

Comme décrits dans la littérature, nous avons retrouvé des taux très élevés d'IgA circulantes, plus de dix fois supérieurs aux taux chez les souris normales, et la présence d'IgA dans la lumière de la muqueuse (Johansen 1999, Shimada 1999). Les premiers auteurs à avoir décrits cette particularité, à savoir la présence d'IgA dans la salive, dans le lavage intestinal et dans les fecès, ont montré que la barrière épithéliale digestive est perturbée chez les souris déficientes en pIgR : leur salive contient une grande quantité d'albumine. Il est probable que les IgA que nous mesurons dans le BAL proviennent donc d'un passage passif à partir de la circulation. Lorsque les souris sont traitées par le LPS, une augmentation de deux fois des IgA du BAL est observée. Cette augmentation est cohérente avec celle de l'albumine que nous avions mesurée précédemment dans les souris normales (Figure 2 de l'article « *Lipopolysaccharide enhances IgA production and transcytosis in airways* ») suggérant que l'augmentation de deux fois des IgA dans le BAL après traitement par le LPS est dû à une augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale. Nous avons été étonnés de constater que le LPS n'augmente pas l'expression des transcrits codant pour les IgA membranaires et les IgA sécrétées dans le poumon. Nous n'avons pas d'explication claire pour cette absence d'effet mais nous supposons qu'elle est liée à la perturbation majeure de la muqueuse chez les souris âgées de 6 mois que nous avons utilisées. Un article a décrit qu'à cet âge les souris déficientes en pIgR développent spontanément une bronchopenumopathie chronique

obstructive caractérisée par une inflammation pulmonaire massive (Richmond 2016). Il est possible que les stimuli inflammatoires masquent l'effet du LPS injecté par voie i.t.

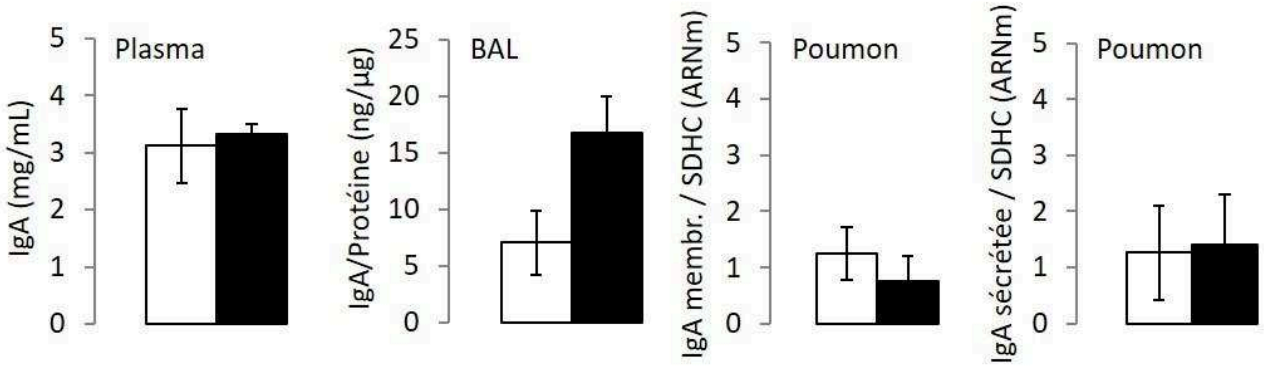


Figure 1 supp : Mesure des IgA circulantes, dans le BAL, et dans le poumon de souris déficientes en pIgR, 5 jours après une injection i.t. de LPS (colonnes noires) ou de sérum physiologique (colonnes blanches).

Comme le LPS avait été décrit comme un facteur provoquant l'hypogalactosylation des IgA sur les lymphocytes B en culture, nous avons mesuré la glycosylation des IgA du BAL des souris traitées ou non par le LPS. Nous avons utilisé deux lectines, HAA pour révéler les GalNAc non galactosylés et la lectine végétale de Maackia Amurensis (MA) qui détecte les sialylations. Les mesures ont été faites sur deux séries de BAL qui ont donné des résultats différents : dans la première série, de nettes hypogalactosylation et sialylation sont mesurées sur les IgA des BAL collectés sur les souris traitées par le LPS alors que dans la seconde série nous ne retrouvons pas ces différences entre les animaux ayant reçu le LPS et les contrôles. Nous avons attribué la non-reproductibilité des résultats à la très faible teneur en IgA des BAL des souris contrôle, ce qui rend l'analyse peu fiable. La glycosylation des IgA circulantes a aussi été quantifiée en utilisant HAA et MA. Les résultats, reproductibles, présentés dans la figure ci-après (Figure 2 supp) indiquent que le LPS injecté par voie i.t. ne modifie pas la glycosylation des IgA circulantes. Alternativement, il est possible que quelques IgA mucosales anormalement glycosylées sous l'effet du LPS passent dans la circulation mais elles sont en trop petite quantité pour être mesurables.

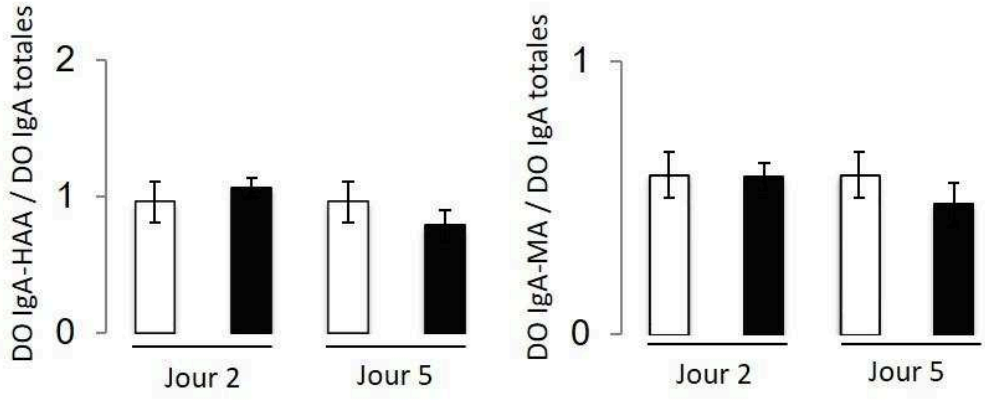


Figure 2 supp : Glycosylation (GalNAc libres à gauche et sialylation à droite) des IgA plasmatiques deux ou cinq jours après une injection i.t. de LPS (colonnes noires) ou de sérum physiologique (colonnes blanches).

Chapitre V. 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 α1KI générées au laboratoire (Duchez 2010). Cette lignée de souris a été créée par insertion du segment génique Cα1 humain dans la région Sμ 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 α1KI-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 α1KI 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 α1KI avec des souris γ1KI 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 α1KI 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 α1KI, des souris γ1KI, des souris α1KI-γ1KI, des souris CD89Tg, des souris α1KI-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 α1KI, γ1KI, et α1KI-γ1KI, 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 α1KI homozygotes ont des taux élevés d'IgA humaines mais pas d'IgG humaines ni d'IgM murines, les souris γ1KI homozygotes ont des taux élevés d'IgG humaines mais pas d'IgA humaines ni d'IgM murines alors que les souris α1KI-γ1KI ont des taux intermédiaires d'IgA et d'IgG humaines mais pas d'IgM murines.

Dans les expériences utilisant les souris α1KI ou celles avec les souris α1KI-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'-ATCTGCCCGGGGCGGCTCAGTAGC-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 μg/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 μg/souris ou 4 ou 8 fois en i.p. à 1,3, 2,5, 3,3, 6,5 ou 13 μg/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).

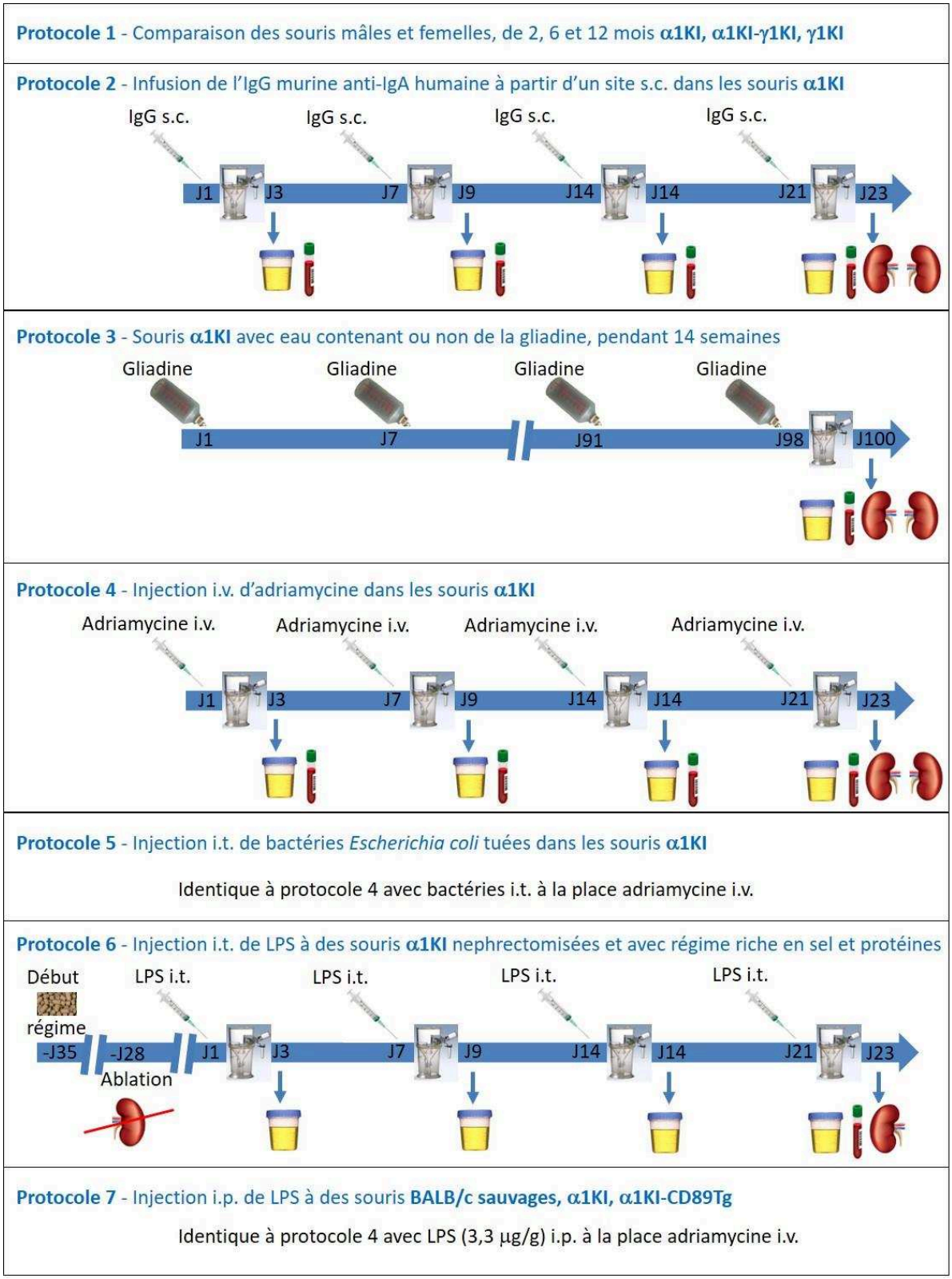


Figure 3 supp : Les différents protocoles utilisés pour modéliser la N-IgA dans les souris α1KI (J pour Jour)

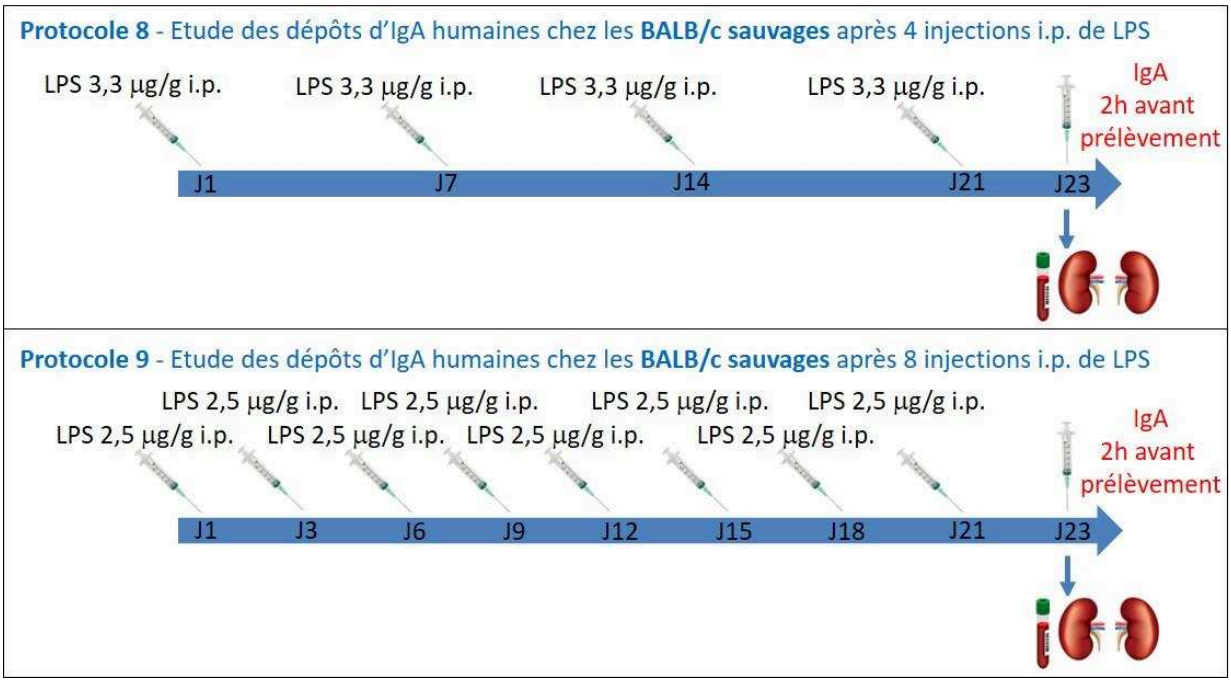


Figure 4 supp : Les protocoles utilisés sur les souris BALB/c pour l'étude des dépôts d'IgA. (J pour Jour)

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 recupérée 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 Kovaslide (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 α1KI et γ1KI (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 α1KI 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.

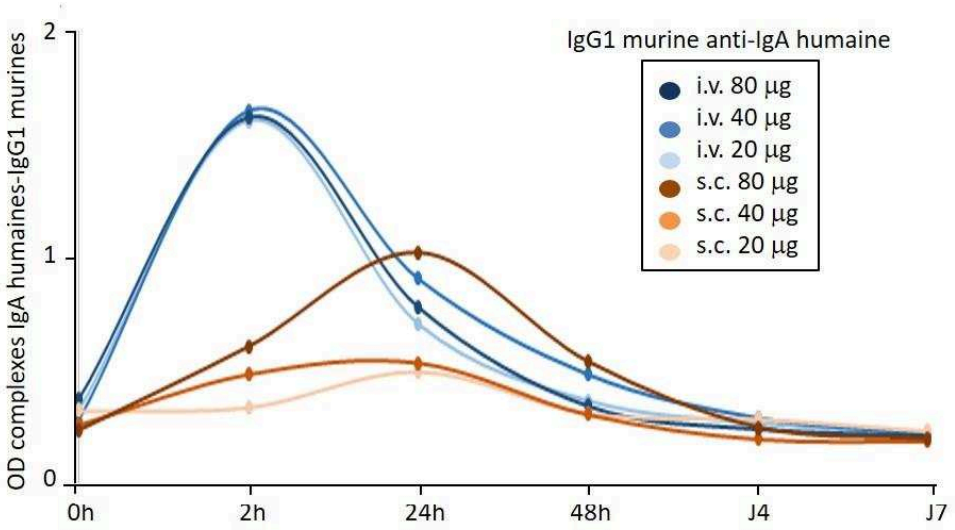


Figure 5 supp : Mesure des complexes immuns IgA humaines - IgG1 murines anti-IgA humaines dans la circulation des souris α1KI, de quelques heures à quelques jours après l'administration en i.v. ou en s.c. de 20, 40 ou 80 µg d'anticorps.

Nos résultats montrent que la N-IgA ne se manifestent pas chez les souris α1KI même âgées d'un an, qu'elles soient mâles ou femelles (protocole 1). En les croisant avec les souris γ1KI, 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 α1KI et α1KI-γ1KI, 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 surchage 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 µg 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 supp).

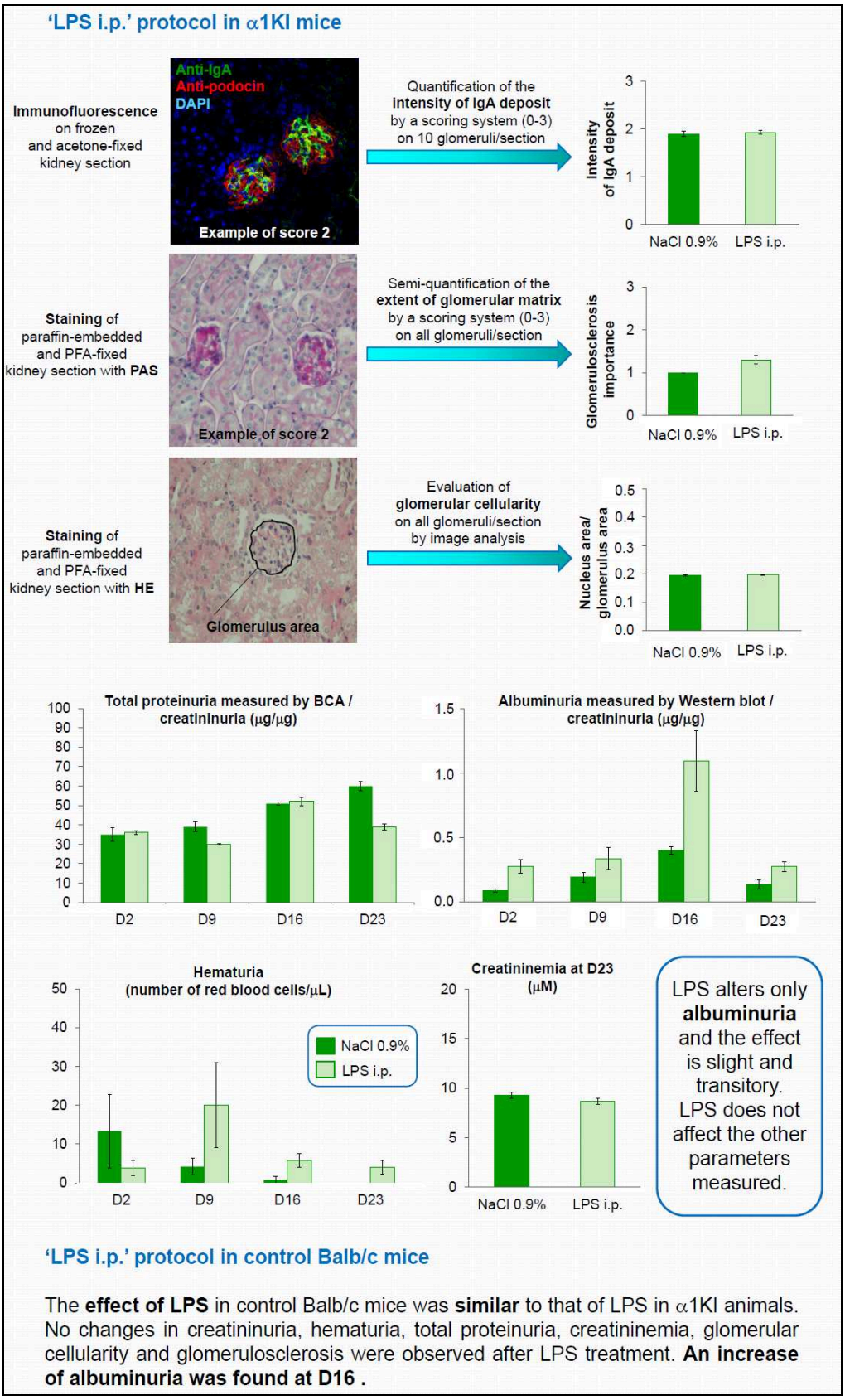


Figure 6 supp : Extrait du poster Archelus A *et al,* Modelization of IgA nephropathy in alpha-knock-in mice présenté au 14ième congrès IIGANN à Tours en 2016.

Le LPS injecté par voie i.p. ne modifie pas les dépôts mésangiaux d'IgA, n'entraine pas de lésions glomérulaires ni d'altération de la créatininémie, ni d'hématurie, et ni de protéinurie totale. Cependant une albuminurie transitoire après la 3ième injection de LPS est mesurée chez les souris α1KI 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 μg/g de souris de façon répétée aux premières souris α1KI-CD89Tg que nous avions 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 23ième jour. Au 2ième 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/μL d'urine *versus* entre 0 et 10 chez les souris contrôle. Au 8ième 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/μL 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 α1KI-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 α1KI-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 α1KI-CD89Tg que nous avions : souris sauvages, souris α1KI homozygotes, souris CD89Tg homozygotes et tenté d'obtenir des α1KI-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 repoduction 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 surement 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 fœtus (Hahn 2012).

Bien que préliminaires, nos résultats sur les souris diffèrent de ceux publiés avec les souris α1KI-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) extrèmement 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 dévérouillée 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 α1KI**.

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 poduites 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 parait donc intéressant de poursuivre le travail amorcé sur les souris α1KI-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 Fcα 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, Hulian 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. I39: 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 Clint 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, morphologyand role in mucosal im munity 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, Courtoiis 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 BALT 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, Gobbetti 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 JVJr, 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 JVJr, 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 JVJr, 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 physicalchemical 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 fançaise 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 worldride; a neglected disease in the United States ? Am J Med. 84 : 129-32.
Julian BA, Wooodford SY, Baehler RW, McMorrow 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, Vrtovsnik 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.
Kiryluk K, Moldoveanu Z, Sanders JT, Eison TM, Suzuki H, Julian BA, Novak J, Gharavi AG, Wyatt RJ (2011) Aberrant glycosylation of IgA1 is inherited in both pediatric IgA nephropathy and Henoch-Schonlein purpura nephritis. Kidney Int. 80 : 79-87.
Kiryluk K, Novak J, Gharavi AG. (2013) Pathogenesis of immunoglobulin A nephropathy: recent insight from genetic studies. Annu Rev Med. 64 : 339-56.
Kiryluk 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, Dallera 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, Magistroni 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.

Kiryluk 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, Reily 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 spatzle/ 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.

Levi Mortera S, Del Chierico F, Vernocchi P, Rosado MM, Cavola A, Chierici M, Pieroni L, Urbani A, Carsetti R, Lante I, Dallapiccola B, Putignani L. (2016) Monitoring perinatal gut microbiota in mouse models by mass spectrometry approaches : parental genetic background and breastfeeding effects. Front Microbiol. 7 : e1523.
Levy M. (1993) Multiplex families in IgA nephropathy. Contrib Nephrol. 104 : 46-53.
Li PK, Leung CB, Chow KM, Cheng YL, Fung SK, Mak SK. (2006) Hong Kong study using valsartan in IgA nephropathy (HKVIN): a double blind randomized, placebo-controlled study. Am J Kidney Dis. 47 : 751-60.
Li GS, Zhang H, Lv JC, Shen Y, Wang HY. (2007) Variants of C1GALT1 gene are associated with the genetic susceptibility to IgA nephropathy. Kidney Int. 71 : 448-53.
Liang S, Jin J, Lin B, Gong J, Li Y, He Q. (2017) Rapamycin induces autophagy and reduces the apoptosis of podocytes under a stimulated condition of immunoglobulin A nephropathy. Kidney Blood Press Res. 42 : 177-87.
Lim BJ, Lee D, Hong SW, Jeong HJ. (2011) Toll-like receptor 4 signaling is involved in IgA-stimulated mesangial cell activation. Yonsei Med J. 52 : 610-5.
Lin X, Ding J, Zhu L, Shi S, Jiang L, Zhao M, Zhang H. (2009) Aberrant galactosylation of IgA1 is involved in the genetic susceptibility of Chinese patients with IgA nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 24 : 3372-5.
Liu LL, Wang LN, Jiang Y, Yao L, Dong LP, Li ZL, Li XL. (2015) Tonsillectomy for igA nephropathy : a meta-analysis. Am J Kidney Dis. 65 : 80-7.
Lu A, Magupalli VG, Ruan J, Yin Q, Atianand MK, Vos MR, Schröder GF, Fitzgerald KA, Wu H, Egelman EH. (2014). Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. Cell. 156: 1193-206.
Lv J, Zhang H, Chen Y, Li G, Jiang L, Singh AK. (2009) Combination therapy of prednisone and ACE inhibitor versus ACE-inhibitor therapy alone in patients with IgA nephropathy: a randomized controlled trial. Am J Kidney Dis. 53 : 26-32.
Lycke NY, Bemark M. (2017) The regulation pf gut mucosal IgA B-cell responses : recent developments. Mucosal Immunol. 10 : 1361-74.
Lydyard P, Grossi CE. (2007) Cellules, tissus et organes du système immunitaire. In D Male, J Brostoff, DB Roth, I Roitt, traduction fançaise de PL Masson (Eds), Immunologie. Elsevier Masson SAS, Issy-les-Moulineaux. pp 31-64.

M

Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A. (2013) Microfold (M) cells : an important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. Mucosal Immunol. 6 : 666-77.
Maes BD, Oyen R, Claes K, Evenepoel P, Kuypers D, Vanwalleghem J. (2004) Mycophenolate mofetil in IgA nephropathy: results of a 3-year prospective placebocontrolled randomized study. Kidney Int. 65 : 1842-9.
Magistroni R, D'Agati VD, Appel GB, Kyrulyk K. (2015) New developments in the genetics, pathogenesis and therapy of IgA nephropathy. Kidney Int. 8 : 974-89.
Maiguma M, Suzuki Y, Suzuki H, Okasaki K, Aizawa M, Muto M, Tomino Y. (2014) Dietary zinc is akey environmental modifier in the progression of IgA nephropathy. PLoS One. 9 : e90558.
Maillard N, Wyatt RJ, Julian BA, Kiryluk K, Gharavi A, Fremeaux-Bacchi V, Novak J. (2015) Current understanding of the role of complement in IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol 26 : 1503-12.
Maintz J, Elema JD, Henningsen B, Blaker F, Bunger P. (1972) A special form of chronic glomerulonephritis: IgA-IgG nephropathy. Dtsch Med Wochenschr. 97 : 1527-33.
Mamani-Matsuda M, Cosma A, Weller S, Faili A, Staib C, Garçon L, Hermine O, Beyne-Rauzy O, Fieschi C, Pers JO, Arakelyan N, Varet B, Sauvanet A, Berger A, Paye F, Andrieu JM, Michel M, Godeau B, Buffet P, Reynaud CA, Weill JC. (2008) The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells. Blood. 111 : 4653-9.
Manno C, Torres DD, Rossini M, Pesce F, Schena FP. (2009) Randomized controlled clinical trial of corticosteroids plus ACE-inhibitors with long-term follow- up in proteinuric IgA nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 24 : 3694–701.
Mantis NJ, Cheung MC, Chintalacharuvu KR, Rey J, Corthesy B, Neutra MR. (2002) Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells : evidence for a novel IgA receptor. J Immunol. 169 : 1844-51.
Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptative immunity. Nature Rev Immunol. 11 : 519-531.
Maruoka T, Nagata T, Kasahara M. (2004) Identification of the rat IgA Fc receptor encoded in the leukocyte receptor complex. Immunogenetics. 55 : 712-6.
Max E E, Korsmeyer S J. (1985). Human J chain gene. Structure and expression in B lymphoid cells. J Exp Med. 161 : 832-49.
Mazanec MB, Kaetzel CS, Lamm ME, Fletcher D, Nedrud JG. (1992) Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. Proc Natl Acad Sci USA. 89 : 6901-5.
Mazanec MB, Nedrud JG, Kaetzel CS, Lamm ME. (1993) A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. Immunol Today. 14 : 430-5.

McCarthy DD, Kujawa J, Wilson C, Papandile A, Poreci U, Porfilio EA, Ward L, Lawson MA, Macpherson AJ, McCoy KD, Pei Y, Novak L, Lee JY, Julian BA, Novak J, Ranger A, Gommerman JL, Browning JL. (2011) Mice overexpressing BAFF develop a commensal flora-dependent, IgA-associated nephropathy. J Clin Invest. 121 : 3991-4002.
McEnery PT, McAdams J, West CD. (1973) Glomerular morphology, natural IgA-IgG mesangial nephropathy. In : Kincaid-Smith P, Mathew TH, Becker EL (Eds), Glomerulonephritis : morphology, natural history and treatment. Part I. John Wiley & sons Inc, New York. pp 305-20.
Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CAJr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature. 388 : 394–97.
Melchers F, Karasuyama H, Haasner D, Bauer S, Kudo A, Sakaguchi N, Jameson B, Rolink A. (1993) The surrogate light chain in B-cell development. Immunol Today. 14:60–8.
Melchers F, Rolink A, Grawunder U, Winkler TH, Karasuyama H, Ghia P. (1995) Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. Curr Opin Immunol. 7: 214-27.
Mellors RC, Ortega LG, Holman HR. (1957) Role of gamma globulis in the renal lesions of systemic lupus erythematosus and chronic membranous glomerulonephritis, with an observation on the lupus erythematosus cell reaction. J Exp Med. 106: 191-201.
Meng T, Li X, Ao X, Zhong Y, Tang R, Peng W, Yang J, Zou M, Zhou Q. (2014) Hemolytic streptococcus may exacerbate kidney damage in IgA nephropathy through CCL20 response to the effect of Th17 cells. PLoS One. 9 : 0108723.
Mestecky J, Raska M, Julian BA, Gharavi AG, Renfrow MB, Moldoveanu Z, Novak L, Matousovic K, Novak J. (2013) IgA Nephropathy: molecular mechanisms of the disease. Annu Rev Pathol. 8:217–40.
Meyer-Bahlburg A. (2015) B-1 cells as a source of IgA. Ann NY Acad Sci. 1362 : 122-31.
Miralda I, Uriarte SM, McLeish KR. (2017) Multiple phenotypic changes define neutrophil priming. Front Cell Infect Microbiol. 7 : 217
Mkaddem SB, Christou I, Rossato E, Berthelot L, Lehuen A, Monteiro RC. (2014) IgA, IgA receptors, and the anti-inflammatory properties. Curr Top Microbiol Immunol. 382 : 221-35.
Monroe JG, Dorshkind K. (2007) Fate decisions regulating bone marrow and peripheral B lymphocyte development. Adv Immunol. 95: 1-50.
Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. (2006) New perspectives in B-1 B cell development and function. Trends Immunol. 27 : 428-33.
Monteiro RC, Halbwachs-Mecarelli L, Roque-Barreira MC, Noel LH, Berger J, Lesavre P. (1985) Charge and size of mesangial IgA in IgA nephropathy. Kidney Int. 28 : 666-71.
Monteiro RC, Leroy V, Launay P, Moura IC, Arcos-Fajardo M, Benbamou M, Haddad E. (2003) Pathogénie de la maladie de Berger: implication des immunoglobulines A et de leurs récepteurs. Med Sci. 19 : 1233-41.
Moore KJ, Andersson LP, Ingalls RR, Monks BG, Li R, Arnaout MA, Golenbock DT, Freeman MW. (2000) Divergent response to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages. J Immunol. 165 : 4272–80.
Morton HC, van den Herik-Oudijk IE, Vossebeld P, Snijders A, Verhoeven AJ, Capel PJ, van de Winkel JG. (1995). Functional association between the human myeloid immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and FcR gamma chain. Molecular basis for CD89/FcR gamma chain association. J Biol Chem. 270 : 29781-7.
Morton HC, Pleass RJ, Storset AK, Brandtzaeg P, Woof JM. (2005) Cloning and characterization of equine CD89 and identification of the CD89 gene in chimpanzees and rhesus macaques. Immunology. 115 : 74-84.
Moura IC, Centelles MN, Arcos-Fajardo M, Malheiros DM, Collawn JF, Cooper MD, Monteiro RC. (2001) Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. J Exp Med. 194 : 417-25.
Moura IC, Arcos-Fajardo M, Sadaka C, Leroy V, Benhamou M, Novak J, Vrtovsnik F, Haddad E, Chintalacharuvu KR, Monteiro RC. (2004) Glycosylation and size of IgA1 are essential for interaction with mesangial transferrin receptor in IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol. 15 : 622-34.
Moura IC, Arcos-Fajardo M, Gdoura A, Leroy V, Sadaka C, Mahlaoui N, Lepelletier Y, Vrtovsnik, Haddad E, Benhamou M, Monteiro RC. (2005) Engagement of transferrin receptor by polymeric IgA1 : evidence for a positive feedback loop involving increased receptor expression and mesangial cell proliferation in IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol. 16 : 2667-76.
Moura IC, Benhamou M, Launay P, Vrtovsnik F, Blank U, Monteiro RC. (2008) The glomerular response to IgA deposition in IgA nephropathy. Semin Nephrol. 28 : 88-95.

N

Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K. (2002) Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. Nat Immunol. 3 : 667-72.
Narita I, Kondo D, Goto S, Saito N, Watanabe Y, Yamazaki H, Sakatsume M, Saito A, Gejyo F. (2001) Association of gene polymorphism of polymeric immunoglobulin receptor and IgA nephropathy. Intern Med. 40: 867-72.
Nast CC. (2012) Infection-related glomerulonephritis : changing demographics and outcomes. Adv Chronic Kidney Dis. 19 : 68-75.

Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP. (2001). Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. Nat Immunol. 2,1004-9.
Nikaido H, Vaara M. (1987) Outer membrane. In : Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Umbarger HE (Eds), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington DC. pp 7-22.
Nishie T, Miyaishi O, Azuma H, Kameyama A, Naruse C, Hashimoto N, Yokoyama H, Narimatsu H, Wada T Asano M. (2007) Development of immunoglobulin A nephropathy-like disease in ß-1,4-galactosyltransferase-I-deficient mice. Am J Pathol. 170 : 447-56.
Novak J, Tomana M, Matousovic K, Brown R, Hall S, Novak L. (2005) IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy differentially affect proliferation of mesangial cells. Kidney Int. 67 : 504-13.
Novak J, Moldoveanu Z, Renfrow MB, Yanagihara T, Suzuki H, Raska M, Hall S, Brown R, Huang WQ, Goepfert A, Kilian M, Poulsen K, Tomana M, Wyatt RJ, Julian BA, Mestecky J. (2007) IgA nephropathy and Henoch-Schoenlein purpura nephritis: aberrant glycosylation of IgA1, formation of IgA1-containing immune complexes, and activation of mesangial cells. Contrib Nephrol. 157 : 134-8.
Novak J, Julian BA, Tomana M, Mestecky J. (2008) IgA glycosylation and immune complexes in the pathogenesis of IgA nephropathy. Semin Nephrol. 28 : 78-87.
Novak J, Raskova Kafkova L, Suzuki H, Tomana M, Matousovic K, Brown R, Hall S, Sanders JT, Eison TM, Moldoveanu Z, Novak L, Novak Z, Mayne R, Julian BA, Mestecky J, Wyatt RJ. (2011) IgA1 immune complexes from pediatric patients with IgA nephropathy activate cultured mesangial cells. Nephrol Dial Transplant. 26 : 3451–7.

O

Obara W, Iida A, Suzuki Y, Tanaka T, Akiyama F, Maeda S, Ohnishi Y, Yamada R, Tsunoda T, Takei T, Ito K, Honda K, Uchida K, Tsuchiya K, Yumura W, Ujiie T, Nagane Y, Nitta K, Miyano S, Narita I, Gejyo F, Nihei H, Fujioka T, Nakamura Y. (2003) Association of single-nucleotide polymorphisms in the polymeric immunoglobulin receptor gene with immunoglobulin A nephropathy (IgAN) in Japanese patients. J Hum Genet. 48 : 293-9.
Ogawa H, Rafiee P, Heidemann J, Fisher PJ, Johnson NA, Otterson MF, Kalyanaraman B, Pritchard KAJr, Binion DG. (2003) Mechanisms of endotoxin tolerance in human microvascular endothelial cells. J Immunol. 170 : 5956-64.
Ohno H. (2016) Intestinal M cells. J Biochem. 159 :151-60.
Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. (2000. Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. J Immunol. 164:558–61.
Okasaki K, Suzuki Y, Otsuji M, Suzuki H, Kihara M, Kajiyama T, Hashimoto A, Nishimura H, Brown R, Hall S, Novak J, Izui S, Hirose S, Tomino Y. (2012) Development of a model of early-onset IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol. 23 : 1364-74.
Oortwijn BD, Rastaldi MP, Roos A, Mattinzoli D, Daha MR, van Kooten C. (2007). Demonstration of secretory IgA in kidneys of patients with IgA nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 22 : 3191-5.
Oruc Z, Oblet C, Boumediene A, Druilhe A, Pascal V, Le Rumeur E, Cuvillier A, El Hamel C, Lecardeur S, Leanderson T, Morelle W, Demengeot J, Aldigier JC, Cogné M. (2016) IgA structure variations associate with immune stimulations and IgA mesangial deposition. J Am Soc Nephrol. 27:2748-61.
Otani M, Nakata J, Kihara L, Leroy V, Moll S, Wada Y, Izui S. (2012) O-glycosylated IgA rheumatoid factor induces IgA deposits and glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol. 23 : 438-46.

P

Pabst R, Gehrke F. (1990) Is the BALT an integral structure of the lung in normal mammals, including humans ? Am J Respir Cell Mol Biol. 3 :131-5.
Pabst R. (1992). Is BALT a major component of the human lung immune system ? Immunol Today. 13 :119-22.
Papista C, Berthelot L, Monteiro RC. (2011) Dysfunctions of the IgA system: a common link between intestinal and renal diseases. Cell Mol Immunol. 8 : 126-34.
Papista C, Lechner S, Ben Mkaddem S, LeStang MB, Abbad L, Bex-Coudrat J, Pillebout Z, Chemouny JM, Jablonski M, Flamant M, Daugas E, Vrtovsnik F, Yiangou M, Berthelot L, Monteiro RC. (2015) Gluten exacerbates IgA nephropathy in humanized mice through gliadin-CD89 interaction. Kidney Int. 88 : 276-85.
Partrick DA, Moore FA, Moore EE, Barnett CCJr, Silliman CC. (1996) Neutrophil priming and activation in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. New Horiz. 4 : 194-210.
Pascal V, Laffleur B, Debin A, Cuvillier A, van Egmond M, Drocourt D, Imbertie L, Pangault C, Tarte K, Tiraby G, Cogné M. (2012) Anti-CD20 IgA can protect mice against lymphoma development : evaluation of the direct impact of IgA and cytotoxic effector recruitment on CD20 target cells. Haematologica. 97 : 1686-94.
Patole PS, Pawar RD, Lech M, Zecher D, Schmidt H, Segerer S, Ellwart A, Henger A, Kretzler M, Anders HJ. (2006) Expression and regulation of toll-like receptors in lupus-like immune complex glomerulonephritis of MRL-Fas(lpr) mice. Nephrol Dial Transplant. 21 : 3062-73.

Phalipon A, Cardona A, Kraehenbuhl JP, Edelman L, Sansonetti P, Corthesy B. (2002) Secretory component: a new role in secretory IgAmediated immune exclusion in vivo. Immunity. 17 : 107-15.
Piccolo M, De Angelis M, Lauriero G, Montemurno E, Di Cagno R, Gesualdo L, Gobbetti M. (2015) Salivary microbiota associated with immunoglobulin A nephropathy. Microb Ecol. 70 : 557-65.
Pillebout E, Vérine J. (2016) Glomérulonéphrite à dépots mésangiaux d'immunoglobulines A. Nephrol Ther. 12 : 238-54.
Pippin JW, Brinkkoetter PT, Cormack-Aboud FC, Durvasula RV, Hauser PV, Kowalewska J, Krofft RD, Logar CM, Marshall CB, Ohse T, Shankland SJ. (2009) Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. Am J Physiol Renal Physiol. 296 : F213-F29
Placzek WJ, Yanagawa H, Makita Y, Renfrow MB, Julian BA, Rizk DV, Suzuki Y, Novak J, Suzuki H. (2018) serum galactose-deficient-IgA1 and IgG autoantibodies correlate in patients with IgA nephropathy. PLoS One. 13 : e0190967.
Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCrmice: mutation in *Tlr4* gene. Science. 282 : 2085-8.
Polesskaya O, Wong C, Lebron L, Chamberlain JM, Gelbard HA, Goodfellow V, Kim M, Daiss JL, Dewhurst S (2014) MLK3 regulates fMLP-stimulated neutrophil motility. Mol Immunol. 58 : 214-22.
Ponticelli C, Glassock RJ. (2010) Posttransplant recurrence of primary glomerulonephritis. Clin J Am Soc Nephrol. 5 : 2363-72.
Pozzi C, Andrulli S, Pani A, Scaini P, Del Vecchio L, Fogazzi G. (2010) Addition of azathioprine to corticosteroids does not benefit patients with IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol. 21 : 1783-90.
Praga M, Gutirrez E, Gonzalez E, Morales E, Herandez E. (2003) Treatment of IgA nephropathy with ACE inhibitors : a randomized and controlled trial. J Am Soc Nephrol. 14 : 1578-83.

Q

Qian X, Zhao H, Chen X, Li J. (2018) Disruption of transient receptor potential melastatin 2 decreases elastase release and bacterial clearance in neutrophils. Innate Immun. 24 : 122-130.
Qin W, Zhong X, Fan JM, Zhang YJ, Liu XR, Ma XY. (2008) External suppression causes the low expression of the Cosmc gene in IgA nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 23 : 1608-14.
Qin J, Li R., Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pederson O, Parkhill J, Weissenbach J, MetaHIT consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. 464: 59–65.
Qiu W, Zhou J, Zhu G, Zhao D, He F, Zhang J, Lu Y, Yu T, Liu L, Wang Y. (2014) Sublytic C5b-9 triggers glomerular mesangial cell apoptosis via XAF1 gene activation mediated by p300-dependent IRF-1 acetylation. Cell Death Dis. 5:e1176.
Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D. (1999). Endotoxin tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (*Tlr4*). J Exp Med. 189 : 615–25.

R

Rauterberg EW, Lieberknecht HM, Wingen,AM, Ritz E. (1987) Complement membrane attack (MAC) in idiopathic IgA-glomerulonephritis. Kidney Int. 31 : 20–9.
Renfrow MB, Cooper HJ, Tomana M, Kulhavy R, Hiki Y, Toma K, Emmett MR, Mestecky J, Marshall AG, Novak J. (2005) Determination of aberrant O-glycosylation in the IgA1 hinge region by electron capture dissociation fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry. J Biol Chem. 280 : 19136-45.
Reinholdt J, Kilian M. (1987) Interference of IgA protease with the effect of secretory IgA on adherence of oral streptococci to salivacoated hydroxyapatite. J Dent Res. 66 : 492-7.
Richmond I, Pritchard GE, Ashcroft T, Avery A, Corris PA, Walters EH. (1993) BALT in human lung: its distribution in smokers and non smokers. Thorax. 48 : 1130-4.
Richmond BW, Brucker RM, Han W, Du RH, Zhang Y, Cheng DS, Gleaves L, Abdolrasulnia R, Polosukhina D, Clark PE, Bordenstein SR, Blackwell TS, Polosukhin VV. (2016) Airway bacteria drive a progressive COPD-like phenotype in mice with polymeric immunoglobulin receptor deficiency. Nature Comm. 7, 11240.
Robert ISD. (2013) Oxford classification of immunoglobulin A nephropathy: an update. Curr Opin Nephrol Hypertens. 22 : 281-6.
Robert T, Berthelot L, Cambier A, Rondeau E, Monteiro RC. (2015) Molecular insights into the pathogenesis of IgA nephropathy. Trends Mol Med. 21 : 762-75.
Rochereau N, Drocourt D, Perouzel E, Pavot V, Redelinghuys P, Brown GD, Tiraby G, Roblin X, Verrier B, Genin C, Corthésy B, Paul S. (2013) Dectin-1 is essential for reverse transcytosis of glycocylated SIgA-antigen complexes by intestinal M cells. Plos Biol. 11:e1001658.

Rochereau N, Pavot V, Verrier B, Jospin F, Ensinas A, Genin C, Corthesy B, Paul S. (2016) Delivery of antigen to nasal-associated lymphoid tissue microfold cells through secretory IgA targeting local dendritic cells confers protective immunity. J Allergy Clin Immunol. 137 : 214-22.
Rodrigues JC, Haas M, Reich HN. (2017) IgA nephropathy. Clin J Am Soc Nephrol. 12 : 677-86.
Rogier EW, Frantz AL, Bruno ME, Wedlund L, Cohen DA, Stromberg AJ, Kaetzel CS. (2014) Lessons from mother : long-term impact of antibodies in breast milk on the gut microbiota and intestinal immune system of breastfed offspring. Gut Microbes. 5 : 663-8.
Roos A, Bouwman LH, van Gijlswijk-Janssen DJ, Faber-Krol MC, Stahl GL, Daha MR. (2001) Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. J Immunol. 167 : 2861-8.
Rothstein TL, Quach TD. (2015) The human counterpart of mouse B-1 cells. Ann N Y Acad Sci. 1362 : 143-52.
Roy B, Brennecke A-M, Agarwal S, Krey M, Duber S, Weiss S. (2013) An Intrinsic Propensity of Murine Peritoneal B1b Cells to Switch to IgA in Presence of TGF-b and Retinoic Acid. PLoS ONE. 8 : e82121.
Russo D, Minutolo R, Pisani A. (2001) Coadministration of losartan and enalapril exerts additive antiproteinuric effect in IgA nephropathy. Am J Kid Dis. 38 : 18-25.

S

Sallustio F, Cox SN, Serino G, Curci C, Pesce F, De Palma G, Papagianni A, Kirmizis D, Falchi M, Schena FP. (2015) Genome-wide scan identifies a copy number variable region at 3p21.1 that influences the TLR9 expression levels in IgA nephropathy patients. Eur J Hum Genet. 23 : 940-8.
Samuels JA, Strippoli GF, Craig JC, Schena FP, Molony DA. (2004) Immunosuppressive treatments for immunoglobulin A nephropathy: a meta-analysis of randomized controlled trials. Nephrology. 9 : 177–85.
Sano T, Hiki Y, Kokubo T, Iwase H, Shigematsu H, kobayashi Y. (2002) Enzymatically deglycosylated human IgA1 molecules accumulate and induce inflammatory cell reaction in rat glomeruli. Nephrol Dial Transplant. 17 : 50-56.
Schena FP. (1995) Immunogenetic aspects of primary IgA nephropathy. Kidney Int. 48 : 1998-2013.
Schmitt R, Carlsson F, Mörgelin M, Tati R, Lindahl G, Karpman D. (2010) Tissue deposits of IgA-binding streptococcal M proteins in IgA nephropathy and Henoch-Schonlein purpura. Am J Pathol. 176 : 607-18.
Schmitt R, Stahl AL, Olin AI, Kristoffersson AC, Rebetz J, Novak J, Lindahl G, Kapman D. (2014) The combined role of galactose-deficient IgA1 and streptococcal IgA-binding M protein in inducing IL-6 and C3 secretion from human mesangial cells: implications for IgA nephropathy. J Immunol. 193 : 317–26.
Scolari F, Amoroso A, Savoldi S, Prati E, Scaini P, Manganoni A, Borelli I, Mazzola G, Canale L, Sacchi Nunzia Miglietti G, Critinelli L, Curtoni ES, Binda PL, Bonomelli D, Maiorca R. (1992). Familial occurrence of primary glomerulonephritis : evidence for a role of genetic factors. Nephrol Dial Transplant. 7 : 587-96.
Schroeder HWJr, Cavacini L. (2010) Structure and function of immunoglobulins. J Allergy Clin Immunol. 125, S41–52.
Sekikawa T, Kashihara N, Maruyama K, Satoh M, Okamoto K, Kanao K, Maeshima Y, Sugiyama H, Yamasaki Y, Makino H. (1998) Expression of interleukin-8 in human glomerulonephritis. Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 99 : 217-24.
Semedo P, Donizetti-Oliveira C, Burgos-Silva M, Cenedeze MA, Avancini Costa Malheiros DM, Pacheco-Silva A, Câmara NO. (2010) Bone marrow mononuclear cells attenuate fibrosis development after severe acute kidney injury. Lab Invest. 90 : 685-95.
Serino G, Sallustio F, Cox SN, Pesce F, Schena FP. (2012) Abnormal miR-148b expression promotes aberrant glycosylation of IgA1 in IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol. 23 : 814-24.
Serino G, Sallustio F, Curci C, Cox SN, Pesce F, De Palma G. (2015) Role of let-7b in the regulation of N-acetylgalactosaminyltransferase 2 in IgA nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 30 : 1132-9.
Sevillano AM, Gutiérez E, Yuste C, Cavero T, Mérida E, Rodriguèz P, Garcia A, Morales E, Fernandez C, Martinez MA, Moreno JA, Praga M. (2017) Remission of hematuria improves renal survival in IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol. 28 : 3089-99.
Shang L, Fukata M, Thirunarayanan N, Martin AP, Arnaboldi P, Maussang D, Berin C, Unkeless JC, Mayer L, Abreu MT, Lira SA. (2008) Toll-like recptor signaling in small intestinal epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria. Gastroenterology. 135 : 529-38.
Sharabi AB, Aldrich M, Sosic D, Olson EN, Friedman AD, Lee SH, Chen SY. (2008) Twist-2 controls myeloid lineage development and function. PLoS Biol. 6 : e316.
Sharmin S, Shimizu Y, Hagiwara M, Hirayama K, Koyama A. (2004). Staphylococcus aureus antigens induce IgA-type glomerulonephritis in Balb/cmice. J Nephrol. 17 : 504-11.
Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, Hu L, Shao F. (2014) Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. Nature. 514 :187-92.
Shimada S, Kawaguchi-Miyashita M, Kushiro A, Sato T, Nanno M, Sako T, Matsuoka Y, Sudo K, Tagawa Y, Iwakura Y, Ohwaki M. (1999) Generation of polymeric immunoglobulin receptor-deficient mouse with marked reduction of secretory IgA. J Immunol. 163 : 5367-73.

Shimizu Y, Seki M, Kaneko S, Hagiwara M, Yoh K, Yamagata K, Koyama A. (2007) Patients with IgA nephropathy respond strongly through production of IgA with low avidity against Staphylococcus aureus. Contrib Nephrol. 157 : 139-43.
Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. (2005) Identification and characterization of circulating human transitional B cells. Blood. 105 : 4390-8.
Sminia T, Van der Brugge-Gamelkoorn GJ, Jeurissen SH. (1989) Structure and function of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT). Crit Rev Immunol. 9 : 119-50.
Smith SM, Tung KS. (1985) Incidence of IgA-related nephritides in American Indians in New Mexico. Hum Pathol. 16 : 181-4.
Smith AC, Molyneux K, Feehally J, Barratt J. (2006) O-Glycosylation of serum IgA1 antibodies against mucosal and systemic antigens in IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol. 17: 3520-8.
Spiro RG. (2002) Protein glycosylation : nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. Glycobiology. 12 : 43-R-56R.
Stangou M, Ekonomidou D, Giamalis P, Liakou H, Tsiantoulas A, Pantzaki A. (2011) Steroids and azathioprine in the treatment of IgA nephropathy. Clin Exp Nephrol.15 : 373-80.
Stratta P, Musetti C, Barreca A, Mazzucco G. (2014) New trends of an old disease : the acute post infectious glomerulonephritis at the beginning of the new millennium. J Nephrol. 27 : 229-39.
Su T, Chapin SJ, Bryant DM, Shewan AM, Young K, Mostov KE. (2011) Reduced immunoglobulin A transcytosis associated with immunoglobulin A nephropathy and nasopharyngeal carcinoma. J Biol Chem. 286 : 44921-5.
Sutherland DB, Fagarasan S. (2012) IgA synthesis: a form of functional immune adaptation extending beyond gut. Curr Opin Immunol. 24 : 261-8.
Suzuki H, Moldoveanu Z, Hall S, Brown R, Julian, BA, Wyatt RJ, Tomana M, Tomino Y, Novak J, Mestecky J. (2007) IgA nephropathy: characterization of IgG antibodies specific for galactose-deficient IgA1. Contrib Nephrol. 157 : 129-33.
Suzuki H, Suzuki Y, Narita I, Aizawa M, Kihara M, Yamanaka T, Kanou T, tsukaguchi H, Novak J, Horikoshi S, Tomino Y. (2008) Toll-like receptor 9 affects severity of IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol. 19 : 2384-95.
Suzuki H, Fan R, Zhang Z, Brown R, Hall S, Julian BA, Chatham WW, Suzuki Y, Wyatt RJ, Moldoveanu Z, Lee JY, Robinson J, Tomana M, Tomino Y, Mestecky J, Novak J. (2009). Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. J Clin Invest. 119 : 1668-77.
Suzuki H**,** Kiryluk K, Novak J, Moldoveanu Z, Herr AB, Renfrow MB, Wyatt RJ, Scolari F, Mestecky J, Gharavi AG, Julian BA. (2011) The pathophysiology of IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol. 22 : 1795-803.
Suzuki H, Raska M, Yamada K, Moldoveanu Z, julian BA, Wyatt RJ, Tomino Y, Gharavi AG, Novak J. (2014a) Cytokines alter IgA1 O-glycosylation by dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc-II enzymes. J Biol Chem. 289, 5330-9.
Suzuki H, Suzuki Y, Novak J, Tomino Y. (2014 b) Development of animal models of human IgA nephropathy. Drug Discov Today Dis Models. 11 : 5-11.
Szalo IM, Taminiau B, Mainil J. (2006) Le lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* : structure, biosynthèse et rôles. Ann. Méd. Vét. 150 : 108-124.

T

Takeda K, Akira S. (2004) TLR signaling pathways. Semin Immunol. 16 : 3–9.
Tamouza H, Chemouny JM, Raskova Kafkova L, Berthelot L, Flamant M, Demion M, Mesnard L, Paubelle E, Walker F, Julian BA, Tissandié E, Tiwari MK, Camara NOS, Vrtovsnik F, Benhamou M, Novak J, Monteiro RC, Moura IC. (2012) The IgA1 immune complex-mediated activation of the MAPK/ERK kinase pathway in mesangial cells is associated with glomerular damage in IgA nephropathy. Kidney Int. 82 : 1284-96.
Tang SC, Tang AW, Wong SS, Leung JC, Ho YW, Lai KN. (2010) Long-term study of mycophenolate mofetil treatment in IgA nephropathy. Kidney Int. 77 : 543-9.
Tissandié E, Morelle W, Berthelot L, Vrtovsnik F, Daugas E, Walker F, Lebrec D, Trawalé JM, Francoz C, Durand F, Moura IC, Paradis V, Moreau R, Monteiro RC. (2011) Both IgA nephropathy and alcoholic cirrhosis feature abnormally glycosylated IgA1 and soluble CD89-IgA and IgG-IgA complexes : common mechanisms for distinct diseases. Kindey Int. 80 : 1352-63.
Tomana M, Novak J, Julian BA, Matousovic K, Konecny K, Mestecky J. (1999) Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. J Clin Invest. 104 : 73-81.
Tonegawa S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. Nature. 302: 575-81.
Toshchakov V, Jones BW, Perera PY, Thomas K, Cody MJ, Zhang S, Williams BR, Major J, Hamilton TA, Fenton MJ, Vogel SN. (2002) TLR4, but not TLR2, mediates IFN-β-induced STAT1α/β-dependent gene expression in macrophages. Nat Immunol. 3: 392–98.
Trimarchi H, Barratt J, Cattran DC, Cook HT, Coppo R, Haas M, Liu ZH, Roberts IS, Yuzawa Y, Zhang H, Feehally J, IgAN classification working group of the international IgA nephropathy network and the renal

pathology society. (2017) Oxford classification of IgA nephropathy 2016 : an update from the nephropathy classification working group. Kidney Int. 91 : 1014-21.
Tumlin JA, Madaio MP, Hennigar R. (2004) Idiopathic IgA nephropathy : pathogenesis, histopathology and therapeutic options. Clin J Am Soc Nephrol. 2 : 1054-61.

U

Ueda, Y, Sakai O, Yamagata M, Kitajima T, Kawamura K. (1975) IgA glomerulonephritis in Japan. Contrib Nephrol. 4 : 37-47.

V

Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Häcker H, Wagner H. (2001) Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. J Biol Chem. 276 : 31332-9.
Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. (2002) HSP70 as endogenous stimulus of toll/interleukin-1 receptor signal pathway. J Biol Chem 277:15107–12.
Van der Boog PJ, de Fijter JW, van Kooten C, van der Holst R, van Seggelen A, van Es LA, Daha MR. (2003) Complexes of IgA with FcalphaRI/CD89 are not specific for primary IgA nephropathy. Kidney Int. 63 : 514-21.
Van der Boog PJ, van Kooten C, van Zandbergen G, Klar-Mohamad N, Oortwijn B, Bos NA, van Remoorters A, Hokke CH, de Fijter JW, Daha MR. (2004) Injection of recombinant FcalphaRI/CD89 in mice does not induce mesangial IgA deposition. Nephrol Dial Transplant. 19 : 2729-36.
Van der Boog PJM, van Kooten C, de Fijter JW, Daha MR. (2005) Role of macromolecular IgA in IgA nephropathy. Kidney Int. 67 : 813-21.
Van der Steen L, Tuk CW, Bakema JE, Kooij G, Reijerkerk A, Vidarsson G, Bouma G, Kraal G, de Vries HE, Beelen RH, van Egmond M. (2009) Immunoglobulin A : Fc(alpha)RI interactions induce neutrophil migration through release of leukotriene B4. Gastroenterology. 137 : 2018-29.
Van Egmond M, van Vuuren AJ, Morton HC, van Spriel AB, Shen L, Hofhuis FM, Saito T, Mayadas TN, Verbeek JS, van de Winkel. (1999) Human immunoglobulin A receptor (FcalphaRI, CD89) function in transgenic mice requires both FcR gamma chain and CR3 (CD11b/CD18). Blood. 93 : 4387-94.
Vaure C, Liu Y. (2014) A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. Front Immunol. 5 : 316.
Velden VH, Versnel HF. (1998) Bronchial epithelium : morphology, function and pathophysiology in asthma. Eur Cytokine Netw. 9 : 585-97.
Vidya MK, Kumar VG, Sejian V, Bagath M, Krishnan G, Bhatta R. (2017). Toll-like receptors: significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. Int Rev Immunol.13 : 1-17.
Vinuesa CG, Sanz I, Cook MC. (2009) Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. Nat Rev Immunol. 9 : 845-57.
Visintin A, Iliev DB, Monks BG, Halmen KA, Golenbock DT. (2006) MD-2. Immunobiology. 211 : 437-47.
Vivante A, Afek A, Frenkel-Nir Y, Tzur D, Farfel A, Golan E, Chaiter Y, Shohat T, Skorecki K, Calderon-Margalit R. (2011) Persistent asymptomatic isolated microscopic hematuria in Israeli adolescents and young adults and risk for end-stage renal disease. JAMA. 306 : 729-36.
Vuong MT, Hahn-Zoric M, Lundberg S, Gunnarsson I, van Kooten C, Wramner L, Seddighzadeh M, Fernström A, Hanson LA, Do LT, Jacobson SH, Padyukov L. (2010). Association of soluble CD89 levels with disease progression but not susceptibility in IgA nephropathy. Kidney Int. 78, 1281–1287.

W

Wan JX, Fukuda N, Endo M, Tahira Y, Yao EH, Matsuda H, Ueno T, Matsumoto K. (2007). Complement 3 is involved in changing the phenotype of human glomerular mesangial cells. J Cell Physiol. 213. 495–501.
Wang J, Anders RA, Wu A, Peng D, Chi JH, Su Y, Karaliukas R, Kang HS, Turner JR, Fu YX. (2004) Dysregulated LIGHT expression on T cells mediates intestinal inflammation and contributes to IgA nephropathy. J Clin Invest. 113 : 826-35.
Wang L, Li X, Shen H, Mao N, Wang H, Cui L, Cheng Y, Fan J. (2016a) Bacterial IgA protease-mediated degradation of agIgA1 and agIgA1 immune complexes as a potential therapy for IgA nephropathy. Sci Rep. 6 : 30964.
Wang L, Tan RZ, Chen Y, Wang HL, Liu YH, Wen D, Fan JM. (2016b) CagA promotes proliferation and secretion of extracellular matrix by inhibiting signaling pathway of apoptosis in rat glomerular mesangial cells. Ren Fail. 38 : 458-64.

Watanabe H, Goto S, Mori H, Higashi K, Hosomichi K, Aizawa N, Takahashi N, Tsuchida M, Suzuki Y, Yamada T, Horii A, Inoue I, Kurokawa K, Narita I. (2016) Comprehensive microbiome analysis of tonsillar crypts in IgA Nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 32 : 2072-9.
Wei C, Möller CC, Altintas MM, Li J, Schwarz K, Zacchigna S, Xie L, Henger A, Schmid H, Rastaldi MP, Cowan P, Kretzler M, Parrilla R, Bendayan M, Gupta V, Nikolic B, Kalluri R, Carmeliet P, Mundel P, Reiser J. (2008). Modification of kidney barrier function by the urokinas receptor. Nat Med. 14 : 55-63.
Weltzin R, Lucia-Jandris P, Michetti P, Fields BN, Kraehenbuhl JP, Neutra MR. (1989). Binding and transepithelial transport of immunoglobulins by intestinal M cells: demonstration using monoclonal IgA antibodies against enteric viral proteins. J Cell Biol. 108 : 1673-85.
Williams RC, Gibbons RJ. (1972) Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A : a mechanism of antigen disposal. Science. 177 : 697-9.
Wines BD, Hogarth PM. (2006) IgA receptors in health and disease. Tissue Antigens. 68 : 103-14.
Woodroffe AJ, Thomson NM, Meadows R, Lawrence JR. (1975) IgA-associated glomerulonephritis. Aust N Z J Med. 5 : 97-100.
Woof JM, Russell MW. (2006) The function of immunoglobulin A in immunity. J Pathol. 208 : 270-82.
Woof JM, Russell MW. (2011). Structure and function relationships in IgA. Mucosal Immunol. 4 : 590-7.
Wyatt RJ, Julian BA. (1988) Activation of complement in IgA nephropathy. Am J Kidney Dis. 12 **:** 437-42.
Wyatt RJ, Julian BA. (2013) IgA nephropathy. N Engl J Med. 368 : 2402-14.

X

Xie Y, Nishi S, Ueno M, Imai N, Sakatsume M, Narita I, Suzuki Y, Akazawa K, Shimada H, Arakawa M, Gejyo F. (2003) The efficacy of tonsillectomy on long-term renal survival in patients with IgA nephropathy. Kidney Int. 63 : 1861-7.
Xie Y, Chen X, Nishi S, Narita I, Gejyo F. (2004) Relationship between tonsils and IgA nephropathy as well as indications of tonsillectomy. Kidney Int. 65 : 1135-44.
Xie LS, Qin W, Fan JM, Huang J, Xie XS, li Z. (2010) The role of C1GALT1C1 in lipopolysaccharide-induced IgA1 aberrant O-glycosylation in IgA nephropathy. Clin Invest Med. 33 : E5-E13.
Xu L, Li B, Huang M, Xie K, Li D, Li Y, Gu H, Fang J. (2016) Critical role for Kuppfer cell CD89 expression in experimental IgA nephropathy. PLoS One. 11 : e0159426.

Y

Yang M, Li FG, Xie XS, Wang SQ, Fan JM. (2014) CagA, a major virulence factor of Helicobacter pylori, promotes the production and underglycosylation of IgA1 in DAKIKI cells. Biochem Biophys Res Commun. 444: 276-81.
Yeo C, Cheung CK, Barratt J. (2017) New insights into the pathogenesis of IgA nephropathy. Pediatr Nephrol. Sous presse.
Yoon H, Shin J, Yang S, Chae D, Kim H, Lee D, Kim H, Kim S, Lee J, Kim Y. (2003) Association of the CD14 gene – 159C polymorphism with progression of IgA nephropathy. J Med Genet. 40 : 104-8.
Youinou P, Renaudineau Y. (2011) CD5 expression in B cells from patients with systemic lupus erythematosus. Crit Rev Immunol. 31 : 31-42.
Yu XQ, Li M, Zhang H, Low HQ, Wei X, Wang JQ, Sun LD, Sim KS, Li Y, Foo JN, Wang W, Li ZJ, Yin XY, Tang XQ, Fan L, Chen J, Li RS, Wan JX, Liu ZS, Lou TQ, Zhu L, Huang XJ, Zhang XJ, Liu ZH, Liu JJ. (2011) A genome-wide association study in Han Chinese identifies multiple susceptibility loci for IgA nephropathy. Nat Genet. 44:178-82.
Yiu WH, Lin M, Tang SCW. (2011) Toll-like receptor activation : from renal inflammation to fibrosis. Kidney Int. 4 (Supp) : 20-5.

Z

Zhang L, Ye F, He Y, Kong D, Han C, Zhao Z, Zhu J, Meng H, Liu X, Jin X. (2010) Establishment of a mouse IgA nephropathy model with the MBP-20-peptide fusion protein. Anat Rec (Hoboken). 293 : 1729-37.
Zhang X, Zhao S, Sun L, Li W, Glogauer M, Hu Y. (2016) Comparison of neutrophil functions between two strains of inbred mice. Microbiol Immunol. 60 : 859-63.
Zhang Y, Yan X, Zhao T, Xu Q, Peng Q, Hu R, Quan S, Zhou Y, Xing G. (2017) Targeting C3a/C5a receptors inhibits human mesangial cell proliferation and alleviates immunoglobulin A nephropathy in mice. Clin Exp Immunol. 189 : 60-70.
Zhou YH, Tanf LG, Guo SL, Jin ZC, Wu MJ, Zang JJ, Xu JF, Wu CF, Qin YY, Cai Q, Gao QB, Zhang SS, Yu DH, He J. (2011). Steroids in the treatment of IgA nepropathy to the improvement of renal survival : a systematic review and meta-analysis. PLoS One. 6 : e18788
Zhu L, Zhang H. (2015) The genetics of IgA nephropathy : an overview from China. Kidney Dis (Basel). 1 : 27-32.

Zhu TT, Wang L, Wang HL, He Y, Ma X, Fan JM. (2016) Helicobacter pylori participates in the pathogenesis of IgA nephropathy. Ren Fail. 38 : 1398-404.
Zou JN, Xiao J, Hu SS, Fu CS, Zhang XL, Zhang ZX, Lu YJ, Chen WJ, Ye ZB. (2017) Toll-like receptor 4 signaling pathway in the protective effect of pioglitazone on experimental immunoglobulin A nephropathy. Chin Med J (Engl). 130 : 906-913.

ANNEXE

Anderson ARCHELUS
Né à Gonaïves, Haïti

CURSUS SCOLAIRE ET UNIVERSITAIRE

2013-2018 Doctorat de l'Ecole Doctorale Science Biologique & Santé (ED 615), spécialité : Immunologie
Université de Limoges, CNRS UMR7276-INSERM UMR1262

2010-2013 L3 puis Master Recherche en Ingénierie et Biosanté - *Mention AB*
Université de Poitiers, Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées

2006-2009 Année préparatoire, 1re et 2ième en Sciences Naturelles/Chimie - *Mention AB*
Université d'Etat d'Haïti, Ecole Normale Supérieure, Port-au-Prince, Haïti

2005-2006 Baccalauréat II, section C (équivalent du bac général Mathématiques/Physique) - *Mention B*
Lycée Jean Robert Cius, Gonaïves, Haïti

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

❖ ACTIVITES DE RECHERCHE

Depuis octobre 2013 : **Travail de recherche du doctorat**
CNRS UMR7276-INSERM UMR1262-Université de Limoges (CRIBL)
Projet de recherche : Rôle de l'environnement microbien dans la régulation de l'immunoglobuline A mucosale et dans le développement de la maladie de Berger. (Encadrant : Dr. A. DRUILHE)
Compétences techniques majeures : expérimentation animale, biochimie des protéines, biologie moléculaire

Janvier-Juillet 2013 : **Stage pour le M2**
CNRS UMR7276-Université de Limoges (CRIBL)
Projet du stage : Mise au point d'un modèle murin de la maladie de Berger. (Encadrant : Dr. A. DRUILHE)
Compétences techniques majeures : expérimentation animale, biochimie des protéines

Mai-Juin 2012 (6 semaines) : **Stage pour le M1**
Plateforme d'imagerie de l'Université de Poitiers (ImageUP)
Projet du stage : Etude par microscopie électronique à balayage et à transmission des effets de PSM alpha et Warnéricine sur *Legionella pneumophila* et les cellules Jurkat. (Encadrant : Dr. E BERE)
Compétences techniques majeures : microscopie

Avril-Mai 2011 (4 semaines) : **Stage pour le L3**
Laboratoire de Chimie et de Microbiologie de l'Eau, Université de Poitiers
Projet du stage : Développement de surfaces anti-biofilm de *Candida albicans*. (Dr. J.-M. BERGEAUD)
Compétences techniques majeures : microbiologie

❖ ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT

Septembre 2016-Août 2017 : **ATER, temps complet (192h équivalent TD)**
Département des Sciences du Vivant, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Limoges
Niveaux d'enseignement : Classe Préparatoire à l'Entrée en Licence (CPEL2), L1 et L2
Matières enseignées : Enzymologie, Biologie moléculaire, Génétique, Biologie animale, Biologie du développement et de la reproduction, Physiologie animale, Physiologie végétale
Autres : Proposition de sujets d'examen, correction d'examen et de compte-rendus de TP et surveillance d'examen

Octobre 2013-Août 2016 : **DCACe, temps partiel (par an : 64h équivalent TD par an)**
Niveaux d'enseignement : Classe Préparatoire à l'Entrée en Licence (CPEL2), L1 et L2
Matières enseignées : Enzymologie, Biologie-informatique, Physiologie animale, Physiologie végétale

Autres :

- Proposition de sujets d'examen, correction d'examen et de compte-rendus de TP et surveillance d'examen
- **Formations suivies au Centre de Préparation au Métier d'Enseignant Chercheur**
  - Structures et enjeux à l'université
  - Déontologie de l'enseignement supérieur
  - Approche du langage théatral à visée pédagogique
  - Prendre la parole en pubic
  - De la peur au plaisir de prendre la parole en public
  - Utilisation des moyens numériques en enseignement (TICE)
  - Mémoire et apprentissage
  - Evaluer les étudiants à l'université
  - Gestion des urgences médicales en cours (Premier secours)

DISTINCTIONS

2013 Contrat d'allocataire de recherche avec charge d'enseignement de 3 ans du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France

2010 Bourse d'excellence du gouvernement français pour la poursuite d'études dans une université française suite au tremblement de terre de 2010 en Haïti

2006 Entrée sur concours (24 admis pour environ 1000 candidats) à l'Ecole Normale Supérieure de l'Université d'Etat d'Haïti

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

❖ ARTICLE

Archelus A, Létuvé S, Lecardeur S, Carrion C, Oblet C, Aldigier JA, Cogné M, Druilhe A. (2018) **Lipopolysaccharide enhances immunoglobulin A and transcytosis in airways**. *En soumission à Mucosal Immunol*ogy.

❖ POSTERS

Lipopolysaccharide and immunoglobulin A transcytosis in airways
Archelus et coll.
18th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI), juillet 2017, Washington D.C., Etats-Unis
10th meeting of the European Mucosal Immunology Group (EMIG), octobre 2016, Copenhague, Danemark

Modelization of IgA nephropathy in alpha-1 knock-in mice
Archelus et coll.
14th symposium of the International IgA Nepropathy Network (IIGANN), septembre 2016, Tours, France

Involvement of neutrophils in IgA production in a mouse model of IgA nephropathy
Archelus et coll.
2nde Journée de l'Institut de Recherche GEIST de l'Université de Limoges, septembre 2015, Limoges
1st meeting of the Neutrophil Club, avril 2015, Paris

Effect of LPS on IgA production in a mouse model of IgA nephropathy
Archelus et coll.
1ère Journée Recherche des CHU de Tours, Poitiers et Limoges, décembre 2014, Tours
1ère Journée de l'Institut de Recherche GEIST de l'Université de Limoges, septembre 2014, Limoges

Etude de l'effet néphrotoxique des complexes IgA-IgG dans un modèle murin de maladie de Berger
Druilhe, Oruc, Archelus et coll.
1ère Journée Recherche des CHU de Tours, Poitiers et Limoges, décembre 2014, Tours
16ième Réunion commune de la Société de Néphrologie et de la Société Francophone de Dialyse (SN-SFD), octobre 2014, Saint-Etienne, publié dans Néphrol Ther, 2014, 10 : 402

Rôle de l'environnement microbien dans la régulation de l'immunoglobuline A mucosale et dans le développement de la maladie de Berger

La maladie de Berger est la glomérulonéphrite la plus fréquente avec une estimation selon laquelle 1% de la population mondiale serait touchée. L'agent causal est une immunoglobuline (Ig)A anormale (polymérique et hypogalactosylée) qui se dépose dans le mésangium et provoque un dysfonctionnement rénal (protéinurie, hématurie) et des lésions glomérulaires. Dans 25% des cas, la maladie évolue sur 20 ans vers l'insuffisance rénale terminale. Des évidences, de plus en plus nombreuses, montrent que l'environnement microbien, en particulier bactérien, commensal ou pathogène, a un impact important sur le développement de la maladie. Au cours de ma thèse, j'ai d'abord étudié l'effet d'une molécule de la paroi bactérienne, le lipopolysaccharide (LPS), sur la production des IgA dans les muqueuses chez la souris normale. Les résultats que j'ai obtenus et ceux publiés permettent de proposer que la stimulation chronique des muqueuses par l'environnement microbien conduit à une augmentation de la production d'IgA néphrotoxiques, qui, du fait d'un déficit de leur récepteur pIgR mucosal, sont anormalement dirigées vers la circulation plûtôt que dans la lumière es muqueuses. Dans une seconde partie de mon travail, j'ai étudié l'effet du LPS sur le développement de la maladie de Berger dans un modèle de souris α1KI. Ces souris génétiquement modifiées produisent de l'IgA humaine et développent spontanément des dépôts mésangiaux d'IgA mais n'ont pas de protéinurie, d'hématurie ou de lésions glomérulaires. Nos résultats montrent que le LPS provoque une forte hématurie dans les souris α1KI lorsque celles-ci expriment le récepteur des IgA humaines, CD89, à la surface des polymorphonucléaires neutrophiles. En conclusion, mon travail de thèse a permis de mettre en lumière un impact de l'environnement microbien sur pIgR et sur les polymorphonucléaires neutrophiles dont la déficience ou l'activation pourrait contribuer au développement de la maladie de Berger.

Mots-clés : Néphropathie à IgA, modèle murin, LPS, pIgR, CD89, polymorphonucléaire neutrophile, hématurie

Role of microbial environment on the mucosal immunoglobulin A regulation and in the development of IgA nephropathy

IgA nephropathy is the most frequent glomerulonephritis worldwide. It features mesangial immunoglobulin (Ig)A deposits and proteinuria, hematuria and glomerular histological lesions. In 25% patients, it evolves, within 20 years, towards the end stage renal disease. Microbial environment, through the interaction with mucosa, is believed to play a crucial role in the development of the disease. The objectives of my work were to evaluate the effect of the microbial compound lipopolysaccharide (LPS) on the production of the nephritogenic IgA in the mucosa of mice and on the development of IgA nephropathy in the murine model α1KI that spontaneously develops mesangial IgA deposits without the other signs of the disease. Our results and those previously published suggest that the chronic stimulation of mucosa by microbiota leads to the increased production of nephritogenic IgA in the mucosa. These IgA, thanks to a deficient mucosal receptor pIgR in patients with IgA nephropathy, may be abnormally routed in the blood. We also showed that LPS provokes hematuria in the α1KI mice, when they express a specific IgA receptor, CD89, on the surface of polymorphonuclear neutrophils. Altogether our findings highlight the impact of microbial environment on pIgR and on polymorphonuclear neutrophils and thus, potentially, on IgA nephropathy.

Keywords : murine model, LPS, pIgR, CD89, polymorphonuclear neutrophil, hematuria