



**Université
Libanaise**



**Université
de Limoges**

THESE EN COTUTELLE

Pour obtenir le grade de Docteur délivré par

L'Université Libanaise

Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie

Et

L'Université de Limoges

Ecole Doctorale Sciences Biologiques et Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Batoul WEHBE

Le 15 Octobre 2018

IgA et rein : destructrice ou protectrice ?

Rôles de l'immunoglobuline A (IgA) dans deux pathologies rénales

Directeurs de thèse : M. Bassam BADRAN et M. Jean-Claude ALDIGIER

Co-directeurs de thèse : M. Michel COGNE et Mme. Yolla EL MAKHOUR

Membres du Jury :

M. Christophe MARIAT, CHU de Saint-Etienne, France

M. Marc KARAM, Université de Balamand, Liban

M. Christophe MARIAT, CHU de Saint-Etienne, France

M. Elie HADCHITI, Université Libanaise, Liban

M. Nicolas MAILLARD, CHU de Saint-Etienne, France

Mme. Jeanne MOREAU, Université de Limoges, France

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Invité



Au cours des trois premières années de ma thèse, j'ai bénéficié d'une bourse commune du CNRS libanais et de l'Université Libanaise (CNRS-UL).

Et comme je n'ai pu commencer les travaux de recherche qu'en deuxième année, j'avais besoin d'une quatrième année pendant laquelle j'ai eu un contrat doctoral avec l'Université de Limoges.

Mes travaux de thèse ont été effectués au sein du laboratoire d'accueil CRIBL à la faculté de Médecine de l'Université de Limoges.



*A ma mère,
Elle saura pourquoi...*

Remerciements

En préambule à ce mémoire, je voudrais remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la concrétisation de ma thèse.

D'abord, j'adresse mes sincères remerciements et mon profond respect aux membres du jury Messieurs les professeurs Pr Mariat, Pr Karam, Pr Maillard et Pr Hadshiti qui me font l'honneur de juger mon travail.

Je remercie mes directeurs et mes co-directeurs de thèse : Pr Bassam Badran, Pr Jean-Claude Aldigier, Pr Michel Cogné et Dr Yolla El Makhour.

Tout d'abord, je tiens à remercier Pr Badran pour m'avoir donné la chance de réaliser cette thèse.

Je remercie Pr Aldigier pour la confiance qu'il m'a accordée. J'aimerais bien lui dire à quel point j'ai apprécié sa bonne humeur et son humour aux moments les plus difficiles.

Je souhaiterais exprimer ma gratitude au Pr Cogné pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire CRIBL et qui m'a permis de bénéficier de son grand savoir en Immunologie, de ses idées originales et de ses précieux conseils.

Je dois une reconnaissance particulière à Dr El Makhour ; je la remercie pour la confiance et la compréhension qu'elle a manifestées à mon égard pendant ces (nombreuses !) années.

Je remercie également l'Université Libanaise, le CNRS libanais et l'ALURAD qui m'ont financé pendant ce parcours.

Je remercie également Mr Bertrand Courtioux et Mme Adeline Rigaud de l'Ecole Doctorale SBS à Limoges pour le suivi et le soutien qu'ils nous ont apporté que ce soit sur les plans administratif et académique.

Nombreux sont ceux à avoir, au fil de ma thèse, apporté leur contribution scientifique voire leur secours. Je tiens tout particulièrement à remercier Sylvie. Gérer un élevage de 12 lignées de souris ne m'aurait pas pu être réalisable sans ta contribution.

Je remercie les membres de l'« IgA team » qui ont enrichi mon savoir lors de nos réunions: Ahmed, Anne, Anderson mon ancien voisin de bureau, Christelle, Florence, François et Marie. Je remercie surtout Christelle avec qui j'ai partagé le bureau pendant ces 3 ans et qui a toujours été prête à répondre à mes questions et qui m'a transmis de nombreuses compétences techniques. Un grand merci à Marie de m'avoir accompagné pour mes premiers pas dans le labo. Je pense également à Arnaud mon premier stagiaire à Limoges.

J'exprime ma gratitude notamment à Jeanne pour son soutien et pour toutes les corrections d'anglais.

Je remercie Zéliha, Cendrine et Claire pour le soutien moral et technique qu'elles ont pu m'offrir. Je remercie également Audrey Bayout, Alexis, Julie et Tiffany pour leur aide et leur gentillesse.

Je souhaite bon courage aux doctorants du labo : Anne, Audrey, Cathy, Emilie, Henda, Jean-Marie, Lilian, Ophélie, Seb et Victoria.

Je remercie toute l'équipe UMR7276 et je souhaite à tous ses membres chercheurs, techniciens et gestionnaires plein d'épanouissement et de réussite au plan professionnel ainsi que personnel.

Un grand merci à l'équipe de l'animalerie et surtout Bernadette, David, Louis, Martial, Ophélie et Véronique. Une pensée particulière aux membres de l'association « Campus à cultiver » et à l'équipe du BAI de l'Université de Limoges : les moments que j'ai passés en votre compagnie au potager ainsi que les différentes sorties resteront gravées à jamais dans ma mémoire.

Je ne pourrais ne pas remercier Cécile pour sa sympathie et sa gentillesse infinies. Je garderai un très bon souvenir des soirées en famille que vous m'avez donné l'occasion de vivre en votre compagnie et de la découverte de la porcelaine et les émaux limougeauds.

Je remercie tous les copains avec qui j'ai passé des moments inoubliables dont je garde d'excellents souvenirs : Zeinab, Iman, Hussein, Nour, Leena, Hafida, Mohamad Baydoun, Mohamad Saleh, Rafic, Sofia, Dima et de loin Batoul. Pour « Les Dallouls » avec qui j'ai partagé de bons moments de fous-rires et à qui je souhaite une très grande réussite personnelle et professionnelle : merci chères voisines pour votre accueil, sympathie et gentillesse. Je n'oublie certainement pas ceux qui sont partis : Nivine, Fatima, Racha et Omar.

Une pensée amicale à Hawraa. Après ces quatre ans de thèse, je te remercie infiniment pour ton soutien moral qui m'a tellement touché.

J'adresse d'immenses mercis à mes tantes, à mon cousin et à mon amie Dima pour leur soutien et pour les attentions diverses qu'ils m'ont accordées tout au long de ces années ; les échanges scientifiques n'étant pas tellement leur « tasse de thé », je les remercie d'autant plus pour avoir essayé de prendre de mes nouvelles et de suivre l'avancée de mes travaux.

Merci à ma famille d'avoir toujours cru en moi. Malgré la distance qui nous sépare, ils ont su être toujours près de moi.

Merci Ghadir pour tes messages touchants, tu m'as tellement manqué !

Merci Ahmad et Ali pour votre soutien et votre affection illimités!

Maman, Papa, que vous trouviez dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de vos efforts et de vos sacrifices ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude !

En dernier, je tiens à remercier tout particulièrement celui qui a été le premier à partager mes joies et mon chagrin. Merci Mohamad d'avoir été toujours là pour moi et de m'avoir soutenu et motivé quand il le fallait. C'est toi qui a pu rendre cet hiver limougeaud supportable.

Mes mots ne suffiraient certainement pas...

*Je tourne une page
J'en ouvre une autre !!!*

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/>



Table des matières

| | |
|---|----|
| Remerciements | 4 |
| Droits d'auteurs | 7 |
| Table des matières | 8 |
| Table des illustrations | 10 |
| Liste des abréviations | 12 |
| Avant-propos | 17 |
| Introduction bibliographique | 18 |
| Chapitre I. L'immunoglobuline A | 19 |
| I.1. Structure biochimique | 19 |
| I.1.1. Les IgA monomériques | 19 |
| I.1.2. Les IgA polymériques | 21 |
| I.2. IgA1 vs IgA2 | 22 |
| I.3. Glycosylation | 23 |
| I.3.1. O-glycosylation | 24 |
| I.3.2. N-glycosylation | 25 |
| I.4. Production | 25 |
| I.4.1. Cellules productrices d'IgA | 26 |
| I.4.2. Induction de la production d'IgA | 26 |
| I.4.3. Migration cellulaire ou homing | 34 |
| I.5. Régulation de synthèse | 35 |
| I.5.1. Les cellules épithéliales | 35 |
| I.5.2. Le microbiote intestinal | 36 |
| I.5.3. Les cellules immunitaires et les facteurs solubles | 37 |
| I.6. Récepteurs | 39 |
| I.6.1. Récepteurs de Fc | 39 |
| I.6.2. Récepteurs de glycanes | 41 |
| I.7. Fonctions | 42 |
| I.7.1. L'homéostasie du microbiote | 42 |
| I.7.2. La défense contre les pathogènes | 43 |
| I.7.3. La régulation de l'érythropoïèse | 44 |
| I.7.4. La modulation des réponses immunes | 44 |
| I.8. Pathologies associées | 45 |
| I.8.1. Le déficit sélectif en IgA | 45 |
| I.8.2. Le myélome multiple à IgA | 46 |
| I.8.3. La maladie de la chaîne α | 46 |
| I.8.4. Le purpura rhumatoïde ou maladie d'Henoch-Schölein | 46 |
| I.8.5. La néphropathie à IgA | 46 |
| Chapitre II. La néphropathie à IgA | 47 |
| II.1. Caractéristiques | 47 |
| II.1.1. Caractéristiques épidémiologiques | 47 |
| II.1.2. Présentation clinique et histopathologique | 48 |
| II.1.3. Pronostic | 50 |
| II.1.4. Défaut de glycosylation | 55 |
| II.1.5. Facteurs environnementaux | 57 |

| | |
|--|-----|
| II.1.6. Prédisposition génétique | 59 |
| II.2. Evolution de la lésion rénale | 59 |
| Objectifs | 64 |
| Publications | 69 |
| I.Article 1..... | 69 |
| II.Article 2..... | 100 |
| III.Article 3..... | 118 |
| Conclusion et perspectives..... | 162 |
| Références bibliographiques | 166 |
| Valorisation du travail | 176 |
| Annexe | 177 |
| I.Construction du modèle α -KO..... | 177 |
| II.Production d'IgA humanisées par la technique d'hybridomes | 179 |
| III.Resume | 181 |

Table des illustrations

| | |
|--|----|
| Figure 1: Structure de l'IgA monomérique | 19 |
| Figure 2: Différence de la région charnière entre IgA1 et IgA2 | 20 |
| Figure 3: De l'IgA dimérique à l'IgA sécrétoire | 21 |
| Figure 4 : Modélisation moléculaire de l'IgA1 et de l'IgA2..... | 22 |
| Figure 5: Sites potentiels de O- et de N-glycosylation chez IgA1 et IgA2..... | 23 |
| Figure 6: Voie de O-glycosylation de la région charnière des IgA1 | 24 |
| Figure 7: Production T-indépendante et T-dépendante d'IgA au niveau intestinal | 27 |
| Figure 8: Anatomie du centre germinatif | 28 |
| Figure 9: Formation et dynamique du centre germinatif..... | 29 |
| Figure 10: Représentation schématique de la synapse immunologique | 30 |
| Figure 11: Commutation isotypique d'IgM en IgA | 31 |
| Figure 12: Affinité des IgA | 32 |
| Figure 13: Compétition cellulaire au niveau du GC..... | 33 |
| Figure 14: Sélection positive des cellules B..... | 34 |
| Figure 15: Circulation des cellules B entre moelle osseuse et GALT..... | 35 |
| Figure 16: Production d'IgA sous contrôle du microenvironnement cytokinique..... | 36 |
| Figure 17: Effet du microbiote intestinal sur la production d'IgA..... | 37 |
| Figure 18: Induction de la production d'IgA par les DC et les lymphocytes T..... | 38 |
| Figure 19: Représentation schématique de certains récepteurs à IgA..... | 41 |
| Figure 20: Exclusion immune médiée par l'IgA..... | 43 |
| Figure 21: Distribution géographique de la prévalence de l'IgAN dans certaines régions | 48 |
| Figure 22: Coupes d'une biopsie rénale d'un patient à IgAN | 49 |
| Figure 23: Différents stades pathologiques de l'IgAN | 50 |
| Figure 24 : Physiopathologie de l'IgAN..... | 53 |
| Figure 25: Modèle hypothétique de clivage du CD89 | 54 |
| Figure 26: Profil de galactosylation des IgA1 chez les patients à IgAN..... | 56 |
| Figure 27: Implication potentielle des antigènes alimentaires dans l'IgAN | 58 |
| Figure 28: Structure du rein..... | 60 |
| Figure 29: Représentation schématique des voies d'activation du complément..... | 61 |
| Figure 30: Mécanisme d'induction des lésions glomérulaires au cours de l'IgAN..... | 62 |
| Figure 31: Glomérule normal et glomérule pathologique | 63 |
| Figure 32: Croisement des différents modèles de souris | 66 |

| | |
|--|-----|
| Figure 33: Injection des IgA aux souris nudes | 67 |
| Figure 34: Génération des souris $h\alpha 1^{+/+}$ $Fas^{-/-}$ | 67 |
| Figure 35: Construction du modèle $\alpha 2KI$ | 68 |
| Figure 36: Construction du vecteur de ciblage du gène codant l'IgA murine | 177 |
| Figure 37: Transfection et implantation des cellules souches embryonnaires | 178 |
| Figure 38: Protocole d'immunisation des souris..... | 179 |
| Figure 39 : Protocole de fusion PEG-DMSO..... | 179 |
| Figure 40 : Principe de sélection des clones..... | 180 |
| Figure 41: Clone d'hybridome à J9 et à J13 après fusion | 180 |
| | |
| Tableau 1: Exemples de récepteurs à IgA..... | 42 |

Liste des abréviations

A

| | |
|--------------|---|
| A | Adénine |
| ACE | Angiotensin Converting Enzyme |
| ADIN | Antibody Dependent Intracellular Neutralization |
| ADN | Acide DésoxyriboNucléotidique |
| AID | Activation-Induced cytidine Deaminase |
| AKT | Serine/Threonine Kinase |
| APC | Antigen-Presenting Cell |
| APRIL | A Proliferation Inducing Ligand |
| ASGPR | ASialoGlycoProtein Receptor |
| Asn | Asparagine |
| α 1KI | alpha 1 gene Knock-In |
| α 2KI | alpha 2 gene Knock-In |

B

| | |
|------------------|--|
| BAFF | B-cell Activating Factor of the TNF Family |
| BCR | B Cell Receptor |
| β -4 GalT1 | β -4 GalactosylTransférase 1 |

C

| | |
|-----------|---|
| C | Cytosine |
| C μ | Région constante codant l'immunoglobuline M |
| C3 | Composant 3 du complément |
| CAM | Complexe d'Attaque Membranaire |
| CCL | Chemokine C-C motif Ligand |
| CCR | C-C chemokine Receptor |
| CD | Cluster de Différenciation |
| CD40-L | Ligand de CD40 |
| CDR | Région Déterminant la Complémentarité |
| Cellule M | Cellule Microflod |
| CH | Domaine constant de la chaîne lourde |
| CL | Domaine constant de la chaîne légère |
| CMH | Complexe Majeur d'Histocompatibilité |
| CSR | Commutation isotypique |
| Cter | C terminale |
| CXCL | C-X-C motif chemokine |

| | |
|-------------|---|
| CXCR | C-X-C motif receptor |
| C α | Région constante codant l'immunoglobuline A |
| D | |
| D | Day |
| DC | Cellule Dendritique |
| DC-SIGN | Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin |
| ddY mice | Deutschland, Denken, and Yoken mouse strain |
| DH | Segment de Diversité de la chaîne lourde |
| DMSO | DiMéthylSulfOxyde |
| DSS | Dextran SodiumSulfate |
| E | |
| ERK | Extracellular signal-Regulated Kinase |
| ES | Embryonic Stem cells |
| ESRD | End Stage Renal Disease |
| F | |
| Fab | Antigen binding Fragment |
| Fc | Cristallisable Fragment |
| FDC | Follicular Dendritic Cell |
| FDC-SP | Follicular Dendritic Cell-Secreted Protein |
| FR | Framework Region |
| G | |
| g | Gramme |
| G | Guanine |
| Gal | Galactose |
| GalNac | N-acétylGalactosamine |
| GALT | Tissu lymphoïde associé aux intestins |
| GATA-3 | GATA-binding protein-3 |
| GC | Centres Germinatifs |
| Gd-IgA | Galactose deficient-IgA |
| GWAS | Genome Wide Association Study |
| γ 2b | Immunoglobuline Gamma 2 b |
| H | |
| h | Heure |
| HAT | Hypoxanthine- Aminoptérine- Thymidine |

| | |
|-----------|--|
| HE | Hématoxyline Eosine |
| Hg | Mercure |
| HGPRT | Hypoxanthine Guanine-PhosphoRibosyl-Tansférase |
| HIGA mice | High IgA mice |

I

| | |
|------|---|
| ICAM | InterCellular Adhesion Molecule |
| Ig | Immunoglobuline |
| IgA | Immunoglobuline A |
| IgAN | Néphropathie à IgA |
| IgD | Immunoglobuline D |
| IgG | Immunoglobuline G |
| IGH | Gène codant la chaîne lourde de l'immunoglobuline |
| IGHA | Gène codant la chaîne lourde de l'immunoglobuline A |
| IgM | Immunoglobuline M |
| IL | InterLeukine |
| ILF | Follicules Lymphoïdes Isolées |
| IM | Intra-Musculaire |
| ITAM | Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif |

J

| | |
|---------|-------------------------------|
| J | Joining segment |
| J | Jour |
| J chain | Chaîne de Jonction |
| JH | Segment J de la chaîne lourde |

K

| | |
|------|-----------------------|
| κ | Chaîne légère kappa |
| kDa | Kilo Dalton |
| KIKS | Knock-In Kappa Switch |
| KO | Knock-Out |

L

| | |
|---------|---|
| L | Ligand |
| λ | Chaîne légère lambda |
| let-7-b | lethal-7-b |
| LIGHT | Lymphotoxin with Inducible expression competant with HSV Glycoprotein D for binding to Herpesvirus on T lymphocytes |

M

| | |
|---------|---|
| MadCam | Mucosal vascular addressin Cell adhesion molecule |
| MALT | Tissu Lymphoïde Associé aux Muqueuses |
| MAPK | Mitogen-Activated Protein Kinases |
| MBL | Mannose-BindingLectin |
| mg | milligramme |
| mIgA | IgA monomérique |
| miR | microRNA |
| mL | millilitre |
| mm | millimètre |
| MRL/lpr | Murphy Roths Large/ lymphoproliferation mice |

N

| | |
|------|--------------|
| N | Nitrogen |
| Neo | Neomycine |
| NO | Nitric oxide |
| Nter | Nterminale |

O

| | |
|----|-----------------------|
| OH | Oxygen hydrogen bound |
|----|-----------------------|

P

| | |
|------------|---|
| PDGF | Platelet Derived Growth Factor |
| PEG | PolyEthylène Glycol |
| PI3K | PhosphoInositide 3-Kinase |
| pIgA | IgA polymérique |
| pIgR | Récepteur des immunoglobulines polymériques |
| Pol η | ADN polymérase eta |
| PP | Plaques de Peyer |

R

| | |
|----------------|---|
| R | Receptor |
| RANK | Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B |
| RANK-L | Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand |
| RASB | Renin-Angiotensin System Blockers |
| ROR γ T | RAR-related Orphan Receptor gamma T cells |
| RtA | Retinoïc Acid |
| RUNX | Runt Related Transcription Factor |

S

| | |
|------------|---|
| S μ | Région Switch μ |
| SC | Secretory Component |
| SCID | Severe Combined Immuno Deficiency |
| SHM | Hypermutation somatique |
| SIgA | IgA Sécrétoire |
| Siglec-5 | Sialic acid-binding Ig-like lectin-5 |
| SMAD | Small Mothers Against Decapentaplegic gene family |
| S α | Région Switch α |

T

| | |
|--------------|---|
| T | Thymidine |
| TCR | T Cell Receptor |
| TFH | Follicular Helper T cell |
| TFR | Follicular Regulatory T cell |
| TfR1 | Transferrin Receptor 1 |
| TGase 2 | TransGlutaminase 2 |
| TGF- β | Tumor Growth Factor β |
| TH17 | T cell Helper 17 |
| TIP-DC | TNF and iNOS-producing DC |
| TLR | Toll Like Receptor |
| TNF | Tumor Necrosis Factor |
| TReg | T Regulatory cell |
| TRIM21 | TRIMpartite Motif-containing protein 21 |
| TT | Toxoïde tétanique |

V

| | |
|----------------|--------------------------------------|
| VCAM | Vascular Cell Adhesion Molecule 1 |
| V _L | Domaine variable de la chaîne légère |
| vs | Versus |

Avant-propos

Parmi les cinq classes d'anticorps, l'immunoglobuline A (IgA) est la plus abondamment produite chez l'homme ; elle est prépondérante au niveau des muqueuses et des liquides biologiques ; elle joue un rôle crucial dans la protection de l'organisme et contribue notamment à l'homéostasie du microbiote. Ses propriétés ambivalentes l'impliquent non seulement dans des mécanismes de protection lors des réponses immunes contre des pathogènes et toxines variés mais aussi dans des mécanismes de tolérance vis-à-vis de certains antigènes hors de tout contexte inflammatoire. Toutefois, et pour des raisons mal connues, les IgA peuvent acquérir des propriétés pathogènes qui les rendent capables de se déposer au niveau tissulaire (paroi des capillaires, peau, mésangium rénal...) et de déclencher des réactions inflammatoires induisant ainsi des lésions (purpuras, dermatoses, glomérulopathies...) dont l'évolution et les conséquences peuvent être très variables.

Dans un premier temps nous aborderons la structure biochimique de l'IgA, la régulation de sa production ainsi que ses différentes fonctions. Dans un second temps seront détaillées les caractéristiques de la néphropathie à IgA ainsi que les différentes hypothèses et modèles expérimentaux expliquant sa physiopathologie.

Mes travaux ont porté essentiellement sur l'étude des propriétés pathogènes des IgA humaines ; ils ont été réalisés en générant différents modèles murins exprimant l'IgA humaine ; ces animaux ont été suivis pendant 12 mois ; la capacité de ces IgA à se déposer et à induire des lésions rénales a été étudiée (article 1) ; les propriétés immunologiques et physico-chimiques d'IgA monoclonales issues de différents hybridomes et de patients ayant une dysglobulinémie à IgA ont été analysées et des résultats préliminaires ont été obtenus (article 2).

Une deuxième partie du travail a consisté à étudier les propriétés immuno-modulatrices et anti-inflammatoires de l'IgA humaine dans un modèle murin de lupus spontané (article 3).

Une dernière partie a porté sur la caractérisation d'un modèle murin dans lequel l'expression de l'IgA humaine de classe 2 a été forcée comme cela avait été fait auparavant avec les souris $\alpha 1KI$ (article 4).

Introduction bibliographique

Chapitre I. L'immunoglobuline A

La structure de l'IgA est hautement polymorphique et son degré d'oligomérisation varie selon les sites dans lesquels elle est produite. Les IgA circulantes sont essentiellement monomériques (mIgA), elles sont sécrétées par les plasmocytes hébergés dans la moelle osseuse et leur production est estimée à ~3.3 mg/mL. Les polymères d'IgA (pIgA) prédominent au niveau des muqueuses, celles-ci représentant des centaines de mètres carrés de superficie et de contact avec le milieu extérieur. A ce niveau-là, les IgA sont majoritairement sécrétées sous forme d'IgA sécrétoire (SIgA) avec une production journalière évaluée à 66 mg/ kg.

I.1. Structure biochimique

I.1.1. Les IgA monomériques

L'IgA monomérique est une molécule symétrique constituée d'un hétérotétramère polypeptidique d'environ 160 kDa avec deux chaînes lourdes et deux chaînes légères. Les chaînes sont homologues 2 à 2 et sont reliées entre elles par des ponts disulfures (Figure 1). Les chaînes légères d'environ 25 kDa sont de deux types : kappa (κ) codée par des gènes situés au niveau des chromosomes 2 et 6 respectivement chez l'homme et la souris et lambda (λ) codée respectivement par des gènes présents au niveau des chromosomes 22 et 16.

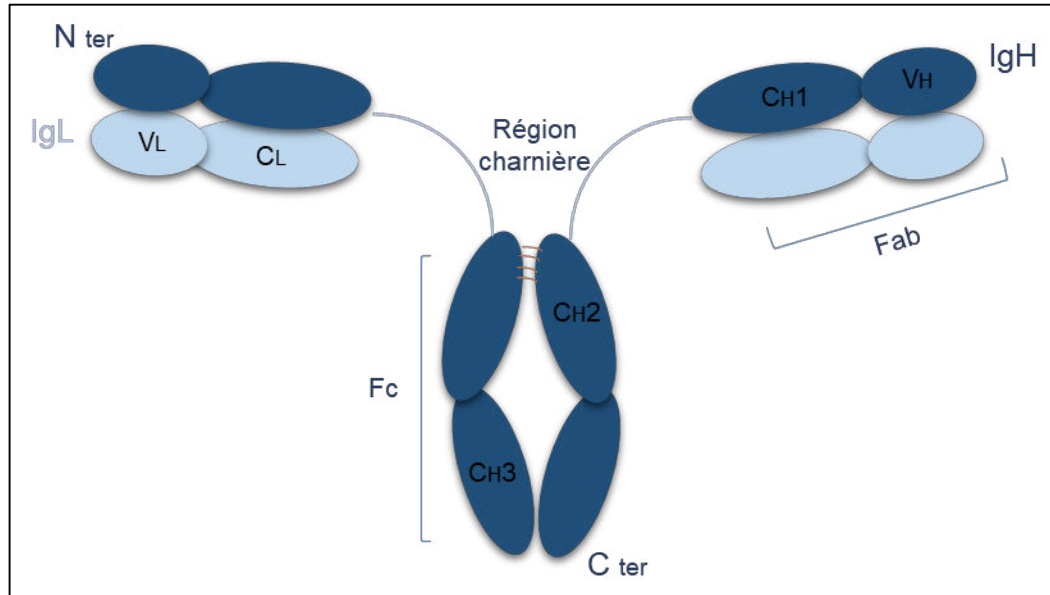


Figure 1: Structure de l'IgA monomérique

Structure bidimensionnelle de la mIgA montrant les domaines constants et variables des chaînes lourdes (C_H et V_H) et légères (C_L et V_L) ainsi que la région charnière. Le fragment de liaison à l'antigène (F_{ab}) ainsi que le fragment cristallisable (F_c) sont également montrés. N_{ter} et C_{ter} désignent les extrémités N- et C-terminale de l'IgA

Chaque chaîne légère comporte un domaine variable V_L et un domaine constant C_L séparés par un segment J (joining segment) (Kerr, 1990; Woof and Russell, 2011).

La chaîne lourde est d'environ 60 kDa, elle est codée par les gènes *IGHA1* ou *IGHA2* situés au niveau du locus *IgH* sur le chromosome 14 chez l'homme ce qui permet de différencier deux sous-classes d'IgA : les IgA1 et les IgA2 (Kerr, 1990; Woof and Kerr, 2006). Chez la souris, il n'existe qu'une seule classe d'IgA codée exclusivement par le gène *Igha* situé au niveau du chromosome 12. Chaque chaîne lourde comporte un domaine variable V_H , un segment de diversité D_H , un segment J_H et trois domaines constants C_{H1} , C_{H2} et C_{H3} . L'ensemble des chaînes constitue un hétérotétramère de type globulaire qui s'organise en un feuillet β stabilisé par des ponts disulfures. Les domaines variables des chaînes lourdes et légères comprennent trois régions hypervariables dites CDR pour Complementary Determining Region. Les CDR sont entourés par quatre régions moins variables dites FR pour Framework Region.

C'est au niveau de la région charnière située entre les domaines C_{H1} et C_{H2} de la chaîne lourde qu'apparaît la différence entre les IgA1 et les IgA2. La région charnière est une région riche en prolines ; chez les IgA1 cette région est flexible et elle est constituée de 18 acides aminés hautement répétitifs et riches en sérine/thréonine potentiellement O-glycosylables alors que chez les IgA2, elle est plus courte et elle ne porte pas de sites de O-glycosylation (Kerr, 1990; Knoppova et al., 2016) (Figure 2).

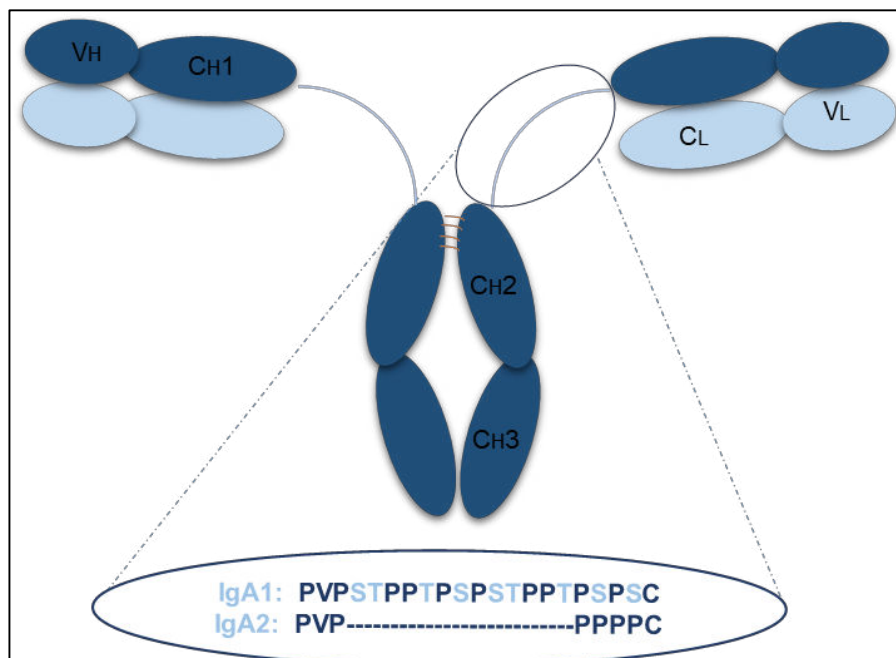


Figure 2: Différence de la région charnière entre IgA1 et IgA2

La région charnière de l'IgA1 est caractérisée par la présence de 21 acides aminés hautement répétitifs. En revanche, l'IgA2 a une région charnière plus courte en conséquence d'une délétion de 13 acides aminés (D'après Knoppova et al., 2016)

Cette différence est à l'origine de particularités de chacune des classes d'IgA que ce soit sur le plan conformationnel ou fonctionnel.

I.1.2. Les IgA polymériques

La molécule d'IgA peut se présenter sous différentes formes d'oligomérisation telles que des dimères, des trimères et des polymères de haut poids moléculaire. Ceci est possible grâce à l'établissement d'une liaison covalente entre les monomères par un pont disulfure, ainsi que la liaison d'une cystéine de la chaîne lourde à une chaîne protéique de jonction -d'environ 15 kDa- appelée chaîne J. Le dimère d'IgA consiste alors en deux molécules d'IgA monomériques bout à bout, liées d'une part par la chaîne J établissant un pont disulfure avec la chaîne lourde de chaque molécule d'IgA et d'autre part par un pont disulfure établi entre les deux chaînes lourdes restantes. Ce dimère peut se lier au récepteur PolyIg (pIgR) exprimé à la surface basolatérale des cellules épithéliales au niveau des muqueuses. Le complexe formé sera transporté à la face apicale des cellules et libéré sous forme de SIgA tout en conservant le domaine extracellulaire du pIgR dès lors appelé pièce sécrétoire (SC pour Secretory Component) (Figure 3). Les IgA polymériques et surtout sécrétoires présentent la forme majoritaire d'IgA produite au niveau des muqueuses (Johansen et al., 2001; 2007).

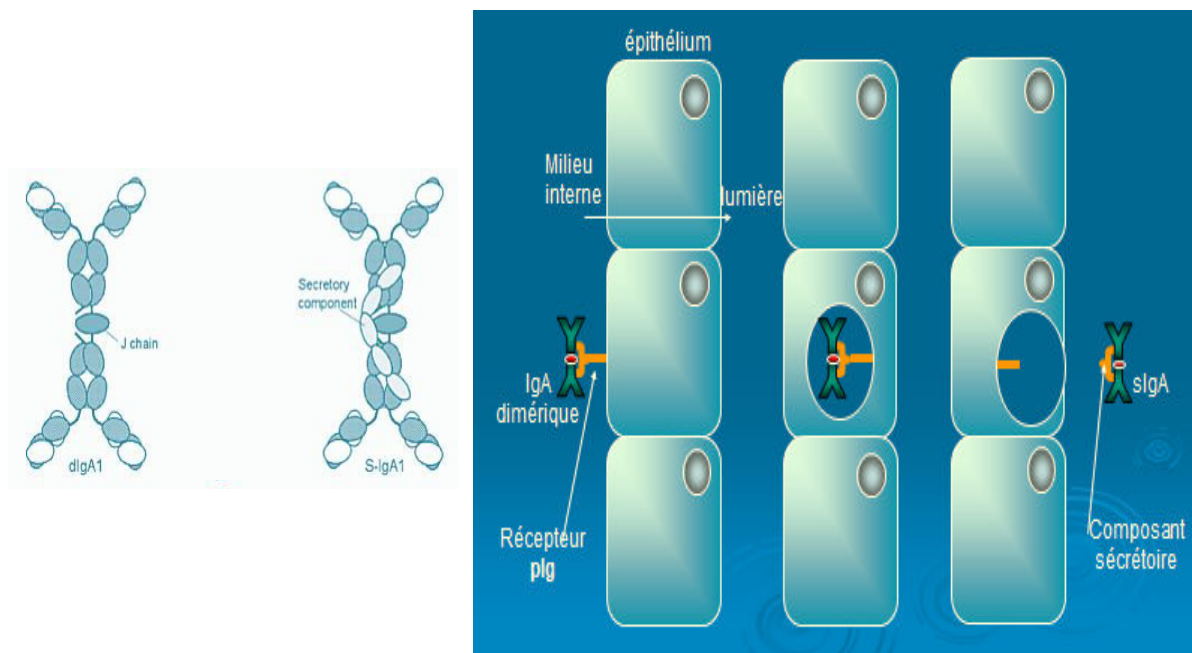


Figure 3: De l'IgA dimérique à l'IgA sécrétoire

Représentation schématique du dimère d'IgA1 lié par la chaîne J (dIgA1) et de l'IgA1 sécrétoire (S-IgA1) comportant le composant sécrétoire (à gauche). Acquisition du composant sécrétoire par le dIgA1 lors du transport trans-épithélial après clivage du domaine extracellulaire du pIgR (à droite) (Adaptée de Kaetzel 2007)

I.2. IgA1 vs IgA2

Contrairement aux autres immunoglobulines dont la conformation est décrite en Y, les IgA présentent une conformation en T avec un angle de 180° entre les fragments de fixation à l'antigène F_{ab} (Furtado et al., 2004) (Figure 4).

A l'exception de la région charnière, les deux sous-classes d'IgA partagent des similarités remarquables vis-à-vis de leurs séquences. Le degré d'homologie est de 99.3% au niveau de la région C_{H2} alors qu'il est de 98% au niveau de C_{H3} (Mestecky et al., 2013).

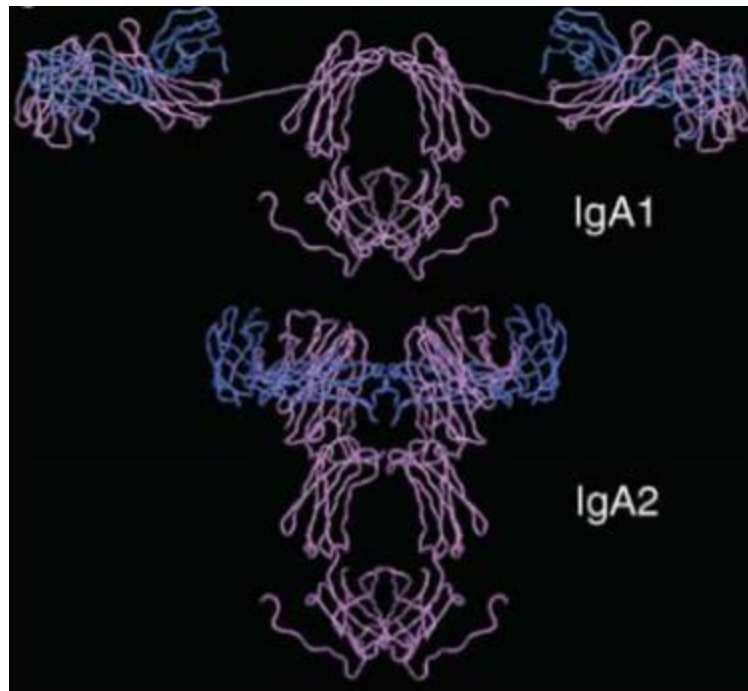


Figure 4 : Modélisation moléculaire de l'IgA1 et de l'IgA2

Les IgA sont présentées avec une conformation prédominante en "T". La distance séparant les deux fragments F_{ab} est plus grande chez l'IgA1 que chez l'IgA2 permettant à la première de lier des antigènes plus éloignés (Extraite de Woof and Russel 2011)

La différence majeure entre ces deux sous-classes réside essentiellement au niveau de la région charnière liant les fragments F_{ab} et F_c . Une région charnière plus étendue offre à l'IgA1 contrairement à l'IgA2 une conformation moins compacte ainsi qu'une flexibilité du fragment F_{ab} ; ceci confère à l'IgA1 la particularité d'une liaison bivalente d'antigènes relativement éloignés avec une meilleure avidité (Woof and Kerr, 2004).

En revanche, cet avantage de reconnaissance antigénique est associé à une vulnérabilité accrue au clivage protéolytique. La majorité des protéases bactériennes peut cliver spécifiquement la région charnière de l'IgA1 (telles que *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*...) afin de faciliter l'initiation d'infection par ces microorganismes au niveau des muqueuses (Woof and Kerr, 2004).

Les sites de O-glycosylation présents au niveau de cette région permettent à l'IgA1 d'interagir avec certains récepteurs ou aussi avec des lectines telles que la jacaline utilisée pour la purification différentielle des deux sous-classes (Moura, 2004).

Ces différences structurales peuvent rendre compte de différences de fonctions et de distribution au niveau de l'organisme.

I.3. Glycosylation

La glycosylation des protéines est un processus permettant de les associer à des glucides de façon covalente. Elle débute dans le réticulum endoplasmique et s'achève au niveau de l'appareil de Golgi. Les IgA sont caractérisées par leur haut niveau de glycosylation ce qui permet de les rendre plus stables, plus résistantes à la protéolyse et qui permet de moduler leurs fonctions. Les IgA peuvent subir des O- et des N-glycosylations (Maverakis et al., 2015) (Figure 5). Les glycanes sont exposés à la surface des IgA leur permettant de lier d'une façon non spécifique les adhésines bactériennes tandis que les régions de liaison aux antigènes restent libres.

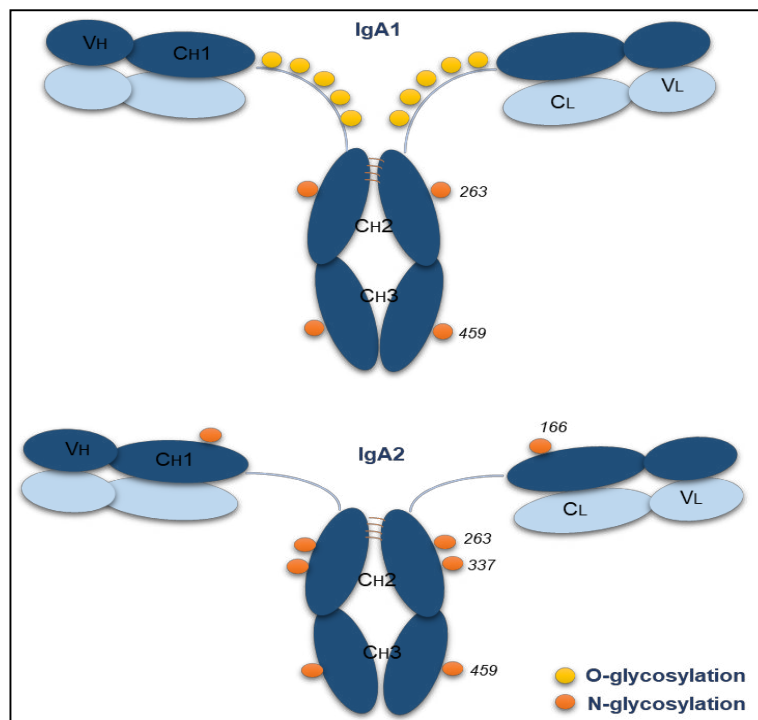


Figure 5: Sites potentiels de O- et de N-glycosylation chez IgA1 et IgA2

L'IgA1 présente 9 motifs potentiels de O-glycosylation au niveau de la région charnière ainsi que 2 sites potentiels de N-glycosylation au niveau de chacune des chaînes lourdes. Par contre, l'IgA2 est dépourvue de O-glycosylation mais présente 8 motifs potentiels de N-glycosylation. Les positions des acides aminés glycosylés sont notés (D'après Woof and Russell 2011)

I.3.1. O-glycosylation

Au cours de la O-glycosylation, un glucide est ajouté aux résidus –OH des sérines et/ou des thréonines. La O-glycosylation des IgA a lieu au niveau de l'appareil de Golgi (Mestecky et al., 2013). La région charnière de l'IgA1 présente 9 sites potentiels de O-glycosylation dont seuls 3 à 5 sont généralement occupés.

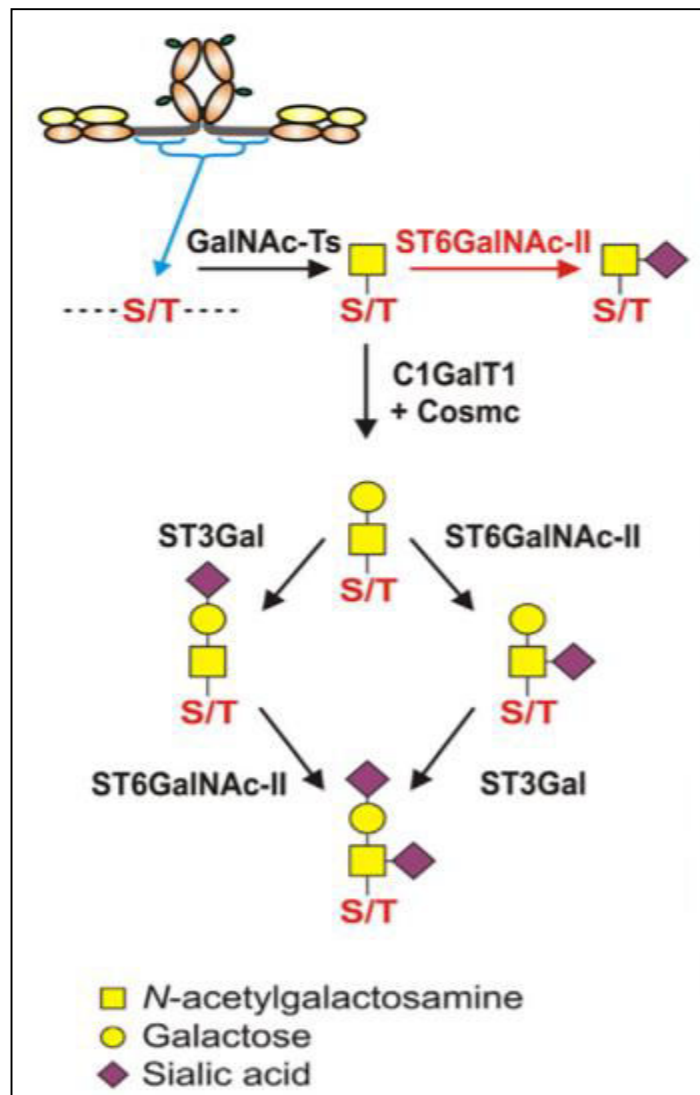


Figure 6: Voie de O-glycosylation de la région charnière des IgA1

La O-glycosylation débute par l'ajout de N-acétylgalactosamine (GalNAc) aux résidus sérine (S) ou thréonine (T) catalysée par une GalNAc transférase (GalNAc-Ts). L'addition d'un galactose se fait par la β 1,3- galactosyltransférase (C1GalT1) dont la stabilité est assurée par la molécule chaperonne Cosmc. De l'acide sialique peut être branché au galactose par l'enzyme α 2,3-sialyltransférase (ST3Gal) et/ou aux résidus GalNAc par la ST6GalNAc (Extraite de Knoppova et al. 2016)

Ce processus est initié par l'addition d'un N-acétylgalactosamine (GalNAc) aux acides aminés sérines et thréonines sous l'action d'une N-acétylgalactosamine transférase. Ensuite, une galactosyltransférase catalyse l'ajout d'une molécule de galactose (Gal) au GalNAc. A chacun

de ces glucides, un acide sialique peut aussi être branché par une sialyltransférase (Ju et al., 2008) (Figure 6). Le déficit de O-glycosylation pourrait jouer un rôle dans l'atteinte glomérulaire de la néphropathie à IgA (Novak et al., 2007) (voir chapitre 2). L'étude du rôle des O-glycosylations est limitée dans les modèles murins ; en effet, les IgA murines tout comme les IgA2 présentent une région charnière courte et non O-glycosylée.

I.3.2. N-glycosylation

Au cours de la N-glycosylation, la N-acétylglucosamine lie un résidu asparagine (Asn) d'une séquence Asn-X-sérine/ thréonine. La structure des N-glycosylations présentes au niveau de l'IgA est plus complexe que celle des O-glycosylations (Huang et al., 2015).

L'IgA2 présente 4 sites de N-glycosylation sur chaque chaîne lourde alors que 2 sites uniquement sont situés sur chaque chaîne lourde de l'IgA1 (Figure 5) ; un seul site de N-glycosylation est situé au niveau de la chaîne J et 7 sites au niveau de la pièce sécrétoire.

La N-glycosylation débute par l'ajout en bloc d'un oligosaccharide contenant des résidus de N-acétylglucosamine, de mannose et de glucose aux résidus N de l'asparagine de la protéine IgA naissante.

Au cours de la maturation de l'IgA, des démannosylations accompagnées de transfert de N-acétylglucosamine, de résidus de fucose, de galactose et d'acide sialique auront lieu. D'une façon intéressante, le contenu élevé en oligomannanes des IgA polymériques semble être à l'origine de leur forte aptitude à activer la voie alterne du complément (Oortwijn et al., 2006).

La mutagenèse dirigée des sites de N-glycosylation situés au niveau de la chaîne α ne compromet pas l'assemblage, la polymérisation et la sécrétion des IgA (Mestecky et al., 2013). Par contre, le rôle des N-glycanes dans le catabolisme et la clairance des IgA a été démontré. Ces résidus sont impliqués dans la fixation des IgA aux récepteurs ASialoGlycoProteins (ASGPR) exprimés à la surface des hépatocytes ; le fait que les IgA2 présentent plus de résidus N-glycosylés leur confère une avidité accrue vis-à-vis des ASGPR et pourrait en partie expliquer leur faible abondance au niveau sérique (10% vs 90% d'IgA1) et leur demi-vie inférieure à celle des IgA1 (10h vs 14h pour IgA1) du fait de leur clairance rapide au niveau hépatique (Rifai et al., 2000).

I.4. Production

La muqueuse intestinale constitue le site majeur de production des immunoglobulines ; la majorité des cellules sécrétrices d'IgA sont issues de l'activation des cellules B au niveau du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT) ; il s'agit d'un tissu recouvert d'un épithélium complexe et situé à proximité des surfaces muqueuses. Au niveau de l'intestin, le MALT est appelé gut-associated lymphoid tissue ou GALT (Lindner et al., 2015). La synthèse d'IgA

requiert la commutation de classe ou class switch recombination (CSR), de l'IgM qui est majoritairement produite lors des réponses primaires, vers l'IgA.

I.4.1. Cellules productrices d'IgA

L'IgA est produite par les lymphocytes B conventionnels (B2) selon des mécanismes T-dépendants et T-indépendants. Des études ont mis en évidence la présence d'une sous-population de cellules B appelée cellules B1 distinctes des cellules B2 par son origine ontogénique, sa distribution tissulaire, ses marqueurs phénotypiques et ses fonctions. Il devient de plus en plus évident que les cellules B1 contribuent fortement à la production de l'IgA au niveau des muqueuses et par la suite participent à la régulation du microbiote. Les données actuelles montrent que les cellules B1 sont issues de précurseurs hétérogènes présents au niveau de sites distincts tels que le sac vitellin extra-hématopoïétique, le foie fœtal ainsi que la moelle osseuse pour lesquels existe d'emblée un certain niveau de réactivité contre des antigènes du soi (Baumgarth, 2016). Cette faible autoréactivité des cellules B1 est physiologique et distincte des phénomènes auto-immuns ; elle contribue à la sélection de ces cellules et à leur affectation au compartiment B1. Ces cellules sont essentiellement présentes au niveau des cavités pleurale et péritonéale ainsi qu'au niveau de la rate (Meyer-Bahlburg, 2015). Les cellules B1 produisent des anticorps peu affins et polypécifiques dits naturels capables de reconnaître des épitopes communs à de nombreux antigènes. Les anticorps naturels produits par les cellules B1 constituent une première ligne de défense de l'organisme (Schwartz-Albiez et al., 2009).

Chez la souris, les études *in vitro* et *in vivo* ont montré la capacité de ces cellules à se différencier en cellules sécrétrices d'IgA sous l'effet de plusieurs facteurs tels que les interleukines IL-5 et IL-15, les facteurs BAFF (B-cell Activating Factor of the TNF Family) et TGF- β (Tumor Growth Factor- β). Chez l'homme, les données concernant ces cellules B1 restent limitées du fait que cette population ne soit pas encore complètement caractérisée (Meyer-Bahlburg, 2015).

I.4.2. Induction de la production d'IgA

La production d'IgA est initiée au niveau des GALT des plaques de Peyer (PP), des follicules lymphoïdes isolés (ILF) ainsi que dans la rate et les ganglions lymphoïdes secondaires sous l'effet du microenvironnement cytokinique et selon des mécanismes dépendants ou non des lymphocytes T (Pabst, 2012).

Dans le cas d'une production d'IgA T-indépendante (Figure 7.A), les cellules B sont activées par différentes voies dont celle des Toll Like Receptors (TLR). Les facteurs BAFF et APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand) produits par les cellules dendritiques (DC) et les cellules épithéliales induisent l'expression de l'enzyme AID (Activation-Induced cytidine Deaminase)

responsable de la CSR. Ceci se produit normalement au niveau du dôme sous-épithélial (Macpherson et al., 2008, 2012).

Dans le cas d'une production d'IgA T-dépendante (Figure 7.B), la formation des centres germinatifs (GC) joue un rôle crucial dans la génération de cellules B à IgA, de plasmocytes de longue durée de vie et de cellules B mémoires (Macpherson et al., 2012).

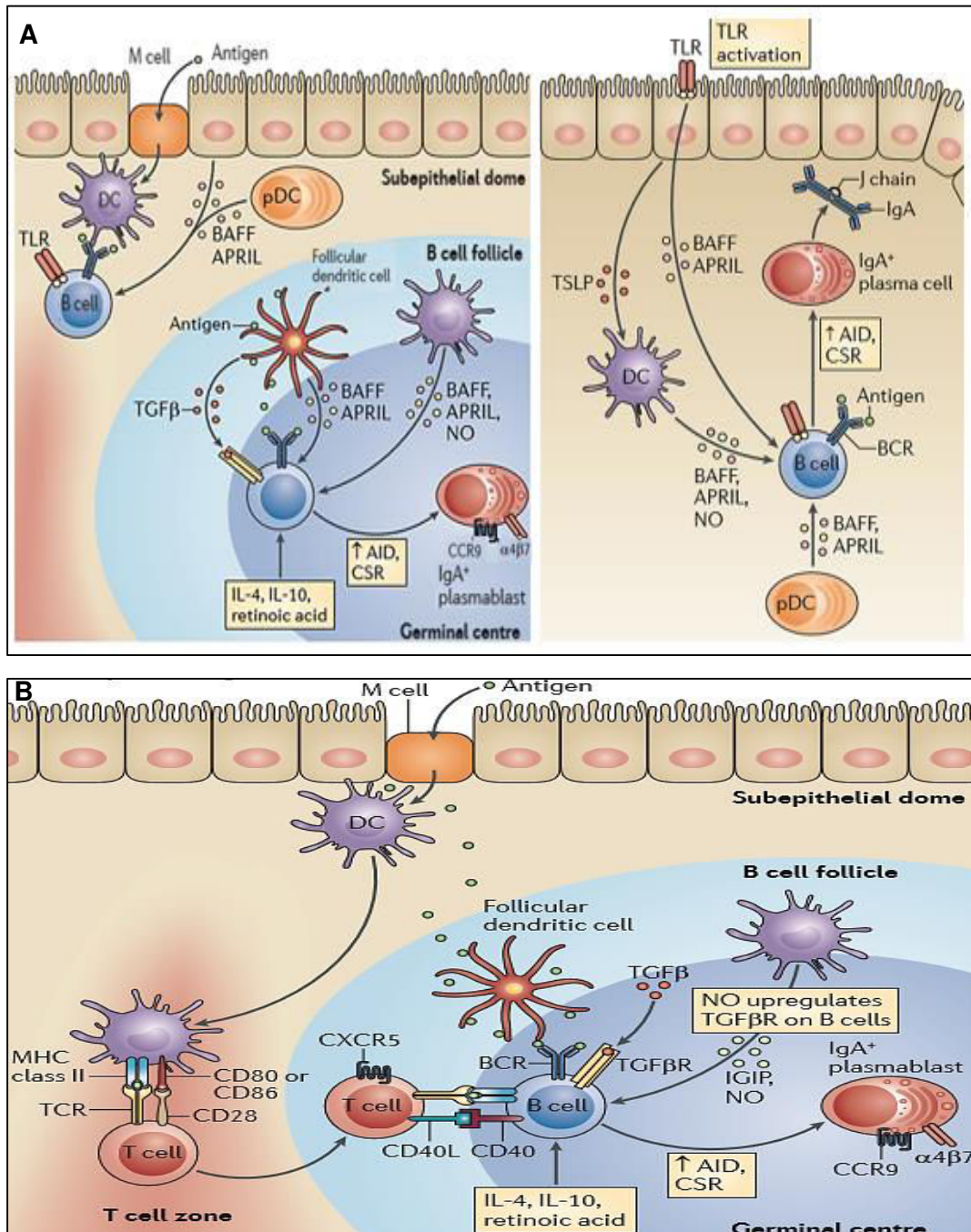


Figure 7: Production T-indépendante et T-dépendante d'IgA au niveau intestinal

La synthèse d'IgA est induite lors d'une stimulation antigénique selon des mécanismes dépendants (A) ou non des lymphocytes T (B) (Adaptée de Pabst et al. 2012)

I.4.2.1. Les centres germinatifs :

Les centres germinatifs (GC) (Figures 8 et 9) sont des microstructures anatomiques présentes dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires et dans lesquelles peuvent s'effectuer les phénomènes de CSR et d'hypermutation somatique (SHM) sous la dépendance de l'enzyme AID (Macpherson et al., 2012; Pabst, 2012). C'est grâce à ces événements que les cellules B du GC seront capables de produire l'IgA de bonne affinité.

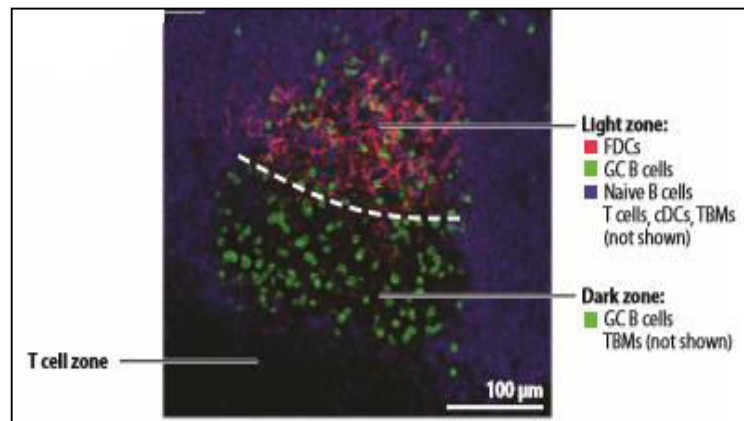


Figure 8: Anatomie du centre germinatif

Coupe tissulaire marquée par immunofluorescence montrant les différentes populations cellulaires du GC (Adaptée de Vitoria et Nussenzweig 2012)

I.4.2.2. Description et acteurs du centre germinatif :

Le centre germinatif est formé de deux grandes zones : la zone sombre (Dark Zone ou DZ) marquée par une prolifération intense des lymphocytes B appelées centroblastes et la zone claire (Light Zone ou LZ) marquée par la présence de petites cellules B appelées centrocytes, de cellules dendritiques folliculaires (FDC) et de cellules T folliculaires helper (T_{FH}) (Mesin et al., 2016).

La formation des GC a lieu suite à une réponse T-dépendante où les cellules présentatrices d'antigène (APC) telles que les macrophages ou les cellules dendritiques ayant capté un antigène le présentent aux lymphocytes B et T présents au niveau des follicules. Les cellules B peuvent aussi reconnaître l'antigène présenté à la surface des FDC sous forme de complexes immuns. Ces interactions entraînent l'activation et la prolifération cellulaire. Les cellules B et T activées par le même antigène vont interagir dans le follicule et c'est là que les cellules B vont se recentrer et former le GC (De Silva and Klein, 2015; Macpherson et al., 2012; Pabst, 2012).

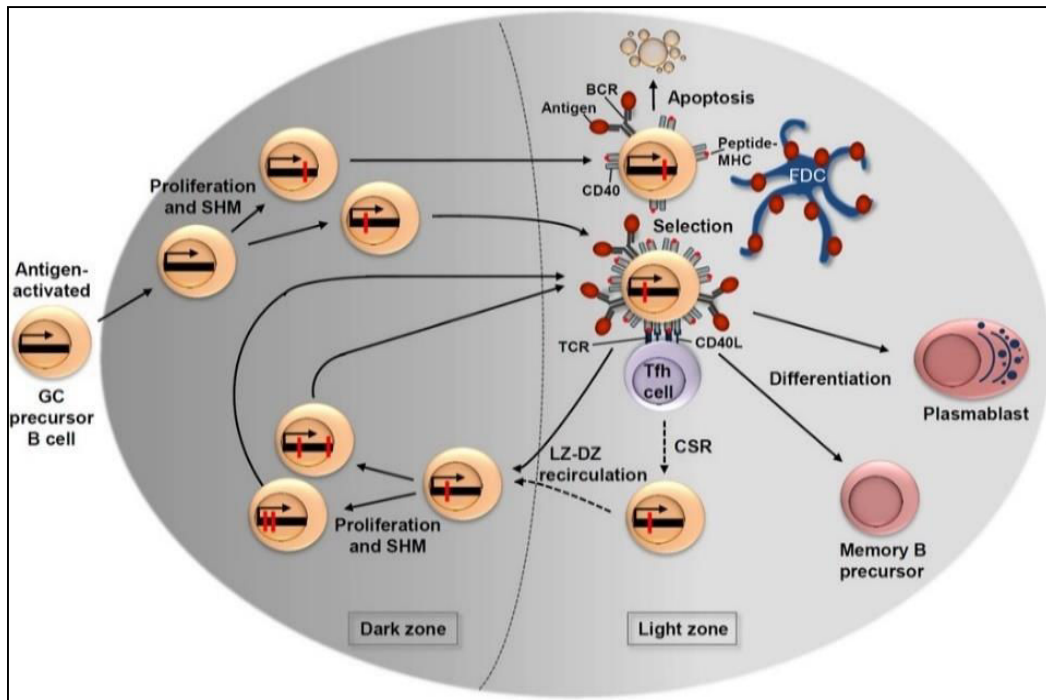


Figure 9: Formation et dynamique du centre germinatif

Le GC est divisé en une zone claire (LZ) et une zone sombre (DZ). La maturation d'affinité est assurée suite à des cycles répétitifs de prolifération et de SHM au niveau de la DZ suivis de la sélection des cellules exprimant les BCR les plus affins au niveau de la LZ (Extraite de De Silva et al. 2015)

La cellule B activée reçoit des signaux de co-stimulation des cellules T CD4+ grâce à l'interaction de plusieurs récepteurs et ligands exprimés à la surface des deux types cellulaires et impliqués dans la formation d'une structure appelée synapse immunologique (Shekhar and Xi, 2012) (Figure 10). Ces interactions vont induire la prolifération excessive de la cellule B qui se dirige vers la zone sombre du GC générant ainsi de grosses cellules proliférantes, les centroblastes. C'est au niveau de la zone sombre que la cellule B subira la SHM. Après avoir subi une phase intense de prolifération et de mutations dans la zone sombre, la cellule B migre vers la zone claire où l'affinité du nouveau B-cell receptor (BCR) vis-à-vis de l'antigène sera testée (Mesin et al., 2016; Pabst, 2012). La CSR se fait en un site qui reste discuté, mais sans doute principalement dans la zone claire.

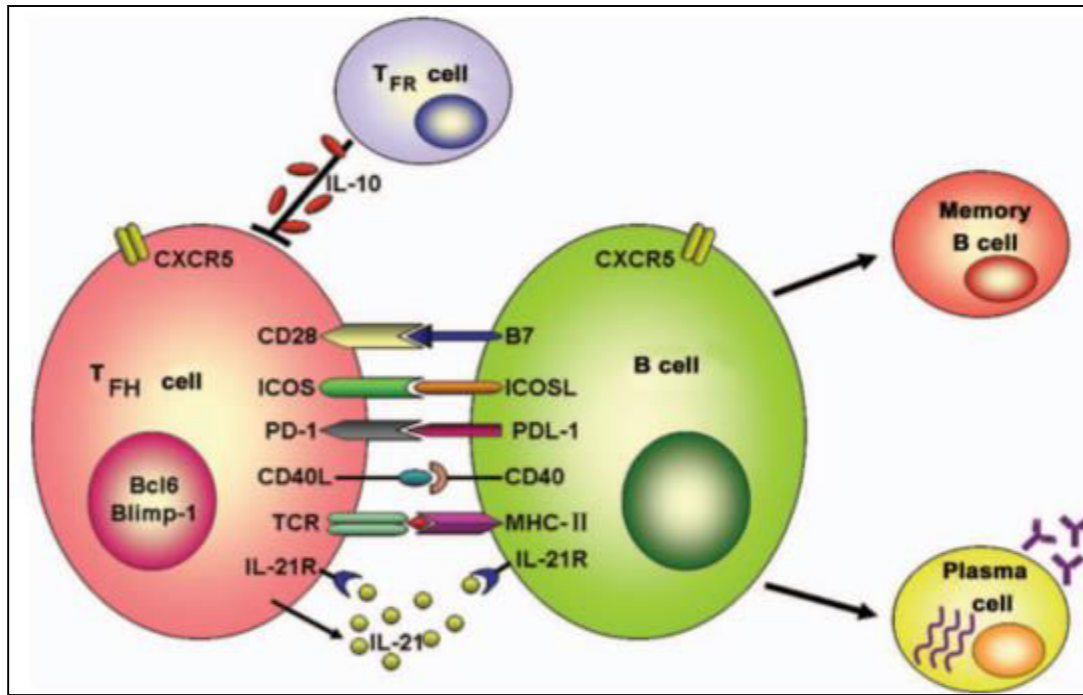


Figure 10: Représentation schématique de la synapse immunologique

Dans le GC, l'interaction entre la cellule T_{FH} et la cellule B spécifiques du même antigène a lieu grâce à des molécules variées telles que ICOS–ICOSL, PD-1–PDL-1, CD40–CD40L et IL-21R–IL-21, aboutissant à la génération de plasmocytes et de cellules B mémoires. Une hyperactivation aberrante des cellules T_{FH} peut conduire à la production d'auto-anticorps. Les cellules T_{FR} inhibent ce genre de réactions par sécrétion d'IL-10. CXCR5: chemokinereceptor-5; ICOS: inducible costimulator; PD-1: programmed death-1; T_{FR} : follicular T regulatory (Extraite de Shekhar and Yang 2012)

I.4.2.3. Commutation de classe vers IgA

En réponse à l'environnement cytokinique favorisant l' α -CSR, et sous l'action des promoteurs germinaux et des activateurs transcriptionnels, l'expression de l'enzyme AID est induite dans la cellule B. Cette enzyme cible les régions switch S_{μ} et S_{α} situées en amont des régions constantes C_{μ} et C_{α} du locus *IgH* et opère ainsi une cassure double brin au niveau de l'ADN. Cette cassure donne naissance à une portion d'ADN épisomal circulaire permettant de témoigner le déroulement de l' α -CSR (Figure 11). La machinerie de réparation cellulaire intervient et permet la juxtaposition des régions Switch (S-S synapsis) et donc la reconstitution du gène *IGHA* recombiné.

Après recombinaison, le promoteur situé en amont du gène *IGHA* est activé, induisant ainsi la transcription de ce dernier ce qui donne naissance à un transcrit $V_HDJ_H C_{\alpha}$. Ce transcrit sera épissé et traduit pour générer la chaîne lourde α du BCR.

Chez l'homme, la production du facteur APRIL par les cellules épithéliales intestinales peut induire soit une $\alpha 2$ -CSR directe, soit une CSR séquentielle $\alpha 1 \rightarrow \alpha 2$. Après l'assemblage des chaînes lourdes et légères, les différentes modifications post-traductionnelles (dont la glycosylation) auront lieu au niveau du réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Les IgA seront d'abord exprimées à la surface des cellules B sous forme de BCR (Macpherson et al., 2012; Muramatsu et al., 2000; Pabst, 2012; Xu et al., 2012).

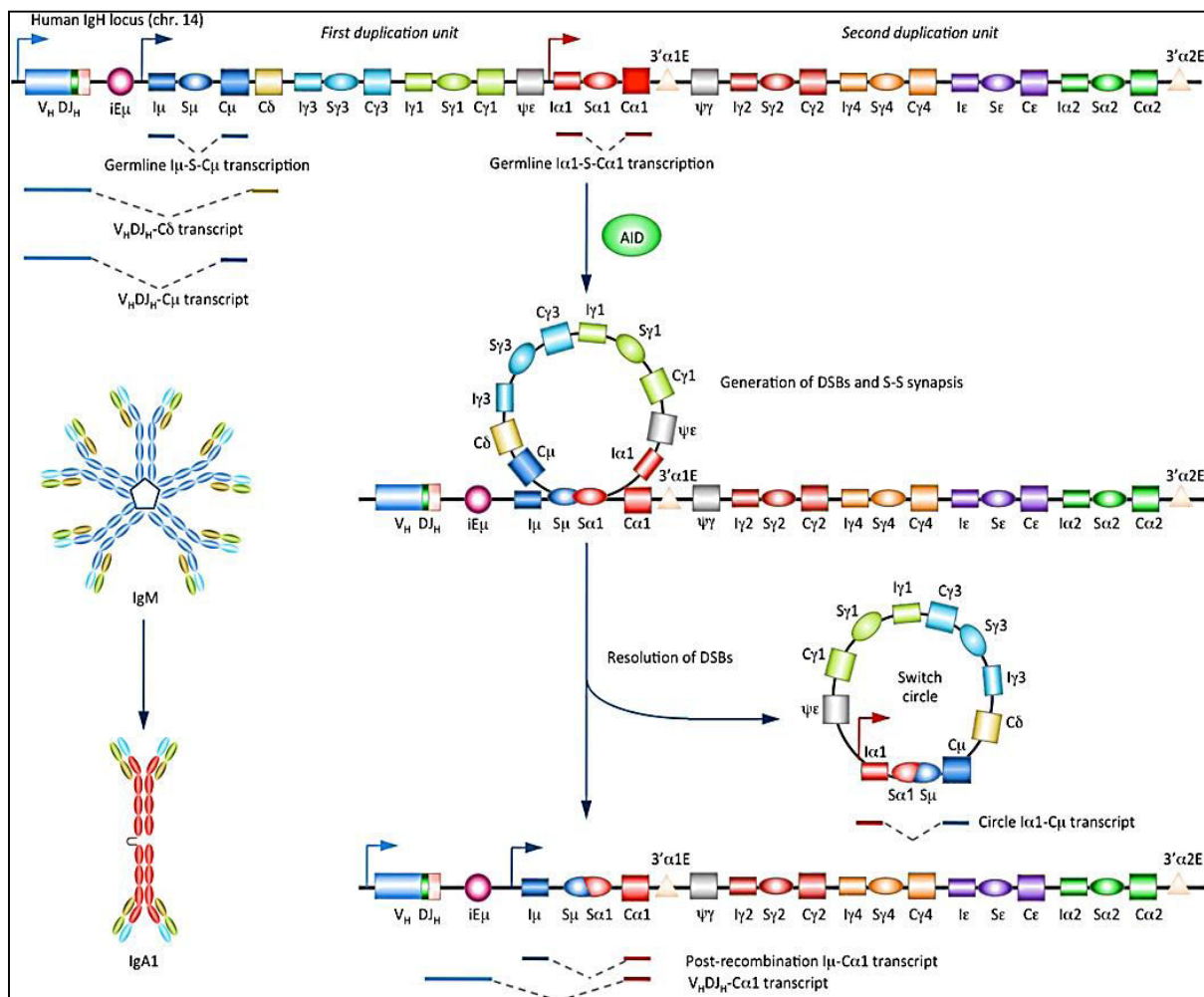


Figure 11: Commutation isotypique d'IgM en IgA

En réponse aux cytokines promouvant l' α -CSR, le promoteur situé en amont de l'exon d'initiation ($I\alpha 1$) est activé et la synthèse d'un transcrit germlinal $I\alpha$ -S- $C\alpha$ aura lieu suivie de la formation d'un hybride ADN-ARN stable. Une cassure double brin médiée par l'enzyme AID aura lieu au niveau de la région Switch. La machinerie de réparation de l'ADN permet la juxtaposition des régions $S\mu$ et $S\alpha$ et la recombinaison du locus codant la région constante (Adaptée de Xu et al. 2012)

I.4.2.4. Hypermutation somatique

L'hypermutation somatique a lieu au cours de la prolifération des centroblastes et a pour conséquence l'augmentation de la variabilité du site de reconnaissance antigénique. Elle est définie par l'introduction de substitutions nucléotidiques ciblant les quatre bases azotées

(guanine G, cytosine C, thymidine T et adénine A) au niveau des gènes de la région variable de l'immunoglobuline. Au cours de la SHM, le nombre de mutations au niveau des régions VDJ est augmenté 10^6 fois plus que la normale dans le reste du génome.

La première phase de l'hypermutation somatique consiste à générer des mutations au niveau des paires C/G ; ces mutations résultent d'une action directe de l'enzyme AID.

Ensuite, après excision plus large d'un segment simple brin autour d'une lésion initiée par AID, les mutations des paires A/T requièrent un second processus de mutagenèse impliquant les mécanismes de réparation ainsi que des polymérases infidèles telles que l'error-prone DNA polymerase eta (Pol η) (Neuberger and Rada, 2007).

Lors de la transcription du gène *IGHA* et particulièrement au niveau des séquences de la région variable, l'enzyme AID fortement exprimée dans les centroblastes intervient.

Par déamination des cytidines, AID transforme les paires de bases cytidine-guanine en uracile-guanine ; l'excision de ces uraciles néoformées par le système de réparation cellulaire crée des coupures qui seront réparées par la polymérase de très faible fidélité Pol η . Cette polymérase introduit des mutations ponctuelles aléatoires à la séquence d'ADN et surtout au niveau des régions codant pour les CDR du domaine variable. Ces mutations vont être à l'origine d'une diversité énorme de spécificité des BCR reconnaissant les épitopes antigéniques avec une affinité plus ou moins importante (Neuberger and Rada, 2007; Pabst, 2012) (Figure 12).

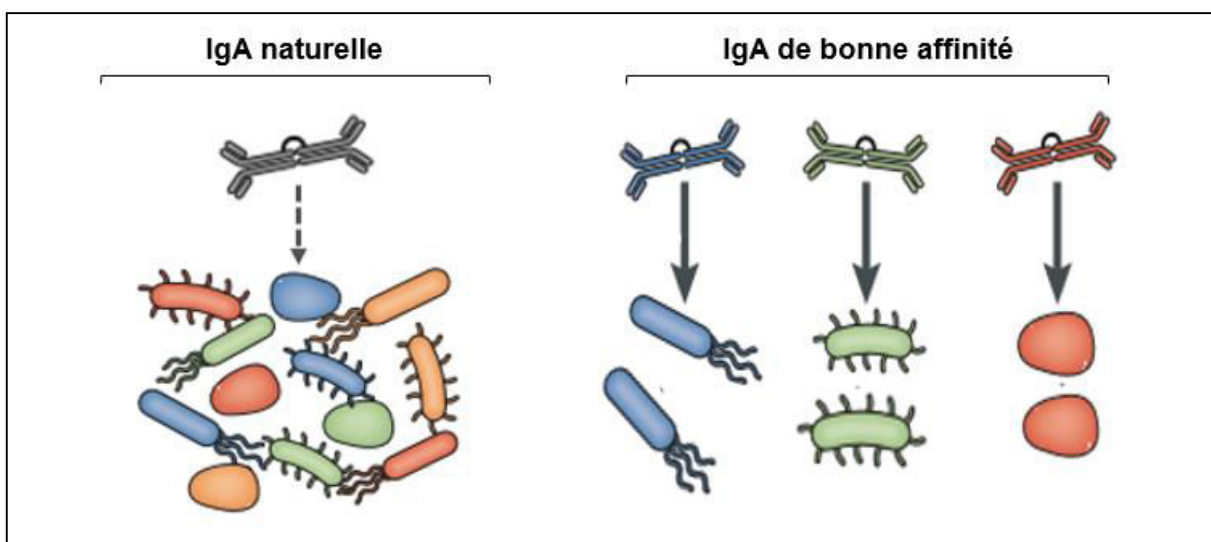


Figure 12: Affinité des IgA

Les IgA naturelles sont générées lors d'une réaction indépendante de stimulation antigénique ; elles peuvent reconnaître le soi, le soi altéré ainsi que les bactéries commensales. Par contre, les IgA classiques sont issues suite à des réactions T-dépendantes et possèdent une forte affinité à des cibles spécifiques (Adaptée de Pabst 2012)

Par ailleurs, les anticorps naturels sont des immunoglobulines produites par les lymphocytes B1 (et en partie aussi par les cellules B de la zone marginale) en absence de toute stimulation antigénique. Comme ces lymphocytes ne sont pas présents au niveau du centre germinatif et par conséquent ne subissent pas l'hypermutation somatique, leurs séquences sont quasi-germline caractérisées par un répertoire et une réactivité très restreints. Les anticorps naturels constituent un élément important de la défense contre les pathogènes ainsi que dans la régulation de la clairance des cellules apoptotiques et nécrotiques (Schwartz-Albiez et al., 2009). Ils participent aussi à la régulation des autres réponses immunitaires via le rôle des complexes immuns IgM-Ag transportés vers les tissus lymphoïdes (Shibuya and Honda, 2015a).

I.4.2.5. Sélection cellulaire au niveau des GC

Une fois les processus de CSR et de SHM subis, les centroblastes quittent la zone sombre pour se diriger vers la zone claire du GC contenant des populations importantes de cellules FDC et T_{FH}. Ces deux populations cellulaires jouent un rôle fondamental dans le tri des cellules B devenues des centrocytes en sélectionnant celles ayant le BCR de plus haute affinité vis-à-vis de l'immunogène. Les mécanismes de sélection impliquent à la fois la survie, l'expansion clonale et la différenciation des cellules B. La sélection clonale est basée sur la théorie de compétition pour l'antigène dans le but de sélectionner les clones B ayant le plus d'affinité. Les cellules B entrent en compétition pour les niches antigéniques présentés à la surface des FDC sous forme de complexes immuns.

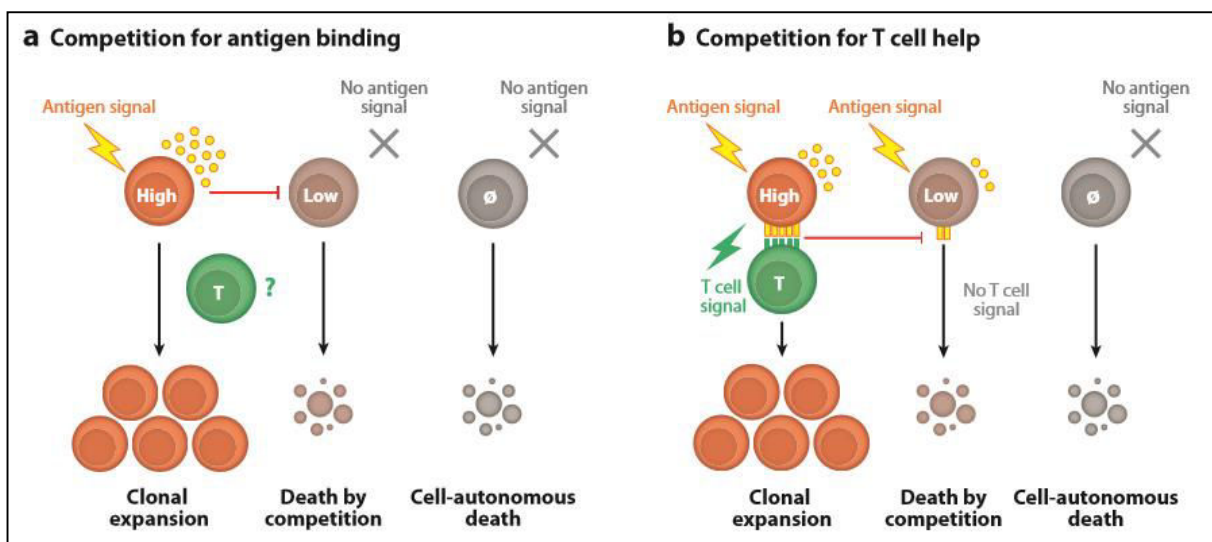


Figure 13: Compétition cellulaire au niveau du GC

Les cellules B présentant des BCR de forte affinité vont occuper les sites antigéniques disponibles ce qui empêche les cellules dont les BCR sont moins affins de recevoir une signalisation via leurs BCR (a). Les clones B de forte affinité pour l'antigène vont lier les cellules T_{FH} (dont le nombre est limité) ; les clones de moindre affinité entrent en apoptose par manque de signaux de survie des cellules T_{FH} séquestrées par les cellules B de forte affinité (b) (Extraite de Victora et Nussenzweig 2012)

Les cellules présentant le BCR de meilleure affinité surclasseront celles dont l'affinité est moindre. Les premières reçoivent des signaux de survie fournis par les FDC ainsi que par la signalisation du BCR tandis que les secondes entrent en apoptose (Victora and Nussenzweig, 2012). Une sélection clonale des cellules B peut avoir lieu par compétition pour la présentation d'antigènes aux cellules T_{FH} . Suite à l'interaction T_{FH} -centrocytes, les cellules T_{FH} stimulent la survie, la prolifération et la différenciation des cellules B ayant acquis des mutations de forte affinité (Victora and Nussenzweig, 2012) (Figure 13). Les études montrent que les plasmocytes de longue durée vie effectuent plus de cycles DZ-LZ et subissent ainsi beaucoup plus de mutations au niveau des régions variables de leur BCR ce qui leur permet d'acquérir un degré d'affinité plus élevé que celui des B mémoires. Ces observations suggèrent que les B mémoires quittent précocement les GC avant les cellules B à longue durée de vie (Mesin et al., 2016; Pabst, 2012; Weisel et al., 2016). La classe de l'immunoglobuline produite détermine aussi clairement un destin différent des cellules B mémoires (Dogan et al., 2009; Laffleur et al., 2013).

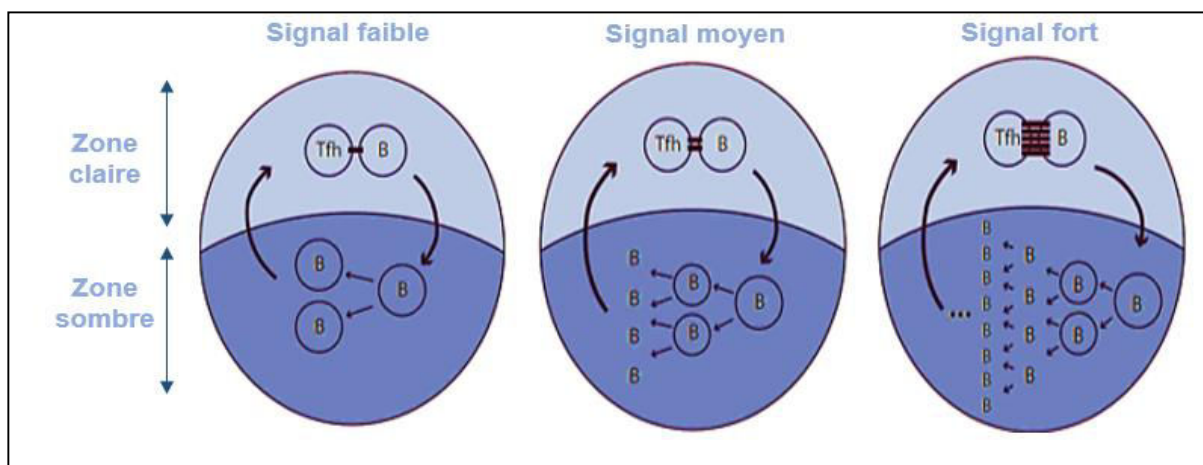


Figure 14: Sélection positive des cellules B

L'intensité de l'interaction T_{FH} -B détermine le nombre de divisions cellulaires et de cycles zone claire-zone sombre que la cellule B va subir. Une cellule B ayant subi un faible signal de survie prolifère beaucoup moins qu'une cellule ayant subi un signal plus fort (Adaptée de Mesin et al, 2016)

I.4.3. Migration cellulaire ou homing

Après leur activation, expansion et maturation au niveau du GALT, les cellules B migrent dans les canaux lymphatiques puis dans le canal thoracique pour atteindre la circulation sanguine. L'expression à leur surface de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ ainsi que des récepteurs CCR9 et CCR10 leur permet de regagner la *lamina propria* intestinale en suivant le gradient des chimiokines CCL25 et CCL28 produites par les cellules épithéliales de l'intestin grêle et du côlon. L'extravasation leur est possible par adhésion à MadCAM-1 exprimée par les cellules de l'endothélium intestinal.

Par contre, les cellules productrices d'IgA sériques activées dans la rate et les ganglions lymphoïdes périphériques expriment le récepteur CXCR4 ainsi que l'intégrine $\alpha 4\beta 1$. L'expression de CXCR4 oriente ces cellules vers la moelle osseuse où les cellules stromales synthétisent le ligand CXCL12. L'extravasation de ces cellules peut avoir lieu par adhésion à VCAM-1 exprimé à la surface de l'endothélium médullaire (Zhiming et al., 2018) (Figure 15).

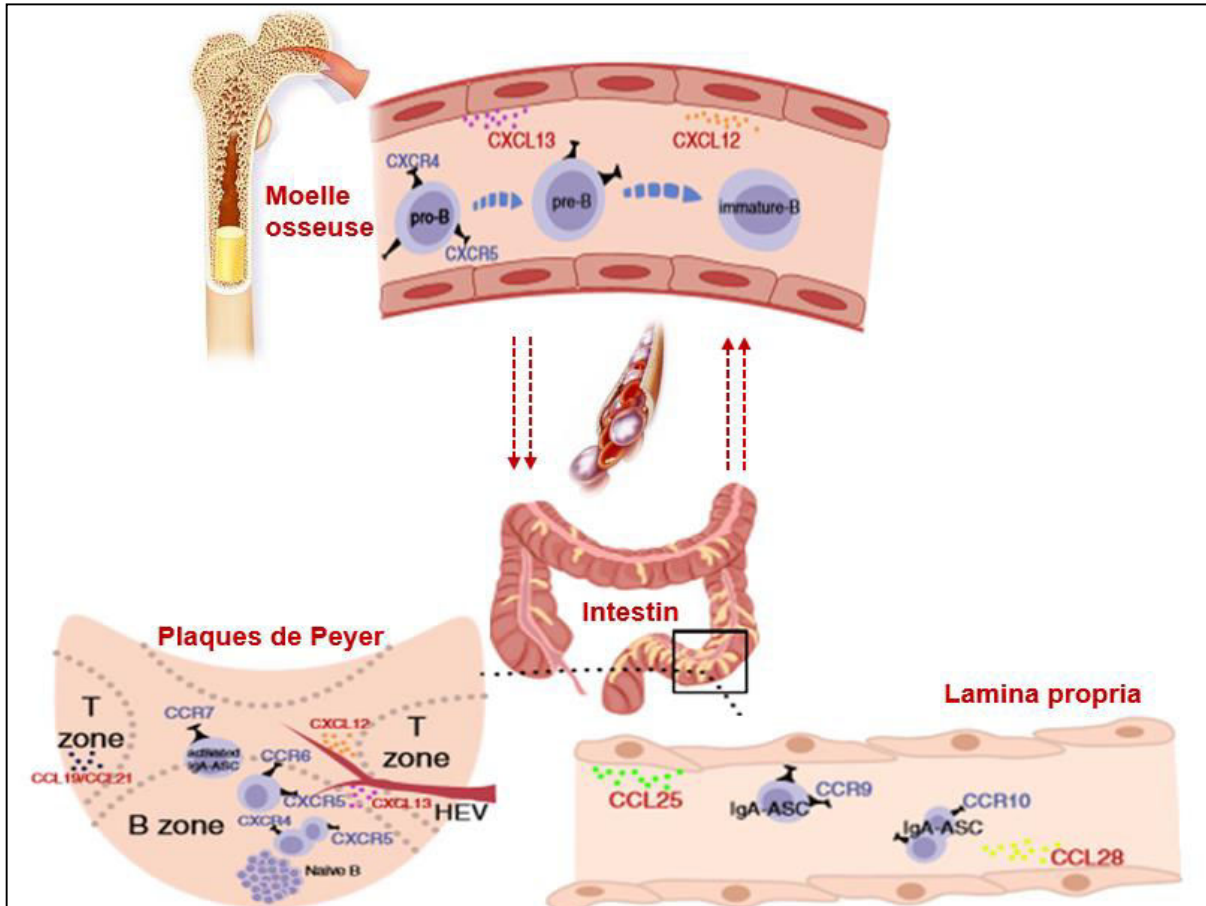


Figure 15: Circulation des cellules B entre moelle osseuse et GALT.

Dans la moelle osseuse, le développement des cellules B progénitrices dépend des axes CXCL12–CXCR4 et CXCL13–CXCR5. Ces deux axes sont aussi indispensables pour l'homing des cellules B à IgA vers la moelle. Les axes CCR9–CCL25 et CCR10–CCL28 contrôlent la circulation entre les ganglions lymphoïdes et la lamina propria intestinale. Les cellules B en cours d'activation surexpriment CCR7 et se dirigent vers la zone T des follicules. Les cellules B matures résident au niveau de l'intestin grâce à l'expression de CCR6 (Adaptée de Zhimming et al. 2018)

I.5. Régulation de synthèse

Plusieurs facteurs peuvent affecter la production de l'IgA :

I.5.1. Les cellules épithéliales

Les cellules épithéliales contribuent considérablement au renforcement de la barrière intestinale. En plus, elles peuvent stimuler le niveau de production d'IgA sous l'effet de la

production de facteurs qui comprennent notamment BAFF et APRIL (Macpherson et al., 2012) (Figure 18). Par exemple, les cellules de Goblet présentes au niveau de l'épithélium peuvent assurer un transport rétrograde des antigènes grâce à un phénomène appelé Goblet Antigen Passage (McDole et al., 2012).

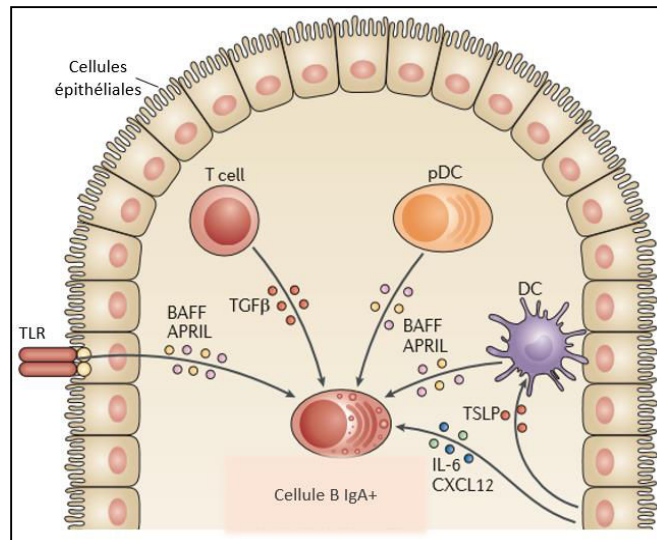


Figure 16: Production d'IgA sous contrôle du microenvironnement cytokinique

Les cellules épithéliales sont capables de produire des facteurs tels que BAFF, APRIL, l'IL-6, la chimiokine CXCL12 ainsi que la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) qui stimulent la formation de cellules B à IgA (Adaptée de Pabst et al. 2012)

D'une façon similaire, les cellules M sont capables de transporter des antigènes endolumineux piégés par les SIgA vers les follicules lymphoïdes par transcytose inverse. Ce transport permet de délivrer les antigènes aux cellules dendritiques et activer la production d'IgA par les cellules B (Pabst, 2012). Les cellules M sont issues de la stimulation de RANK, exprimé par les cellules souches épithéliales, par le ligand RANKL synthétisé par les cellules stromales. Après stimulation par RANKL plusieurs facteurs de transcription sont exprimés dont Spi-B (de Lau et al., 2012). Les animaux dont RANK n'est pas exprimé sur les cellules épithéliales ou dont RANKL n'est pas exprimé sur les cellules stromales produisent une faible quantité d'IgA (Nagashima et al., 2017; Rios et al., 2016). Les cellules épithéliales sont également capables de produire BAFF et APRIL ce qui augmente la prolifération et la survie des plasmocytes à IgA (Shang et al., 2008)

I.5.2. Le microbiote intestinal

Il a été démontré que les microbes commensaux de la flore intestinale ont une forte influence sur la production des IgA. Chez les animaux élevés dans des conditions germ-free, le nombre de cellules B à IgA ainsi que la production d'IgA sont considérablement réduits. La colonisation

par introduction de bactéries commensales restaure la production d'IgA (Macpherson et al., 2008, 2012) (Figure 17).

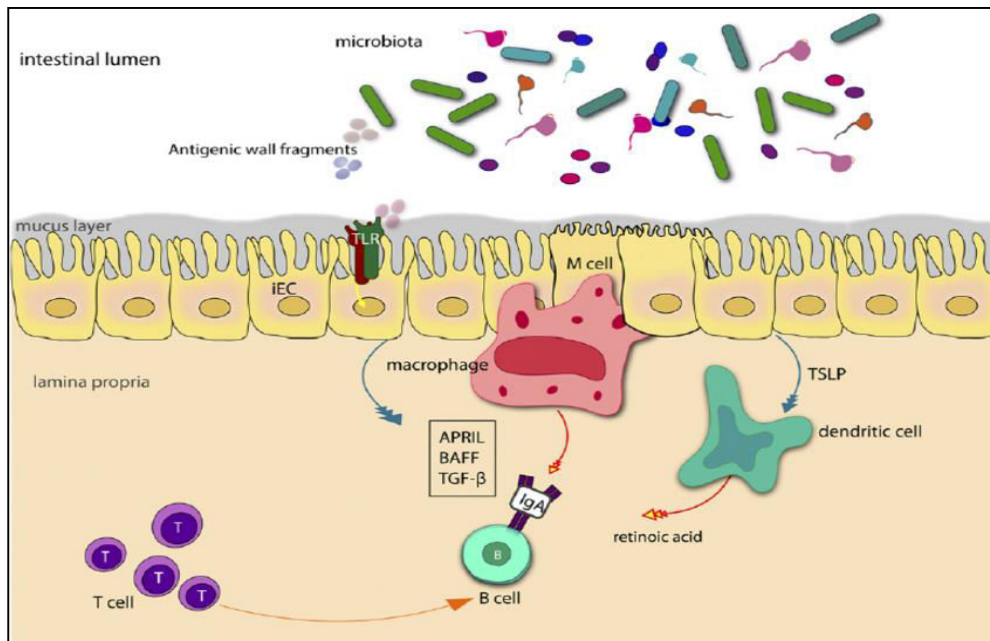


Figure 17: Effet du microbiote intestinal sur la production d'IgA

Des éléments du microbiote intestinal peuvent activer les macrophages et les DC de la lamina propria qui à leur tour activent la production d'IgA par les cellules B

I.5.3. Les cellules immunitaires et les facteurs solubles

Les antigènes présentés à la surface de certaines APC, les cytokines ainsi que d'autres facteurs solubles peuvent contribuer à l'activation ou à l'inhibition de la production d'IgA.

- **Rôle des cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes, dont les FDC présents dans les GC peuvent intervenir dans la production d'IgA en particulier via l'interaction directe avec les cellules B initiat l' α -CSR (Cerutti and Rescigno, 2008) (Figure 16).

Ceci fait intervenir la production du TGF- β , le facteur principal contrôlant le switch IgA. Le mécanisme d'action du TGF- β implique les complexes SMAD3/4 et Runx qui fixent un élément spécifique du promoteur I α du gène *IGHA* et activent sa transcription (Macpherson et al., 2012; Shi et al., 2001).

La production du monoxyde d'azote (NO) par les TIP-DC (TNF/INOS Producing-DC) peut intervenir sur la commutation vers IgA en régulant l'expression du récepteur de TGF- β à la surface des cellules B ; les animaux déficients en TIP-DC ont des taux diminués de SIgA (Macpherson et al., 2012; Tezuka et al., 2007).

Les DC produisent de l'acide rétinoïque (RtA) à partir de la vitamine A. La fixation du RtA sur son récepteur nucléaire induit l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ et du récepteur CCR9 sur les cellules B et T activées permettant leur homing vers la muqueuse intestinale et l'augmentation de la transcription du gène *IGHA* dans les cellules B ; la déplétion en vitamine A réduit fortement la production d'IgA (Kaufman et al., 2011; Mora, 2006; Sage et al., 2016).

Les DC plasmacytoïdes produisent les facteurs BAFF et APRIL après stimulation des TLR présents à leur surface ce qui induit la production d'IgA T-indépendante (Macpherson et al., 2012; Tezuka et al., 2011).

- **Rôle des FDC :**

Les FDC sont des cellules stromales d'origine épidermique. Elles sécrètent une protéine, la FDC-SP, qui constitue un facteur suppresseur de la réponse B à IgA ; l'absence de cette protéine entraîne une augmentation de la production d'IgA au cours du développement de dépôts mésangiaux (Hou et al., 2014; Shibuya and Honda, 2015b).

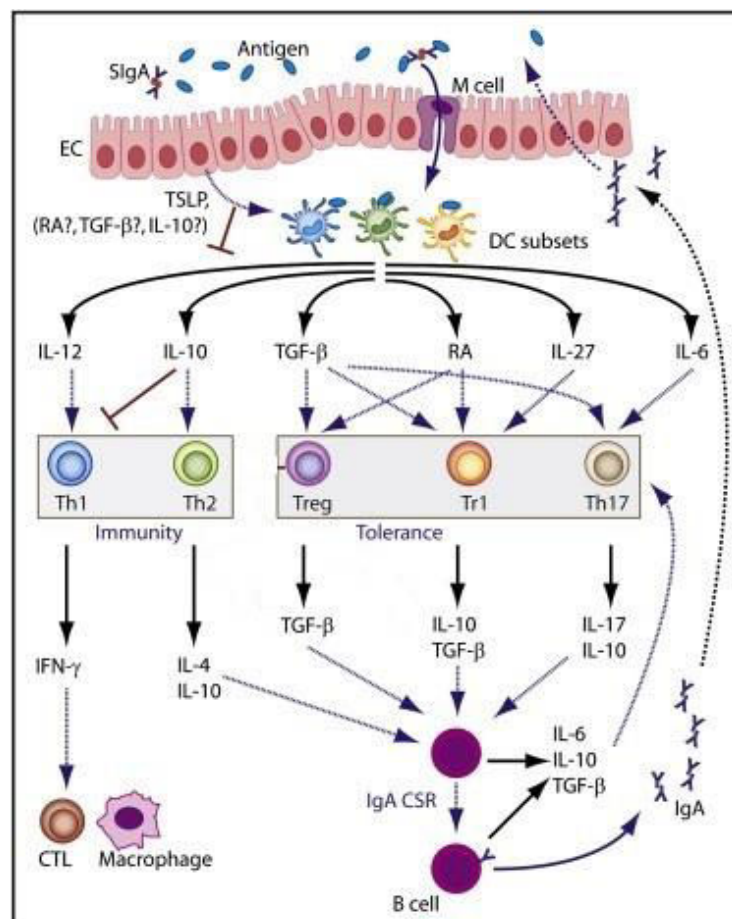


Figure 18: Induction de la production d'IgA par les DC et les lymphocytes T

Les différentes sous-populations de cellules dendritiques favorisent l'initiation de réponses T non-inflammatoires et l'inhibition de réponses T_{H1} pro-inflammatoires. La réponse de type T_{H2} favorise l' α -CSR et la production d'IgA par les cellules B (Adaptée de Cerruti et al 2008)

- **Rôle des lymphocytes T**

Il a été montré que les lymphocytes ROR γ T sont indispensables à la production d'IgA au niveau des muqueuses (Winsauer et al., 2015). Le rôle des T_{FH} intervient dans la formation des GC, l'expansion et la différenciation des cellules B. Les T_{FH} et T_{H17} produisent de grandes quantités d'IL-21 ce qui induit l'expression de l'enzyme AID et par conséquent favorise l' α -CSR dans les cellules B; le défaut de production d'IL-17 par les T_{H17} influe également sur la sécrétion des IgA (Cao et al., 2015; Seo et al., 2009).

Contrairement aux T_{FH}, les cellules T folliculaires régulatrices (T_{FReg}) n'expriment ni l'IL-21 ni le CD40-L. Ces cellules ont une activité suppressive sur les T_{FH} et par la suite sur la production d'IgA (Sage et al., 2016).

Les T régulateurs (T_{Reg}) peuvent aussi activer la production d'IgA soit par l'adressage de signaux de survie aux cellules B à IgA par le biais du TGF- β , soit par la privation des GC en IL-2 ce qui bloque la différenciation des précurseurs des T en cellules T_{FReg} (Ballesteros-Tato et al., 2012; Cerutti and Rescigno, 2008; Oestreich et al., 2012) (Figure 16).

- **Rôle des cellules B_{Reg} :**

Il a été montré que, chez l'homme, la coopération du TGF- β et de l'IL-10 stimule la production de l'IgA par les cellules B naïves (Defrance et al., 1992). Plus récemment, une nouvelle sous-population de cellules B appelée B régulatrices (B_{Reg}) a été identifiée. Les cellules B_{Reg} jouent un rôle important dans la régulation de synthèse de l'IgA ; elles sont caractérisées par la production du TGF- β et de l'IL-10 (Gorosito Serrán et al., 2015; Mizoguchi and Bhan, 2006; Yanaba et al., 2008).

I.6. Récepteurs

Comme toute autre immunoglobuline, l'IgA possède à la fois des fonctions de liaison antigénique ainsi que des fonctions effectrices. Ces dernières sont exercées grâce à l'interaction de la partie constante de l'IgA avec différents récepteurs intra- ou extracellulaires. Parmi les récepteurs à IgA actuellement identifiés, on peut distinguer ceux capables d'interagir avec le fragment cristallisable (F_c) de l'IgA et ceux capables de lier les glycanes exposés à sa surface.

I.6.1. Récepteurs de F_c

I.6.1.1. Le pIgR : il s'agit du récepteur aux immunoglobulines polymériques, il est capable de fixer les IgA et les IgM polymériques.

Ce récepteur est exclusivement exprimé au pôle basolatéral des cellules épithéliales muqu

euses et glandulaires ; par transcytose, le complexe pIgR-pIgA est transféré vers le pôle apical de la cellule avant qu'un clivage protéolytique ait lieu libérant ainsi la pIgA associée à la pièce sécrétoire dans la lumière mucoale (Johansen et al., 2001; Papista et al., 2011) (Figure 19, tableau1).

I.6.1.2. Le Fc α / μ R : il présente des similitudes structurales avec le pIgR ; il est capable de fixer les IgA et IgM polymériques. Son expression est restreinte aux lymphocytes B, notamment ceux de la zone marginale, et aux FDC (Shibuya and Honda, 2015a; Wang et al., 2009) (Figure 19, tableau1).

I.6.1.3. Le CD71 : ou récepteur à la transferrine, il est exprimé à la surface de toutes les cellules de l'organisme à l'exception des érythrocytes. CD71 est capable de lier une grande variété de ligands ; il interagit préférentiellement avec les IgA polymériques hypogalactosylées (Moura, 2004). Son implication dans la pathogénie de la néphropathie à IgA a été discutée (Moura, 2005) (Figure 19, tableau1).

I.6.1.4. Le CD89 : ou Fc α RI, est le récepteur à IgA le mieux caractérisé.

Il est exprimé au niveau des cellules de la lignée myéloïde telles que les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, les macrophages et les cellules dendritiques. Il est composé de deux domaines extracellulaires, d'une région transmembranaire et d'une petite région intracellulaire. Cette dernière ne porte aucun motif de transduction.

La signalisation en aval de ce récepteur dépend de son association à une chaîne Fc γ R. Celle-ci présente des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) dont la phosphorylation active de nombreuses kinases intracellulaires.

Ce récepteur est doté d'une dualité fonctionnelle ; les IgA monomériques peuvent lier le CD89 et induire une phosphorylation partielle de la chaîne Fc γ R. Ceci est à l'origine d'un signal ITAM inhibiteur témoignant les propriétés anti-inflammatoires conférées au CD89. Par contre, la fixation des IgA polymériques au niveau du CD89 induit le clivage de son domaine extracellulaire, la libération de complexes solubles et le regroupement des récepteurs CD89 et Fc γ R.

Ceci induit une forte phosphorylation des récepteurs et génère une réponse pro-inflammatoire (Heineke and van Egmond, 2017; Monteiro, 2010; Monteiro and van de Winkel, 2003) (Figure 19, tableau1).

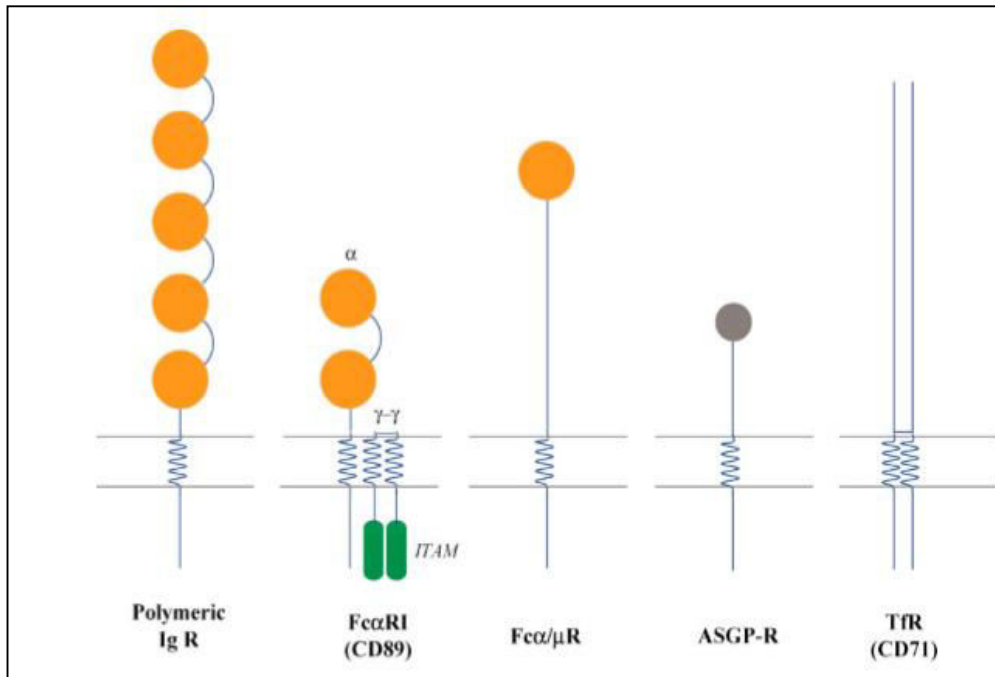


Figure 19: Représentation schématique de certains récepteurs à IgA

Les cercles oranges représentent les Ig-like domains, les domaines transmembranaires et intracellulaires sont également présentés (Extraite de Monteiro et van de Winkel 2003)

I.6.2. Récepteurs de glycanes

I.6.2.1. La β -4 Gal T1 : la β -4 galactosyltransférase T1 est une enzyme transmembranaire capable de lier l'IgA et pouvant aussi se présenter sous forme soluble. Une étude récente a montré l'expression de cette enzyme au niveau des cellules mésangiales du rein et son éventuelle participation à l'atteinte rénale lors de la néphropathie à IgA (Molyneux et al., 2017).

I.6.2.2. L'ASGPR : il est essentiellement exprimé au niveau des cellules hépatiques. Ce récepteur est impliqué dans le catabolisme et la clairance des glycoprotéines sériques dont les IgA (Monteiro and van de Winkel, 2003; Rifai et al., 2000) (Figure 19, tableau1).

I.6.2.3. Le DC-SIGN : pour Dendritic Cell- Specific Intracellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-Integrin ; c'est un récepteur transmembranaire exprimé à la surface des cellules dendritiques et liant les IgA sécrétoires. L'endocytose du complexe DC-SIGN-SIgA induit la production de l'IL-10 favorisant la génération des T régulateurs et par la suite la génération d'une réponse immune tolérogène (Diana et al., 2013) (Tableau 1).

| Name | AKA | Expression | Ligands | Function |
|------------------------------|-------|---|---|--|
| FcαRI | CD89 | Myeloid cells, platelets | IgA1, IgA2, pentraxins | Immune activation or inhibition |
| Transferrin receptor | CD71 | Universal | Transferrin, haemochromatosis protein, IgA1 | Proliferation |
| Asialoglyco-protein receptor | ASGPR | Hepatocytes | Asialoglyco-proteins, IgA1, IgA2 | Removal glycoconjugates from circulation |
| Fcα/μR | CD351 | Multiple cells, including B cells and macrophages | IgM, polymeric IgA | Internalization |
| FcRL4 | | Mucosal lymphoid tissue memory B cells | Human serum IgA | Inhibit B-cell signalling |
| DC-SIGN/SIGNR1 | CD209 | Dendritic cells and macrophages | Carbohydrates, Secretory IgA | Anti-inflammatory |
| Polymeric Ig Receptor | plgR | (Intestinal) epithelial cells | Polymeric IgA and IgM | Transport |
| SC-receptors | | Eosinophils | Secretory component | Eosinophil degranulation |
| M-cell receptors | | (Murine) M Cells | Monomeric IgA, SIgA | Transport |

Tableau 1: Exemples de récepteurs à IgA

Les récepteurs à IgA sont exprimés à la surface d'une variété de cellules de l'organisme et présentent des fonctions diverses (Extrait de Heineke et al. 2017)

I.6.2.4. Le Siglec-5 : ou Sialic acid-binding Immunoglobulin-like Lectin-5 est un récepteur exprimé à la surface des cellules M. Ce récepteur lie préférentiellement les complexes antigènes-IgA2 présents dans la lumière muqueuse et permet leur transcytose inverse (Rochereau et al., 2013).

I.7. Fonctions

L'IgA assure plusieurs fonctions et joue un rôle critique dans la réponse immune.

I.7.1. L'homéostasie du microbiote

Les IgA sont connues pour leur capacité à « façonner » le microbiote commensal et à maintenir une communauté bactérienne appropriée à chaque site. Des études montrent que chez des animaux déficients en IgA par défaut de commutation de classe ou par défaut d'expression de certains récepteurs à IgA, la qualité du microbiote est modifiée ; par contre, une greffe de moelle osseuse permet la restauration de la production d'IgA (Kaetzel, 2014; Macpherson et al., 2012).

I.7.2. La défense contre les pathogènes

Au niveau des muqueuses, les IgA participent à la défense de l'organisme contre les agents pathogènes (virus, bactéries, toxines...) et contribuent d'une façon importante à la barrière intestinale (Papista et al., 2011). Cette défense est médiée par différents mécanismes tels que :

I.7.2.1. L'exclusion immune

-*Indépendante de la spécificité antigénique* : c'est un mécanisme de l'immunité innée, où les SIgA fortement glycosylées peuvent fixer par l'intermédiaire de leurs glycanes des lectines microbiennes ou végétales et empêcher, par encombrement stérique, leur adhésion à l'épithélium (Mantis et al., 2006).

Récemment, une étude a mis en évidence la capacité de l'IgA d'induire l'« enchained growth » de certaines bactéries. Les microbes et les SIgA s'agglutinent dans le mucus ce qui facilite par la suite la clairance de l'ensemble dans les selles (Moor et al., 2017) (Figure 20).

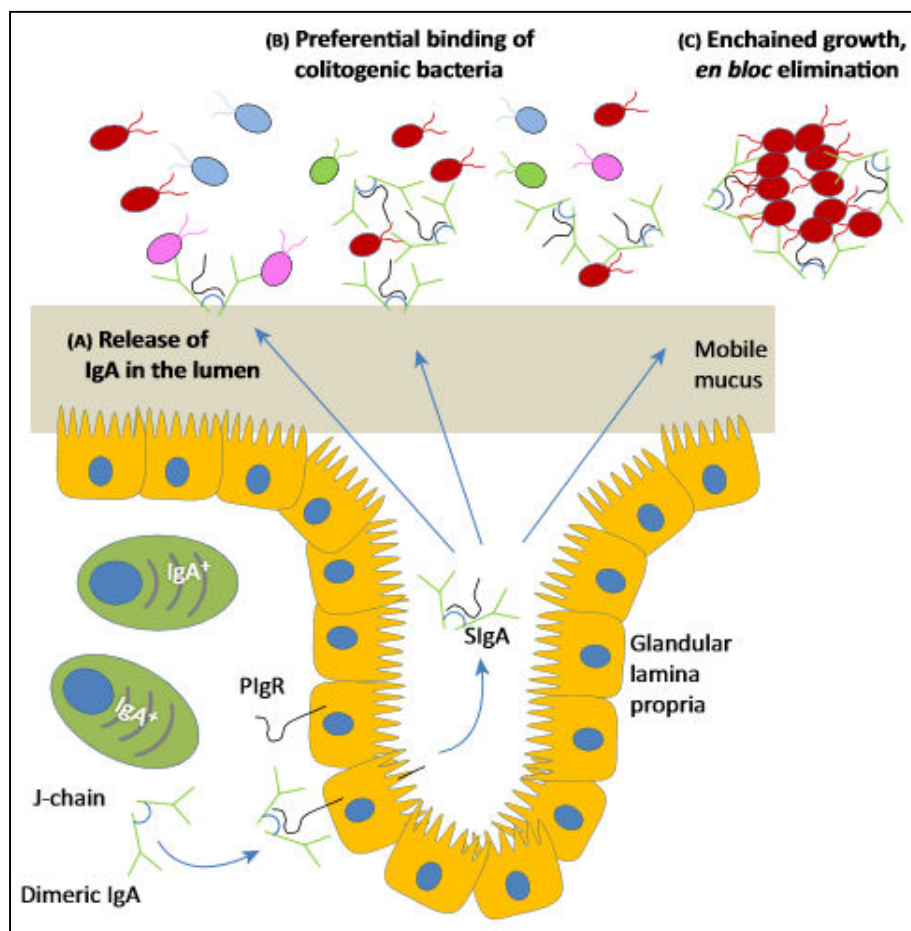


Figure 20: Exclusion immune médiée par l'IgA

Les SIgA libérées dans la lumière intestinale peuvent lier directement les bactéries d'une manière antigène-spécifique (A). Les SIgA permettent aussi la clairance en bloc des bactéries invasives par un processus appelé « enchainé growth » (B) (Extrait de Jahnsen et al. 2018)

-*Dépendante de la spécificité antigénique* : les SIgA sont capables de fixer de nombreux pathogènes et toxines en liant spécifiquement leurs épitopes de surface. Cette liaison a pour effet de neutraliser ces agents et/ou d'inhiber leur fixation aux récepteurs spécifiques (Silvey et al., 2001) (Figure 20).

I.7.2.2. L'atténuation de la virulence microbienne

L'IgA sécrétoire peut avoir un effet direct sur les agents pathogènes en limitant leur pouvoir virulent ; la fixation de ces agents peut être à l'origine de la réduction de leur mobilité ainsi que de leur bioénergétique (Forbes, 2011).

I.7.2.3. L'excrétion luminale

Certains microbes peuvent réussir à franchir la barrière épithéliale et atteindre le chorion. C'est là où ils sont captés par les IgA polymériques. Les complexes immuns formés seront transportés par le plgR et excrétés au pôle apical des cellules épithéliales (Kaetzel et al., 1994).

Ainsi, cette voie est empruntée par des plgA ayant neutralisé des composants microbiens dans le cytoplasme des cellules infectées ; ce mécanisme de neutralisation intracellulaire dépendante de l'anticorps ou ADIN implique TRIM21, un récepteur intracellulaire de l'IgA. Le rétro-transfert des antigènes de la *lamina propria* vers la lumière intestinale évite l'induction de réponse inflammatoire (Bidgood et al., 2014).

I.7.2.4. La transcytose inverse

Les cellules M jouent un rôle important dans l'internalisation des IgA2 qui peuvent lier des composants microbiens par les deux récepteurs : Siglec-5 et Dectine-1. Ces complexes sont endocytés dans le dôme sous-épithélial. Ceci permet l'induction d'une réponse humorale muqueuse et/ou systémique importante contre ces composants (Mantis et al., 2002).

I.7.3. La régulation de l'érythropoïèse

Il a été démontré que l'IgA joue un rôle important dans le contrôle de la prolifération érythroblastique. L'interaction des IgA1 avec le récepteur CD71 augmente la sensibilité des érythroblastes à l'érythropoïétine et accélère l'érythropoïèse (Coulon et al., 2011).

I.7.4. La modulation des réponses immunes

En plus de leurs fonctions protectrices, les IgA présentent des fonctions immunomodulatrices.

Des études cliniques montrent que les patients qui souffrent d'une déficience sélective en IgA, s'ils ne présentent pas de pathologie majeure, ont une incidence élevée de réactions allergiques et de désordres auto-immuns (Jacob et al., 2008; Monteiro, 2010).

Des études moins récentes ont montré l'implication des IgA dans la régulation négative de la phagocytose médiée par les IgG, de la chimiotaxie, des réactions impliquant le stress oxydatif ainsi que dans la diminution de production des cytokines (Monteiro, 2010).

Contrairement aux pIgA capables d'activer le CD89 et les voies du complément, les IgA sériques -majoritairement monomériques- jouent plutôt un rôle anti-inflammatoire.

La phosphorylation partielle de la chaîne FcR γ associée au CD89 après fixation des mIgA induit un signal inhibiteur et bloque l'activité de ce récepteur (Monteiro, 2010).

Par ailleurs, des quantités de SIgA ont été trouvées dans la circulation chez des individus sains ; ces quantités sont augmentées chez des patients ayant des pathologies associées à l'IgA sans que leur rôle soit bien défini. Ces SIgA interagissent fortement avec les cellules dendritiques par le récepteur DC-SIGN. Cette interaction induit la production de grandes quantités d'IL-10 et de TGF- β ce qui favorise l'expansion des T_{Reg}. En plus, la fixation du DC-SIGN à ICAM3 induit la génération de cellules T CD4⁺ suppressives (Diana et al., 2013).

Il a été montré que l'IgA peut induire la production d'IL-10 par les monocytes (Pilette et al., 2010) ; l'IL-10 favorise le shift vers une réponse anti-inflammatoire de type T_{H2}. L'IL-10 a aussi un effet favorisant le switch vers IgA et/ou la sécrétion des IgA (Defrance et al., 1992; Wang et al., 2014).

L'ensemble de ces données témoigne de l'effet suppresseur et tolérogène des mIgA et des SIgA circulantes dont les mécanismes moléculaires sont encore mal connus. Au cours de mes travaux de thèse, nous avons montré l'effet inhibiteur de l'expression de l'IgA sur l'évolution de l'auto-immunité chez un modèle de souris lupiques (voir article 3).

I.8. Pathologies associées

Par ailleurs l'IgA peut être synthétisée en quantité anormalement élevée pouvant même excéder la production totale des autres isotypes. L'IgA peut être associée à plusieurs pathologies :

I.8.1. Le déficit sélectif en IgA

C'est la forme la plus commune d'immunodéficience primaire dans les pays occidentaux avec une prévalence de 1/600. Elle est définie par de très faibles taux d'IgA (≤ 0.07 g/L). Les patients souffrent de réactions allergiques et d'infections récurrentes du tractus gastro-intestinal et des

voies aériennes avec un fort risque de développer des réactions immunitaires chroniques sévères (Kaetzel 2007).

I.8.2. Le myélome multiple à IgA

C'est une affection fréquente ; son incidence annuelle est de 1/20 000 ; il est caractérisé par le tropisme des plasmocytes tumoraux IgA+ pour la moelle osseuse où la production excessive des IgA (quelques grammes/100 mL) aura lieu. Ces IgA peuvent être détectées dans les urines des patients (Kaetzel 2007).

I.8.3. La maladie de la chaîne α

Contrairement au myélome multiple, cette maladie trouve son origine au niveau des sites muqueux. Il s'agit d'un désordre lymphoprolifératif rare des lymphocytes B produisant des chaînes lourdes défectueuses non associées à des chaînes légères (Kaetzel 2007).

I.8.4. Le purpura rhumatoïde ou maladie d'Henoch-Schölein

Il s'agit d'une vascularite inflammatoire des petits vaisseaux secondaire aux dépôts de complexes immuns à IgA. Elle est principalement caractérisée par une atteinte cutanée se traduisant par la présence de pétéchies, par une atteinte digestive associant douleurs abdominales et parfois saignements et par une atteinte glomérulaire qui sur le plan histologique est identique à celle de la néphropathie à IgA. Cette affection touche préférentiellement les enfants (Schmitt et al., 2010).

I.8.5. La néphropathie à IgA

C'est une glomérulonéphrite histologiquement caractérisée par la présence de dépôts d'IgA au niveau du mésangium rénal (Wyatt and Julian, 2013). Elle fera l'objet du chapitre suivant.

Chapitre II. La néphropathie à IgA

II.1. Caractéristiques

La néphropathie à IgA (IgAN) est la glomérulonéphrite primaire la plus fréquente dans le monde. Elle a été décrite pour la première fois en 1968 par les français Berger et Hinglais suite à l'étude d'une série de biopsies rénales par immunofluorescence. Elle est principalement caractérisée par le dépôts d'IgA au niveau du mésangium rénal (Pillebout and Vérine, 2016). Cette maladie montre des tableaux cliniques très variables et à ce jour-là sa pathophysiologie reste mal élucidée. Dans la plupart des cas, l'IgAN est une maladie sporadique primaire. Toutefois, elle pourrait constituer une manifestation secondaire décrite chez de nombreux patients ayant souffert d'autres pathologies systémiques dont la cirrhose hépatique et les maladies inflammatoires du tube digestif (Knoppova et al., 2016).

II.1.1. Caractéristiques épidémiologiques

La prévalence exacte de l'IgAN reste inconnue. D'une part, ceci est dû au fait que la maladie pourrait être silencieuse chez beaucoup de gens. D'autre part, le diagnostic de l'IgAN requiert une biopsie rénale parfois difficile à être réalisée ce qui fait que les données documentées réfèrent uniquement au nombre de cas positifs enregistrés après biopsie.

La prévalence de l'IgAN varie selon les différentes régions géographiques (Cheung and Barratt, 2016) (Figure 21): elle est estimée à plus de 40% des cas de biopsies rénales en Asie. La prévalence est de 20% de cas de biopsies approximativement en Europe où la maladie est plus fréquente au Nord qu'en Sud (Coppo, 2018). En France, chaque année au moins 1 500 nouveaux cas d'IgAN sont déclarés (2.5/100 000 personnes) (Noel, 2008). En Amérique du Nord, la prévalence de l'IgAN est évaluée à 5 à 10% de cas de biopsies ; aux Etats-Unis l'incidence annuelle de l'IgAN est de 1/100 000 personnes. Par contre, elle est évaluée à moins de 5% en Afrique centrale (Mestecky et al., 2013).

La disparité de distribution démographique est liée à la différence des stratégies de dépistage ainsi qu'à plusieurs facteurs génétiques et environnementaux.

La maladie peut être décelée à tout âge (de 4 à plus de 60 ans) mais ses manifestations sont beaucoup plus souvent observées entre 20 et 40 ans. Les hommes sont généralement plus touchés que les femmes (Donadio and Grande, 2002; Pillebout and Vérine, 2016; Wyatt and Julian, 2013).

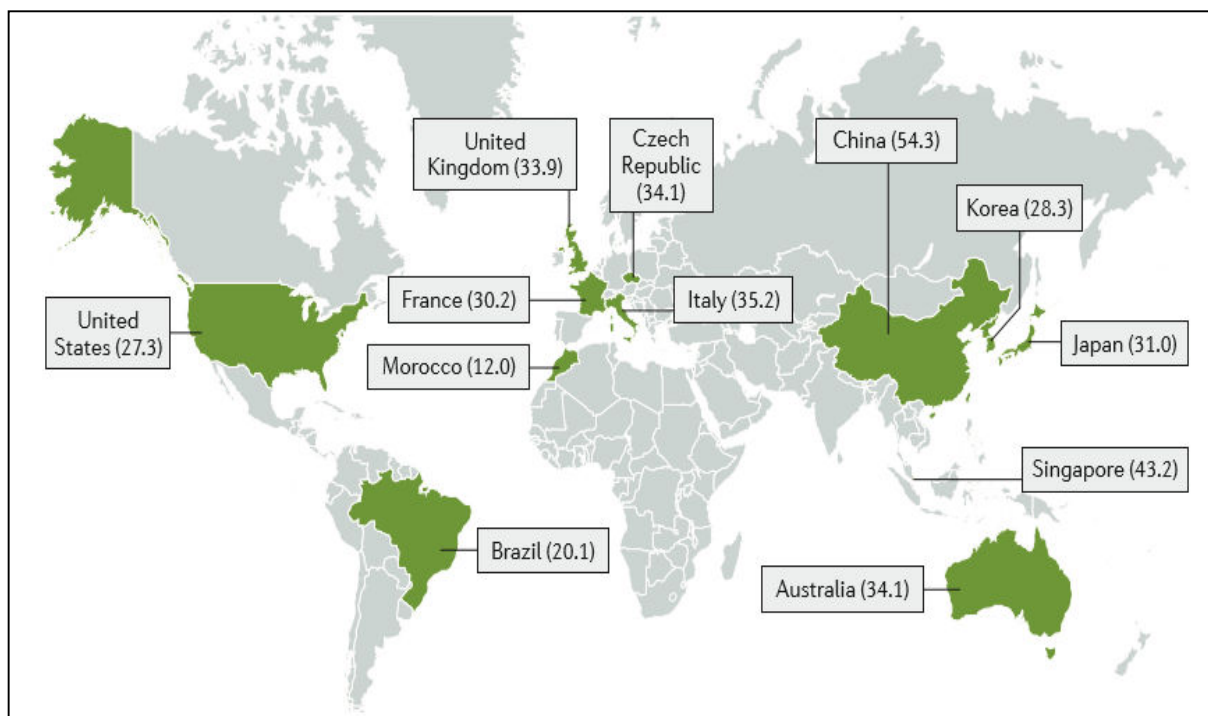


Figure 21: Distribution géographique de la prévalence de l'IgAN dans certaines régions
 La prévalence est présentée sous forme de pourcentage de cas positifs de biopsies rénales (Extrainte de Lai et al. 2016)

II.1.2. Présentation clinique et histopathologique

Les manifestations cliniques de la néphropathie à IgA sont variables. Dans certains cas dits asymptomatiques la maladie peut passer totalement inaperçue tandis que chez le tiers des cas, sa progression peut rapidement aboutir au stade terminal d'insuffisance rénale (ESRD) (Pillebout and Vérine, 2016; Wyatt and Julian, 2013).

II.1.2.1. L'hématurie

Elle est le témoin principal de l'IgAN. L'hématurie peut être micro- ou macroscopique ; elle est souvent le mode de révélation de la maladie.

II.1.2.2. La protéinurie

La protéinurie est elle aussi détectée lors d'examen urinaires faits à titre systématique. Sa quantité est très variable, le plus souvent de l'ordre de 1 g/24 h ; elle peut réaliser un syndrome néphrotique.

II.1.2.3. L'hypertension artérielle

L'hypertension artérielle peut être un signe révélateur de l'IgAN ; elle est toujours présente dès l'installation d'une insuffisance rénale.

II.1.2.4. Les lésions histologiques

En présence de ces manifestations, la biopsie rénale reste le seul moyen pour affirmer le diagnostic.

L'immunofluorescence sur des coupes de biopsie révèle la présence de dépôts mésangiaux d'IgA (Figure 22) sous forme d'un marquage granulaire ou filamenteux plus ou moins diffus en « arbre mort » ou en « coup d'ongle » (Noel, 2008).

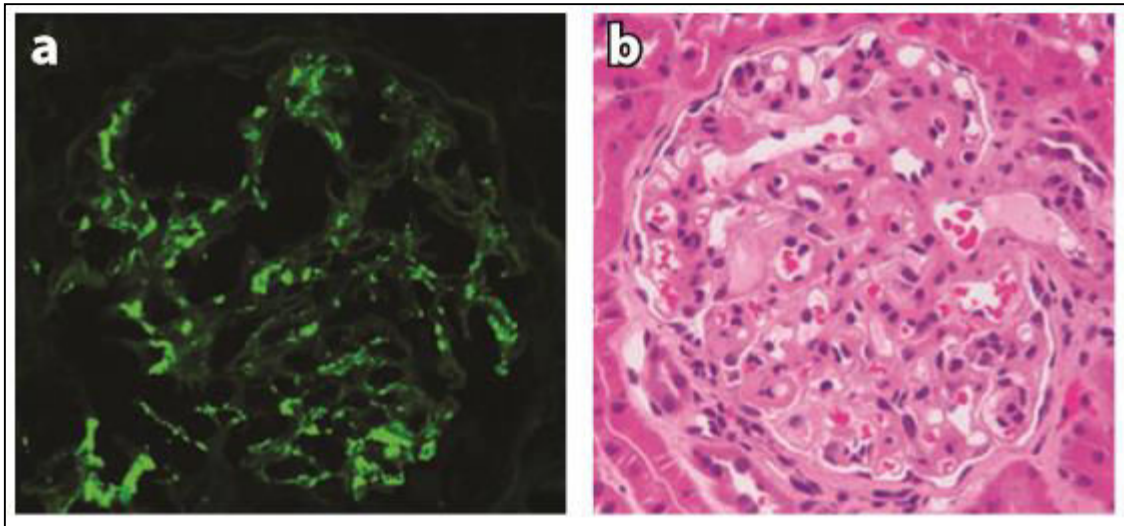


Figure 22: Coupes d'une biopsie rénale d'un patient à IgAN

Dépôts mésangiaux granulaires d'IgA détectés par immunofluorescence (a). Hypercellularité et épaississement de la matrice mésangiale révélés par la coloration hématoxyline-éosine (b) (Extrait de Mestecky et al. 2013)

La présence des chaînes légères de type lambda et kappa au niveau des dépôts a été rapportée. Les dépôts d'IgA co-localisent le plus souvent avec du C3, parfois avec IgG et IgM (Mestecky et al., 2013). D'ailleurs, la présence des dépôts au niveau d'un seul glomérule suffit pour faire le diagnostic (Noel, 2008). Toutefois la présence des dépôts n'est pas nécessairement pathologique comme dans le cas de sujets sains ne présentant aucun signe clinique de l'IgAN malgré une détection de dépôts mésangiaux (Mestecky et al., 2013) (données d'autopsie et prélèvement en vue de transplantation).

L'étude anatomo-pathologique des coupes de biopsie rénale met en évidence des lésions mésangiales (hypertrophie de la matrice mésangiale volontiers segmentaire, parfois associée à une prolifération cellulaire mésangiale) avec éventuellement une prolifération endocapillaire voire extracapillaire.

D'autres lésions peuvent être observées : sclérose segmentaire, atrophie tubulaire et fibrose interstitielle (Noel, 2008) (Figure 23).

De nombreux systèmes de classification des lésions histologiques ont été proposés dans le but d'évaluer les lésions et de les corrélérer au pronostic clinique. Récemment une classification basée sur le système de score, simple d'utilisation et extrêmement reproductible appelée classification d'Oxford semble être relativement fiable et devient de plus en plus utilisée (Pillebout and Vérine, 2016). Une étude rétrospective a montré l'utilité de cette classification sur l'établissement d'un pronostic chez les patients à IgAN (Alamartine et al., 2011).

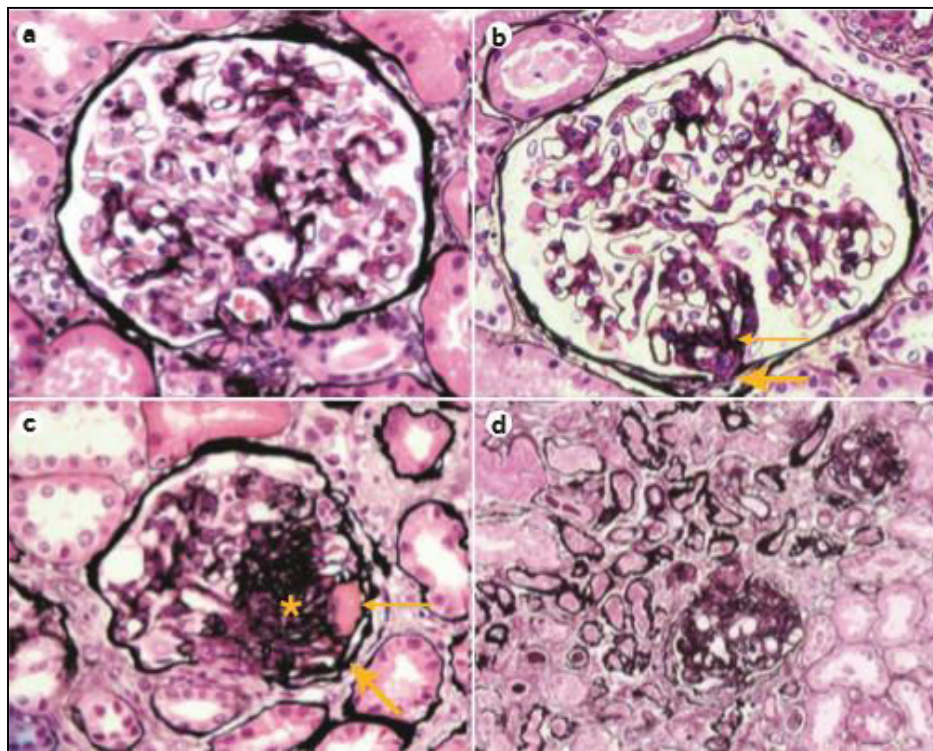


Figure 23: Différents stades pathologiques de l'IgAN

Stade précoce d'IgAN avec une expansion mésangiale minimale (a). Début de sclérose segmentaire (25% de l'aire glomérulaire) avec effondrement capillaire (flèche fine) et adhésion capsulaire (flèche épaisse) (b). Sclérose segmentaire significative (50%) avec effondrement capillaire et consolidation (*), hyalinose (flèche fine) et adhésion capsulaire (flèche épaisse) (c). Glomérulosclérose avancée ou obsolescence glomérulaire (>75%) associée à une atrophie tubulaire et fibrose interstitielle (d)
(Extraite de Lai et al. 2016)

II.1.3. Pronostic

Une protéinurie supérieure à 1 g/ 24 h, un débit réduit de filtration glomérulaire, une hypertension artérielle supérieure à 140/90 mm Hg ainsi que la présence de lésions histologiques sévères constituent des facteurs de risque majeur conduisant à un mauvais pronostic (Wyatt and Julian, 2013).

Le traitement de l'IgAN n'est pas codifié ; les mesures de protection glomérulaire sont toujours proposées : contrôle de la pression artérielle, contrôle des facteurs de risque cardiovasculaires

en particulier l'arrêt du tabac et le contrôle du poids. Les corticoïdes voire les immunosuppresseurs sont préconisés dans certains cas.

En Europe, 30 à 40% des jeunes patients ayant une IgAN évoluent vers une insuffisance rénale terminale dans un délai de 20 ans (Coppo, 2018; Noel, 2008). La majorité cependant a un pronostic meilleur ; il est à noter que les biopsies itératives quand elles ont été pratiquées ont montré que les dépôts d'IgA pouvaient soit persister (Wyatt and Julian, 2013) soit disparaître (Hotta et al., 2002).

II.1.4. Physiopathologie

La néphropathie à IgA est une maladie « mystérieuse ». L'hétérogénéité des tableaux cliniques et de son évolution pourrait en partie expliquer que sa physiopathologie reste mal comprise malgré le nombre élevé d'études et les avancées remarquables qui ont été réalisées.

L'IgAN n'est pas une anomalie rénale primitive ; la récurrence des dépôts d'IgA sur un rein normal transplanté à un patient ayant une IgAN ou bien au contraire, la disparition des dépôts lors de la transplantation accidentelle d'un rein présentant des dépôts à un individu normal constituent deux arguments en faveur de l'existence d'une anomalie d'origine extra-rénale (Knoppova et al., 2016).

Actuellement, toutes les études montrent que l'IgAN est une maladie multifactorielle impliquant l'intervention de nombreux acteurs dont la prédisposition génétique, le défaut de glycosylation des IgA, les facteurs environnementaux ainsi que des anomalies du système immunitaire (Knoppova et al., 2016) (Figure 24).

II.1.4.1. Anomalies du système immunitaire

La néphropathie à IgA semble être principalement due à une anomalie du système immunitaire; la survenue d'épisodes d'hématurie macroscopique lors d'une infection des muqueuses chez les patients ayant une IgAN évoque une réponse immunitaire inappropriée vis-à-vis d'agents infectieux (Kiryluk et al., 2013; Wyatt and Julian, 2013).

Chez les patients ayant une IgAN, une augmentation du taux plasmatique d'IgA est habituellement observée ; ceci évoque une stimulation accrue de la production médullaire ou muqueuse d'IgA ou d'une altération du cross-talk moelle osseuse-muqueuses dans la pathogenèse de l'IgAN (Suzuki et al., 2011).

Il a été montré que la greffe de moelle osseuse chez des patients ayant une leucémie associée à l'IgAN s'accompagne de la guérison de cette dernière (Park et al., 2008). Parallèlement, le transfert de moelle osseuse de souris sauvages aux souris HIGA atténue les lésions glomérulaires tandis que l'inverse induit une glomérulopathie chez les souris sauvages

(Imasawa et al., 1999). Ces éléments confirment que des cellules B mémoires nichées dans la moelle osseuse sont sécrétrices d'IgA apte à se déposer au niveau du mésangium.

De même, les lymphocytes disséminés dans les organes lymphoïdes y compris dans les muqueuses pourraient intervenir dans le développement de la maladie ; le transfert de cellules B CD19+ de la rate de souris ddY à des souris SCID permet d'induire l'IgAN chez ces souris (Nakata et al., 2013). L'hypothèse d'une modification de l'axe muqueuse-reins au cours de l'IgAN a été soulignée (Floege and Feehally, 2016; Zhang and Zhang, 2018). Dans ce sens, une étude récente a rapporté l'effet bénéfique de l'amygdalectomie chez les patients à IgAN (Liu et al., 2015) ; cet effet doit cependant être pondéré par le fait qu'il est surtout observé dans une population japonaise.

Les cellules T pourraient aussi avoir un rôle important ; des études ont évoqué l'induction d'un profil T_{H2} plutôt que T_{H1} au niveau des muqueuses au cours de l'IgAN (He et al., 2014).

L'expression constitutive de LIGHT, ligand du récepteur de lymphotoxine β des lymphocytes T chez un modèle murin augmente significativement le nombre de cellules B à IgA. Les taux plasmatiques d'IgA polymérique sont augmentés ; des dépôts d'IgA et de C3 ainsi qu'une expansion de la substance mésangiale accompagnée de protéinurie et d'hématurie sont observés (Wang et al., 2004).

Des souris transgéniques co-exprimant le facteur GATA-3 et un TCR spécifique de l'ovalbumine développent des dépôts mésangiaux d'IgA après immunisation orale (Yamanaka et al., 2016).

Un autre modèle murin surexprimant le facteur BAFF est développé. Dans ce modèle, les taux d'IgA dans le sérum et les muqueuses s'élèvent et on observe des dépôts mésangiaux d'IgA; la protéinurie est détectée chez les souris à partir de l'âge de 8 mois ; il convient de noter que les lésions glomérulaires pourraient être la conséquence d'une auto-immunité observée chez ces animaux (McCarthy et al., 2006).

Les résultats d'une étude réalisée chez l'homme ont montré une diminution du nombre de cellules B_{Reg} circulantes dans le sang chez les patients ayant une IgAN. Ceci a mis en évidence l'implication des cellules B_{Reg} dans la pathogenèse de l'IgAN selon un mécanisme probablement dépendant de l'IL-10 (Wang et al., 2014).

Récemment, une équipe a montré que l'expression de CD37, une tétraspanine exprimée à la surface des cellules B est significativement diminuée chez des patients à IgAN en comparaison avec des sujets sains; les travaux de cette équipe montrent que l'IL-6 peut également médier la pathogenèse de l'IgAN chez des souris déficientes en CD37 (Rops et al., 2018).

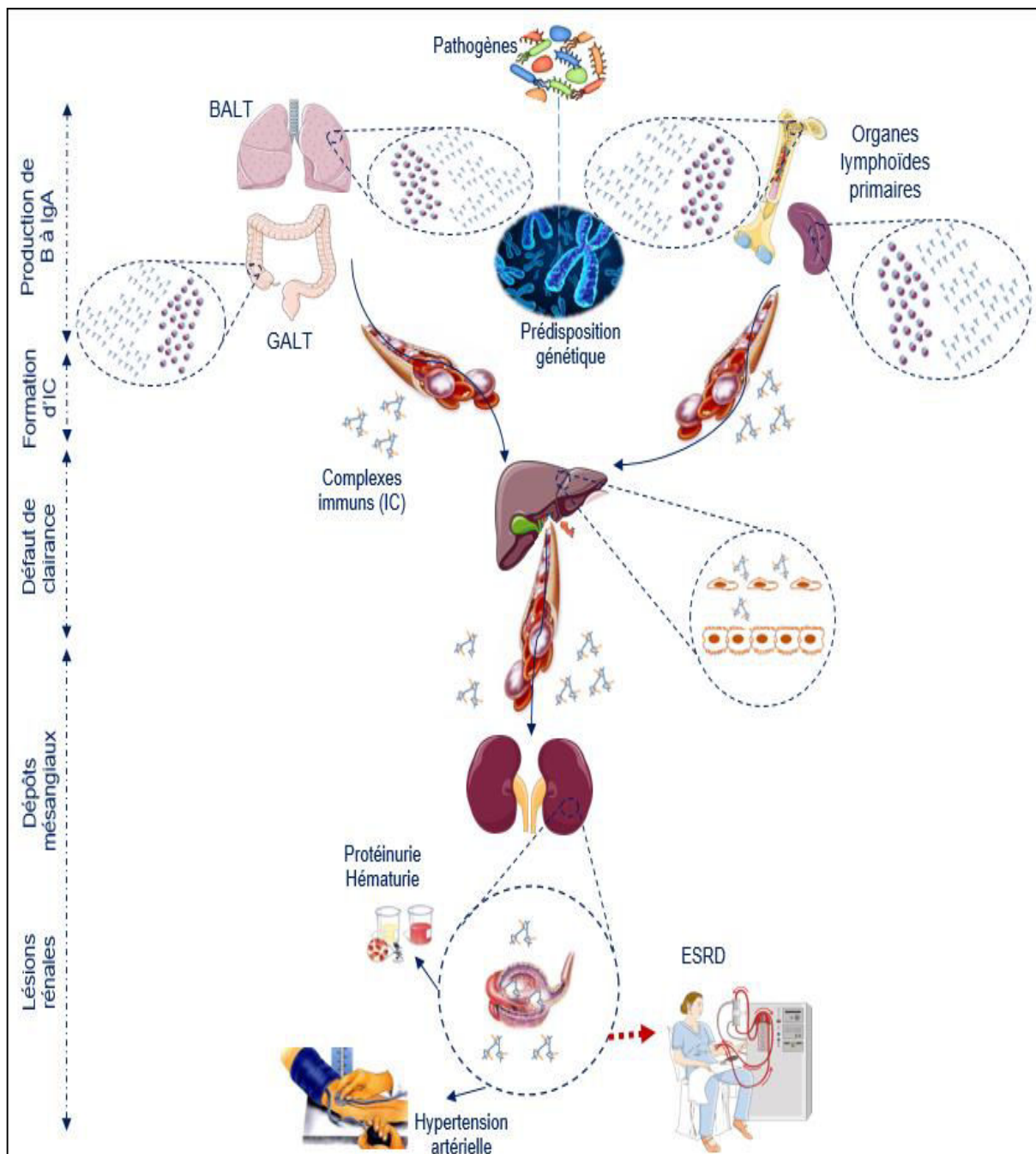


Figure 24 : Physiopathologie de l'IgAN

La pathogenèse de l'IgAN implique potentiellement une altération de la production d'IgA, la formation de complexes immuns, le défaut de clairance des IgA, leurs dépôts au niveau mésangial et l'induction de lésions rénales

Un autre modèle murin suggère l'implication d'une anomalie de production d'IgA au niveau des centres germinatifs. Les animaux déficients en FDC-SP, une protéine suppressive de la production d'IgA et sécrétée par les FDC présentent une augmentation des taux d'IgA du lavage intestinal et du sérum.

Ceci résulte de l'accumulation des cellules B à IgA au niveau du sang, de la moelle, des plaques de Peyer et des ganglions lymphoïdes. Les dépôts d'IgA accompagnés d'une protéinurie se développent à partir de l'âge de 6 mois (Hou et al., 2014).

Un modèle moins récent évoque l'intervention de l'utéroglobuline, une protéine connue pour ses propriétés immunomodulatrices ; les souris invalidées pour l'utéroglobuline ont des dépôts mésangiaux de complexes immuns IgA-fibronectine et de C3. Des signes d'atteinte rénale et d'hématurie microscopique ont été décrits. L'injection d'utéroglobuline aboutit à la formation d'hétérodimères avec la fibronectine et prévient ainsi la formation et le dépôt des complexes immuns (Zheng et al., 1999).

Le rôle de CD89 (FcaRI) a été étudié ; plusieurs modèles murins exprimant le CD89 humain ont été développés.

Un premier modèle exprime le CD89 humain sous la dépendance de ses propres promoteurs et régulateurs à la surface des cellules de la lignée myéloïde (van Egmond et al., 1999). Nous avons utilisé ce modèle au cours de notre étude (voir article 1).

Le second modèle exprime le CD89 à la surface des monocytes et des macrophages (sous le contrôle du promoteur de CD14). Des complexes IgA-CD89 sont détectés dans la circulation

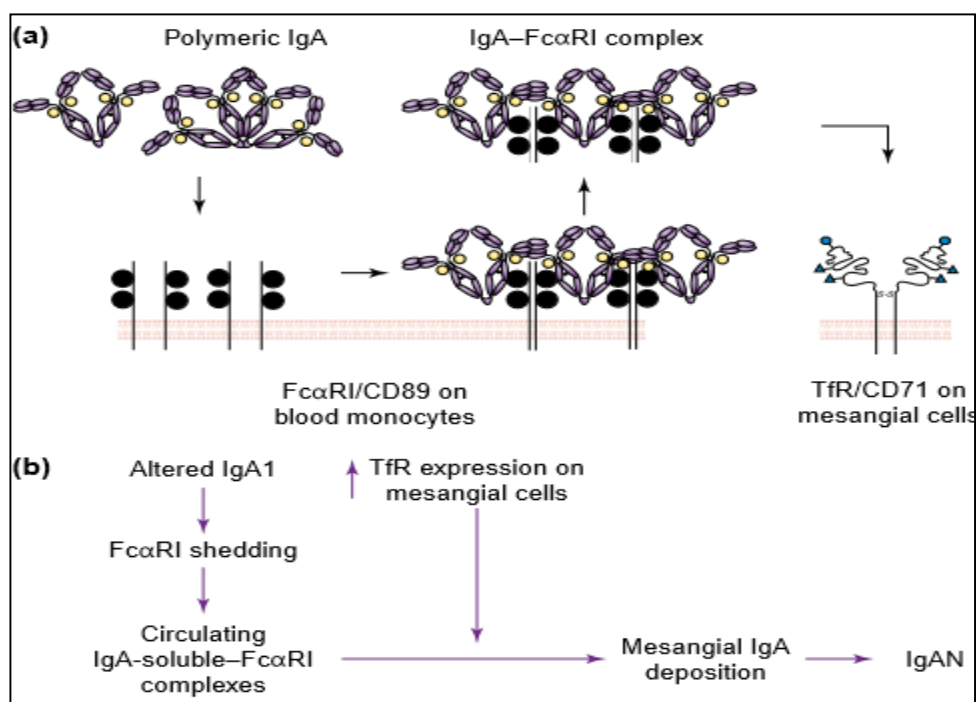


Figure 25: Modèle hypothétique de clivage du CD89

Clivage du CD89 (FcaRI) suite à la fixation de l'IgA polymérique conduisant à la formation et le dépôt de complexes IgA-FcaRI par fixation au récepteur à la transferrine (TfR/CD71) exprimé par les cellules mésangiales (a). Séquence d'événements proposés pour expliquer la pathogenèse d'IgAN (b) (Extraite de Monteiro et al. 2002)

et les souris montrent des dépôts spontanés d'IgA ainsi que des signes de protéinurie et d'hématurie (Launay et al., 2000) (Figure 25).

Le troisième modèle a été récemment généré par soumission du gène codant le CD89 humain au contrôle du promoteur du gène de CD14 murin. Les souris ne présentent pas de dépôts de complexes IgA-CD89 qui circulent en quantités très faibles en conséquence d'une clairance hépatique accrue grâce aux cellules de kuppfer (Xu et al., 2016).

Dans notre laboratoire, un modèle murin exprimant la chaîne lourde de l'IgA1 humaine (hIgA) et mimant la situation physiologique chez l'homme a été mis en place (Duchez et al., 2010). Les hIgA1 présentent un dépôt mésangial spontané chez tous les animaux. Jusqu'à 12 mois, les souris ne présentent aucun signe de lésion rénale avec une absence de protéinurie et d'hématurie. Ce modèle a pu approcher l'asymptomatologie des dépôts d'IgA chez 2 à 16% d'individus ayant des dépôts. D'une façon intéressante, ce modèle confirme que le dépôt des IgA ne dépend ni de leur degré de polymérisation ni de leur profil de glycosylation mais plutôt de leurs propriétés physico-chimiques et de la structure de leurs domaines variables (Oruc et al., 2016). Ces observations ont été confirmées au cours de nos travaux (voir articles 1 et 2).

Ce modèle humanisé a permis l'évolution vers une altération fonctionnelle des reins avec protéinurie et hématurie après croisement avec des souris exprimant le CD89 murin cité plus haut (Berthelot et al., 2012).

II.1.4.2. Défaut de glycosylation

La glycosylation des IgA peut influencer leur conformation, leur stabilité ainsi que leur clairance par l'organisme (Rifai et al., 2000).

En 1990, une étude a démontré que les IgA circulantes des patients à IgAN sont anormales et qu'elles présentent éventuellement un défaut de glycosylation (Andre et al., 1990) (Figure 26).

Des études ultérieures confirment cette hypothèse suite à la détection de molécules d'IgA1 circulantes déficientes en galactose et nommées Gd-IgA (Galactose-deficient IgA).

En 2008, une équipe montre que les IgA produites à partir de plasmocytes immortalisés des patients à IgAN sont polymériques et caractérisées par l'exposition des résidus GalNac au niveau de la région charnière (Suzuki et al., 2008). Ces IgA hypoglycosylées ont tendance à s'aggréger et à se lier aux cellules mésangiales.

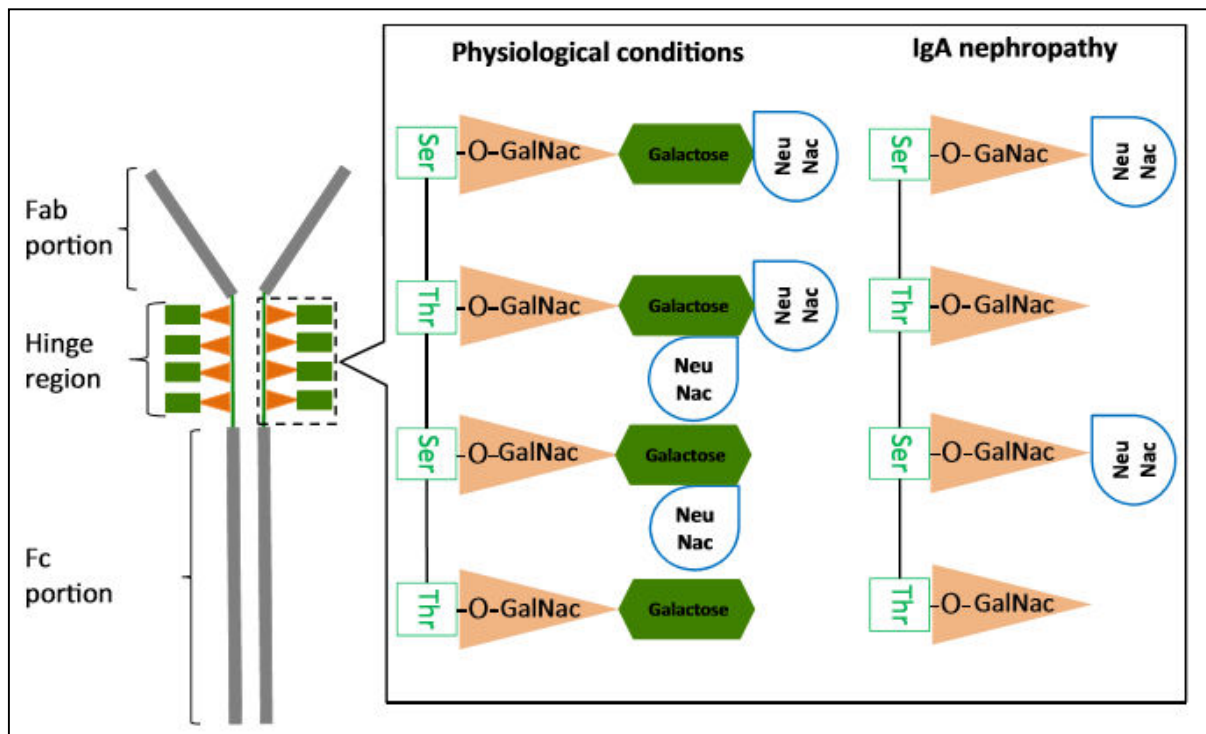


Figure 26: Profil de galactosylation des IgA1 chez les patients à IgAN

Dans les conditions physiologiques, les résidus sérine (Ser) et thréonine (Thr) sont normalement glycosylés. Dans le cas d'IgAN, un défaut de fixation de galactose ou de l'acide N-acétylneuraminique (NeuNac) pourrait avoir lieu (Extrainte de Robert et al. 2015)

Même si la présence d'une région charnière courte au niveau des IgA de souris constitue un facteur limitant pour l'étude du défaut de glycosylation et de son influence sur l'évolution de la maladie chez les modèles murins, ceux-ci permettent d'en explorer certains aspects.

En effet, l'inactivation de l'enzyme β -1,4 galactosyltransférase T1 (β -1,4GalT1) chez des souris implique l'absence complète de galactosylation et de sialylation chez ces animaux. Les taux d'IgA circulantes sont augmentés avec prédominance de la forme polymérique et le développement de protéinurie et d'hématurie (Nishie et al., 2007).

L'association des niveaux d'expression des enzymes de glycosylation avec l'IgAN a été récemment étudiée ; il s'avère que l'augmentation des taux des micro-ARN : miR-148b et let-7b joue un rôle puissant dans la diminution de l'expression des gènes codant pour certaines galactosyltransférases (Fabiano et al., 2016; Serino et al., 2015).

Il a été montré que les souris ddY ayant l'allotype d'IgA le moins glycosylé développent plus rapidement une insuffisance rénale qui entraîne leur décès en comparaison avec les souris ayant l'allotype plus glycosylé (Okazaki et al., 2012).

Une autre hypothèse porte sur le défaut de clairance des Gd-IgA ; l'hypoglycosylation masque potentiellement les sites de fixation des Gd-IgA à leurs récepteurs hépatiques et compromet

leur catabolisme ce qui explique l'augmentation des taux circulants d'IgA dans le cas d'IgAN (Mestecky et al., 2013). Par contre, une étude moins récente affirme que les sites de O-glycosylation au niveau de la région charnière des IgA1 ne sont pas impliqués dans la clairance des IgA1 ; la clairance des molécules d'IgA1 dont la région charnière a été délétée est significativement plus rapide que celle des IgA1 normales (Rifai et al., 2000). L'hypogalactosylation semble spécifique des IgA1 dans la mesure où elle n'affecte pas d'autres protéines sériques fortement glycosylées telles que l'IgD (Smith et al., 2006). Plusieurs observations montrent que le seul défaut de glycosylation ne peut être à l'origine de la pathogenèse d'IgAN : des concentrations élevées de Gd-IgA ont été détectées chez des patients présentant une IgAN asymptomatique (Gharavi et al., 2008) ; les taux plasmatiques de Gd-IgA présentent une énorme variabilité entre les patients atteints d'IgAN présentant des tableaux cliniques variés (Yanagawa et al., 2014) ; la capacité de dépôt des IgA chimériques humaines injectées à des souris nudes n'est pas liée à leur état de glycosylation (Oruc et al., 2016).

Enfin nos travaux montrent que la déglycosylation des IgA de patients n'affecte pas leur profil de dépôts chez la souris (voir article 2).

II.1.4.3. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans la pathogenèse de l'IgAN. Ceci a été mis en évidence par de nombreuses études. L'environnement peut d'ailleurs influencer les différentes étapes du développement de la maladie, dès la production d'IgA jusqu'à son dépôt au niveau mésangial.

II.1.4.4. Rôle de la stimulation antigénique

Les germes de l'environnement jouent un rôle potentiel dans le développement de l'IgAN. Dans le modèle $\alpha 1KI$, notre équipe a montré que la stimulation antigénique a un effet promoteur sur l'intensité des dépôts d'IgA au niveau des glomérules ; le passage des souris d'une zone aseptique à une zone de stimulation immunitaire conventionnelle a pour conséquence une augmentation du degré de polymérisation des IgA aussi bien que d'une modification du degré de glycosylation (Oruc et al., 2016).

L'hypoglycosylation des IgA produites *in vitro* suite à une stimulation par des antigènes issus de *Helibacter pylori* était due à une diminution de l'expression d'une galactosyltransférase (Yang et al., 2014). Le facteur majeur de virulence de cette bactérie a été retrouvé au niveau des tubules de patients à IgAN (Zhu et al., 2016).

Ainsi, des bactéries de la famille de streptocoques et de staphylocoques sont aussi suspectées être responsables des glomérulonéphrites post-infectieuses (Stratta et al., 2014). Leurs

antigènes ont été trouvés au niveau du mésangium rénal chez des sujets ayant l'IgAN (Schmitt et al., 2010).

II.1.4.5. Rôle du microbiote

Des études récentes montrent une différence de la composition de la flore commensale du microbiote lors de l'IgAN. La diversité du microbiote est moindre chez les patients ayant l'IgAN en comparaison avec celle des sujets sains où certaines espèces bactériennes se voient considérablement diminuées. Deux études ont montré que le microbiote présent au niveau de la salive et des fèces des patients est différent de celui des témoins (De Angelis et al., 2014; Piccolo et al., 2015).

II.1.4.6. Rôle des antigènes alimentaires

Les antigènes alimentaires sont mis en cause dans le développement de l'IgAN. La gliadine du gluten ainsi que l'ovalbumine figurent parmi les molécules principalement suspectées (Coppo et al., 1992; Sategna-Guidetti et al., 1992) (Figure 27).

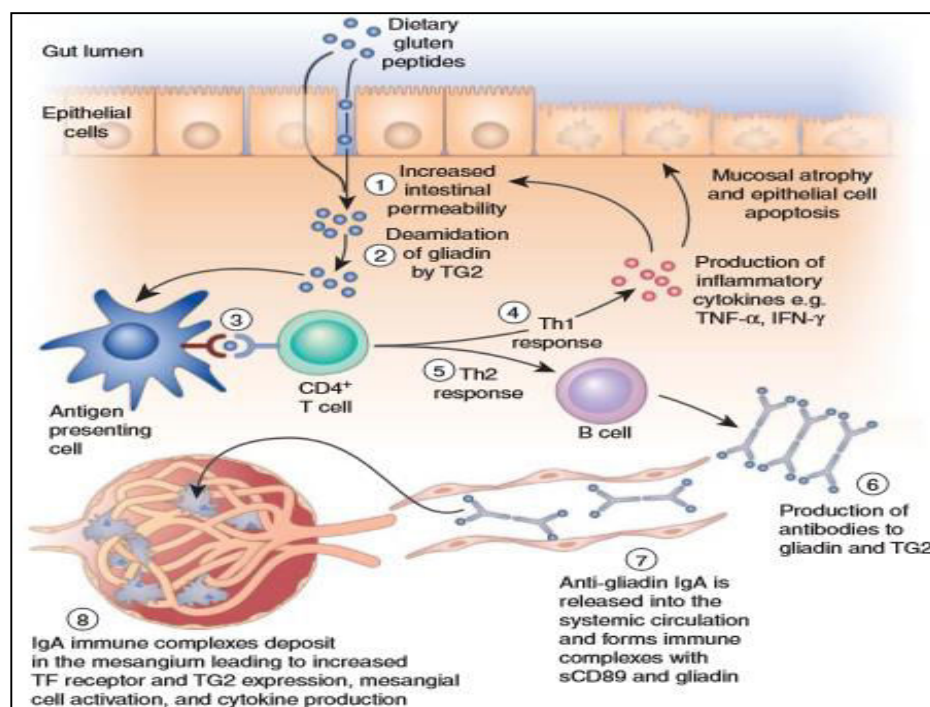


Figure 27: Implication potentielle des antigènes alimentaires dans l'IgAN

Le dépôt mésangial de complexes immuns à IgA produites par les cellules B en réponse à des antigènes alimentaires pourraient activer les cellules mésangiales et induire des lésions rénales. TG2 : Transglutaminase 2, TF : Transferrine (Adaptée de Cheung et Baratt 2015)

L'immunisation par voie orale des souris à l'aide de molécules de gliadine ou d'ovalbumine induit l'augmentation du nombre de cellules plasmocytaires à IgA au niveau des muqueuses bronchiques et digestives ; l'apparition d'IgA circulantes complexées aux fragments antigéniques et leur dépôt au niveau mésangial ont été notés (Emancipator, 1983; Emancipator et al., 1992).

Egalement, une étude rapporte qu'un régime gluten-free pendant 6 mois diminue la protéinurie et l'hématurie chez des patients ayant l'IgAN (Coppo et al., 1990).

II.1.4.7. Predisposition génétique

Depuis la description de la néphropathie à IgA, l'idée d'un terrain génétique avait été évoquée. La grande disparité d'incidence d'IgAN selon les origines ethniques et les régions géographiques en est une preuve (Cheung and Barratt, 2016).

La plupart des cas de l'IgAN sont sporadiques, les formes familiales n'atteignent pas plus que 5% des cas totaux (Mestecky et al., 2013).

Actuellement, les outils développés de la génétique ont permis de confirmer l'existence d'une transmission héréditaire autosomale dominante. Une étude récente a permis de rapporter l'une des formes familiales les plus larges d'IgAN chez une famille libanaise (Karnib et al., 2007).

Une centaine d'études du génome global appelée GWAS (Genome Wide Association study) a été déjà menée chez des patients à IgAN ainsi que chez des individus sains. Les résultats mettent en évidence le polymorphisme de certains gènes impliqués dans les fonctions immunitaires (les gènes codant les TLR, pIgR, TGF- β ...) ainsi que dans la glycosylation des protéines. Les GWAS montrent aussi que l'expression de certains variants alléliques à risque est fortement associée aux données épidémiologiques de la maladie. Ces études lient la susceptibilité d'expression de certains variants alléliques au niveau des loci codant le CMH (impliqué dans des voies d'apprêtement et de présentation antigénique), les facteurs de survie et de différenciation des cellules B tels que BAFF et APRIL en plus de certains composants du complément à la pathogenèse de l'IgAN (Kiryuk et al., 2014). Cependant, aucune étude n'a rapporté la corrélation de gènes liés à la glycosylation à l'incidence de la maladie.

Le fait que l'IgAN soit une pathologie multifactorielle dont les manifestations et l'évolution sont fortement hétérogènes limitent d'une manière considérable l'efficacité de ces études.

II.2. Evolution de la lésion rénale

La fonction primordiale du rein est la filtration et l'épuration du plasma sanguin. Le rein humain est constitué en moyenne de 1.3 million néphrons constituant l'unité fonctionnelle de cet

organe. Chaque néphron est formé du glomérule qui constitue le filtre où se forme l'urine primitive, d'un tubule contourné proximal et puis d'un tubule contourné distal (Figure 28). Toute altération de la fonction rénale peut aboutir à une insuffisance aiguë ou chronique pouvant avoir des conséquences systémiques graves. Elle peut ainsi conduire à la dialyse en cas d'insuffisance rénale terminale.

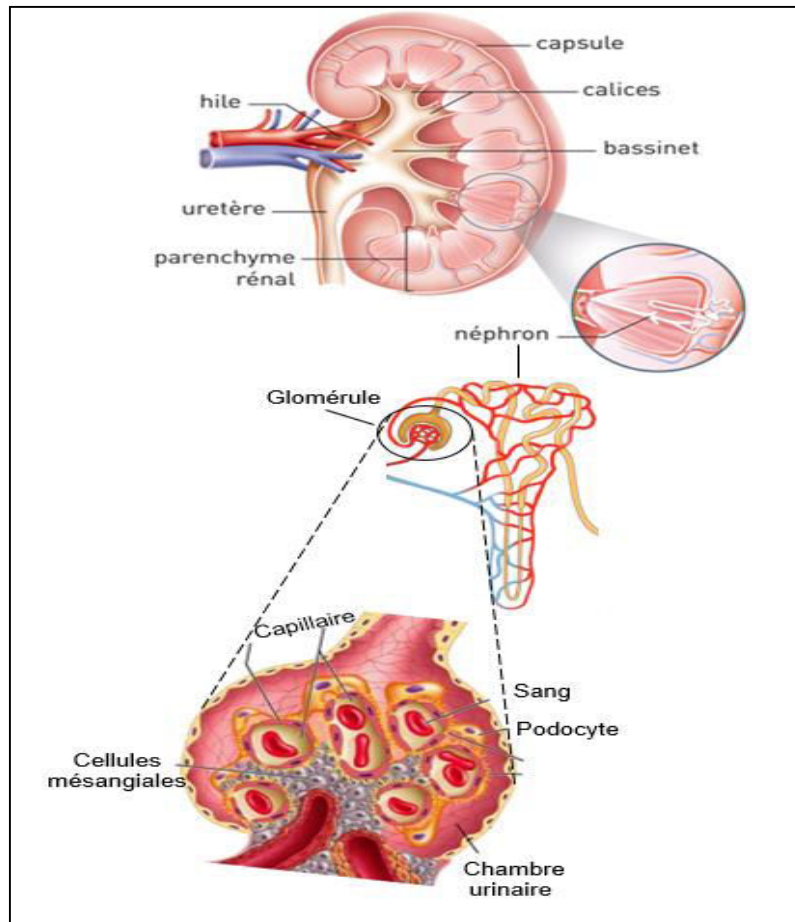


Figure 28: Structure du rein

Représentation schématique d'une coupe longitudinale d'un rein, de l'unité fonctionnelle de filtration ou le néphron ainsi que d'un glomérule rénal (Adaptée de Servier; Benjamin Cummings, Addison Wesley Longman, Inc.)

Le dépôt de complexes immuns contenant les IgA au niveau du mésangium rénal joue un rôle critique dans la pathogenèse de l'IgAN. Les complexes de très haut poids moléculaire (>800 kDa) sont essentiellement ceux qui sont à l'origine de l'induction des lésions (Fabiano et al., 2016).

Les molécules d'IgA polymérisées et les complexes IgA1-IgG, IgA1-IgM ou même IgA1-CD89 peuvent se lier aux récepteurs exprimés à la surface des cellules mésangiales et notamment au récepteur de la transferrine CD71 ou TfR1. L'internalisation de ces complexes stimule une boucle d'activation ou de rétrocontrôle positif, qui à son tour, induit une plus forte expression

du récepteur CD71 et par la suite une liaison accrue des complexes à IgA1 (Fabiano et al., 2016).

En plus, l'interaction des complexes IgA-CD89 avec le CD71 induit l'expression de la transglutaminase 2 (TGase2) à la surface des cellules mésangiales ce qui stimule la surexpression du CD71 à leur surface (Berthelot et al., 2012).

Les cellules mésangiales activées prolifèrent et produisent des cytokines, des chimiokines et des protéines de la matrice extracellulaire (Mestecky et al., 2013). La production des cytokines IL-6 et IL-8 par les cellules mésangiales est activée par la voie PI3K/AKT ainsi que par la voie MAPK/ERK (Fabiano et al., 2016). Les facteurs humoraux tels que le TNF- α , le TGF- β et le PDGF sont aussi libérés par les cellules du mésangium (Fabiano et al., 2016).

Le système du complément intervient à ce niveau: des dépôts mésangiaux de MBL (Mannose-Binding Lectin) sont observés dans 17 à 25% des cas de néphropathie à IgA (Maillard et al., 2015).

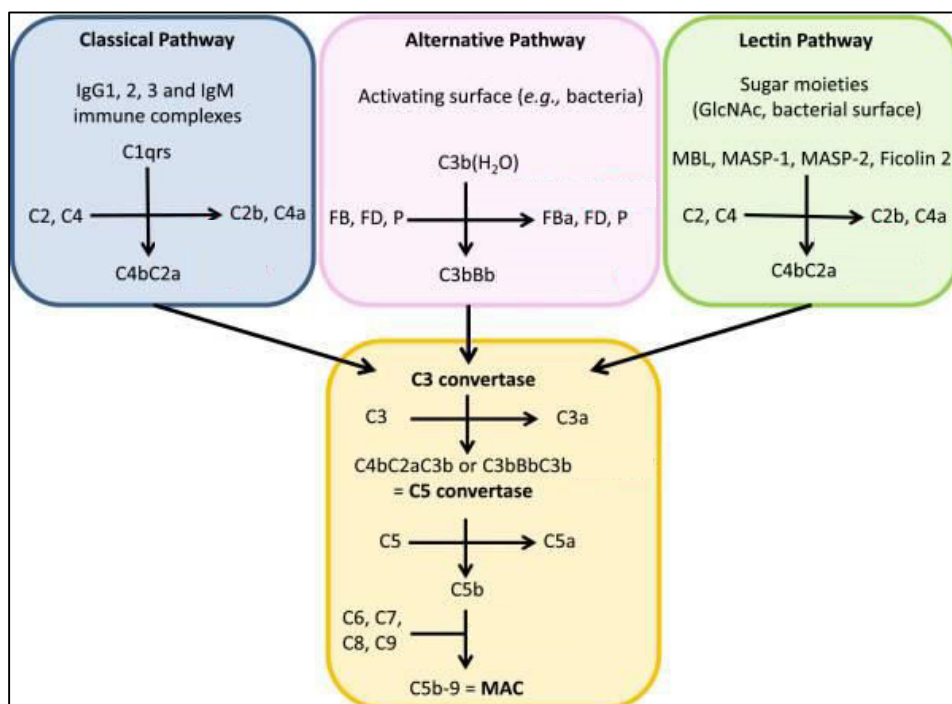


Figure 29: Représentation schématique des voies d'activation du complément

Chacune des 3 voies du complément conduit à la génération d'une C5 convertase et par la suite à la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) (Adaptée de Maillard et al. 2015)

Le composant C3 du complément est détecté dans les glomérules de > 90% des patients à IgAN (Fabiano et al., 2016). Récemment, une étude montre la capacité des cellules mésangiales à synthétiser le composant C3 après stimulation par des IgA complexées (Schmitt et al., 2014).

L'interaction des IgA déposées avec les composants du complément active principalement la voie alterne et la voie des lectines (Maillard et al., 2015; Roos et al., 2001) (Figure 29).

Les IgA polymériques sont nécessaires pour induire la voie alterne dont le mécanisme d'activation au niveau rénal reste mal élucidé. Ces IgA sont aussi capables d'activer la voie des lectines via leurs résidus N-glycanes. Cette activation conduit à la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM) C5b-C9 qui s'insère au niveau de la bicouche lipidique des cellules : il peut soit provoquer le stress cellulaire et une réaction pro-inflammatoire plus accrue, soit entraîner la lyse osmotique de certaines cellules (Fabiano et al., 2016). Il a été démontré que le CAM pouvait induire la production d'IL-10 et de TGF- β et la synthèse de fibronectine par les cellules mésangiales et éventuellement induire leur apoptose (Qiu et al., 2014). Par ailleurs, le CAM peut stimuler la libération de certaines protéases, cytokines et autres composants de la matrice extracellulaire par les podocytes ce qui induit l'altération de la fonction glomérulaire, l'apoptose cellulaire et des lésions glomérulaires importantes (Nangaku et al., 2005).

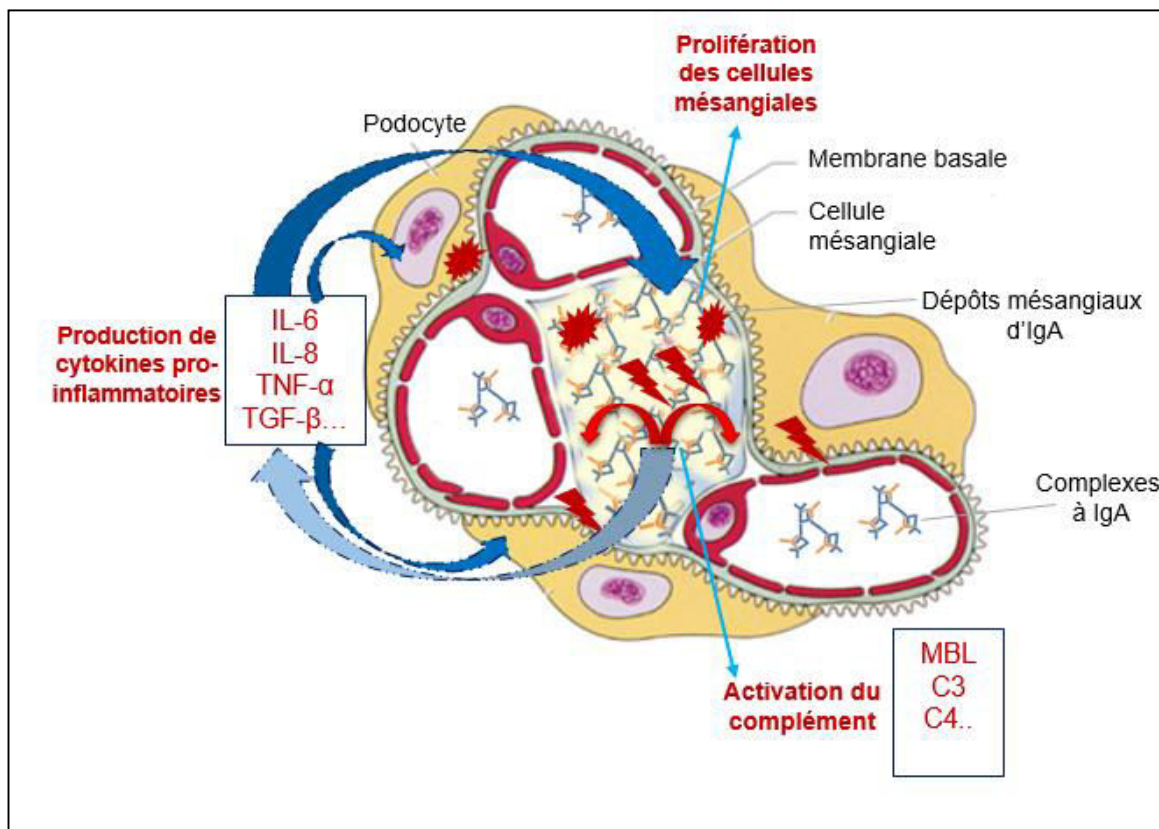


Figure 30: Mécanisme d'induction des lésions glomérulaires au cours de l'IgAN

Le dépôt mésangial des complexes immuns chez les patients à IgAN active le système du complément et la production de cytokines pro-inflammatoires et induit la fibrose rénale. Ceci résulte en des lésions cellulaires graves conduisant à un dysfonctionnement rénal progressif

L'infiltration des cellules inflammatoires dans le compartiment tubulo-interstitiel active la cascade inflammatoire et conduit à l'altération de l'expression génique des podocytes ainsi qu'à l'augmentation de la perméabilité glomérulaire ; ces lésions pourraient expliquer l'observation d'épisodes d'hématurie et de protéinurie chez les patients ayant une IgAN (Mestecky et al., 2013) (Figures 30 et 31).

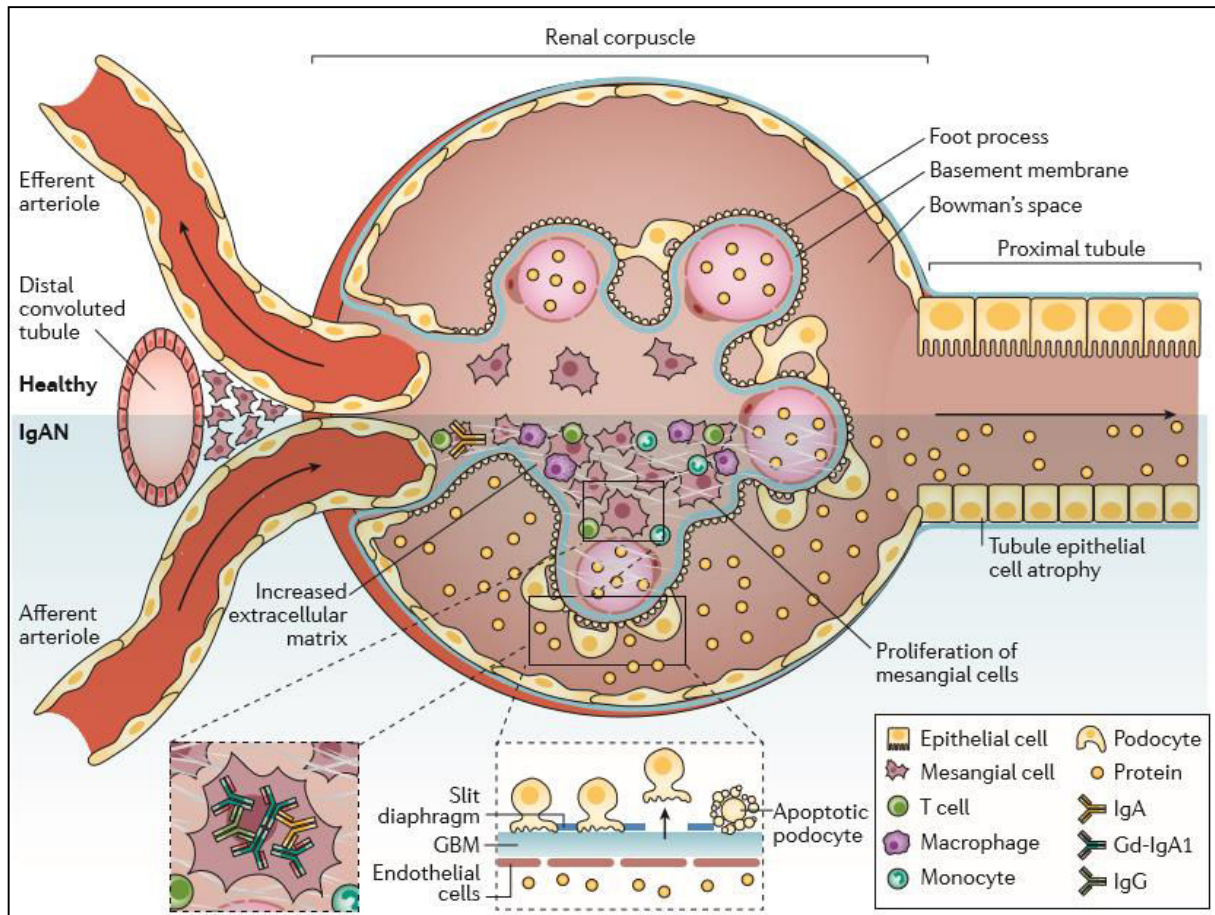


Figure 31: Glomérule normal et glomérule pathologique

Chez un individu sain, la filtration plasmatique a lieu de façon normale. La barrière formée par les podocytes empêche le passage des protéines dans l'urine primitive. Dans le cas d'IgAN, le dépôt des complexes immuns induit la prolifération des cellules mésangiales, l'augmentation de la synthèse de la matrice extracellulaire, l'infiltration des cellules inflammatoires et l'apoptose des podocytes. GBM: glomerular basement membrane (Extraite de Lai et al. 2016)

Objectifs

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans la continuité des études déjà initiées au laboratoire au sein de l'unité CNRS 7276. Les résultats des travaux menés par l'équipe IgA et publiés en 2016 dans « Journal of the American Society of Nephrology (JASN) » montrent le dépôt spontané des IgA1 chimériques au niveau du mésangium glomérulaire des souris $\alpha 1\text{KI}$ (Duchez et al., 2010) ou autrement dites $\text{h}\alpha 1^{+/+}$. Ces dépôts ne sont pas néphritogènes et aucun signe d'atteinte rénale n'a été observé. La structure des IgA1 et l'intensité des dépôts mésangiaux semblent fortement corrélées à la stimulation immunitaire des souris en fonction des différentes zones d'hébergement. Cette étude a mis en cause la région variable de l'IgA1 dont l'affinité pourrait avoir un effet sur sa capacité à déposer.

Pendant trois ans, mes travaux de recherche portaient sur **trois axes principaux** :

- I- L'étude des effets pathogènes de l'immunoglobuline A
- II- L'étude des propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoire de l'IgA dans un modèle d'auto-immunité
- III- La caractérisation du modèle murin $\alpha 2\text{KI}$ produisant l'IgA2 humaine

I- Premier axe :

Deux études ont été menées :

- **Première étude : Evaluation des propriétés pathogènes des IgA**

Les propriétés pathogènes des IgA et leur capacité à se déposer au niveau mésangial ont été évaluées dans différentes conditions :

- La production d'IgA1 a été boostée par l'induction de colite expérimentale (aiguë et chronique) chez des souris $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ par administration orale de dextrane sodium sulfate (DSS), un polysaccharide entérotoxique utilisé fréquemment pour l'induction de colite expérimentale chez l'animal. L'effet de la réponse inflammatoire sur les taux circulants d'IgA1 ainsi que sur leur capacité à se déposer au niveau mésangial et d'induire des lésions rénales a été analysé; cette analyse rentre aussi dans le cadre de l'étude du cross-talk muqueuse-rein dans le contexte de néphropathie à IgA.

- L'effet de la substitution de la chaîne légère murine par une chaîne kappa humaine a été évaluée. Ceci a été réalisé par croisement des souris $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ avec des souris KIKS (Bonaud et al., 2015). L'analyse de l'effet de cette substitution sur le dépôt mésangial des IgA a été faite chez les animaux doubles homozygotes $\text{h}\alpha 1^{+/+}\text{KS}^{+/+}$ pendant 12 mois.

- Un deuxième modèle murin co-exprimant les IgA et leur récepteur le CD89 humain (van Egmond et al., 1999) a été généré ; l'expression du CD89 est soumise à la régulation de ses propres promoteurs et séquences régulatrices. L'effet de cette co-expression sur l'atteinte rénale a été également étudié chez les doubles homozygotes $ha1^{+/+}CD89^{+/+}$ et ceci lors d'un suivi pendant 12 mois.

- L'implication de la région variable de l'IgA1 dans la pathogenèse de l'IgAN a été étudiée ; deux modèles murins déficients pour le processus de maturation des anticorps et donc restreints à la production d'IgA1 humaine de faible affinité ont été générés à cet égard :

1- Le premier modèle $ha1^{+/+}CD3\epsilon^{-/-}$ exprime des IgA humaines et présente un déficit des lymphocytes T suite au knock-out de la sous-unité epsilon du TCR (Malissen et al., 1995). Suite à l'immunodépression de ces souris qui étaient hébergées en zone conventionnelle de l'animalerie et par conséquent, leur courte durée de vie, les travaux sur ce modèle ne semblaient pas exploitables et du coup ils ont été interrompus en attente de leur décontamination.

2- Le deuxième modèle présente une déficience en AID (Wei et al., 2011), l'enzyme responsable de la maturation d'affinité des immunoglobulines : $ha1^{+/+} AID^{-/-}$. Ces souris produisent exclusivement de l'IgA humaine naturelle de faible affinité (sans pourtant la mise en évidence d'aucune propriété auto-immune) et présentent des dépôts mésangiaux importants d'IgA associés à des lésions rénales. L'effet de dépôts de ces IgA naturelles sur les fonctions rénales a été analysé à différents âges jusqu'à 48 semaines ; le transcriptome glomérulaire a quant à lui été analysé à 24 semaines.

Le suivi des animaux a été fait dans deux zones différentes de l'animalerie : dans la zone conventionnelle où les souris sont en contact avec des germes pathogènes endémiques stimulant leur système immunitaire et dans la zone propre (EOPS : exempte de tout pathogène opportuniste spécifique) afin de comparer l'effet de la stimulation antigénique sur l'évolution des lésions.

Les taux plasmatiques d'IgA humaine et des autres isotypes murins, le degré de polymérisation et le taux de glycosylation des IgA humaines circulantes, l'intensité de dépôts mésangiaux d'IgA, les paramètres biochimiques de la fonction rénale (protéinurie, créatininémie, hématurie) ainsi que l'histologie rénale ont été analysés chez tous les modèles à 6, 12, 24 et 48 semaines d'âge.

Cette première étude fera l'objet d'une première publication, actuellement soumise au « Journal of Clinical Investigation (JCI) » (Article 1).

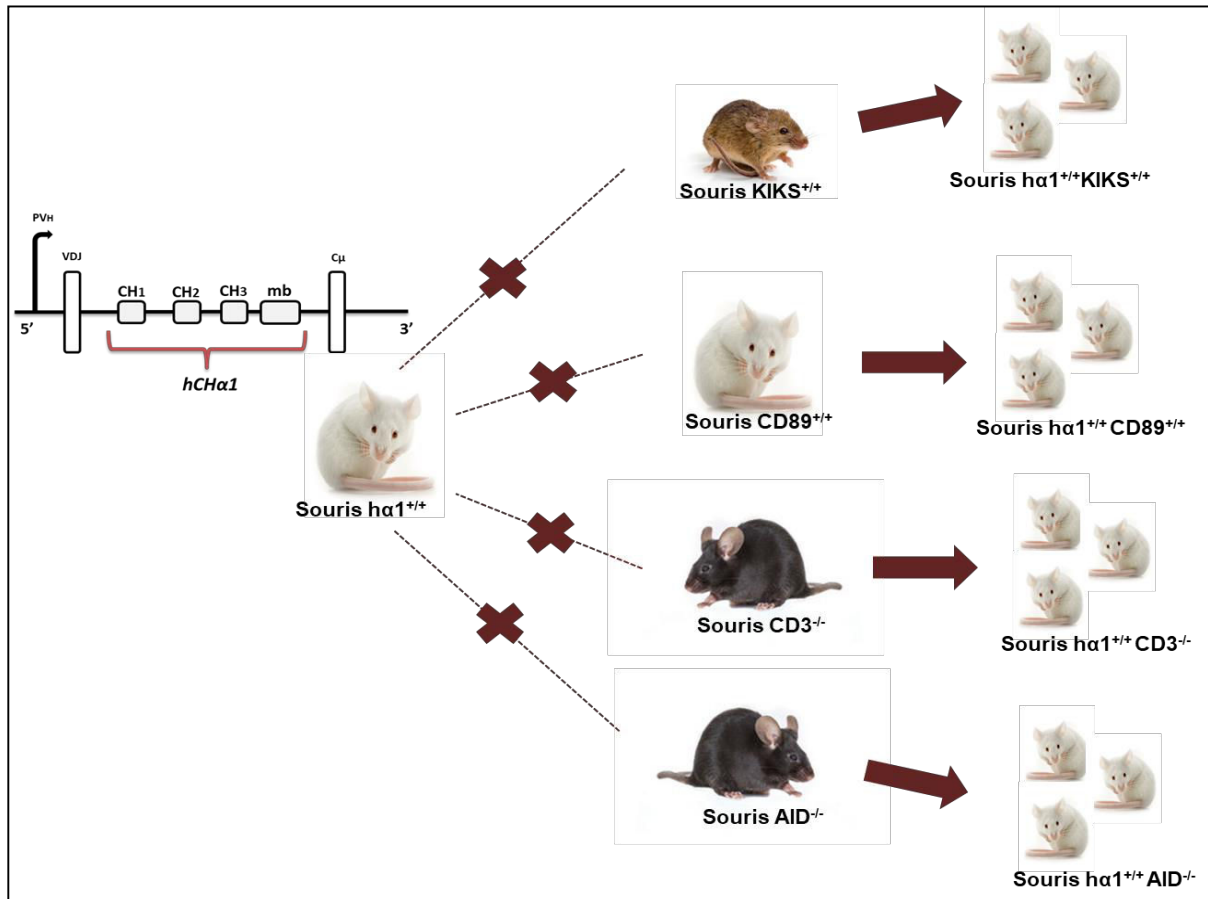


Figure 32: Croisement des différents modèles de souris

- **Deuxième étude : Analyse des caractéristiques immunologiques et physico-chimiques.**

Nous avons disposé de 28 IgA monoclonales purifiées à partir du sérum de patients présentant une dysglobulinémie monoclonale IgA et pour certains ayant bénéficié d'une biopsie rénale, de 12 anticorps monoclonaux IgA humanisées fournis par H Mouquet (Institut Pasteur) et de 16 anticorps monoclonaux d'IgA chimérique produits par des hybridomes issus de souris h α 1^{+/+} (B Cell Design).

Ces IgA ont été injectés *i.v.* à des souris nues ; leur adhésion au mésangium a été mise en évidence par immunofluorescence. Secondairement, leurs propriétés physico-chimiques et immunologiques ont été étudiées et des données préliminaires ont été obtenues (Article 2 en préparation).

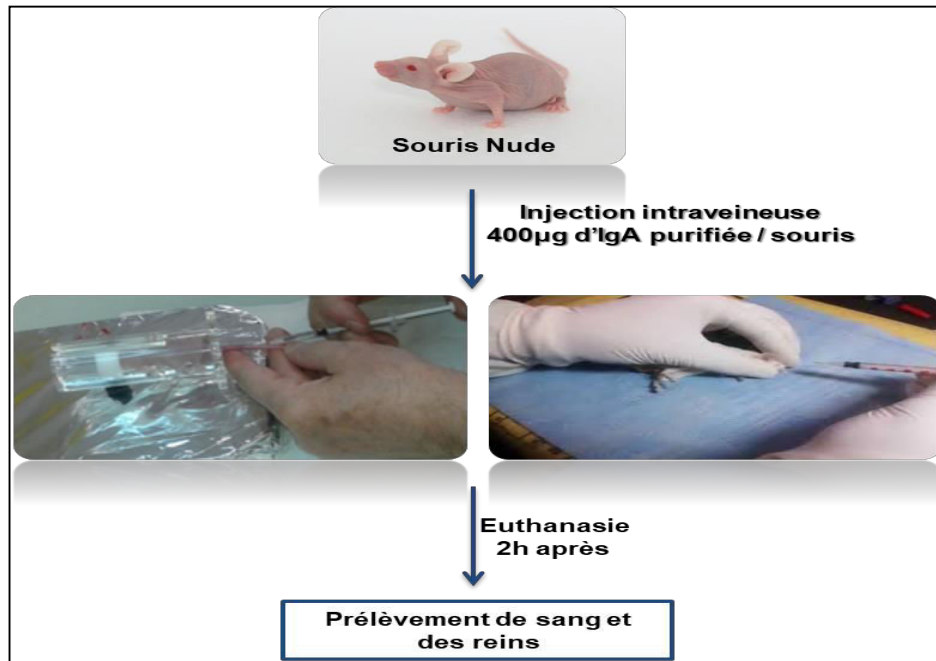


Figure 33: Injection des IgA aux souris nues

II- Deuxième axe : Propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices des IgA humaines

L'expression de l'IgA1 a été induite dans un modèle de souris lupiques MRL/lpr déficientes pour le récepteur Fas ($Fas^{-/-}$) et qui développent des lymphadénopathies ainsi qu'une auto-immunité systémique et meurent au bout de 5 à 6 mois.

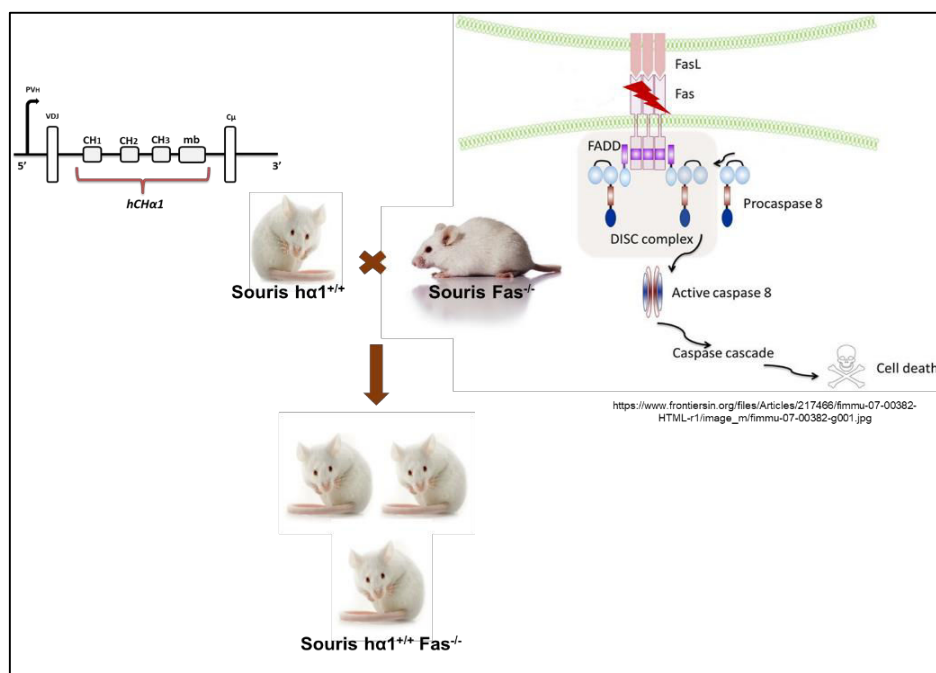


Figure 34: Génération des souris $h\alpha 1^{+/-} Fas^{-/-}$

Chez les animaux doubles homozygotes générés : $h\alpha 1^{+/+}$ $Fas^{-/-}$, les conséquences de l'expression forcée d'IgA humaine ont été évaluées sur la survie, la réponse inflammatoire, l'auto-immunité systémique et finalement sur les fonctions rénales.

Les travaux sont encore en cours et vont faire l'objet d'un troisième article en préparation (Article 3).

III- Troisième axe : Caractérisation d'un modèle transgénique appelé $\alpha 2KI$

Nous avons contribué à l'étude des conséquences de la substitution de la région switch μ (S_{μ}) par la région constante $\alpha 2$ humaine (modèle $\alpha 2KI$). L'effet du remplacement de la région S_{μ} murine par l'IgA2 humaine sur la signalisation du BCR ainsi que sur le développement des cellules B a été évalué. Ce travail fera aussi l'objet d'une publication en préparation (Article 4).

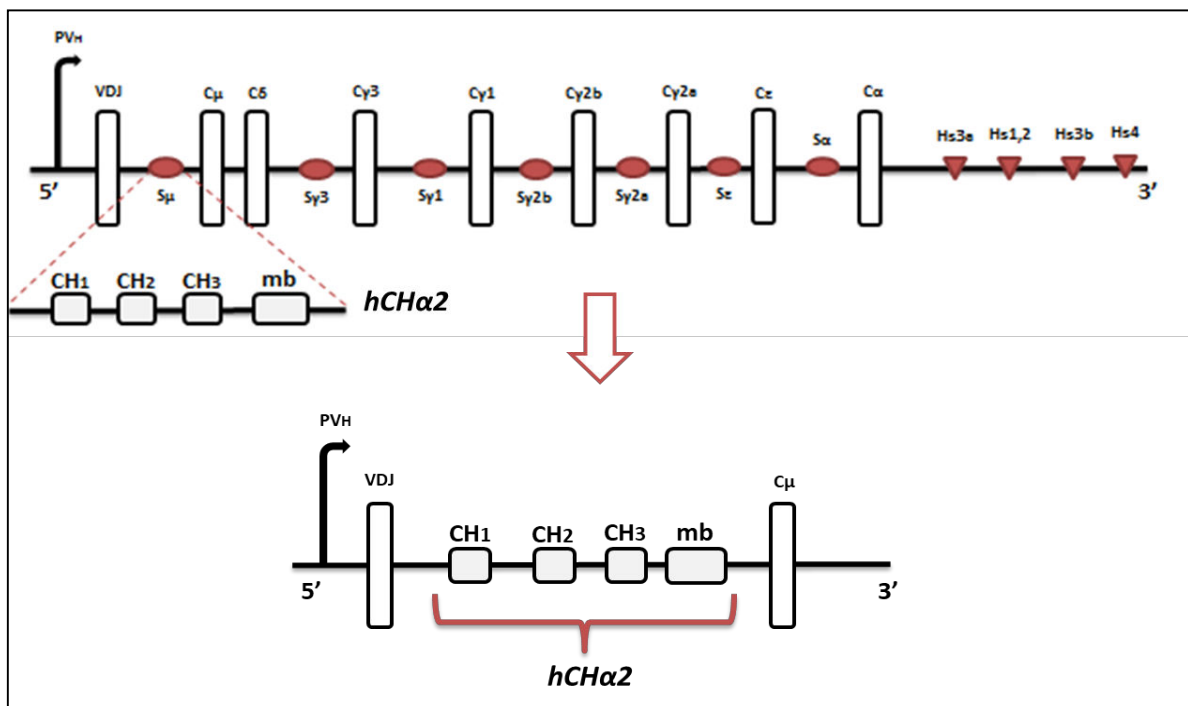


Figure 35: Construction du modèle $\alpha 2KI$

Publications

I.Article 1

Mesangial deposition most often involves IgA molecules lacking affinity maturation

Batoul Wehbi^{1,2}, Christelle Oblet¹, François Boyer¹, Arnaud Huard¹, Anne Druilhe¹, François Paraf³, Etienne Cogné⁴, Jeanne Moreau¹, Yolla El Makhour⁵, Bassam Badran², Michel Cogné¹ and Jean-Claude Aldigier¹

- 1- UMR CNRS 7276 INSERM 1262, Faculty of Medicine, Limoges University, France
- 2- Cancer Biology and Molecular Immunology laboratory, Faculty of Sciences I, Lebanese University, Lebanon
- 3- Anatomy-histopathology department, CHU Dupuytren, Limoges, France
- 4- Nephrology department, CHU Dupuytren, Limoges, France
- 5- Environmental Health Research Laboratory, Faculty of Sciences V, Lebanese University, Lebanon

*Huard's present affiliation: Faculty of Medicine, Goethe-University, Germany

Conflict of interest:

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Address correspondence to:

Pr. Jean-Claude Aldigier, UMR CNRS 7276, INSERM 1262, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges, France. Email: jean-claude.aldigier@unilim.fr; phone number: 33 (0) 519 564 274

Pr. Michel Cogné, UMR CNRS 7276, INSERM 1262, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges, France. Email: michel.cogne@unilim.fr; phone number: 33 (0) 519 564 200

Abstract:

IgA nephropathy (IgAN), the most common glomerulonephritis worldwide, is characterized by mesangial IgA deposition. Deposited IgA are polymeric and feature biochemical abnormalities. The main mechanism leading to IgA nephrotoxicity remains unclearly understood. Here we explored the effect of quantitative and qualitative variations in IgA deposition in a model of human IgA1-producing mice ($h\alpha 1^{+/+}$). Increased levels of human IgA induced by experimental colitis did not exacerbate IgA deposition. Furthermore, the hypothesis of mispaired heavy and light chains being responsible for the IgA deposition was excluded. CD89 receptor, expressed under its own regulatory sequences, forms circulating complexes with human IgA but complex formation did not lead to glomerular lesions in mice even after 48 weeks follow-up. Importantly, we demonstrated that in an $h\alpha 1^{+/+}$ model deficient for immunoglobulin affinity maturation, IgA deposition and complement activation notably implicate natural IgA antibodies lacking affinity maturation and lead to IgAN pathogenesis. We conclude that an affinity maturation defect can be a key event in IgA nephropathy pathogenesis

Introduction:

IgA nephropathy (IgAN) is characterized by IgA mesangial deposition with extracellular matrix production and is often accompanied by a mesangial proliferative glomerulonephritis. It is the most common pattern of primary glomerulonephritis in all countries where renal biopsy is widely practiced (1). It is implicit that not all IgA deposits possess equivalent pathogenic potential, as the glomerular landscape observed in different patients can vary along a broad spectrum from minimal or no lesions to severe sclerosis (2, 3). Furthermore, IgA deposition is not irreversible and can even disappear in grafted kidneys (4); thus IgA glomerular deposition and its mechanism remain a mystery.

IgA are unique immunoglobulins with great heterogeneity. Accordingly, various unconstant abnormalities of deposited IgA have been reported in IgAN: antigen or endogenous protein co-precipitation, negative electrostatic charges and altered patterns of IgA glycosylation with hinge region hypogalactosylation and increased exposition of N-acetylglycosamine (GalNac) resulting in production of anti-degalactosylated hinge autoantibodies (5). Many experimental models have been developed but none of them perfectly reproduces the disease (6). Several models suggest that IgA deposits may be related to abnormal regulation of IgA synthesis and consequently to their affinity maturation (7). We previously studied both polyclonal and monoclonal IgA in knock-in human constant $\alpha 1$ mice ($\alpha 1$ KI or $h\alpha 1^{+/+}$ mice) lacking mIgM expression but producing human IgA1 (8), and we recently showed that, in this model, deposition may be the result of an IgA primary structure abnormally associated with a “variable domain disease” and that, consequently, repertoire changes during immune response might modulate IgA deposition propensity (9). We now examined whether glomerular disease can be influenced by IgA quantitative and qualitative variations and altered affinity maturation. We found that V regions with quasi-germline sequences and no features of affinity maturation were more specifically involved in IgA deposition and glomerular disease.

Results:

hLC substitution in $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ mice does not affect IgA toxicity

$\text{h}\alpha 1^{+/+}$ mice produce the human immunoglobulin A1 heavy chain ($\alpha 1\text{hHC}$) associated with the mouse light chain (mLC). We wondered if any mispairing of the human constant C α CH1 and mouse C κ domain might participate in the propensity of the chimeric IgA to yield deposits. In order to obtain an IgA closer to the human IgA structure, we bred $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ mice with « Knock-In Kappa Switch » (KIKS) mice which express a functional human immunoglobulin light chain C κ domain (hLC) (10). Double mutant mice producing IgA with fully human constant domains were bred in either a “conventional” facility (CF) – yielding contacts with endemic mouse pathogens and conventional immune stimulation – or in a “specific and opportunistic pathogen-free” facility (SOPFF). $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ KS $^{+/+}$ mice essentially produce IgA with human heavy and light chains (HC and LC) and minimal amounts of class-switched murine immunoglobulins, but not mIgM (Supplementary figure 1 A). They were combined with $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ mice solely mutated at the IgH locus. hIgA plasma levels increased with time with higher quantities in CF than in SOPFF mice in both models. Moreover, hIgA levels were significantly higher in $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ KS $^{+/+}$ than in $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ mice in CF (Figure 1 A). In addition, polymeric IgA levels increased in an age-dependent manner in both mouse groups but to a higher extent in CF than in SOPFF housed animals (Supplementary figure 1 B) but no difference in the monomeric/polymeric ratio was observed at 48 weeks between the two models (Figure 1 B). Galactosylation profile of hIgA barely varied between mice at 24 weeks, except for a slight hypersialylation in $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ KS $^{+/+}$ compared to $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ mice (Supplementary figure 1 C). Kidney sections showed similar levels of IgA deposition on the mesangium in both mouse models at 48 weeks. At the same age, small quantities of C3 complement deposits were detected on the mesangium of $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ and $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ KS $^{+/+}$ mice housed in CF (Figure 1 C). Histological analyses showed slight mesangial expansion without cellular proliferation (Figure 1 D). Plasma creatinine and proteinuria levels remained normal in both mouse models housed in SOPFF and CF (Supplementary figure 1 E and F) and no hematuria was observed after 48 weeks follow-up of $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ and $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ KS $^{+/+}$ mice. Consequently, these data eliminate the hypothesis of mis-paired H-L chains being responsible for the chimeric IgA proficiency to deposit in $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ mice.

Colic inflammation does not increase hIgA toxicity

A very rare association exists between IgAN and intestinal diseases (11). However, it is not certain whether gastro-intestinal inflammation exacerbates latent IgAN or whether these diseases share a common pathogenesis. In this study, we induced experimental chronic and acute colitis in $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ mice, by adding 0.5% or 2% dextran sodium sulfate (DSS), respectively,

to drinking water (Figure 2 A). For the chronic colitis group, the disease activity index (DAI) was 1.7. hIgA levels remained in the normal range ($\approx 680 \mu\text{g/ml}$) compared to control mice (Figure 2 B). For the acute colitis group, DAI was 3.7 and hIgA levels dramatically increased ($\approx 2500 \mu\text{g/ml}$) (Figure 2 C). No difference was observed between polymeric and monomeric hIgA forms in the plasma of 0.5% and 2% DSS-treated and untreated mice (Supplementary figure 2 A). Proteinuria and plasma creatinine levels remained normal (Supplementary 2 B and C) and no hematuria was observed. In addition, kidney sections did not show increased hIgA deposits (Figure 2 D and E (1)) IgG or complement deposits nor mesangial proliferation (Figure 2 E (2)) compared to untreated mice. Altogether, these data show that, despite considerably increased hIgA levels, colic inflammation did not induce kidney lesions exacerbated by hIgA deposition in $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ mice.

CD89 is not mandatory for development of glomerular inflammation

It was previously shown that $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ CD89 transgenic mice which express human CD89 on macrophages and monocytes developed pathogenic mesangial deposits. Soluble CD89 (sCD89) found in fractions containing high molecular mass complexes was required for complement deposition, leukocyte infiltration, proteinuria and hematuria (12). To further explore this molecular aspect, we bred hFc α RI transgenic mice (CD89 $^{+/+}$), in which CD89 expression on leukocytes as well as regulation and function of the receptor mimics the physiological situation in humans (13), with $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ mice. We followed up $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ and $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ CD89 $^{+/+}$ mice in the CF for 48 weeks. Flow cytometry showed CD89 surface staining on murine neutrophils from $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ CD89 $^{+/+}$ and its absence in $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ mice (Supplementary figure 3 A). In addition, ELISA quantified the production of hIgA (Supplementary figure 3 B) and the presence of CD89-IgA complexes in $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ CD89 $^{+/+}$ plasma (Figure 3 A). hIgA plasmatic levels were significantly more elevated in $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ CD89 $^{+/+}$ than in $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ mice (Figure 3 B). hIgA polymerization levels increased with age; at 48 weeks there was no difference in the monomeric/polymeric ratio between the two groups (Figure 3 C). Concerning hIgA glycosylation, galactosylation and sialylation profiles were similar (Supplementary figure 3 C). Only at 6 weeks of age, hIgA glomerular deposition was significantly higher in $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ CD89 $^{+/+}$ compared to $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ mice (Supplementary figure 3 D). Later on, this difference disappeared and hIgA deposits were similar in both groups (Figure 3 D (1)) with very slight mC3 deposits found at 48 weeks. No mesangial cell proliferation was seen at 48 weeks in $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ CD89 $^{+/+}$ mice (Figure 3 D (2)). Plasma creatinine and proteinuria levels were not significantly different between both mouse models at 48 weeks and remained in the normal range (Supplementary figure 3 E and F). These data show that in this model and in our hands, IgA-CD89 complex formation did not differ in severity from simple IgA deposits and were notably not able to induce glomerular inflammation nor kidney lesions.

hα1^{+/+} AID^{-/-} mice develop mesangial thickening and complement deposition

We previously reported that IgA deposition might be a disease implicating the Ig variable domain (9). IgA affinity maturation is a process involving modification of the Ig V-region gene via somatic hypermutation (SHM). This process requires the DNA editing enzyme: the Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID). AID deficiency causes a complete defect in class switch recombination (CSR) and SHM (14, 15). We thus bred the hα1^{+/+} model with AID^{-/-} model; double mutant hα1^{+/+} AID^{-/-} mice were housed in both SOPFF and CF. Results showed that hα1^{+/+} AID^{-/-} immunoglobulin production was restricted to hIgA which is consistent with the AID deficiency and CSR defect (Figure 4 A). In addition, hIgA levels were significantly increased in hα1^{+/+} AID^{-/-} compared to hα1^{+/+} mice in an age-dependent manner. Surprisingly, hIgA levels were increased 6-fold at 24 weeks in hα1^{+/+} AID^{-/-} mice housed in CF compared to hα1^{+/+} mice (Figure 4 B). Western blot showed that hα1^{+/+} AID^{-/-} mice produced essentially monomeric IgA whether they were housed in conventional or SOPF facilities. However, dimeric and polymeric forms were less detected in the circulation after 24 weeks (Figure 4 C). IgA galactosylation and sialylation profiles did not differ between the two groups (Figure 4 D). In order to test hIgA affinity in these mice lacking AID expression, we injected intraperitoneally (*i.p.*) two sex and age-matched hα1^{+/+} and hα1^{+/+} AID^{-/-} groups with 50μg ovalbumin at day 0 with a boost at day 14. Despite the fact that total hIgA production was significantly higher in the hα1^{+/+} AID^{-/-} group, ovalbumin-specific hIgA production was absent (days 7 and 14) or significantly decreased (days 21 and 28) compared to the hα1^{+/+} group (Figure 5 A (1) and (2)). This confirmed the production of low-affinity hIgA in these mice. Different assays were then performed in order to test these low affinity-hIgA for autoimmune properties. We failed to detect any anti-dsDNA (Figure 5 B.), autoreactive or polyspecific hIgA in hα1^{+/+} AID^{-/-} sera (Supplementary figure 4 A).

Staining of kidney sections from young animals showed that IgA deposits occurred more aggressively in double mutant animals, with significantly heavier hIgA deposits in hα1^{+/+} AID^{-/-} compared to hα1^{+/+} mice in CF (6 to 24 weeks old) (Supplementary figure 4 B). However, with increasing age, deposits accumulated to a level where no significant difference remained by immunofluorescence examination of kidney sections at 48 weeks (Figure 5 C and Supplementary figure 4 B). In addition, at 12 weeks, we detected slight mC3 deposition in hα1^{+/+} AID^{-/-} mice in CF; mC3 deposits became more pronounced at 24 weeks (Figure 5 C). Moreover, histological analyses showed mesangial cell proliferation in hα1^{+/+} AID^{-/-} mice (50±8 vs 34±6 mesangial cells/ glomerulus in hα1^{+/+} mice) starting at 6 weeks with a considerable thickening of the mesangium at 24 and 48 weeks compared to hα1^{+/+} mice (Figure 5 D). Plasma creatinine levels were significantly increased and proteinuria was higher (but not significant) in hα1^{+/+} AID^{-/-} mice at 24 weeks (Supplementary figure 4 C and D).

In order to identify the molecular determinants of the more severe lesions seen in $\alpha 1^{+/+}$ $AID^{-/-}$ mice, we conducted an exploratory transcriptome analysis by RNA sequencing, comparing glomeruli isolated from WT, $\alpha 1^{+/+}$ and $\alpha 1^{+/+}$ $AID^{-/-}$ mice at 24 weeks. Glomerular RNA profiling showed that for 14762 analyzed genes, the expression of 418 was significantly decreased ($p < 0.001$) while 625 others were upregulated ($p < 0.001$). In $\alpha 1^{+/+}$ $AID^{-/-}$ mice, differentially expressed genes between different mouse models were clearly identified (Figure 6 A). The top six nephrotoxicity markers upregulated in $\alpha 1^{+/+}$ $AID^{-/-}$ mice are also shown (Figure 6 B). Notably, we observed significant upregulation of several genes related to the complement alternative and lectin pathways (*C3ar1*, *C3b*, *C4b* and *Cfb*). Moreover, pathway analysis demonstrated the significant upregulation of several pathways implicated in inflammatory responses and immune cell trafficking (*Irf3*, *Irf7*), extracellular matrix organization (*Col6a5*), cell growth, proliferation and cell cycle (*Mnda*, *Uchl1*), nephrotoxicity parameters (*Ccl5*, *Ccl3*, downregulated *Slc26a1*) in $\alpha 1^{+/+}$ $AID^{-/-}$ versus $\alpha 1^{+/+}$ and WT mice (Figure 6 D). Altogether, these data show that the low affinity-hIgA which are prominent in AID -deficient mice are able to deposit in kidney mesangium and are especially prone to induce mesangial cell proliferation and thickening in mice.

Discussion:

Despite considerable exploration of the biochemical abnormalities affecting IgA1 in IgAN patients, the disease etiology remains poorly understood. Various unconstant abnormalities of deposited IgA have been reported including antigen or endogenous protein co-precipitation, negative electrostatic charges and altered patterns of IgA glycosylation. The hypogalactosylated O-glycosides of the IgA1 hinge region result in increased tendency for non-covalent self-aggregation and polymerization of circulating IgA. Several findings support a key role for galactose deficient (Gd) Gd-IgA in renal aggression as kidney biopsy eluates from IgAN patients mainly contain negatively charged and polymeric IgA1 (16). Free O-glycoside sites in the IgA1 hinge region are recognized as antigenic neo-epitopes and targeted by auto-antibodies. This results in the formation of bulky nephritogenic immune complexes (IC). Analysis of IC from IgAN patients has led to the detection of these antibodies, most often associated with IgG but also IgA (5). However, several data suggest that the glycosylation deficiency of IgA often observed in IgAN (but also, less frequently, in healthy subjects) is not the sole cause leading to IgA deposition. Specific features of IgA V regions have also been suggested by several studies of monoclonal IgA, but these observations are difficult to transpose to the general case of IgAN since the disease most often involves polyclonal IgA. In our $ha1^{+/+}$ model, we observed that IgA hypoglycosylation was not mandatory for their deposition (9). In IgAN patients, two O-glycosylated proteins found in the serum have been studied: C1 esterase inhibitor and IgD and in both cases no alteration of the O-glycosylation pattern was found (17). Gd-IgA antibodies are detected in healthy individuals often after viral infection (18) and it has been demonstrated that these Gd-IgA can play a protective role preventing IgA glomerular deposition (19). Moreover many experimental models have been developed but none of them have perfectly reproduced the disease (6). One model suggests that IgA deposits may be related to abnormal regulation of IgA synthesis and consequently to affinity maturation (7). In the current study, we now show that increased production of IgA lacking affinity maturation can contribute to the development of IgA deposits yielding mesangial inflammation. This study was extended by further exploring a mouse model in which polyclonal chimeric IgA with a human α constant region are produced and previously shown to easily result in kidney deposition (8, 9). Since a primary question in this model might be the stability of the Ig molecules produced, where human IgH constant regions are paired with mouse constant domains, we first validated that similar deposits were obtained in mice expressing human κ chains with a knock-in of the human $C\alpha$ gene downstream of the mouse $V\kappa$ $J\kappa$ clusters, where it was reported that the majority of light chains in this model have a human constant domain (10). We did not observe any difference in renal impairment compared with

$\text{h}\alpha 1^{+/+}$ mice. This validated the $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ IgAN model by showing that the ability to deposit is due to the human C α 1 heavy chains, independently of any mis-association with L chains.

Using the same model, we then addressed the issue of intestinal inflammation. A rare association indeed exists between intestinal bowel diseases (IBD) such as ulcerative colitis and Crohn's disease and IgA renal deposition (11). Frequency of IgAN cases among patients with IBD was higher than that among Caucasian controls, suggesting a shared pathophysiology between these diseases. Mechanisms responsible for IgA glomerular deposition in patients with IBD have not been elucidated (20). DSS, a sulfate polysaccharide administered to mice in drinking water is directly cytotoxic to enterocytes and leads to intestinal barrier damage, microbial translocation and induction of a colitis phenotype that is independent from the adaptive immune system (21). Despite moderate or severe bowel inflammation, we did not observe increased IgA deposition, glomerular cellular infiltration or proteinuria and hematuria in our mice with colitis. In mouse models where B-cell Activating factor of the TNF family (BAFF) or lymphotoxin- β receptor ligand (LIGHT) are overexpressed, high levels of serum polymeric IgA (pIgA) has been considered to play a dominant role in renal damage. However, abnormal expansion of some B cell subsets and loss of B cell tolerance to self-antigens was observed. In these models, auto-antibodies may serve as contributing factors to renal deposition and inflammation (22, 23). In IgAN, only some patients present elevated circulating IgA levels (17). In IgA myeloma patients and despite markedly elevated IgA production, IgAN or IgA vasculitis cases have been rarely documented (24). Our data are consistent with a minor role of serum hyper-IgA syndrome and bowel inflammation in the development and worsening of IgAN.

IgA receptors (IgAR) have also been proposed to play a role in IgAN pathogenesis (25), particularly Fc α RI (CD89) whose expression is restricted to circulating cells of myeloid lineage (26), and TFR1 (transferrin receptor 1 or CD71) expressed on mesangial cells (27). Previously, it has been demonstrated that transgenic mice expressing human CD89 on monocytes/macrophages spontaneously develop IgA deposits on their mesangium (28). Breeding $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ with CD89 transgenic mice resulted in increased IgA and C3 deposition together with proteinuria and hematuria which are hallmarks of IgAN. Furthermore, mesangial TFR1 and transglutaminase 2 (TG2) were overexpressed setting up a self-amplification loop leading to mesangial cell proliferation and secretion of inflammatory cytokines (12). However, CD71 is not expressed in healthy glomeruli and blocking CD71 does not completely abrogate mesangial cell binding. B1,4-galactosyltransferase is constitutively expressed in mesangial cells with an important role in both IgA mesangial clearance and initial response to IgA deposition; its expression increases in IgAN (29). In our $\text{h}\alpha 1^{+/+}$ CD89 $^{+/+}$ model, we did not observe any exacerbation of glomerular lesions in spite of CD89 surface staining on blood leukocytes and the presence of circulating IgA-CD89 immune complexes. This discrepancy

may be explained by a difference in model construction. In one case the Fc α RI expression is restricted to monocytes (28) and in the second it is mainly expressed by total leukocytes which is closer to the human physiology (13, 30). We thus cannot rule out the possibility that the shedding of soluble Fc α R is lower from neutrophils than from monocytes.

We previously reported that IgA deposition might be a disease implicating the Ig variable domain (9). IgA affinity maturation is a process involving modification of the Ig V-region gene via somatic hypermutation (SHM). The IgA repertoire is determined by the complexity of the microbiota and individual mice have distinct repertoires. Secretory antibodies are shaped by ongoing diversification of memory B cells. This process might be beneficial in the intestine to match transient alterations of the microbiota (31). The main sites of this process are the germinal centers (GC) of Peyer's patches (PP). GCs play a critical role in the development of affinity-matured IgA B cells and the formation of long-lived plasma and memory B cells (32). In the presence of antigens, mature B cells diversify their antibody repertoire through SHM and class switching mechanisms. These processes are conditioned by environmental cues and strongly controlled by follicular dendritic cells (FDC) and different subsets of CD4⁺ T cells such as T follicular helper (T_{FH}), T follicular regulatory (T_{FR}) and T helper 17 (T_{H17}) cells (33). These processes require the DNA editing enzyme AID. AID deficiency results in a complete defect in class switching and SHM (14, 15). A modification of this control system can curtail high affinity B-cell selection. Interestingly, follicular dendritic cell secreted protein (FDC-SP) is a suppressive factor of IgA B-cell responses and FDC-SP deficient mice have enhanced IgA production in PP associated with IgA mesangial deposits (7). As already mentioned, increased BAFF expression can affect IgA differentiation (22). Our $\alpha 1^{+/+}$ AID^{-/-} model highlights two elements worthy of interest: the first is the production of low affinity or natural IgA leads to mesangial matrix expansion and fibrosis and the second is that these IgA are capable of activating complement.

In the absence of AID, only natural antibodies are produced, which are notably characterized for their ability to bind self-antigens with low affinity and to often show polyreactivity. The process of affinity maturation normally occurring into germinal centers due to AID-driven SHM of Ig V regions should thus be considered under two inverse (complementary aspects): first it produces high levels of highly specific antibodies against immunizing antigens; secondly it terminates the production of Ig molecules with low affinity for antigen, self-reactivity and polyreactivity. By studying AID-deficient mice, we are clearly in the position where such polyreactive natural IgA can dominate the immune humoral response. Although this aspect cannot be easily measured, we might also speculate that natural antibodies of the IgA class might differentially bind IgA receptors such as CD71 or β 1,4- glycosyltransferase on mesangial

cells or mesangial matrix proteins. The accumulation of IgA can also be explained by the potential saturation of clearance functions of these receptors.

Activation of complement plays a key role in the pathogenesis and clinical expression of IgAN (34). Complement C3 is usually present in lesions with the same distribution as IgA. IgA has been shown to activate the alternative complement pathway *in vitro* independently from the hinge region, but with higher activation by polymeric IgA (35). Polymeric IgA also have the ability to activate the lectin pathway as they can bind Mannose-Binding Lectin (MBL) *in vitro* through the N-linked glycans (36). Interestingly, in our $\alpha 1^{+/+}$ $AID^{-/-}$ model, C3 was markedly present in kidney lesions. Surprisingly, this complement activation was not associated with the higher proportion of polymeric IgA, which suggests that natural and very immature monomeric IgA can also activate complement.

In conclusion, we demonstrate that IgA deposits and IgAN might notably implicate natural antibodies of the IgA class which totally lacking affinity maturation of IgA. The conditions where production of such unmutated IgA are produced in increased amounts in humans remain to be determined but it is noticeable that a sub-population of B-cells from mucosa-associated lymphoid tissues is related to a “B1”-like compartment, reacting to T-independent stimuli but not involved into the production of highly specific IgA against local bacteria (37, 38). This maturation defect of deposited IgA might also explain why IgAN is much more common in young individuals. Although B1 cells are less clearly described in humans than in mice, an equivalent of B1 cells is clearly present in human, also with innate functions and presence in young individuals (39–41). Based on the present data, we also now believe that the hypothesis of an imbalance in IgA production by the B1 versus B2 compartment of B-cells will deserve to be explored in human IgAN patients.

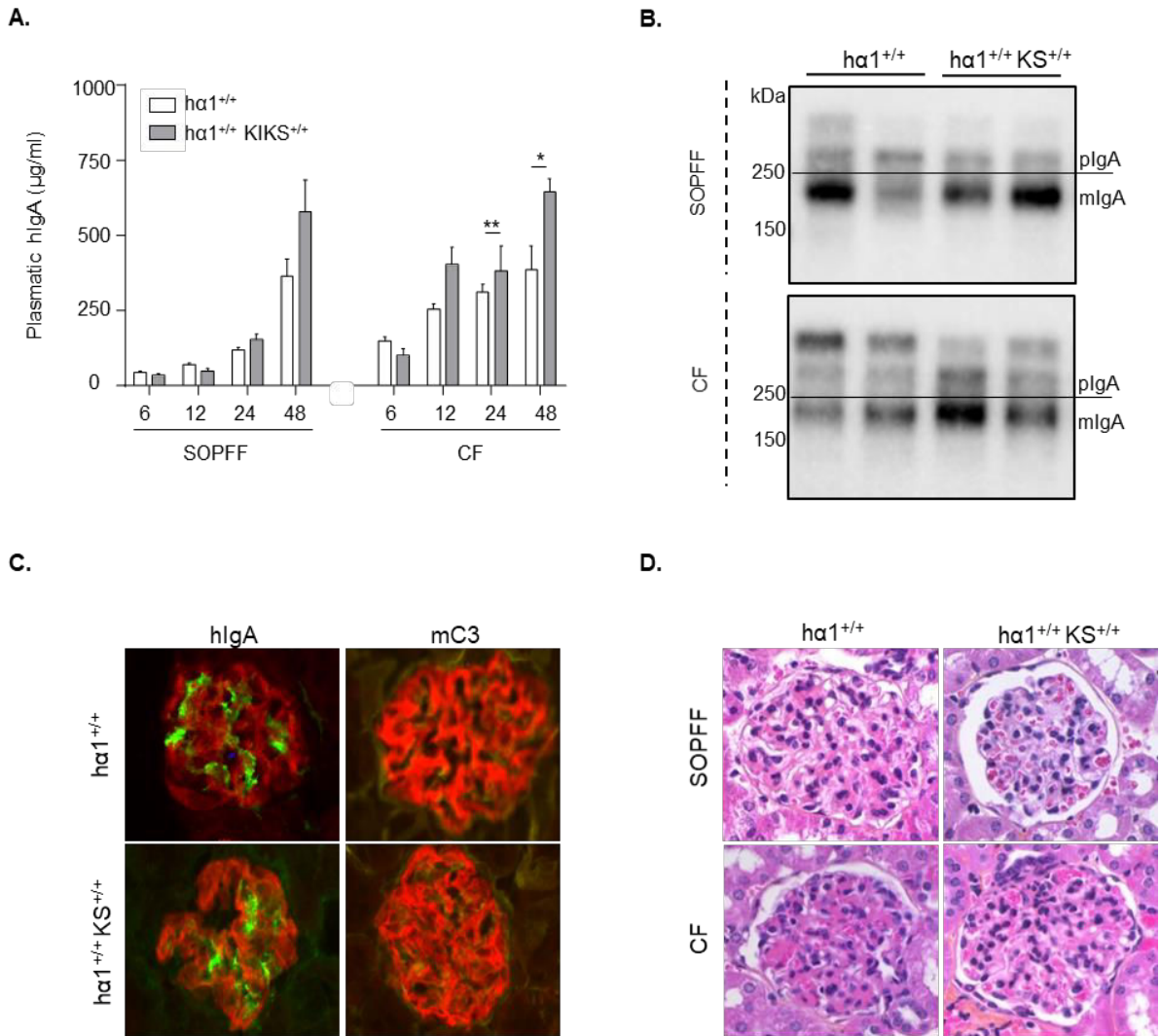


Figure 1: hLC substitution in $ha1^{+/+} KS^{+/+}$ mice. A. Plasmatic hlgA levels in $ha1^{+/+}$ and $ha1^{+/+} KS^{+/+}$ mice at 6, 12, 24 and 48 weeks in both SOPFF and CF. Results are the means \pm SEM of $n=6-10$ mice/ group (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ using the non-parametric Mann-Whitney test). **B.** Analysis of IgA monomeric (mlgA) and polymeric (plgA) forms by western blot at 48 weeks; molecular mass scale is expressed in Kilo Daltons (kDa); blots are representative for $n=6$ mice/ group. 2 mice from each group are presented. **C.** hlgA and mC3 deposits in mice kidneys at 48 weeks in CF (podocin in red, hlgA in green and mC3 in yellow). **D.** H&E staining of kidney sections from mice at 48 weeks. All pictures are representative for glomeruli found in kidney sections of $n=6-12$ mice/ group (Original magnification for all pictures 20X).

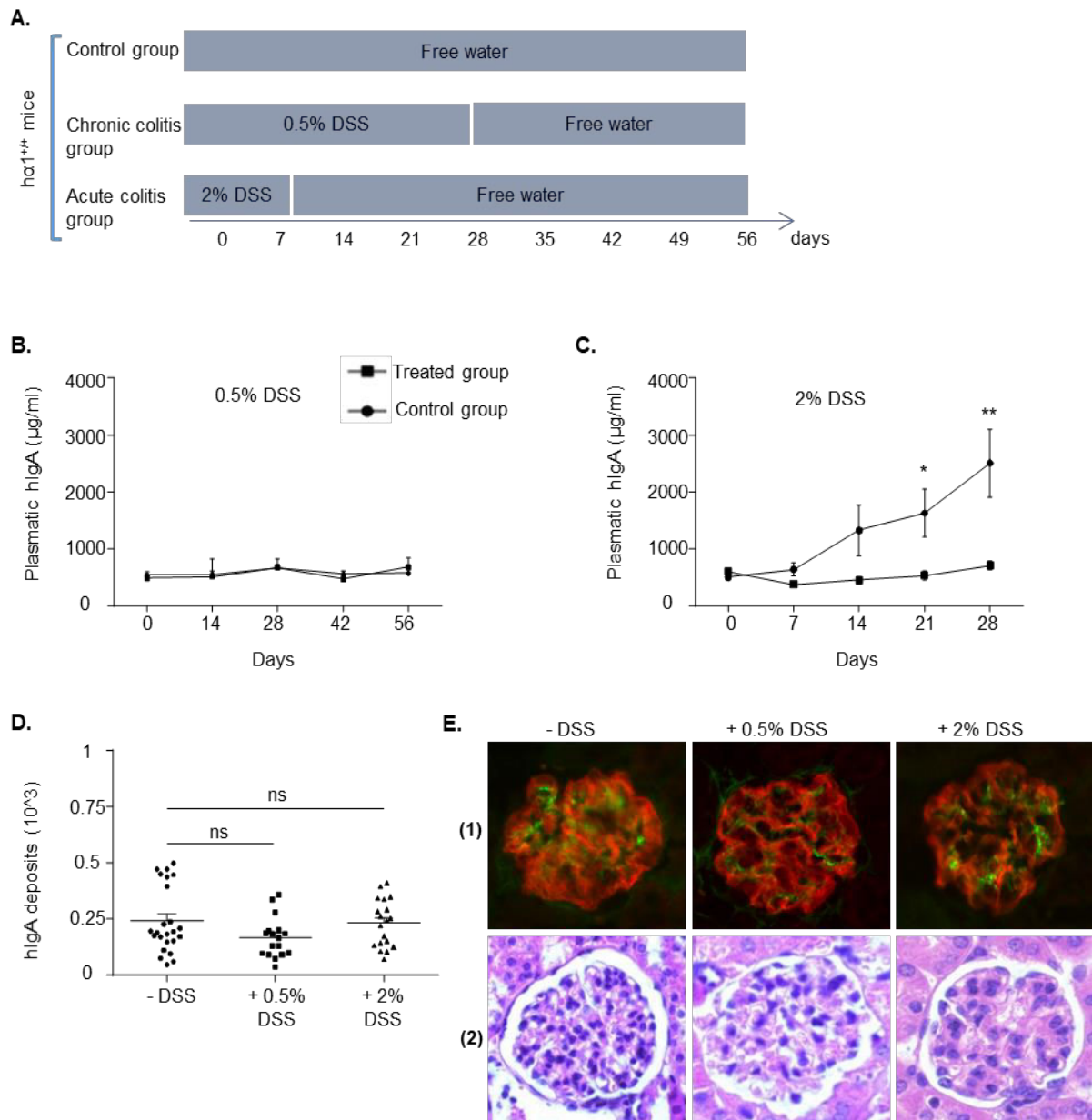


Figure 2: Colitis induction in $ha1^{+/+}$ mice. **A.** Procedure of induction of chronic and acute colitis. The control group ($n=15$ mice) received free water for 56 days, the chronic ($n=17$) and acute ($n=10$) colitis groups received 0.5% and 2% DSS dissolved in water for 28 and 7 days respectively and then free water until the end of the experiment. **B.** Plasmatic hIgA in control and treated groups at 0, 14, 28, 42 and 56 days for the chronic colitis group and **C.** at 0, 7, 14, 21 and 28 days for acute colitis group. Results are means \pm SEM of $n=4-6$ mice/condition; **D.** Quantification of hIgA staining in kidney. Results are means \pm SEM of $n=95-125$ glomeruli/condition. **E.** (1) hIgA glomerular deposits (podocin in red, hIgA in green) and (2) H&E staining on kidney sections from control and DSS-treated mice (0.5% and 2%). Pictures are representative of all glomeruli found in $n=6$ mice/condition (Original magnification 20X). For numeric data, ns is for non-significant p-value, * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared to the control group in the corresponding condition using Mann-Whitney test.

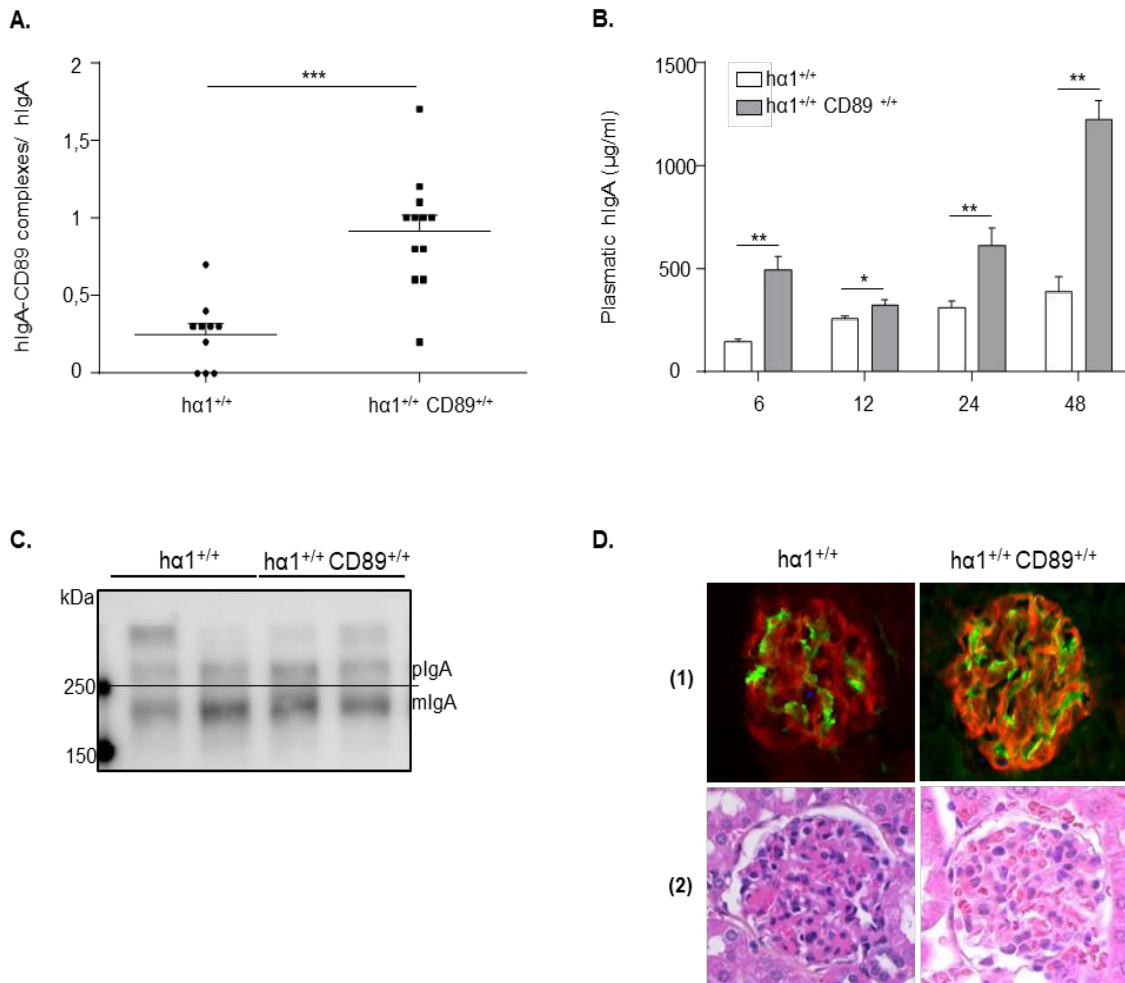


Figure 3: Co-expression of CD89 and hlgA in mice. **A.** Plasma hlgA-CD89 complexes levels in $ha1^{+/+}$ and $ha1^{+/+} CD89^{+/+}$ mice at 12 weeks. Optical density (OD) of (hlgA-CD89 complexes) is normalized to OD of (hlgA) in each model (n=10-12 mice). **B.** Plasmatic hlgA levels in mice at 6, 12, 24 and 48 weeks. **C.** Analysis of hlgA circulating forms by western blot at 48 weeks. Blots are representative for n=6 mice/ condition; 2 mice from each group are presented. **D.** (1) hlgA deposits in green and (2) H&E staining on kidney sections of mice at 24 weeks. Pictures are representative for all glomeruli found in kidney sections of n=6-12 mice/ condition (Original magnification 20X). For numeric data, results are means \pm SEM of n=6-10 mice/ group, *P< 0.05, **P< 0.01 and ***P<0.001 using Mann-Whitney test).

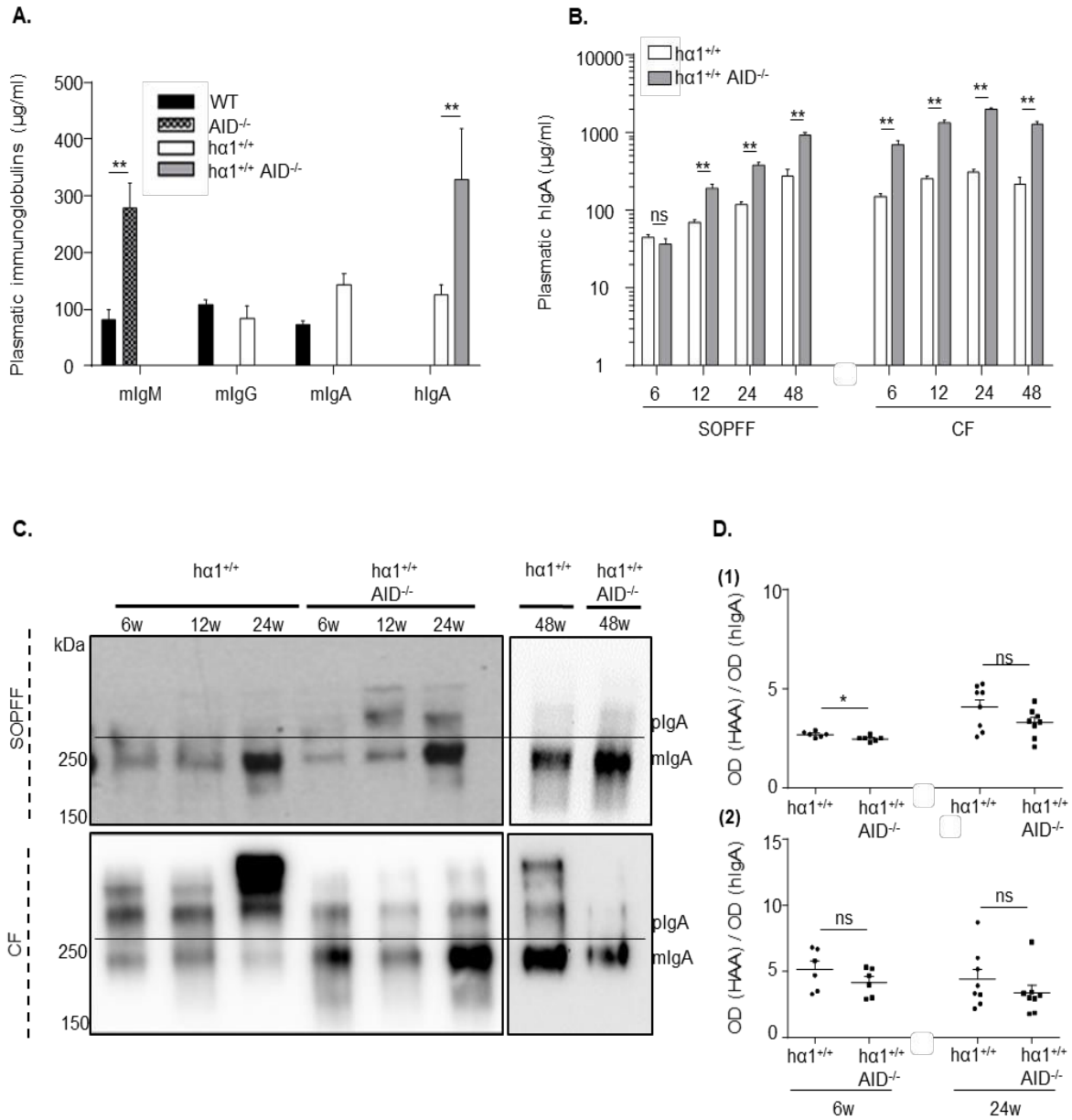


Figure 4. Invalidation of AID in ha1^{+/+} mice. **A.** Different isotypes levels in WT, AID^{-/-}, ha1^{+/+} and ha1^{+/+} AID^{-/-} mice at 6 weeks. **B.** Plasmatic hIgA levels in ha1^{+/+} and ha1^{+/+} AID^{-/-} mice at 6, 12, 24 and 48 weeks in both SOPFF and CF. **C.** Analysis of plasmatic hIgA forms in ha1^{+/+} and ha1^{+/+} AID^{-/-} mice at 6, 12, 24 and 48 weeks in SOPFF and CF. Blots are representative for n=4-6 mice/condition. **D.** hIgA glycosylation levels at 6 and 24 weeks quantified by lectin-binding assay using HAA (1) and MA lectins (2); OD lectin/OD hIgA are presented. All numeric data are expressed as means ± SEM of n=6-10 mice/ group; ns: non-significant, *P < 0.05 and **P < 0.01 using Mann-Whitney test.

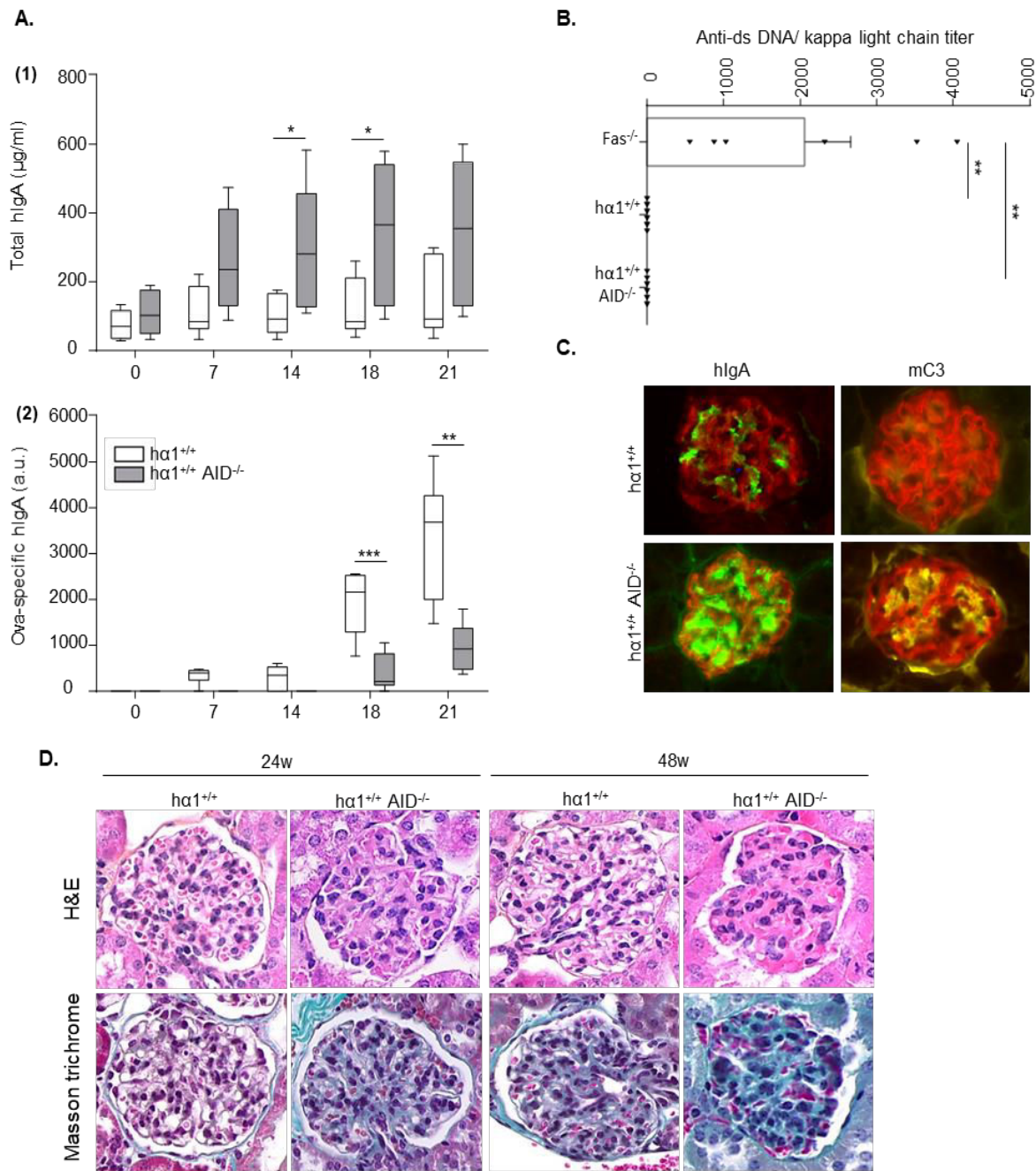
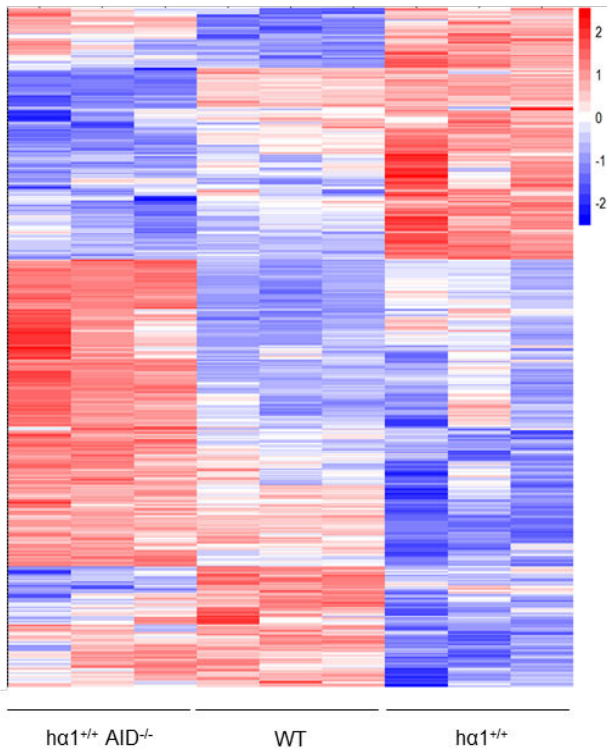
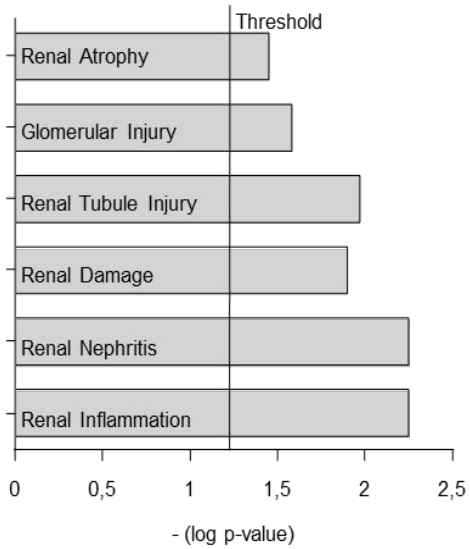


Figure 5: Natural hlgA quality assessment. **A.** Total hlgA (1) and ovalbumin-specific hlgA (2) detected by ELISA in total serum after intraperitoneally ova-immunization of mice. **B.** Anti-ds DNA levels normalized to kappa-light chain titer in $Fas^{-/-}$, $ha1^{+/+}$ and $ha1^{+/+} AID^{-/-}$ mice sera. **C.** hlgA (in green) and mC3 (in yellow) deposits in kidneys sections in CF at 24 weeks. **D.** H&E and Masson trichrome staining of kidney sections from mice housed in CF. All pictures are representative for glomeruli found in kidney sections of $n=6-12$ mice/ condition. Numeric data are means \pm SEM of $n=6-10$ mice/ condition; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ using Mann-Whitney test; original magnification for all pictures 20X.

A.



B.



C.

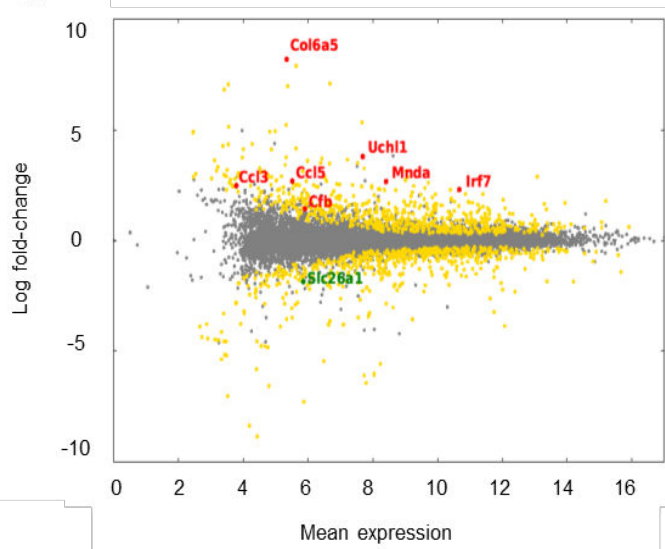
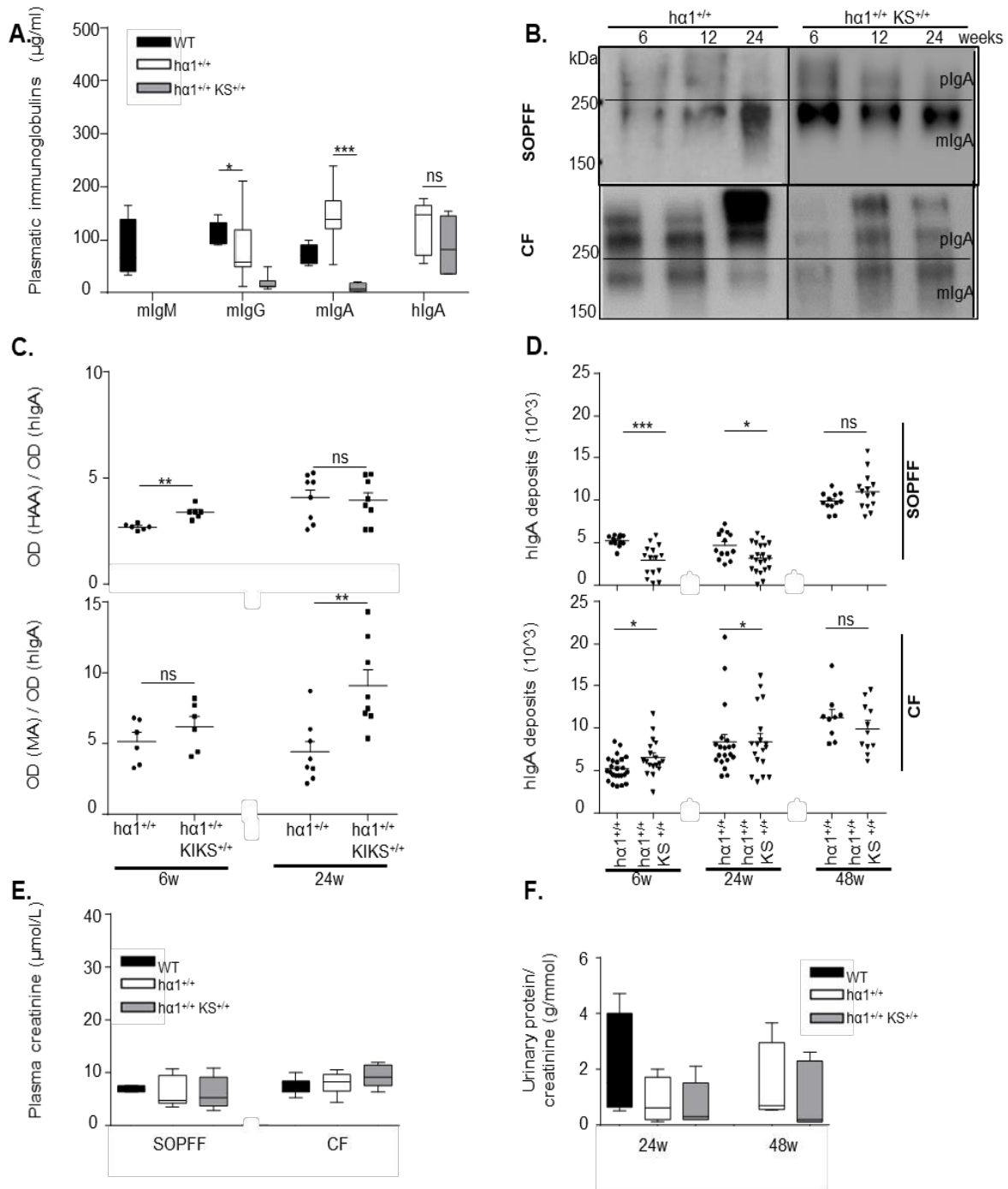
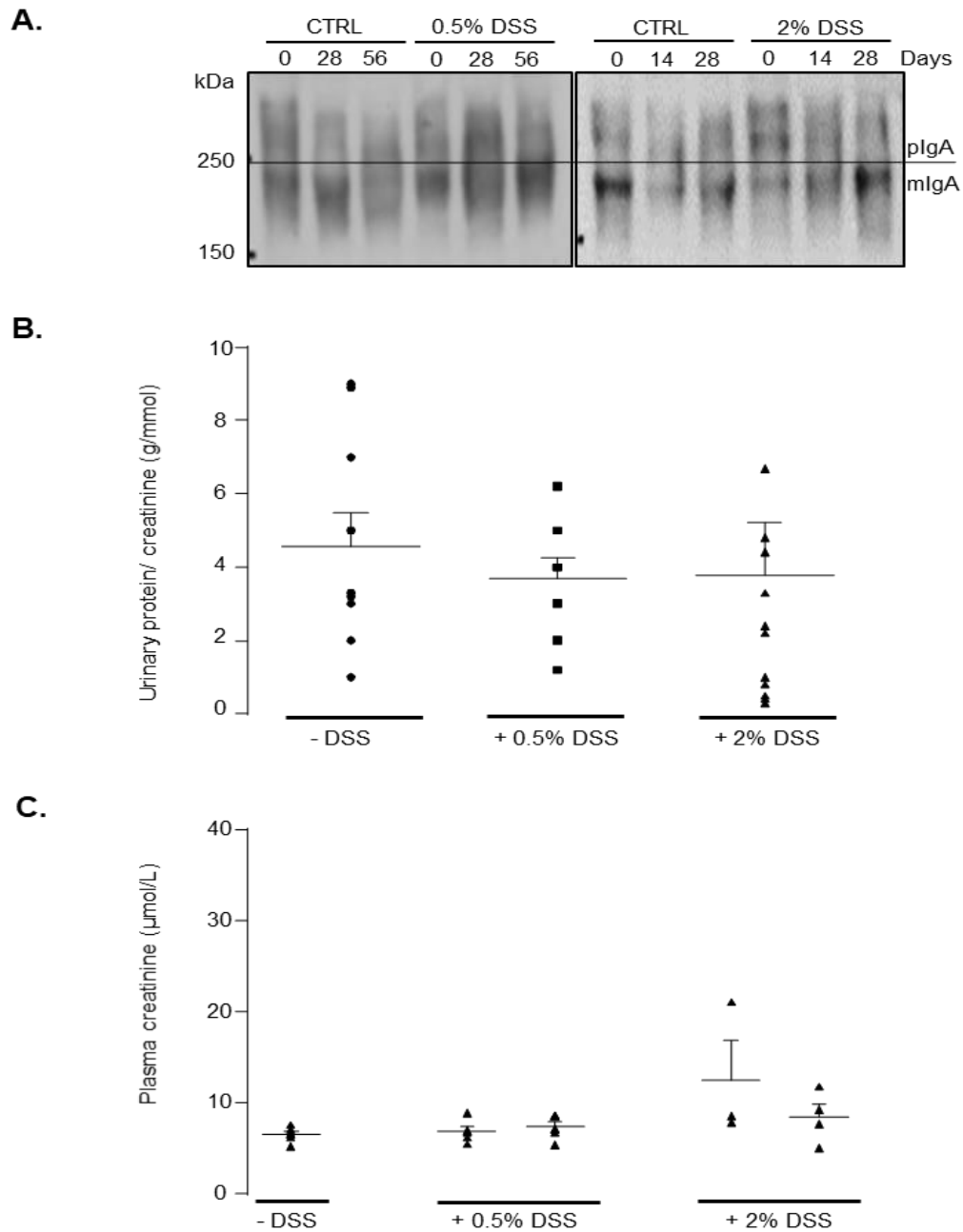


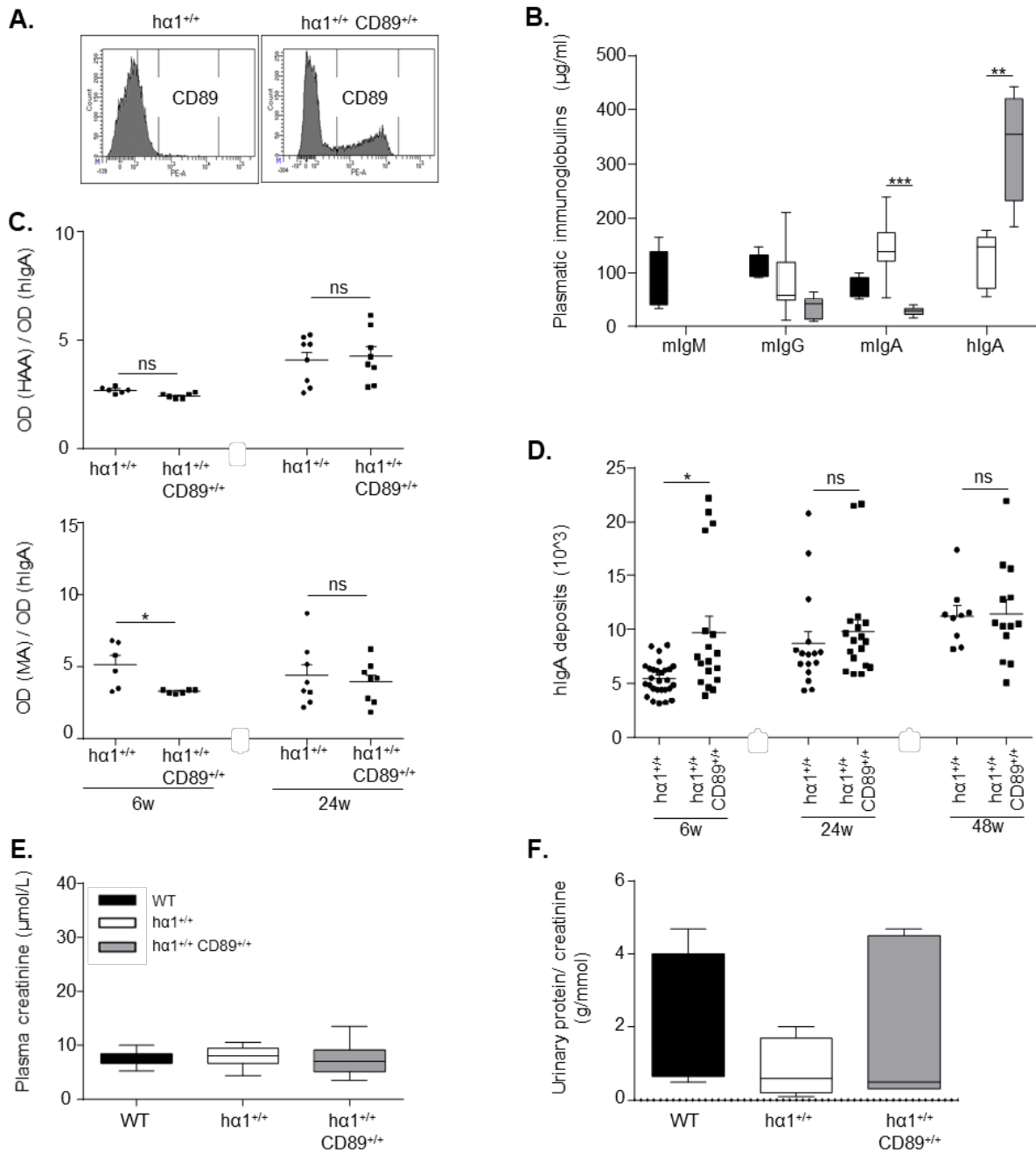
Figure 6. Differential glomerular gene expression in $ha1^{+/+}$ and $ha1^{+/+} AID^{-/-}$ mice. **A.** Heatmap of differentially expressed genes in WT, $ha1^{+/+}$ and $ha1^{+/+} AID^{-/-}$ mice (n=3 mice/ condition) based on Z-score. Red indicates up-regulated genes; blue indicates down-regulated genes. **B.** Top 6 nephrotoxicity parameters upregulated in $ha1^{+/+} AID^{-/-}$ compared to $ha1^{+/+}$ mice. **C.** MA plot for transcriptome profiling data presented mRNA log₂-fold changes in $ha1^{+/+} AID^{-/-}$ versus $ha1^{+/+}$ mice. Some significant upregulated and downregulated genes are depicted.



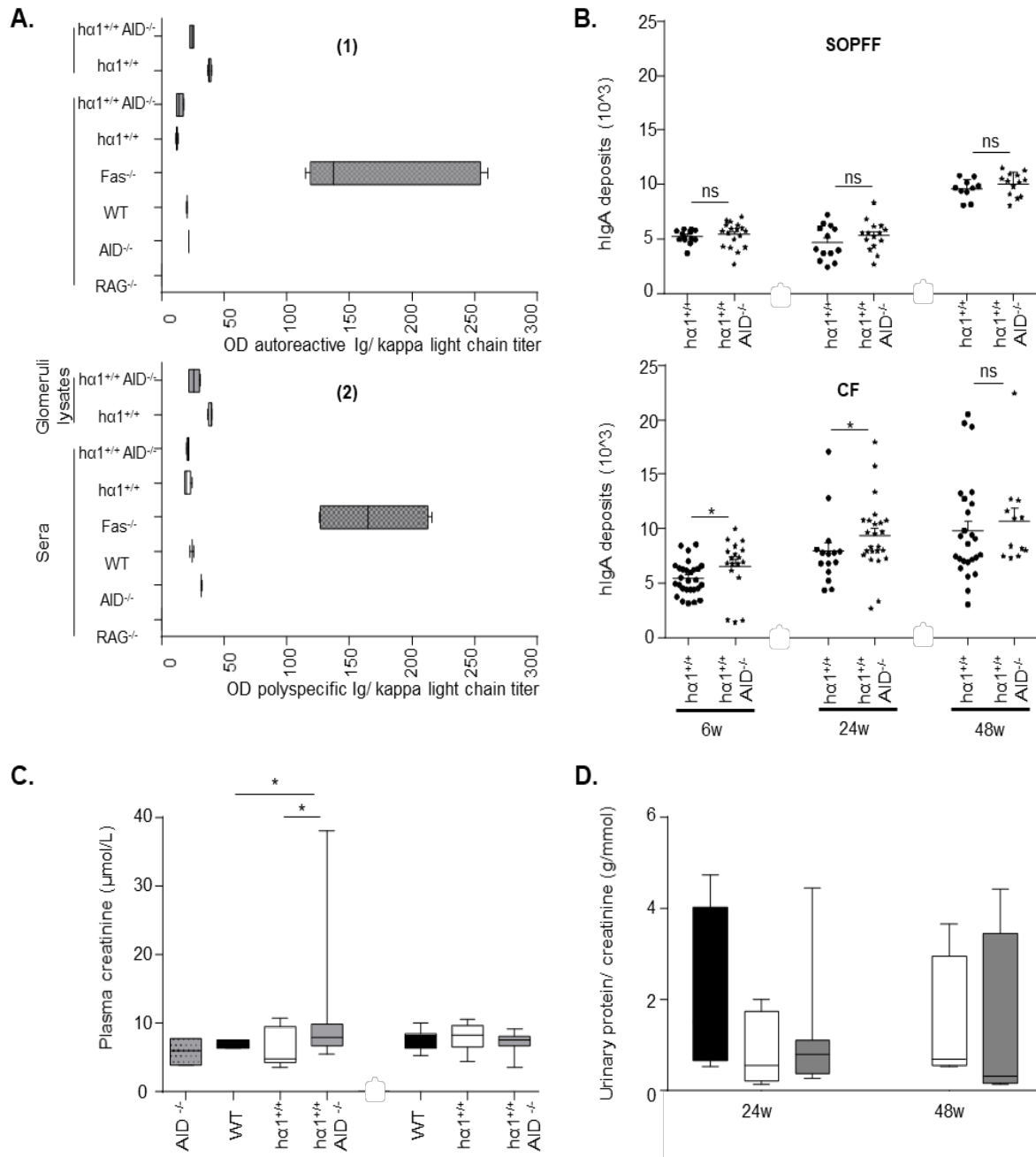
Supplementary figure 1: A. Different isotypes levels in 6-weeks old mice. **B.** Analysis of IgA forms by western blot in SOPFF and CF at 6, 12 and 24 weeks. Blots are representative for $n=6$ mice/ condition. **C.** hIgA glycosylation levels quantified by lectin-binding assay using HAA and MA lectins at 6 and 24 weeks. **E.** hIgA deposits quantification in both SOPFF and CF. Results are means \pm SEM of $n=150$ glomeruli/ condition. **F.** Plasmatic creatinine levels in mice at 48 weeks in both SOPFF and CF. **G.** Protein to the creatinine levels in the urine of mice in CF. Results represent the means \pm SEM of $n=6-12$ mice ($*P < 0.05$ $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$ using Mann-Whitney test).



Supplementary figure 2: A. Polymeric and monomeric hIgA fractions in plasma of control, 0.5% and 2% DSS-treated $h\alpha 1^{+/+}$ mice; molecular mass scale is expressed in Kilodaltons; blots are representative for $n=5$ mice. **B.** Proteinuria (at the end of the experiment) and **C.** plasma creatinin (at day 28 and 56 for the chronic colitis group and day 7 and 28 for the acute colitis group) measured in control and treated groups; results are expressed as means \pm SEM of $n= 4-6$ mice/ condition.



Supplementary figure 3: A. Extracellular staining of CD89 on mouse leukocytes from $ha1^{+/+}$ and $ha1^{+/+} CD89^{+/+}$ mice by flow cytometry. Figures are representative for at least 6 mice. **B.** Different plasmatic isotypes levels in WT, $ha1^{+/+}$ and $ha1^{+/+} CD89^{+/+}$ mice. **C.** hIgA glycosylation levels quantified by lectin-binding assay using HAA and MA lectins. **D.** hIgA deposits quantification by image analysis using Volocity in CF at 6, 24 and 48 weeks. Results are means \pm SEM of $n=150$ glomeruli/ condition. **E.** Plasmatic creatinine and **F.** urinary protein to the creatinine levels in WT, $ha1^{+/+}$ and $ha1^{+/+} CD89^{+/+}$ mice at 48 weeks. All data represent means \pm SEM of $n=6-12$ mice (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ using Mann-Whitney test).



Supplementary figure 4: A. Autoreactivity (1) and polyspecificity tests (2) performed on mice sera and glomeruli lysates. **B.** hlgA deposits quantification by image analysis using Velocity in both SOPFF and CF at 6, 24 and 48 weeks. Results are means \pm SEM of $n=150$ glomeruli/condition. **C.** Plasmatic creatinine levels in mice at 24 and 48 weeks in both SOPFF and CF. **D.** Protein to the creatinine levels in the urine of WT, $ha1^{+/+}$ and $ha1^{+/+} AID^{-/-}$ mice at 24 and 48 weeks in CF. Bars represent means \pm SEM of $n=8-12$ mice/condition (ns for non-significant and * $P < 0.05$ using Mann-Whitney test).

Methods:

1- Animals and housing conditions:

All experiments were performed with age and sex-matched mice that were housed in strict opportunistic pathogen free (SOPFF) and conventional (CF) facilities of the Limoges University with a 12-hours light and dark cycle and free access to food and water. The $\alpha 1$ KI mice ($\alpha 1^{+/+}$) producing IgA with the human C α 1-constant region were bred with « Knock-In Kappa Switch » KIKS mice characterized by the knock-in of functional human kappa light chain ($KS^{+/+}$) CD89 mice, characterized by the human Fc α RI knock-in and its expression on leukocytes ($CD89^{+/+}$; a gift from Dr. M. van Egmond, The Netherlands), and *Aicda*^{-/-} mice ($AID^{-/-}$; a gift from Dr. T. Honjo, Japan) characterized by activation-induced cytidine deaminase deficiency and impaired somatic hypermutation. For each mouse model, the resulting heterozygous mice were intercrossed to obtain the double homozygous: $\alpha 1^{+/+} KS^{+/+}$, $\alpha 1^{+/+} CD89^{+/+}$ and $\alpha 1^{+/+} AID^{-/-}$ mice which were bred into a BALB/c background and compared with wild-type animals from similar background. Mice were screened by PCR for the human Kappa chain knock-in and the AID knock-out genotypes using genomic DNA isolated from tail snips, by flow cytometry on blood samples for the CD89 expression on leukocytes and by ELISA for hIgA1 production using plasma samples collected from mice.

2- Kidney functional parameters:

Protein, albumin and creatinine levels in urine samples collected from mice were measured using a Cobas 8000-0-1 analyzer. Creatinine levels were measured in plasma collected from mice using the enzymatic creatinine assay on a Konelab analyzer (ThermoFisher). For hematuria, red cells were counted under light microscopy (Zeiss) in 10 μ L of fresh urine mounted on Glasstic slides (KOVA) and free hemoglobin was detected by Reagent strips for urinalysis (Siemens).

3- *In vivo* experiments:

For acute and chronic colitis induction, $\alpha 1^{+/+}$ mice received respectively 2% or 0.5% DSS (40 kDa, Sigma) dissolved in ultrapure water orally and ad libitum for 7 or 28 days, followed by 49 or 28 days of regular drinking water. DSS solutions were freshly prepared each 3 days. Control mice had access to ultrapure water. Colitis was assessed using a disease activity index (DAI) defined by scores attributed to body weight loss (0-4 points), stool consistency (0-4 points) and bleeding (0-4 points). Resulting scores were summed up and divided by 3; DAI values ranged from 0 (healthy mice) to 4 (maximal score for colitis).

For plasma hIgA1 affinity evaluation, 8-week old $\alpha 1^{+/+}$ and $\alpha 1^{+/+} AID^{-/-}$ mice were immunized intraperitoneally with 50 μ g ovalbumin (Sigma) with Addavax adjuvant (Invivogen) at day 0 and day 14.

4- Kidney processing:

Mice were euthanized by CO₂ and kidneys were collected immediately. One kidney was snap-frozen in isopentane using SNAPFROST® (Excilone) and then stored at -80 °C until use. The other kidney was fixed in 4% paraformaldehyde for 24h before being processed for hematoxylin and eosin (H & E) and Masson's trichrome staining by the Anatomy-Histopathology department, Hôpital Dupuytren, CHU Limoges. A renal pathologist performed blind histopathological analyses to identify kidney lesions. Mesangial cellularity was quantified by counting nucleus in each glomerulus.

5- Immunofluorescence on kidney sections:

Acetone fixed 8µm kidney sections were incubated 1 hour at room temperature with goat F(ab)₂ anti-human IgA (Southern Biotech; 2052-01) or anti-murine C3 (Abcam; ab11862) and rabbit anti-podocin (Sigma; P0372) coupled to Alexa Fluor 568 (Invitrogen). hIgA was revealed using anti-goat Alexa Fluor 488 secondary antibody (Invitrogen; A21467) and mC3 was revealed using goat anti-rat Alexa Fluor 647 secondary antibody (Molecular Probes; A21247). Washes and antibody dilutions were performed in PBS. Nuclei were stained with Dapi before mounting with Mowiol 4-88 solution (Sigma). Kidney sections were observed under an epifluorescent microscope (Nikon) and signals were quantified using Volocity software (Perkin Elmer). hIgA deposits represent the mean fluorescence intensity of hIgA in glomeruli x hIgA area normalized to the podocin area.

6- Plasma immunoglobulins:

Plasma levels of different immunoglobulin isotypes and hIgA-CD89 complexes were quantified by ELISA. Briefly, 96-well plates (Nunc) were coated overnight with rabbit anti-human IgA (Dako; A0092), anti-human CD89 (BD Biosciences; 555686), anti-mouse IgM, anti-mouse IgG or anti-mouse IgA (Southern Biotech; 1020-01, 1030-01, 1040-01). A blocking step was performed in 3% BSA/PBS at 37 °C for 45 minutes. Plasma samples were diluted in 0.3% BSA/PBS, added to wells and incubated for 2 hours at 37 °C. After washing in 0.1% Tween 20/PBS, wells were incubated with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human IgA, anti-mouse IgM, anti-mouse IgG or anti-mouse IgA (Southern Biotech; 2050-04, 1021-04, 1030-04, 1040-04). After 3 washes, 1 mg/ml p-Nitrophenyl phosphate (p-NPP) was added (Sigma) Alkaline phosphatase activity was blocked with 3N NaOH. Optical density was measured at 405 nm using Multiskan FC photometer (Thermo Scientific).

7- Lectin Binding Assays

96-well plates were coated with anti-human IgA. Plates were blocked with 3% BSA-PBS for 1h. Mouse sera containing 100 ng hIgA diluted in 3% BSA-PBS were added for 2 hours at 37 °C. After washing, wells were incubated with biotinylated lectins: HAA (*Helix aspersa* binding

GalNac, EY Laboratories) and MA-II (*Maackia amurensis* binding-*N*-acetylneuraminic acid, Vector Laboratories). ExtrAvidin coupled to alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich) was added for 1 hour at room temperature. Alkaline phosphatase activity was revealed as above. Lectin OD was normalized to the corresponding IgA OD and results were expressed as OD (HAA)/OD (IgA) or OD (MA)/OD (IgA).

8- Western blots

For detection of monomeric and polymeric IgA1, 30 ng plasma IgA1 were subjected to electrophoresis on a 12% polyacrylamide gel (Biorad) under non-reducing conditions. Proteins were then transferred to PVDF membranes (GE Healthcare). The human α -chain was detected using an HRP-linked goat anti-human IgA antibody (Southern Biotech; 732605). Membranes were developed by enhanced chemiluminescence detection system (ECL) according to the manufacturer's instructions (Biorad).

9- Kidney glomeruli isolation:

Mice were anesthetized *i.p.* (ketamine and 2% xylazine) and perfused with Dynabeads (Invitrogen). Briefly, Dynabeads were washed with 0.1% BSA PBS (pH=7.4) and blocked with 0.1% BSA, 0.2M Tris (pH=8.5) overnight at 37°C. Then, 40 ml Dynabeads at a concentration of 3×10^7 beads/ml HBSS (Gibco) were injected per mouse at a constant flow rate. Following perfusion, kidneys were removed, minced into small pieces and digested with Dnase I and collagenase V (1 mg/ml; Sigma Aldrich) for 40 min at 37°C. Digested tissue was filtered through a 100 μ m cell strainer (Fisherbrand) and washed with HBSS. Extracted glomeruli containing Dynabeads were isolated by a magnetic particle concentrator (Invitrogen), washed three times with HBSS and then counted by light microscopy. One aliquot of extracted glomeruli was kept in QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN) at -80°C until use. The other part was used for glomerular hlgA elution. Pooled glomeruli were lysed on ice using Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (Santa Cruz) containing a protein inhibitor cocktail (Sigma) and then supernatants were collected after 15 min centrifugation 14000 g at 4°C.

10- Autoimmunity, autoreactivity and polyspecificity tests:

To test the presence of anti-ds DNA hlgA, hlgA polyspecificity and autoreactivity respectively, 0.5 μ g/ml calf thymic DNA (Sigma), 10 μ g/ml rabbit immunoglobulin fraction (Dako; X0903) or 10 μ g/ml wild type mouse kidney lysate were coated on 96-well plates overnight at 4 °C. Plates were blocked for 30 min at room temperature in 3% BSA/ PBS, then washed with 0.01% Tween-20 in PBS. Diluted serum samples and glomeruli lysates were added to plates and incubated at 37°C for 2 hours. Plates were washed with 0.01% Tween-20/PBS and further incubated with AP-conjugated goat anti-mouse kappa light chain (Southern Biotech; 1050-04) for 1 hour at room temperature and revealed with pNPP.

11- RNA sequencing:

Total RNA were extracted from purified kidney glomeruli using miRNeasy mini kit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol. RNA quality and quantity were verified with Agilent bioanalyzer. Samples were sequenced on the Illumina NextSeq500 at Nice-Sophia-Antipolis Functional Genomics Platform, France. The obtained libraries of sequences (reads) were aligned with STAR on the mm10 genome. Biological comparison was done using IPA (QIAGEN).

12- Statistics:

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software. Data were shown as means \pm SEM of the indicated number of values. Non-parametric Mann-Whitney test was performed to compare different groups of mice and P-value < 0.05 was considered significant. For RNA seq results, normalization and differential analysis were obtained using the DESeq2 package in R.

13- Study approval:

All animal experiments followed European regulations (applied in France by decree no. 2013-118 of February 1, 2013 on the protection of animals used for scientific research). Animals were housed in the Limoges animal facility (Agreement N° B87-085-05).

Author contributions:

B.W., C.O., A.H. and E.C. performed the experiments. B.W., C.O., F.B., F.P., M.C. and J.C.A. analyzed the data. M.C., J.C.A. and A.D. conceived the study. M.C., J.C.A., Y.E. and B.B. supervised the study. B.W., J.C.A., M.C. and J.M. wrote the manuscript.

Acknowledgments:

This study was supported by grants from Région Nouvelle-Aquitaine (appel d'offre 2017), Chaire d'Immuno-pathologie des Maladies Rénales - Limoges University and Association Limousine pour l'Utilisation du Rein Artificiel à Domicile (ALURAD). B.W. was supported by a doctoral fellowship from Lebanese University and Lebanese National Council for Scientific Research. We thank Sylvie Desforges for excellent technical assistance, Cendrine LeCardeur for kidney section preparation, Claire Carrion for expert help with microscopy and image analysis, Dr. Hélène Chable from the Biochemistry department in CHU Dupuytren for urinalysis, Alain Chaunavel from the anatomy-pathology department for histology staining assistance and Laetitia Magnol from Faculty of Sciences - Limoges University for creatinine analysis.

References:

1. Wyatt RJ, Julian BA. IgA Nephropathy. *N Engl J Med.* 2013;368(25):2402-2414. doi:10.1056/NEJMra1206793
2. Varis J, Rantala I, Pastemack A, et al. Immunoglobulin and complement deposition in glomeruli of 756 subjects who had committed suicide or met with a violent death. *J Clin Pathol.* 1993;46:607-610.
3. Suzuki K, Honda K, Tanabe K, Toma H, Nihei H, Yamagushi Y. Incidence of latent mesangial IgA deposition in renal allograft donors in Japan. *Kidney Int.* 2003;63:2286–2294.
4. Hotta O, Furuta T, Chiba S, Tomioka S, Taguma Y. Regression of IgA nephropathy: A repeat biopsy study. *Am J Kidney Dis.* 2002;39:493-502.
5. Tomana M, Novak J, Julian BA, Matousovic K, Konecny K, Mestecky J. Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *J Clin Invest.* 1999;104:73-81.
6. Floege J, Moura IC, Daha MR. New insights into the pathogenesis of IgA nephropathy. *Semin Immunopathol.* 2014;36(4):431-442. doi:10.1007/s00281-013-0411-7
7. Hou S, Landego I, Jayachandran N, et al. Follicular dendritic cell secreted protein FDC-SP controls IgA production. *Mucosal Immunol.* 2014;7(4):948-957. doi:10.1038/mi.2013.113
8. Duchez S, Amin R, Cogne N, et al. Premature replacement of with immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(7):3064-3069. doi:10.1073/pnas.0912393107
9. Oruc Z, Oblet C, Boumediene A, et al. IgA Structure Variations Associate with Immune Stimulations and IgA Mesangial Deposition. *J Am Soc Nephrol.* January 2016. doi:10.1681/ASN.2015080911
10. Bonaud A, Lechouane F, Le Noir S, Monestier O, Cogné M, Sirac C. Efficient AID targeting of switch regions is not sufficient for optimal class switch recombination. *Nat Commun.* 2015;6:7613. doi:10.1038/ncomms8613

11. Ambruzs JM, Walker PD, Larsen CP. The Histopathologic Spectrum of Kidney Biopsies in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9:265-270. doi:10.2215/CJN.04660513
12. Berthelot L, Papista C, Maciel TT, et al. Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors. *J Exp Med*. 2012;209(4):793-806. doi:10.1084/jem.20112005
13. van Egmond M, van Vuuren AH, Morton HC, et al. Human Immunoglobulin A Receptor (FcaRI, CD89) Function in Transgenic Mice Requires Both FcR g Chain and CR3 (CD11b/CD18). *Blood*. 1999;93:4387-4394.
14. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 2000;102:553–563.
15. Fagarasan S, Muramatsu M, Suzuki K, Nagaoka H, Hiai H, Honjo T. Critical Roles of Activation-Induced Cytidine Deaminase in the Homeostasis of Gut Flora. *Science*. 2002;298:1424-1427.
16. Monteiro RC, Halbwachs-Mecarelli L, Roque-Barreira MC, Noel L-H, Berger J, Lesavre P. Charge and size of mesangial IgA in IgA nephropathy. *Kidney Int*. 1985;28:666-671.
17. Smith AC, Molyneux K, Feehally J, Barratt J. O-Glycosylation of Serum IgA1 Antibodies against Mucosal and Systemic Antigens in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(12):3520-3528. doi:10.1681/ASN.2006060658
18. D'Arrigo I, Cló E, Bergström T, Olofsson S, Blixt O. Diverse IgG serum response to novel glycopeptide epitopes detected within immunodominant stretches of Epstein-Barr virus glycoprotein 350/220: diagnostic potential of O-glycopeptide microarrays. *Glycoconj J*. 2013;30(7):633-640. doi:10.1007/s10719-012-9465-3
19. Hiki Y, Takahashi K, Shimozato S, et al. Protective role of anti-synthetic hinge peptide antibody for glomerular deposition of hypoglycosylated IgA1. *Clin Exp Nephrol*. 2008;12(1):20-27. doi:10.1007/s10157-007-0002-9
20. Saha MK, Julian BA, Novak J, Rizk DV. Secondary IgA nephropathy. *Kidney Int*. May 2018. doi:10.1016/j.kint.2018.02.030

21. Dieleman L, Ridwan B, Tennyson G, Beagley K, Bucy R, Elson C. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology*. 1994;107:(6):1643-52.
22. McCarthy DD, Kujawa J, Wilson C, et al. Mice overexpressing BAFF develop a commensal flora-dependent, IgA-associated nephropathy. *J Clin Invest*. 2011;121(10):3991-4002. doi:10.1172/JCI45563
23. Wang J, Anders RA, Wu Q, et al. Dysregulated LIGHT expression on T cells mediates intestinal inflammation and contributes to IgA nephropathy. *J Clin Invest*. 2004;113(6):826-835. doi:10.1172/JCI200420096
24. Van Der Helm-van Mil AH, Smith AC, Pouria S, Tarelli E, Brunskill NJ, Eikenboom HC. Immunoglobulin A multiple myeloma presenting with Henoch–Schönlein purpura associated with reduced sialylation of IgA1. *Br J Haematol*. 2003;122(6):915–917.
25. Monteiro RC, Moura IC, Launay P, et al. Pathogenic significance of IgA receptor interactions in IgA nephropathy. *Trends Mol Med*. 2002;8(10):464–468.
26. Grossetete B, Launay P, Lehuen A, Jungers P, Bach J-F, Monteiro RC. Down-regulation of Fc alpha receptors on blood cells of IgA nephropathy patients: Evidence for a negative regulatory role of serum IgA. *Kidney Int*. 1998;53:1321–1335.
27. Moura IC, Centelles MN, Arcos-Fajardo M, et al. Identification of the Transferrin Receptor as a Novel Immunoglobulin (Ig)a1 Receptor and Its Enhanced Expression on Mesangial Cells in IgA Nephropathy. *J Exp Med*. 2001;194.
28. Launay P, Grossetete B, Arcos-Fajardo M, et al. Fc α Receptor (CD89) Mediates the Development of Immunoglobulin A (IgA) Nephropathy (Berger’s Disease): Evidence for Pathogenic Soluble Receptor–IgA Complexes in Patients and CD89 Transgenic Mice. *J Exp Med*. 2000;191.
29. Molyneux K, Wimbury D, Pawluczyk I, et al. β 1,4-galactosyltransferase 1 is a novel receptor for IgA in human mesangial cells. *Kidney Int*. 2017;92(6):1458-1468. doi:10.1016/j.kint.2017.05.002
30. van Egmond M, van Vuuren AH, van de Winkel JG. The human Fc receptor for IgA (Fc α RI, CD89) on transgenic peritoneal macrophages triggers phagocytosis and tumor cell lysis. *Immunol Lett*. 1999;68(1):83–87.

31. Lindner C, Wahl B, Föhse L, et al. Age, microbiota, and T cells shape diverse individual IgA repertoires in the intestine. *J Exp Med*. 2012;209(2):365-377. doi:10.1084/jem.20111980
32. Bemark M, Hazanov H, Strömberg A, et al. Limited clonal relatedness between gut IgA plasma cells and memory B cells after oral immunization. *Nat Commun*. 2016;7:12698. doi:10.1038/ncomms12698
33. Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity*. 2016;45(3):471-482. doi:10.1016/j.immuni.2016.09.001
34. Maillard N, Wyatt RJ, Julian BA, et al. Current Understanding of the Role of Complement in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26.
35. Hiemstra P, Gorter A, Stuurman M, Van EL, Daha MR. Activation of the alternative pathway of complement by human serum IgA. *Eur J Immunol*. 1987;17(3):321-6. doi:10.1002/eji.1830170304
36. Roos A, Bouwman LH, van Gijlswijk-Janssen DJ, Faber-Krol MC, Stahl GL, Daha MR. Human IgA Activates the Complement System Via the Mannan-Binding Lectin Pathway. *J Immunol*. 2001;167(5):2861-2868. doi:10.4049/jimmunol.167.5.2861
37. Thurnheer MC, Zuercher AW, Cebra JJ, Bos NA. B1 cells contribute to serum IgM, but not to intestinal IgA, production in gnotobiotic Ig allotype chimeric mice. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003;170(9):4564-4571.
38. Meyer-Bahlburg A. B-1 cells as a source of IgA. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1362:122-131. doi:10.1111/nyas.12801
39. Zhong X, Lau S, Bai C, et al. A novel subpopulation of B-1 cells is enriched with autoreactivity in normal and lupus-prone mice. *Arthritis Rheum*. 2009;60(12):3734-3743. doi:10.1002/art.25015
40. Suchanek O, Sadler R, Bateman EA, Patel SY, Ferry BL. Immunophenotyping of putative human B1 B cells in healthy controls and common variable immunodeficiency (CVID) patients. *Clin Exp Immunol*. 2012;170(3):333-341. doi:10.1111/j.1365-2249.2012.04656.x

41. Griffin DO et al. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21220451>. Accessed July 26, 2018.

II. Article 2

(Preliminary data)

Physico-chemical properties of IgA enable deposition in kidney mesangium

Batoul Wehbi^{1,2}, Christelle Oblet¹, Stanislas Faguer³, Kattel Bathany⁴, François Boyer¹, Valérie Lorin⁵, Hugo Mouquet⁵, Anne Druilhe¹, Etienne Cogné ... Yolla El Makhour⁶, Bassam Badran², Michel Cogné^{1,7} and Jean-Claude Aldigier¹

- 1- UMR CNRS 7276, Limoges University, Limoges, France
- 2- Laboratory of Cancer Biology and Molecular Immunology, Faculty of Sciences I, Lebanese University, Hadath, Lebanon
- 3- Service de Néphrologie et immunologie clinique, CHU Rangueil, Toulouse, France
- 4- CBMN UMR CNRS 5248, Université de Bordeaux, Bordeaux, France
- 5- INSERM U1222, Pasteur Institute, Paris, France
- 6- Environmental Health Research Lab (EHRL), Faculty of Sciences V, Lebanese University, Nabatieh, Lebanon
- 7- Institut Universitaire de France, Paris, France

Correspondence:

Pr. Jean-Claude Aldigier: jean-claude.aldigier@unilim.fr

Pr. Michel Cogné : michel.cogne@unilim.fr

Abstract:

Immunoglobulin A nephropathy (IgAN) is the most frequent form of primary glomerulonephritis worldwide. It is characterized by highly heterogeneous clinical and pathological manifestations and by different long-term outcomes. IgAN pathophysiology is not yet clearly understood. Patients with IgAN develop characteristic IgA-containing immune deposits in the kidney. Deposition of these complexes in the glomerular mesangium produces progressive renal injury. Here we studied the physico-chemical properties of human IgA from a cohort of 28 patients with dysglobulinemia and 28 chimeric IgA from hybridomas. Polymerization, glycosylation profiles and molecular stability of these IgA were determined. Preliminary results showed that degree of polymerization and molecular stability were more important in IgA deposition than the glycosylation profile. Interestingly, IgA prone to deposit had the lowest mutation frequencies in their sequences.

Key words: Immunoglobulin A, IgA nephropathy, mesangial deposition, hinge region, stability, hypermutation, glycosylation.

Introduction:

IgA nephropathy or IgAN was first described by Berger and Hinglais in 1968 when examining renal biopsy specimens from patients (Wyatt and Julian, 2013). The presence of IgA-dominant immune deposits within glomeruli is the hallmark feature of IgAN (Floege et al., 2014).

Since, several studies have been conducted but understanding of the entire IgAN pathophysiology remains incomplete. Deposited IgA show various molecular abnormalities (Oruc et al., 2016). Altered patterns of hinge region glycosylation with increased exposition of N-acetylgalactosamine as well association with certain receptors such as CD89 have already been reported (Berthelot et al., 2012).

We previously showed that circulating IgA quantities, post-translational modifications of the heavy chain and repertoire changes can also modulate the ability of IgA to deposit (Oruc et al., 2016).

Recently, we demonstrated the nephritogenic character of natural IgA in a mouse model lacking somatic hypermutation (Wehbi et al., submitted article). Independently from their polymerization degree or their glycosylation profiles, the low affinity of generated IgA markedly boosts their deposition in the kidney mesangium and thus induces mesangial cell proliferation and thickening.

Here we compare the physico-chemical and immunological properties of human monoclonal IgA from patients with dysglobulinemia, healthy individuals and humanized IgA from hybridomas in order to characterize nephritogenic IgA and to better understand main structural factors leading to their deposition in the context of IgA nephropathy.

Results:

I- Polymeric IgA preferentially deposited in kidney mesangium

IgA samples were collected from patients with IgA nephropathy or IgA myeloma. Nineteen out of 28 patients had undergone renal biopsies. From those having biopsies, 14 patients had IgA deposits present in their kidneys. In this study, we tested the ability of these IgA to deposit in murine kidney mesangium according to a previously described protocol (Oruc et al., 2016). Before injection in mice, and in order to test their degree of polymerization, purified IgA were subjected to western blotting in both reducing and non-reducing conditions. Afterwards, 400 µg IgA were injected intravenously in nude mice. Two hours later, mice were euthanized and kidneys were collected. Immunofluorescence on kidney sections showed that only 8 IgA samples from the 14 patients deposited in the mesangium of nude mice. Notably, IgA that did not show any deposits in biopsy specimens did not also deposit on glomeruli of nude mice. Two IgA from 9 patients without kidney biopsies showed deposition in mice. Results also showed that polymeric IgA tended to deposit more in mice (Figure 1).

II- Chimeric IgA but not their IgG variants were able to deposit

Next, we purified 28 different IgA from hybridoma cultures and injected 400 µg in nude mice as previously described (Oruc et al., 2016). Immunofluorescence on kidney sections revealed that IgA from 7 of the 28 total hybridomas, had the ability to deposit in mice. We also injected the IgG variants of several IgA molecules having the ability to deposit. Interestingly, no IgG deposits were detected in glomeruli whether their corresponding IgA molecules deposited or not in mouse mesangium. Therefore, we suggested that mesangial deposits were only observed with IgA but not with their IgG variants (Figure 1).

III- Deposited IgA displayed enhanced molecular stability

We studied the stability of IgA in solution from patients and healthy individuals using circular dichroism and followed the β-pleated structure of IgA. The denaturation curve showed that the most stable IgA molecules were better able to deposit in mouse kidneys. Similarly, dynamic light scattering showed that IgA molecules able to deposit in the mesangium of nude mouse kidneys were those with the most negative molecular ellipticity (Figure 2).

IV- IgA glycosylation profiles did not affect deposition

We studied the role of glycosylation in the differential deposition of IgA by MALDI-TOFF mass spectrometry. Interestingly, similar patterns of both O- and N-glycans were found in IgA

whether they deposited or not in the mesangium. Glycosylation profiles of IgA purified from patients and produced by hybridomas were also examined by lectin binding assay. Results showed no differences in sialylation and galactosylation between IgA molecules regardless of whether or not they deposited. Altogether, the ability of chimeric IgA to deposit seemed to be independent from their galactosylation and sialylation profiles (Figures 3 and 4).

V- IgA deglycosylation did not affect deposition

To further confirm that glycosylation is not mandatory for IgA deposition, purified IgA molecules from patients and hybridomas were incubated with PNGase, galactosidase and neuraminidase to remove N-glycans, galactose and sialic acid residues respectively. All undigested and deglycosylated IgA molecules were injected into nude mice. Immunofluorescence on kidney sections showed that the IgA deposition was not affected by removal of glycans from the molecule (Figure 5).

VI- Deposited IgA are less mutated

We sequenced the heavy chain region using specific primers for the alpha heavy chain. Preliminary analysis showed that depositing IgA molecules had the lowest mutation rates of their sequences. In contrast, IgA molecules with more mutations lost the ability to deposit. As previously reported in our laboratory (Wehbi et al. submitted article), somatic hypermutation can be potentially implicated in IgA deposition (data not shown).

Discussion:

IgA nephropathy and Henoch-Schölein purpura (HSP) feature IgA mesangial deposition for which the underlying mechanisms remain poorly understood. Deposited IgA are usually polyclonal and showed inconsistent properties. It has been previously reported that nephritogenic IgA are commonly polymeric, negatively charged, poorly galactosylated and more often co-precipitate with Ig, complement components, soluble receptors, autoantibodies or even antigen fragments (Fabiano et al., 2016; Mestecky et al., 2013; Monteiro, 2010; Wyatt and Julian, 2013). Intriguingly, several studies have reported that IgA mesangial deposition can occur during the course of dysglobulinemia and gammopathies (Boumediene et al., 2011) suggesting that monoclonal IgA molecules can share biological and physico-chemical characteristics and thus nephritogenic potential with IgA molecules from IgAN and HSP pathologies.

The present study was designed to assess physico-chemical and immunological properties of monoclonal IgA molecules purified from patients with dysglobulinemia and hybridoma cultures in order to correlate these properties with the deposition potential of IgA molecules.

For that, purified IgA were injected to nude mice in order to determine their potential to yield mesangial deposits in mice after 2 hours as immediate deposition can be sufficient to predict IgA deposition ability over the long term (Oruc et al., 2016).

In IgAN patients, the polymeric/monomeric IgA ratio is increased compared to healthy individuals. Moreover, studies showed that monomeric IgA can be found in mesangial IgA deposits although they are essentially composed of polymeric fractions (Monteiro, 2010; Monteiro et al., 1985). Our results showed that the polymeric fractions of studied IgA had a higher tendency to deposit in the mesangium. In addition, both kappa and lambda light chains were found in monoclonal IgA cases but lambda chains, which are more acidic (Lai et al., 1996) (Boumediene et al., 2011), were more frequently observed in IgAN deposits. The highly anionic charge of IgA has already been reported (Leung et al., 2001; Monteiro, 2010; Monteiro et al., 1985). In previous studies, we reported that monoclonal IgA molecules from a patient with gammopathy (Boumediene et al., 2011) and from hybridoma cultures that deposited in the mesangium (Oruc et al., 2016) contain acidic CDRs suggesting that anionic charges of these domains can promote IgA interactions with mesangial cationic structures. These observations are consistent with previous findings where monoclonal and polyclonal IgA bound cationic polypeptides such as lactoferrin, gliadin and proteinase 3 in several cases of IgAN and HSP (Coppo et al., 1992; Monteiro et al., 1988; Sategna-Guidetti et al., 1992; Zickerman et al., 2000). In the current study, data again showed that the IgA molecules that deposit are more acidic than those lacking this propensity.

Recently, attention has been extensively focused on IgA glycosylation defects as being primordial in the pathogenesis of IgAN (Yanagawa et al., 2014). However, Galactose-deficient (Gd)-IgA molecules alone are not sufficient to cause IgAN manifestations as serum levels of Gd-IgA vary greatly among IgAN patients and IgAN asymptomatic individuals can also have increased Gd-IgA1 levels (Yanagawa et al., 2014)(Gharavi et al., 2008). In our study, we found similar O- and N-glycosylation patterns in analyzed IgA molecules independently from their ability to produce deposits in mice.

Furthermore, recent genomic studies have shown that patients with IgAN have compromised immune responses at mucosal sites (Kiryluk et al., 2013)(Kiryluk et al., 2014). Therefore, somatic hypermutation can modulate IgA affinity and thus IgAN disease activity (Huang et al., 2016). The high pathogenic potency of low-affinity autoantibodies has been previously confirmed (Otani et al., 2012; Fossati-Jimack et al., 1999). We recently described the nephritogenic potential of low-affinity natural human IgA generated in mice lacking Ig affinity maturation and somatic hypermutation (Wehbi et al. submitted article). Here and in agreement with our recent findings, unmutated IgA molecules have a higher potential to yield mesangial deposits in mice and mutation frequencies are inversely correlated with their deposition.

Our data strongly support evidence that monoclonal IgA can possess nephritogenic activity and be implicated in IgA mesangial deposition and glomerular injury. Besides being more stable and resistant to proteolytic clearance, these IgA essentially contain poorly mutated V regions with quasi-germline sequences thus generating particular electrostatic and conformational abnormalities leading to their pathogenic mesangial deposition. This evidence could not only improve our understanding of mesangial IgA deposition but also can help provide novel prognostic and even therapeutic strategies for glomerulonephritis.

Figures:

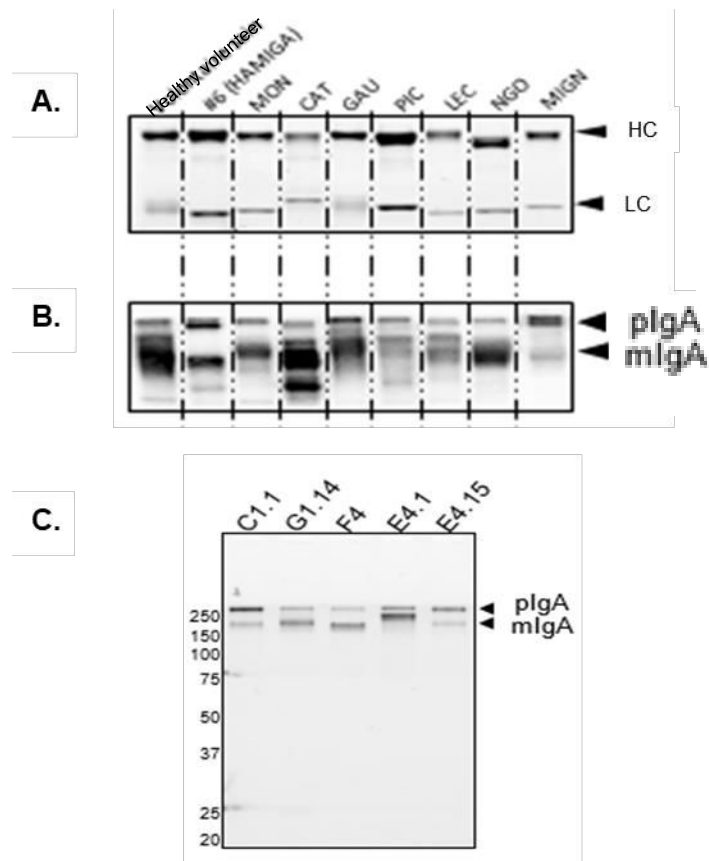
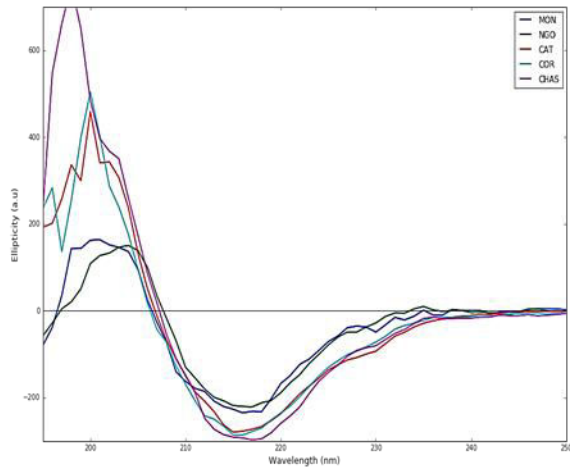


Figure 1: (A) Western blot showing heavy (HC) and light (LC) chains of immunoglobulins from patients and healthy individuals in native conditions; MON, CAT, GAU, PIC, LEC, NGO and MIGN represent tested IgA from patients. (B) Blots showing different monomeric (mlgA) and polymeric (plgA) forms of human and (C) chimeric IgA in non-reducing conditions. Hybridomas clones are designated by C1.1, G1.14, F4, E4.1 and E4.15.

A.



B.

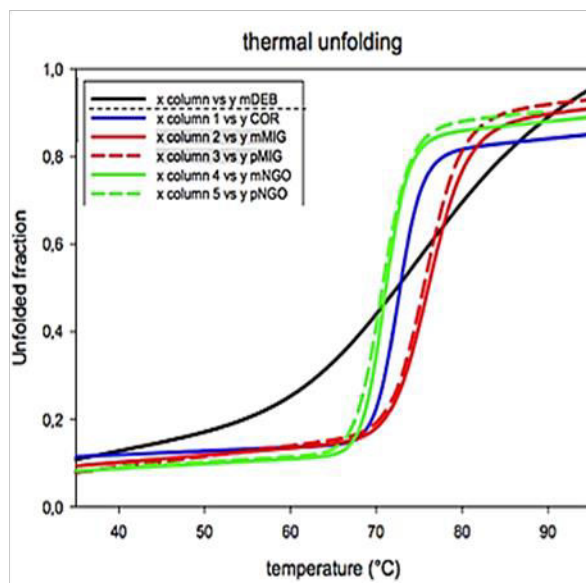


Figure 2: (A) Representative figure for circular dichroism analysis on 5 IgA molecules. **(B)** Representative figure for heat denaturation and pleating analysis conducted on monomeric and polymeric forms of 4 IgA from 4 patients.

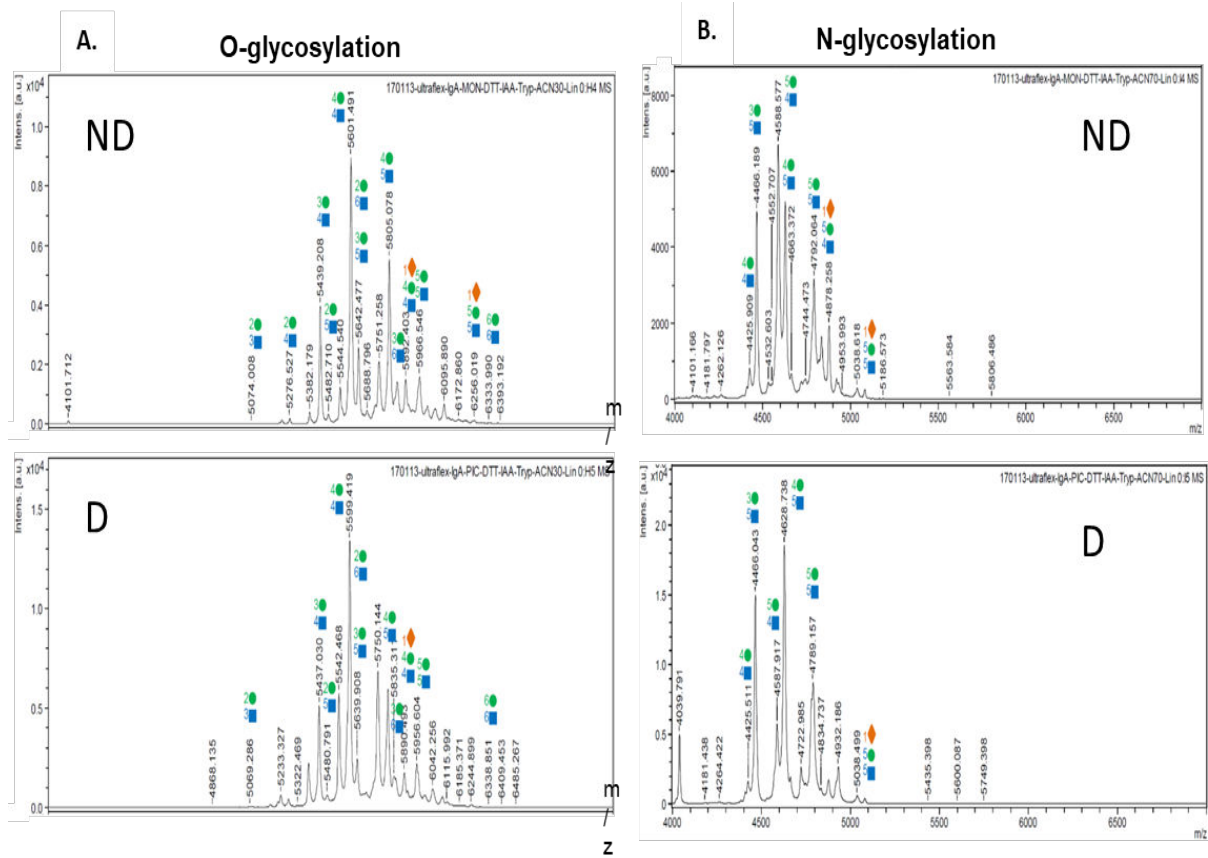


Figure 3: Representative figure for MALDI-TOFF analysis of IgA molecules producing (D) or not (ND) deposits in mouse kidney mesangium. **(A)** O-glycosylation and **(B)** N-glycosylation profiles are shown.

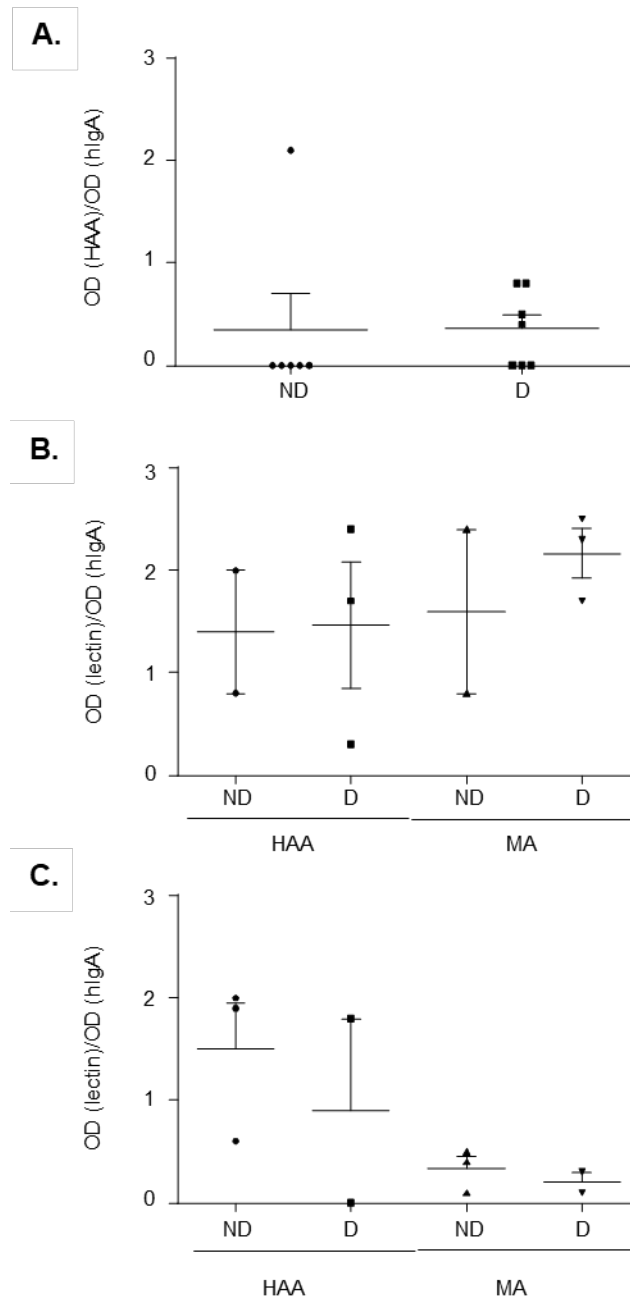


Figure 4: (A) Galactosylation of monoclonal IgA from patients producing deposits (D) or not (ND) in mouse mesangium. **(B and C)** Galactosylation and sialylation of humanized IgA molecules depositing or not in mouse mesangium. OD (HAA or MA) were normalized to OD (hIgA).

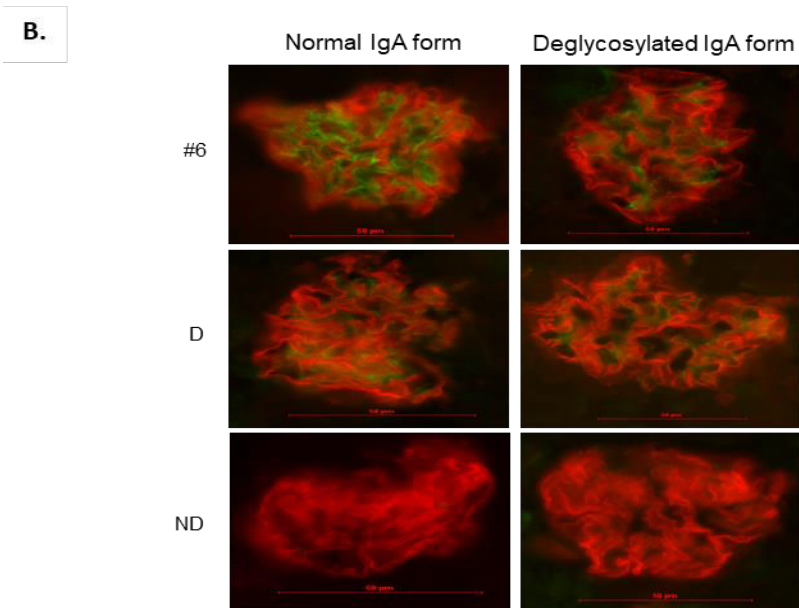
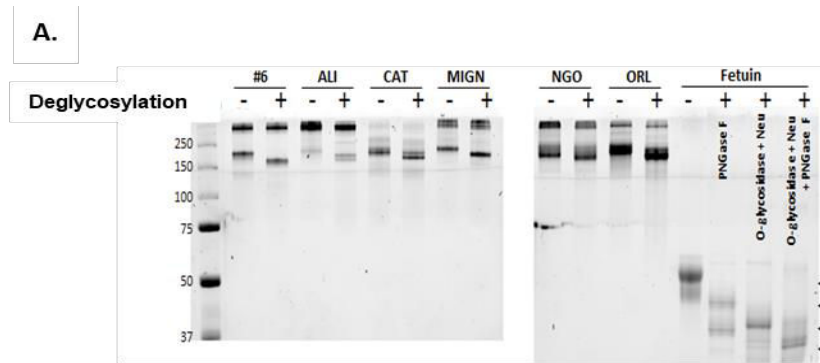


Figure 5: (A) Blots in non-reducing conditions showing shifted bands after deglycosylation of different IgA molecules able or not to deposit; ALI, CAT, MIGN, NGO and ORL indicate tested purified IgA; black arrows indicate shifted fetuin bands after deglycosylation. (B) Representative figures for IgA deposits on kidney mesangium of nude mice of normal or deglycosylated IgA (podocin in red and IgA deposits in green).

Material and methods:

Patients:

Serum samples were collected after obtaining written informed consent from patients with biopsy-proven IgAN, IgA myeloma or healthy controls. The study was approved by the local ethics committee.

Mice:

Hybridomas were produced by B Cell Design (Limoges, France). Human chimeric IgA1 were synthesized using HAMIGA™ technology after cloning the variable region of the IgA1 heavy chain. Swiss Nu/Nu mice were housed in the strict opportunistic and pathogen free zone of the Limoges University animal facility.

hIgA purification and injection in nude mice:

Sera from patients and healthy controls as well as hybridoma supernatants were centrifuged for 5 minutes at 10000 rpm. hIgA were purified using ÄKTA FPLC affinity chromatography (GE Healthcare) and eluted in 0.1M glycine buffer, pH3. Eluted hIgA fractions were then neutralized in 1M Tris buffer, pH9) and concentrated to 2 mg/mL in PBS. 200 µl physiological serum or 400 µg purified hIgA1 were intravenously injected in 8 week-old nude mice (3 mice injected in each condition). Mice were euthanized 2 hours after injection and kidneys were collected.

hIgA deglycosylation:

Purified IgA from patients and healthy individuals were prepared at 1mg/mL in 50mM sodium phosphate, pH 7.5. IgA (800µg) was incubated with a cocktail of Rapid PNGase F (for N-glycan removal; NEB), beta-galactosidase from bovine testis (for galactose removal; Sigma-Aldrich) and neuraminidase from *Vibrio cholera* (for sialic acid removal; Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions during 2 incubation times (3h and 66h) at 37°C. An untreated IgA sample from each patient was used as undigested control. Digested fetuin was used as a control of digestion efficiency. The digestion was controlled by SDS-PAGE in non-reducing conditions.

Illumina next generation sequencing:

IgA repertoire sequencing analysis was done using Illumina Next Seq. Briefly, RNA was extracted from hybridoma cells using GenElute Mammalian Total RNA Miniprep kit (Sigma). RACE reaction was performed using Protoscript II Reverse transcriptase. Amplification of RACE products was performed with Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) according to the manufacturer's protocol. Adapters were then added by primer

extension and the resulting amplicons were sequenced on Illumina Miseq sequencer in Rennes, France. Sequencing results were then analyzed using IMG/High-V-Quest.

Western blot:

IgA1 forms, light chains and deglycosylated IgA were analyzed by Western blotting. hIgA (30 ng) from patients or hybridoma supernatants or 5µl enzyme digestion product were loaded onto 12% polyacrylamide gels (Biorad) under non-reducing conditions. Proteins were then transferred to PVDF membranes (Healthcare). The human alpha and kappa/ lambda light chains were detected using an HRP-linked goat anti-human IgA antibody (Southern Biotech) and HRP anti-human kappa. The shifted deglycosylated IgA were compared to untreated IgA using Stain Free visualization. IgA polymeric and monomeric forms and light chains were visualized by enhanced chemiluminescence detection system (ECL) on ChemiDoc Touch (Biorad).

Kidney processing and IgA deposition analysis:

Nude mice were euthanized by CO₂ two hours after hIgA injection. Kidneys were collected immediately, snap-frozen in isopentane using SNAPFROST® (Excilone) and then stored at -80°C. Kidney sections (8µm) were fixed and labelled with goat F(ab)₂ anti-human IgA (Southern Biotech) and rabbit anti-podocin (Sigma) previously linked to Alexa Fluor 568 (Invitrogen) for 1 hour at 37°C. hIgA deposits were revealed using anti-goat Alexa Fluor 488 secondary antibody (Invitrogen) and observed under an epifluorescent microscope (Nikon).

Lectin Binding Assay:

96-well plates were coated with anti-human IgA (Dako). Plates were blocked with 3% BSA-PBS for 1h. of Patient or supernatant hIgA (100 ng) diluted in 3% BSA-PBS were added and incubated for 2 hours at 37°C. After washing, wells were incubated with biotinylated lectins: HAA (*Helix aspersa* binding GalNac, EY Laboratories) and MA-II (*Maackia amurensis* binding *N*-acetylneuraminic acid, Vector Laboratories). Then, ExtrAvidin coupled to alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich) was added for 1 hour at room temperature. After washing, alkaline phosphatase activity was revealed with p-NPP, and optical density was read at 405 nm. OD of lectin was normalized to OD of the corresponding IgA OD, and results were expressed as OD (HAA)/OD (IgA) or OD (MA)/OD (IgA).

Mass spectrometry analysis:

Purified hIgA1 fractions were reduced and carboxyamidomethylated followed by sequential tryptic and peptide N-glycosidase F digestion and Sep-Pak purification as described. Forty putative O-glycopeptides remaining after PNGase F digestion of the tryptic glycopeptides were

subjected to reductive elimination. Permethylation of glycans, sample cleanup, and MALDI-TOF-MS analysis of permethylated glycans were then performed.

Statistical analysis:

Data are expressed as means \pm SEM of the indicated number of values. Statistical analysis was done using Prism software (GraphPad Software, La Jolla, CA). Significance was calculated with the non parametric Mann–Whitney test.

References:

Berthelot, L., Papista, C., Maciel, T.T., Biarnes-Pelicot, M., Tissandie, E., Wang, P.H.M., Tamouza, H., Jamin, A., Bex-Coudrat, J., Gestin, A., et al. (2012). Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors. *J. Exp. Med.* *209*, 793–806.

Boumediene, A., Oblet, C., Oruc, Z., Duchez, S., Morelle, W., Huynh, A., Pourrat, J., Aldigier, J.-C., and 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*, 3930–3937.

Coppo, R., Amore, A., and Roccatello, D. (1992). Dietary antigens and primary immunoglobulin A nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* *2*, S173.

Fabiano, R.C.G., Pinheiro, S.V.B., and Simões e Silva, A.C. (2016). Immunoglobulin A nephropathy: a pathophysiology view. *Inflamm. Res.* *65*, 757–770.

Floege, J., Moura, I.C., and Daha, M.R. (2014). New insights into the pathogenesis of IgA nephropathy. *Semin. Immunopathol.* *36*, 431–442.

Fossati-Jimack, L., Reininger, L., Chicheportiche, Y., Clynes, R., Ravetch, J.V., Honjo, T., and Izui, S. (1999). High pathogenic potential of low-affinity autoantibodies in experimental autoimmune hemolytic anemia. *J. Exp. Med.* *190*, 1689–1696.

Gharavi, A.G., Moldoveanu, Z., Wyatt, R.J., Barker, C.V., Woodford, S.Y., Lifton, R.P., Mestecky, J., Novak, J., and Julian, B.A. (2008). Aberrant IgA1 Glycosylation Is Inherited in Familial and Sporadic IgA Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* *19*, 1008–1014.

Huang, Z.Q., Raska, M., Stewart, T.J., Reily, C., King, R.G., Crossman, D.K., Crowley, M.R., Hargett, A., Zhang, Z., Suzuki, H., et al. (2016). Somatic Mutations Modulate Autoantibodies against Galactose-Deficient IgA1 in IgA Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* *27*, 3278–3284.

Kirylyuk, K., Novak, J., and Gharavi, A.G. (2013). Pathogenesis of Immunoglobulin A Nephropathy: Recent Insight from Genetic Studies. *Annu. Rev. Med.* *64*, 339–356.

Kirylyuk, K., Li, Y., Scolari, F., Sanna-Cherchi, S., Choi, M., Verbitsky, M., Fasel, D., Lata, S., Prakash, S., Shapiro, S., et al. (2014). Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens. *Nat. Genet.* *46*, 1187–1196.

Lai, K.N., To, W.Y., Li, P.K.T., and Leung, J.C.K. (1996). Increased binding of polymeric λ -IgA to cultured human mesangial cells in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 49, 839–845.

Leung, J.C.K., Tang, S.C.W., Lam, M.F., Chan, T.M., and Lai, K.N. (2001). Charge-dependent binding of polymeric IgA1 to human mesangial cells in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 59, 277–285.

Mestecky, J., Raska, M., Julian, B.A., Gharavi, A.G., Renfrow, M.B., Moldoveanu, Z., Novak, L., Matousovic, K., and Novak, J. (2013). IgA Nephropathy: Molecular Mechanisms of the Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 8, 217–240.

Monteiro, R.C. (2010). The Role of IgA and IgA Fc Receptors as Anti-Inflammatory Agents. *J. Clin. Immunol.* 30, 61–64.

Monteiro, R.C., Halbwachs-Mecarelli, L., Roque-Barreira, M.C., Noel, L.-H., Berger, J., and Lesavre, P. (1985). Charge and size of mesangial IgA in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 28, 666–671.

Monteiro, R.C., Chevaller, A., Noel, L.H., and Lesavre, P. (1988). Serum IgA preferentially binds to cationic polypeptides in IgA nephropathy. *Clin. Exp. Immunol.* 73, 300.

Oruc, Z., Oblet, C., Boumediene, A., Druilhe, A., Pascal, V., Le Rumeur, E., Cuvillier, A., El Hamel, C., Lecardeur, S., Leanderson, T., et al. (2016). IgA Structure Variations Associate with Immune Stimulations and IgA Mesangial Deposition. *J. Am. Soc. Nephrol.*

Otani, M., Junichiro, N., Masao, K., Valérie, L., Solange, M., Yoshinao, W., and Shozo, I. (2012). O-Glycosylated IgA Rheumatoid Factor Induces IgA Deposits and Glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23, 438–446.

Sategna-Guidetti, C., Ferfaglia, G., Bruno, M., Pulitano, R., Roccatello, D., Amore, A., and Coppo, R. (1992). Do IgA antigliadin and IgA anti endomysium antibodies show there is latent coeliac disease in primary IgA nephropathy? *Gut* 33, 476–478.

Wyatt, R.J., and Julian, B.A. (2013). IgA Nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 368, 2402–2414.

Yanagawa, H., Suzuki, H., Suzuki, Y., Kiryluk, K., Gharavi, A.G., Matsuoka, K., Makita, Y., Julian, B.A., Novak, J., and Tomino, Y. (2014). A Panel of Serum Biomarkers Differentiates IgA Nephropathy from Other Renal Diseases. *PLoS ONE* 9, e98081.

Zickerman, A.M., Allen, A.C., Talwar, V., Olczak, S.A., Brownlee, A., Holland, M., Furness, P.N., Brunskill, N.J., and Feehally, J. (2000). IgA myeloma presenting as Henoch-Schönlein purpura with nephritis. *Am. J. Kidney Dis.* 36, e19.1-e19.5.

III. Article 3

Human IgA expression abrogates lupus nephritis in MRL/lpr mice

Batoul Wehbi^{1,2}, Christelle Oblet¹, François Boyer¹ ... Yolla El Makhour³, Bassam Badran², Michel Cogné^{1,4} and Jean-Claude Aldigier¹

6- *UMR CNRS 7276 INSERM 1262, Faculty of Medicine, Limoges University, France*

7- *Laboratory of Cancer Biology and Molecular Immunology, Faculty of Sciences I, Lebanese University, Lebanon*

8- *Environmental Health Research Laboratory, Faculty of Sciences V, Lebanese University, Lebanon*

9- *Institut Universitaire de France, Paris, France*

Conflict of interest:

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Address correspondence to:

Pr. Jean-Claude Aldigier, UMR CNRS 7276, INSERM 1262, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges, France. Email: jean-claude.aldigier@unilim.fr ; phone number: 33 (0) 519 564 274

Pr. Michel Cogné, UMR CNRS 7276, INSERM 1262, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges, France. Email: michel.cogne@unilim.fr ; phone number: 33 (0) 519 564 200

Abstract:

Immunoglobulin A (IgA) is the most abundant secreted isotype in humans and plays pivotal role in immunity at mucosal sites. IgA can display contradictory properties such as activating or inhibiting immune responses depending on different factors such as cytokine environment and interactions with different IgA receptors. In this study, we examined IgA immunoregulatory functions. For that, human IgA1 expression was induced in MRL/lpr mice spontaneously developing systemic lupus erythematosus (SLE). Interestingly, hIgA1 production dramatically extended survival, delayed onset of lymphadenopathy, restored functional renal parameters and mitigated systemic inflammatory responses. Hypersialylated hIgA1 found in elevated levels in plasma is thought to promote anti-inflammatory responses and a protective tolerogenic environment. Our data provide direct evidence pinpointing the crucial anti-inflammatory role of IgA in alleviating lupus pathogenesis.

Key words: Immunoglobulin A - anti-inflammatory - lupus - kidney function

Introduction:

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease that can affect multiple organs including skin, joints and kidneys (Kaul et al., 2016). Currently, SLE treatment is essentially based on non-steroidal anti-inflammatory and immunosuppressive drugs controlling the disease symptoms (Zhang et al., 2018). SLE is characterized by autoantibody production against a variety of nuclear and cytoplasmic self-antigens and by immune complex deposition in various tissues. Immune complex deposition leads to the activation of complement components and to the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines. These factors promote inflammation and fibrosis leading to organ damage. Accumulation of immune complexes in glomeruli induces kidney damage and eventually causes lupus nephritis (LN), the most common form of kidney disease in SLE patients (Hao, 2018). Lupus nephritis features histological changes spanning from mild mesangial proliferation to severe inflammation and end-stage renal disease. Several animal models of SLE have been established to study mechanisms of autoimmunity. The MRL/lpr mouse model is a much-studied model of systemic autoimmunity that closely mimics the human SLE disease. Mice develop massive lymphadenopathy, aberrant T cell proliferation, splenomegaly, hypergammaglobulinemia and glomerulonephritis mediated by immune complex deposition (De Lema et al., 2001; Mandik-Nayak et al., 1999). Normally, Fas-Fas ligand (FasL) interactions control the peripheral elimination of autoreactive lymphocytes (Adachi et al., 1996). MRL/lpr animals carry a spontaneous mutation producing a non-functional Fas receptor. This mutation impairs Fas-FasL apoptotic pathway and therefore, activated autoreactive B cells are persistent in periphery (Hao, 2018). Consequently, these mice develop lymphoproliferation, accelerated auto-immunity (Drappa, 1993) and lupus nephritis. In the late course of the disease, terminal renal dysfunction leads to their death (De Lema et al., 2001).

In humans, immunoglobulin A (IgA) is the most abundantly produced immunoglobulin and is present on mucosal and systemic immune sites. IgA is known for maintaining the integrity of immune barriers by immune exclusion (Monteiro, 2010) but also for its importance in confining bacteria in the gut lumen and shaping the overall composition of the intestinal microbiota (Kaetzel, 2014). Moreover, IgA participates in the maintenance of oral tolerance (Diana et al., 2013); IgA can prevent chronic inflammation despite permanent and intense antigenic stimulation at the digestive level (Kaetzel, 2014). This immunosuppressive activity exceeds the digestive framework to be systemic. In fact, patients affected by an IgA deficiency develop intestinal inflammation as well as autoimmune, allergic and B cell lymphoproliferative disorders (Diana et al., 2013).

In the present study, we explored the effect of IgA-class receptor forced expression on the development of autoimmunity and glomerulonephritis in MRL/Lpr mice by crossing them with $h\alpha 1^{+/+}$ mice producing human IgA (Duchez et al., 2010). We showed that increased production of human IgA (hIgA) by substitution of mouse IgM (Duchez et al., 2010) dramatically improved survival in lupus-prone mice, alleviated autoimmunity and prevented the development of renal damage. These data demonstrated that IgA is important not only for the establishment of intestinal immune homeostasis and immune protection but also for the control of pro-inflammatory and autoreactive B cells clones present in both intestinal and systemic districts.

Results:

hlgA1 expression significantly extended life span of MRL/lpr mice

We induced hlgA1 expression in MRL/lpr mice ($Fas^{-/-}$) by crossing them with the $h\alpha 1^{+/+}$ mouse model. $Fas^{-/-}$ mice are characterized by a rapid and aggressive onset of lupus nephritis leading to high mortality at 20 weeks (Rodriguez et al., 2006). Surprisingly, the survival of obtained $h\alpha 1^{+/+} Fas^{-/-}$ mice was extended for more than 12 months similarly to $h\alpha 1^{+/+}$ mice (Figure 1A). In the absence of Fas-mediated apoptosis, lymphadenopathy was rapidly detected in $Fas^{-/-}$ mice. However, lymphadenopathy onset was delayed in $h\alpha 1^{+/+} Fas^{-/-}$ mice. Starting of 30 weeks, we noted mild adenopathy in double mutant $h\alpha 1^{+/+} Fas^{-/-}$ mice which also showed significantly reduced body weight and splenomegaly (Figure 1 B and C) compared to their $Fas^{-/-}$ littermates at 5 months. Therefore, our data showed that hlgA1 expression delayed lupus clinical manifestations in mice and extended their survival for several months.

$h\alpha 1^{+/+} Fas^{-/-}$ mice manifested decreased autoimmunity

Given that hypergammaglobulinemia and systemic autoimmunity are the characteristic hallmarks of SLE, we assessed circulating immunoglobulins and auto-antibody levels in our mouse models. Except for mlgM which was absent due to $S\mu$ replacement by $h\alpha 1$, all isotypes were produced by $h\alpha 1^{+/+}$ and $h\alpha 1^{+/+} Fas^{-/-}$ mice. Data showed that plasma levels of different isotypes increased progressively with age in all mouse groups (Figure 2). hlgA levels were not significantly different between $h\alpha 1^{+/+}$ and $h\alpha 1^{+/+} Fas^{-/-}$ mice (Figure 2B). Compared to $Fas^{-/-}$ animals, we noticed an approximately 1.5-fold increase in mouse IgA (mlgA) levels at 5 months compared $h\alpha 1^{+/+} Fas^{-/-}$ mice, while total mouse IgG (mlgG) production remained lower than that in lupus-prone mice (Figure 2C and D). These results confirmed that our $h\alpha 1^{+/+} Fas^{-/-}$ mice produced hlgA1 and their ability to undergo isotype class switching was largely unaffected. Anti-Nuclear Antibodies (ANA) and anti-dsDNA antibodies are markers for SLE development. ANA levels (Figure 3A), circulating autoreactive (Figure 3B), polyspecific (Figure 3C), total and IgG anti-ds DNA antibodies (Figure 3D1 and D2) were significantly reduced in $h\alpha 1^{+/+} Fas^{-/-}$ mice in comparison to their $Fas^{-/-}$ littermates. Altogether, these results confirmed that the autoimmune response was markedly delayed with concomitant increased hlgA1 production and decreased pathogenic autoreactive IgG levels in these mice.

$h\alpha 1^{+/+} Fas^{-/-}$ mice presented specific V_H gene repertoire pattern

Repertoire analysis showed that mlgM were significantly highly mutated in $Fas^{-/-}$ mice than in WT mice; the location of the mutations was observed within all the CDR and the FR regions (Figure 4A). hlgA showed similar somatic mutational frequencies in both $h\alpha 1^{+/+}$ and $h\alpha 1^{+/+} Fas^{-/-}$

^{-/-} mice (Figure 4B). Similarly, somatic mutation frequency for mIgG isotype showed no difference between all mouse groups (Figure 5).

Analysis showed also that there was significant differences in the V_H-gene usage between all mouse groups. The V_H1 gene family was significantly highly represented in mIgM⁺ and mIgG⁺ B cells in contrary to V_H4 and V_H9 families that were less frequently used in Fas^{-/-} mice compared to the other mice (Figure 6A and B). However, in hα1^{+/+} Fas^{-/-} mice the hIgA⁺ B cells used more frequently the V_H1 and V_H9 families whereas the V_H3 family was less represented in comparison to hα1^{+/+} mice (Figure 6C).

Kidney functional parameters improved in hα1^{+/+} Fas^{-/-} mice

In order to assess the development of kidney injury we investigated renal biochemical parameters. Interestingly, proteinuria and creatinemia levels were significantly decreased in hα1^{+/+} Fas^{-/-} mice where they almost reached normal basal levels (Figure 7A and B). At 5 months of age, Fas^{-/-} mice showed well-established renal alterations, mostly in glomerular but also in tubulo-interstitial compartments (Figure 7C). Glomerular lesions were characterized by enlarged, hypercellular glomeruli with increased numbers of both resident and infiltrating leukocytes as well as mesangial matrix expansion. Interstitial lesions included the presence of peritubular and pericapillary mononuclear cell infiltrates. Lymphoid cells accumulated in the medulla and around the major renal vessels. At 12 months of age hα1^{+/+} Fas^{-/-} mice showed no glomerular lesions; the glomerulus and interstitium were identical to those observed in hα1^{+/+} mice at the same age. As expected glomerular hIgA deposits were found in higher amounts in hα1^{+/+} Fas^{-/-} than in hα1^{+/+} mice (Figure 7D). Both k-light chain and mIgG glomerular deposits were much less pronounced in hα1^{+/+} Fas^{-/-} than in Fas^{-/-} mice. Similarly, C3 deposit staining was markedly attenuated in hα1^{+/+} Fas^{-/-} mice. Collectively, these data showed that hIgA1 expression was associated with constrained inflammation and an absence of glomerular lesions.

Inflammatory cytokines were differentially expressed in hα1^{+/+} Fas^{-/-} mice

Differential cytokine expression can shift the T_{H2}/T_{H1} balance which is supposed to improve lupus nephritis (De Lema et al., 2004). Systemic mIL-4 levels were significantly increased in hα1^{+/+} Fas^{-/-} compared to their Fas^{-/-} littermates (Figure 8A). hα1^{+/+} Fas^{-/-} splenocytes showed a significant increase in the anti-inflammatory TGF-β transcription rate (Figure 8B) but no difference in other cytokine levels was observed compared to lupus-prone mice (Figure 8C, D and E). Murine IL-10, IL-12 and TNF-α cytokine expression in the kidneys of hα1^{+/+} Fas^{-/-} mice was reduced compared to Fas^{-/-} animals (Figure 9A, B and C) whereas renal TGF-β levels

showed no significant difference between all models (Figure 9D). These data showed that $\alpha 1^{+/+}$ $Fas^{-/-}$ mice had a systemically and locally shifted T_{H2} anti-inflammatory response.

IgA were essentially polymeric and hypersialylated in $\alpha 1^{+/+}$ $Fas^{-/-}$ mice

As the observed difference in clinical features between both mouse strains was associated with forced hIgA production, attention was focused on the mechanisms underlying IgA modulatory effects. Both monomeric and dimeric forms of murine IgA were present in plasma from wild-type mice, whereas lupus-prone mice and $\alpha 1^{+/+}$ mice showed similar molecular forms with monomeric, dimeric and polymeric IgA. By contrast, plasma from $\alpha 1^{+/+}$ $Fas^{-/-}$ mice contained almost exclusively polymeric molecules of mouse IgA (Figure 10A). Concerning human IgA, we noticed that $\alpha 1^{+/+}$ mice produced monomeric and dimeric hIgA. During their first 2 months of life, $\alpha 1^{+/+}$ $Fas^{-/-}$ mice essentially produced monomeric hIgA which is known for its anti-inflammatory effects (Saha et al., 2017). After this age, polymeric hIgA were principally found in the circulation (Figure 10B). IgA glycosylation profiles were also examined. Our data demonstrated that murine IgA contained similar levels of sialylation in all WT, $\alpha 1^{+/+}$, $Fas^{-/-}$ and $\alpha 1^{+/+}$ $Fas^{-/-}$ mice at 5 months (Figure 10C). In contrast, human IgA produced by $\alpha 1^{+/+}$ $Fas^{-/-}$ mice showed a considerable increase in their sialylation levels compared to $\alpha 1^{+/+}$ mice (Figure 10D). Altogether, results showed that $\alpha 1^{+/+}$ $Fas^{-/-}$ mice essentially produced polymeric circulating IgA with significantly increased levels of sialylation.

Discussion:

SLE is characterized by a defect in self-tolerance leading to the emergence, activation and clonal expansion of autoreactive B cells. In SLE patients, lupus nephritis (LN) is a major cause of morbidity and mortality (Zhang et al., 2018). In the current study, we wondered if the forced expression of human IgA (hIgA) could affect SLE and LN evolution. We used the MLR/lpr ($Fas^{-/-}$) mouse model that closely mimics the human SLE disease. We showed that crossbreeding of $h\alpha 1^{+/+}$ mice producing human IgA with $Fas^{-/-}$ mice, dramatically extended the life span of $h\alpha 1^{+/+}$ $Fas^{-/-}$ mice. Lupus prevention in these mice was also associated with the presence of hypersialylated hIgA and the absence of anti-dsDNA antibodies. These observations underscored the potential protective role of IgA expression, which mitigates autoimmunity and alleviates SLE-associated histopathological manifestations and glomerulonephritis.

In SLE, activated reactive B cells are characterized by excessive autoantibody production. In our $h\alpha 1^{+/+}$ $Fas^{-/-}$ model, IgM expression was abolished and replaced by hIgA1; IgG levels also decreased in comparison to lupus-prone mice. The importance of IgG autoantibodies in kidney pathology has previously reported (Jiang, 2008). Although the IgG nephritogenic character in SLE and LN pathogenesis is unblemished, the role of IgM remains controversial. Several studies suggested the protective role of natural IgM autoantibodies in alleviating kidney pathology and other autoimmune disorders such as multiple sclerosis (Schwartz-Albiez et al., 2009), whereas others highlighted the nephritogenic character of IgM autoreactive antibodies (Jiang, 2008).

In lupus-prone mice and SLE patients pathogenic Anti-dsDNA autoantibodies revealed clear signs of somatic hypermutation (SHM) (Schroeder et al., 2013). Activation-Induced cytidine Deaminase (AID)-deficient as well as AID heterozygous MRL/lpr mice showed abrogated or delayed lupus nephritis that correlated with reduced levels of high affinity IgG anti-dsDNA autoantibodies due to reduced hypermutation (Jiang, 2007, 2008). In AID^{g23s} mice where SHM is specifically abolished, SLE-associated histological lesions in MLR/lpr mice were alleviated (Hao, 2018). We recently reported that in a human IgA1 producing model lacking SHM due to AID deficiency, mice did not develop autoimmune disease (Wehbi et al. 2018, submitted). Interestingly, we showed that somatic hypermutation frequency was higher for mIgM in $Fas^{-/-}$ mice. These observations suggest a crucial role for IgA1 expression in controlling autoimmune disorders.

Several observations provide supporting evidence for IgA modulatory and immunoregulatory functions (Schwartz-Albiez et al., 2009). Clinical studies showed that patients with selective IgA deficiency, the most common primary immunodeficiency worldwide, present a high

incidence of allergic reactions and autoimmune disorders (Jacob et al., 2008). Several studies have also demonstrated the anti-inflammatory role of IgA. Indeed, IgA can down-regulate cytokine release, chemotaxis, oxidative burst activity as well as IgG-mediated phagocytosis (Monteiro, 2010).

IgA modulatory functions have been mediated by different IgA receptors. Monomeric IgA binding on CD89 receptor (Fc α RI) leads to partial phosphorylation of CD89-associated Fc γ Receptor (FcR γ) chain and thus to an inhibitory function of the receptor (Diana et al., 2013; Monteiro, 2010). Moreover, in a poly Ig receptor (pIgR) deficient mouse model, hyperreactivity was enhanced due to the lack of secretory IgA (SIgA) (Karlsson et al., 2010). DC-SIGN is another IgA receptor, which is a carbohydrate-recognizing C-lectin receptor. The interaction between DC-SIGN and IgA implicates mannose residues. It has already been reported that *in vivo* treatment with SIgA-DC in mice helped prevent two autoimmune diseases encephalomyelitis and type 1 diabetes suggesting a tolerogenic phenotype of SIgA–DC-SIGN, that through binding to ICAM3 induced the production of large amounts of anti-inflammatory IL-10 and favored the generation of T_{Reg} cells (Diana et al., 2013). As our h α 1^{+/+} Fas^{-/-} mice lack CD89 expression, we can attribute IgA suppressive effects to their interaction with SIGNR1, the analogous of DC-SIGN in mice.

Furthermore, monomeric IgA can induce IL-10 production by human monocytes (Pilette et al., 2010). Reversal of experimental arthritis in CD89 transgenic mice by monomeric IgA was recently reported (Rossato et al., 2015).

Intriguingly, a more recent study reported a direct regulatory function for monomeric IgA on T_{H17} cells implicated in the pathogenesis of several autoimmune, inflammatory and allergic reactions. Monomeric IgA suppressive effects on T_{H17} were associated with expansion of T regulatory cells (T_{Reg}) independently of CD89 and DC-SIGN receptors (Saha et al., 2017). Thus, the balance between T_{H17} and T_{Reg} cells constitutes new paradigm in SLE pathogenesis (Zhang et al., 2018). Activated B cells might also contribute to lupus by presenting antigens and promoting inflammatory environment activating autoreactive T cells (Jiang, 2008).

Glycosylation patterns of immunoglobulins might also affect immune responses by modulating interactions with different receptors. Notably, our h α 1^{+/+} Fas^{-/-} mice synthesized high levels of hypersialylated hIgA1. IgG and IgA display distinct glycosylation profiles. IgA1 is the most glycosylated immunoglobulin. In addition to N- and O-linked glycans in the hinge region, up to 30% of IgA1 Fab fragments contains N-glycans and 90% of IgA1 N-glycans are sialylated (Mattu et al., 1998). Glycosylation profiles are also thought to be implicated in autoimmune pathophysiology. Patients with SLE have altered Ig glycosylation: sialylated Ig are often decreased which promotes pro-inflammatory responses. There is evidence that the DC-SIGN

receptor is implicated in the anti-inflammatory properties of intravenously injected IgG (IVIg) used for therapies (Maverakis et al., 2015). In our model, IgA hypersialylation may have a role in the observed immunosuppressive effect.

In conclusion, we have established for the first time a useful model for the systemic investigation of human IgA immunoregulatory functions. Using this model, we demonstrated the pivotal role of IgA expression in the prevention of SLE and LN development. Subsequently, we spotlighted the promising importance of IgA as therapeutic molecule for the development of innovative strategies for treatment of autoimmune and inflammatory diseases.

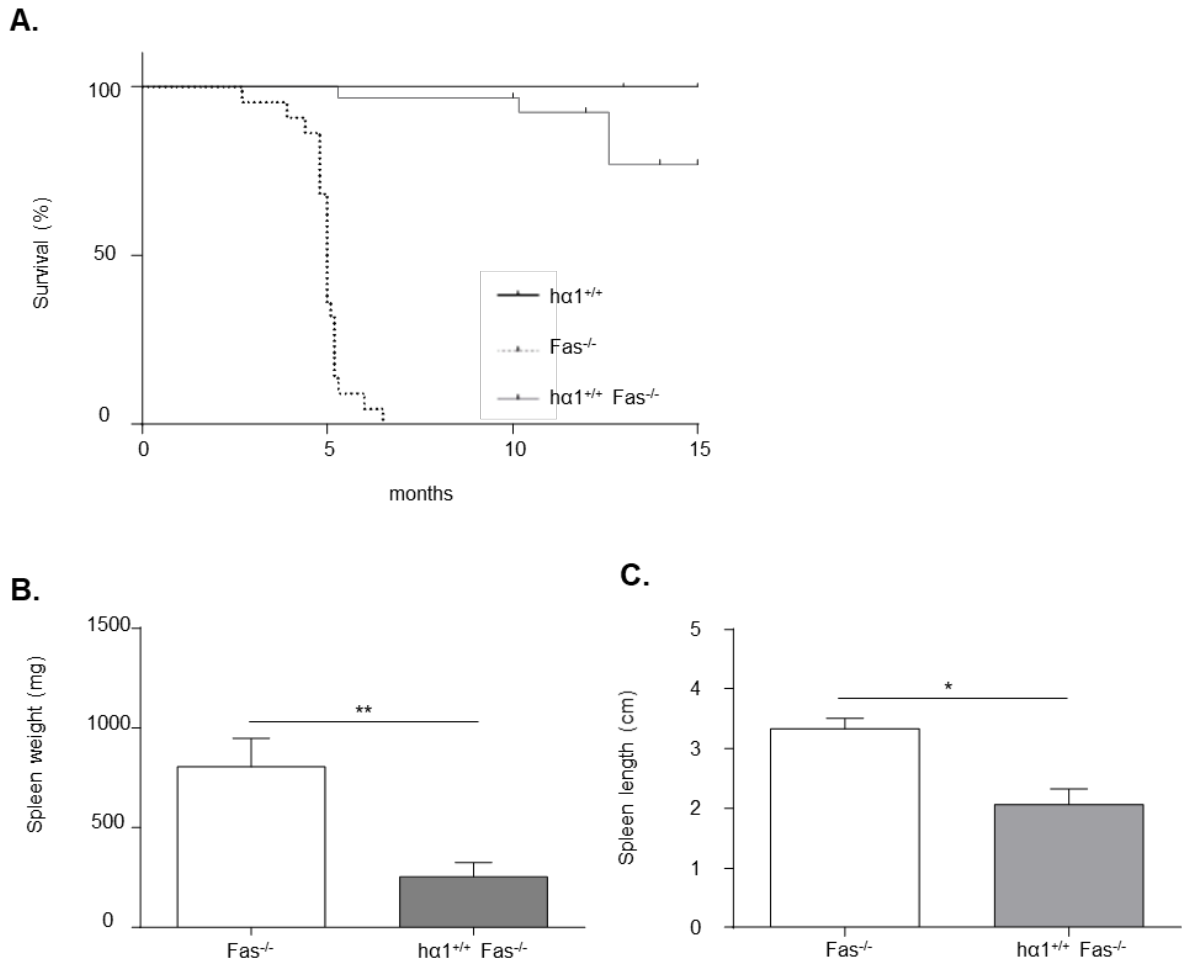


Figure 1: Decreased mortality rate and splenomegaly in hα1^{+/+} Fas^{-/-} mice. (A) Cumulative survival percentage of hα1^{+/+}, Fas^{-/-} and hα1^{+/+} Fas^{-/-} mice monitored for 15 months. **(B and C)** Spleen weight and length recorded for Fas^{-/-} and hα1^{+/+} Fas^{-/-} mice at 5 months. Values are means ± SEM (* p< 0.05 and **p <0.01 using non-parametric Mann-Whitney test).

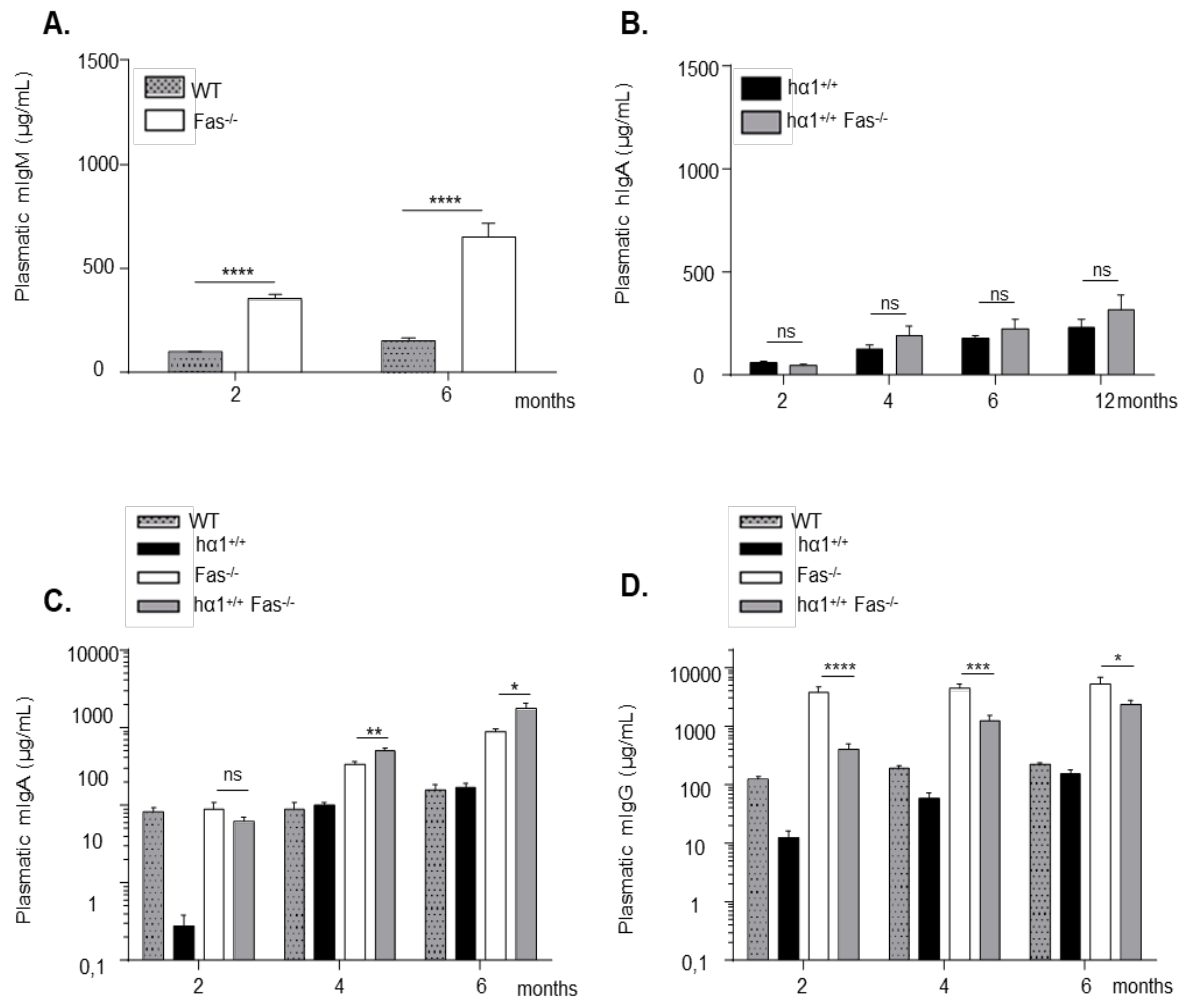


Figure 2: Endogenous immunoglobulin production in mice. (A) Plasma mIgM, (B) hIgA, (C) mIgA and (D) mIgG levels in WT, h α 1^{+/+}, Fas^{-/-} and h α 1^{+/+} Fas^{-/-} mice at 2, 4, 6 and 12 months. Means \pm SEM are presented (ns for non significant, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 and ****p < 0.0001 using Mann-Whitney test).

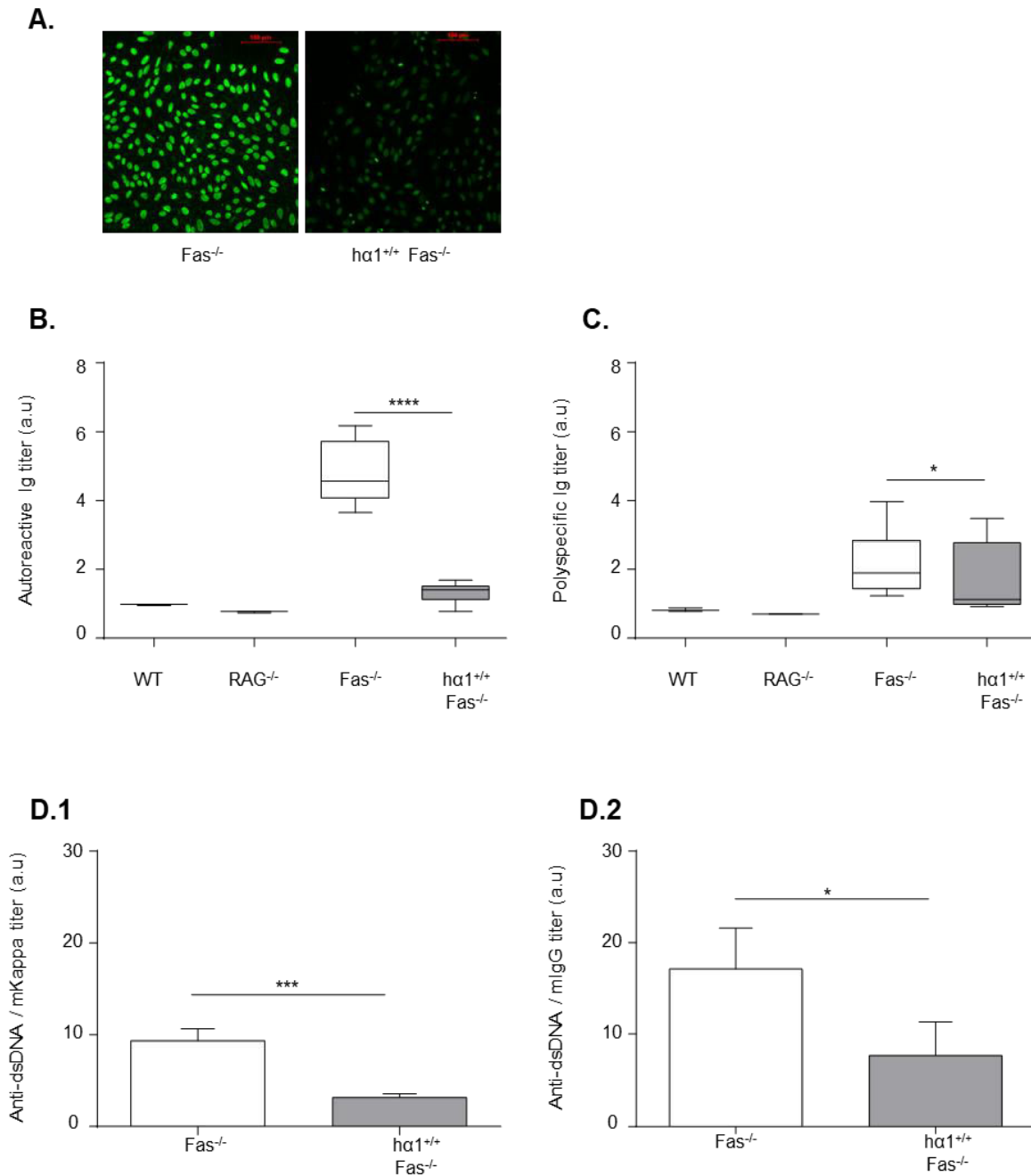


Figure 3: Autoimmunity in $Fas^{-/-}$ and $hc1^{+/+} Fas^{-/-}$ mice at 5 months. (A) Anti-Nuclear Antibodies (ANA) in $Fas^{-/-}$ and $hc1^{+/+} Fas^{-/-}$ mice plasma (representative picture, original magnification 20X). **(B)** Autoreactive and **(C)** polyspecific antibody titer in plasma. WT and $RAG^{-/-}$ mice plasma were used as negative controls. Anti-dsDNA antibody titers in $Fas^{-/-}$ and $hc1^{+/+} Fas^{-/-}$ mice. OD of Ig were normalized to those of kappa light chains in **(D.1)** and murine IgG in **(D.2)** Titer means \pm SEM are presented (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$).

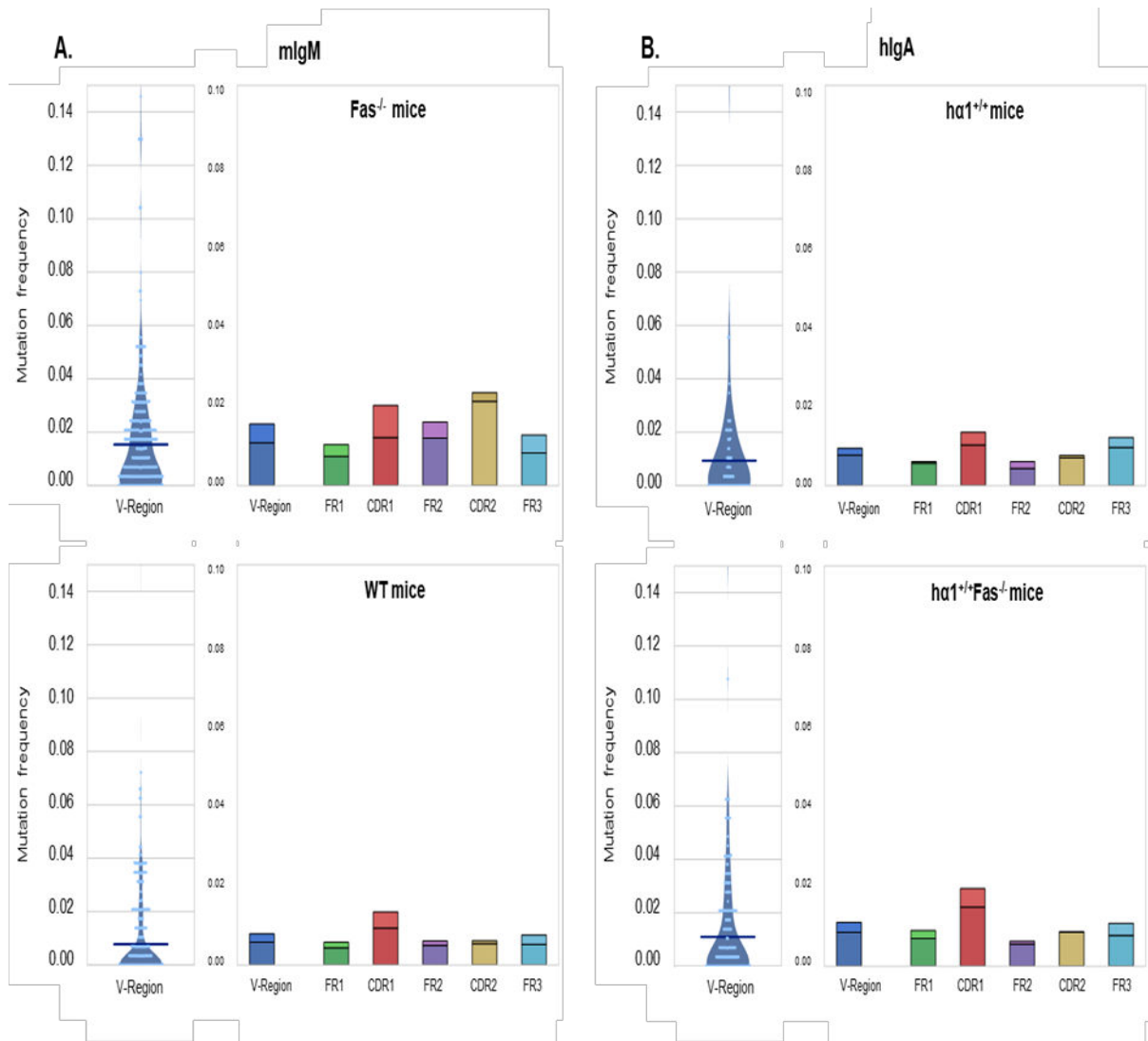


Figure 4: Variable region mutations. Mutation frequency in variable regions of **(A)** mIgM in WT and Fas^{-/-} mice and of **(B)** hlgA in hα1^{+/+} and hα1^{+/+} Fas^{-/-} mice at 5 months (representative figure for n=3 WT mice and n=4 mice from each other model).

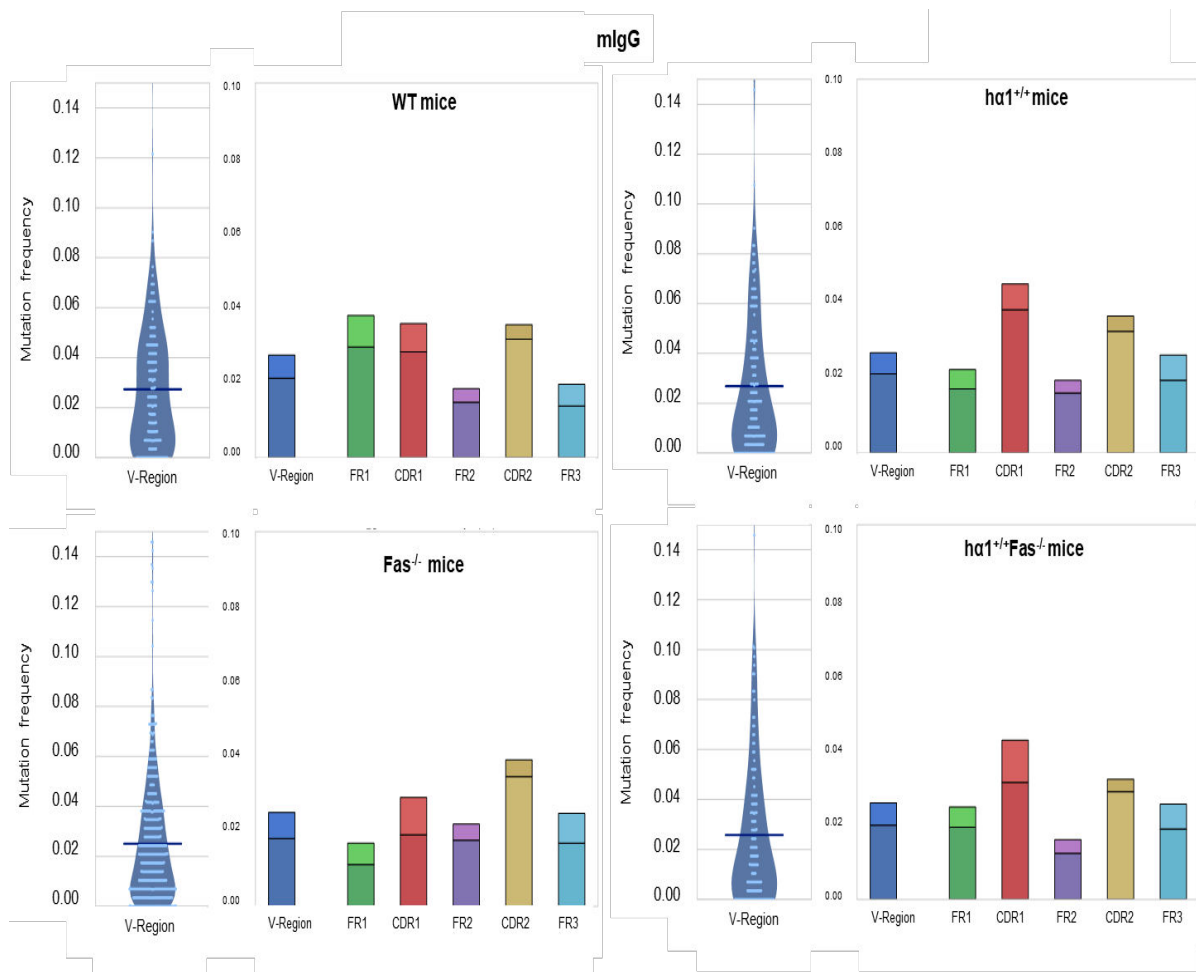


Figure 5: Variable region mutations. Mutation frequency in variable regions of mlgG in WT, Fas^{-/-}, ha1^{+/+} and ha1^{+/+} Fas^{-/-} mice at 5 months (representative figure for n=3 WT mice and n=4 mice from each other model).

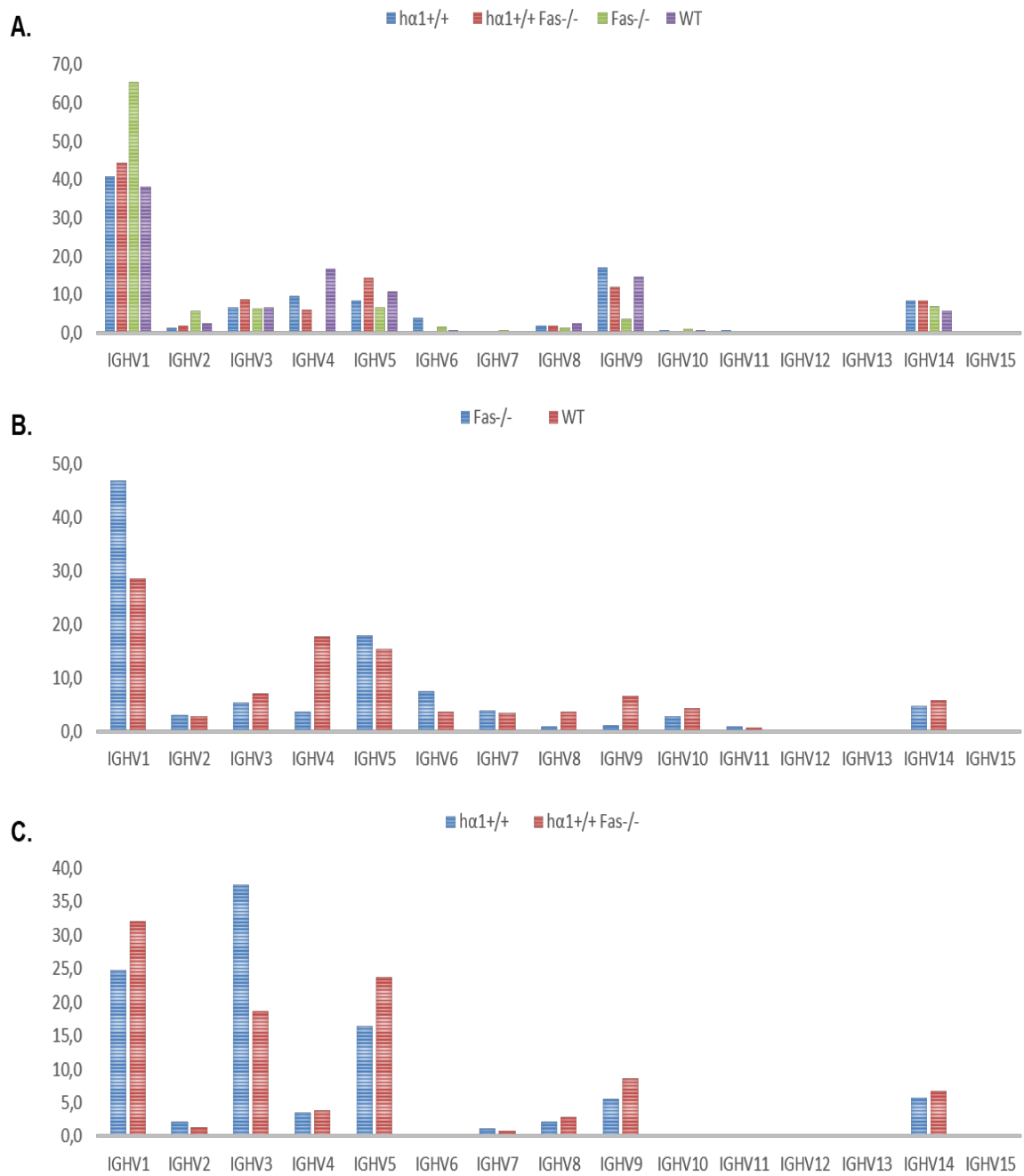


Figure 6: V_H-gene usage. Variable region usage frequency in (A) mIgG, (B) mIgM and (C) hIgA produced in WT, $Fas^{-/-}$, $h\alpha 1^{+/+}$ and $h\alpha 1^{+/+} Fas^{-/-}$ mice at 5 months (representative figure for n=3 WT mice and n=4 mice from each other model).

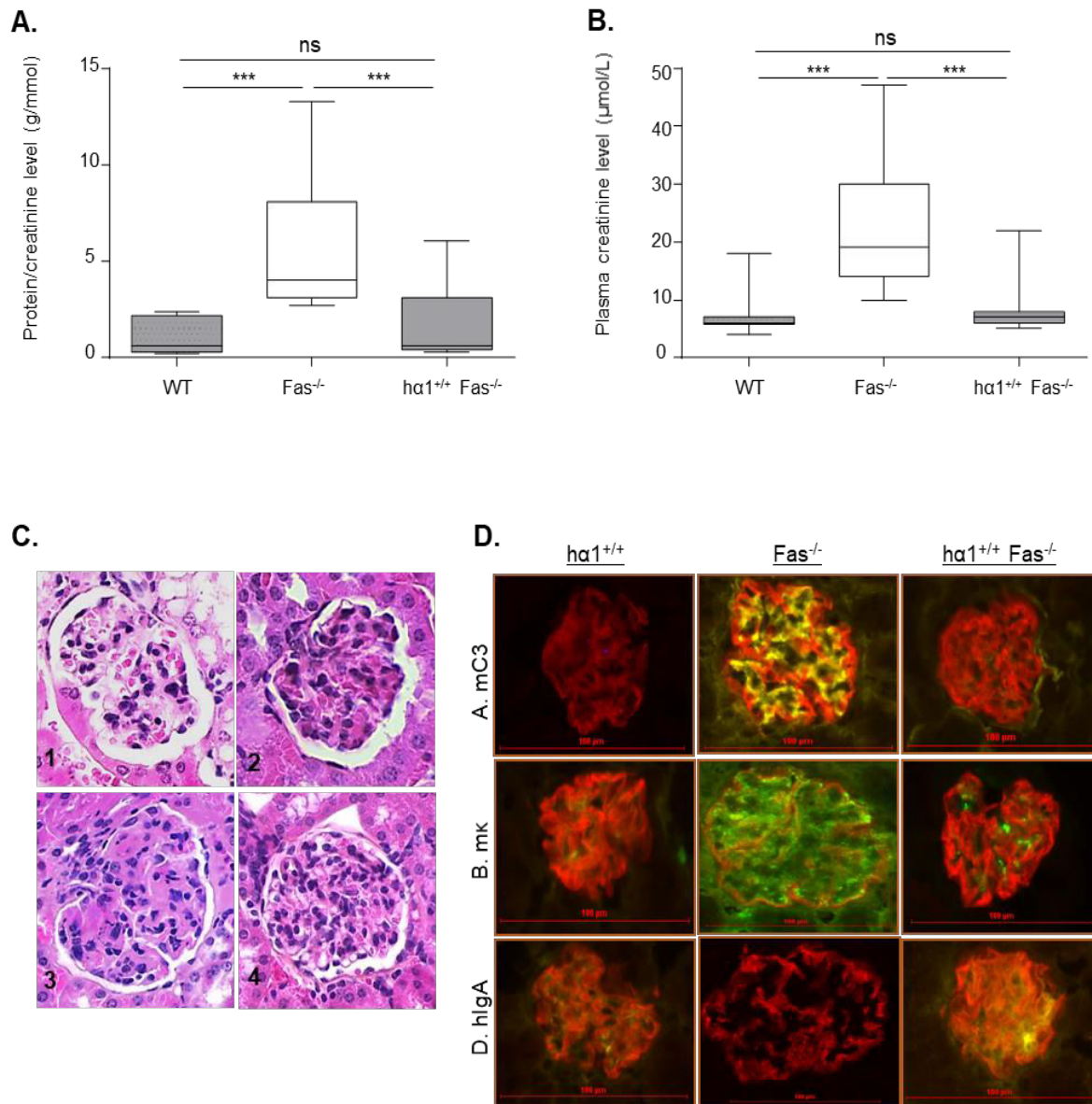


Figure 7: Evaluation of kidney functional parameters in mice at 5 months. (A) Proteinuria and (B) plasma creatinine. Values represent means \pm SEM (** $p < 0.001$). (C) Representative H&E-stained kidney sections from WT (1), hc1^{+/+} (2), Fas^{-/-} (3) and hc1^{+/+} Fas^{-/-} (4) mice. (D) mC3, mkappa and IgA deposits in glomeruli. Representative pictures are shown (400X).

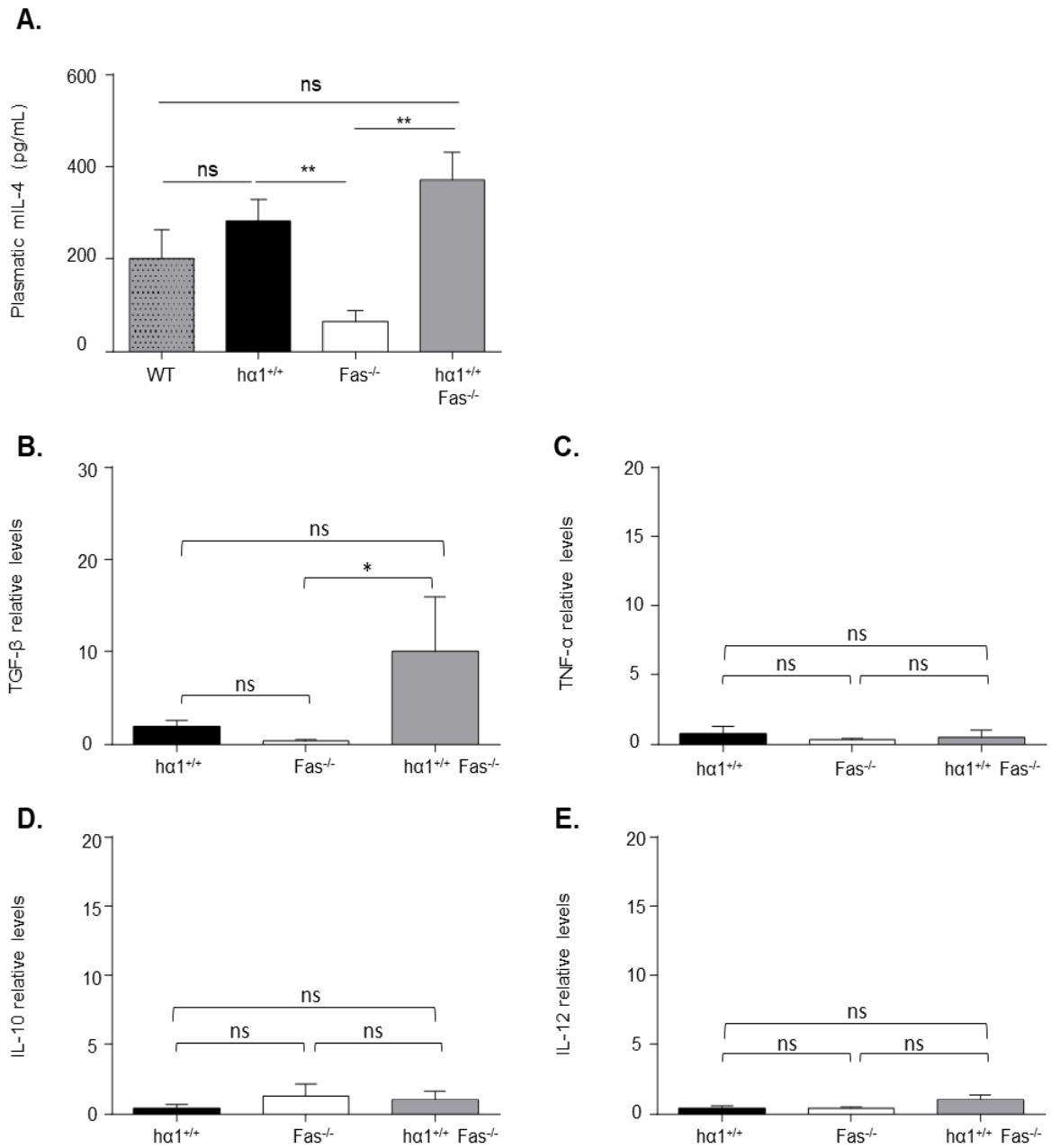


Figure 8: Systemic expression of cytokines and chemokines (A) Circulating of mIL-4 levels in mice assessed by ELISA. Relative **(B)** TGF-β , **(C)** TNF-α, **(D)** IL-10 and **(E)** IL-12 mRNA levels in hα1^{+/+}, Fas^{-/-} and hα1^{+/+} Fas^{-/-} mouse splenocytes assessed by RT-PCR. Relative levels of cytokines were normalized to those in WT mice. Means ± SEM are presented (n=4-6 mice at 5 months; ns= non-significant, * p < 0.05 and **p < 0.01).

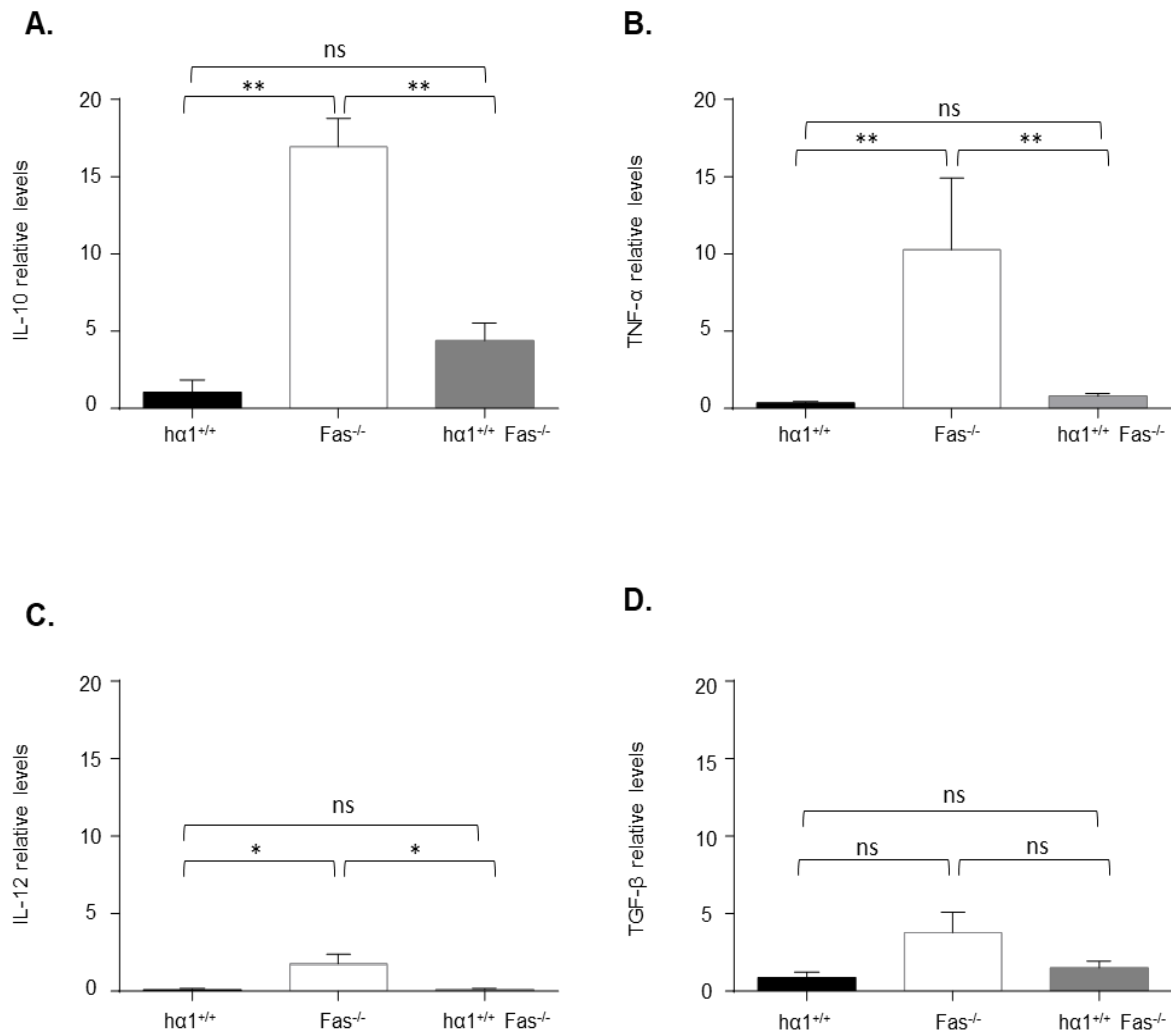


Figure 9: Renal expression of cytokines. (A) IL-10, (B) TNF- α , (C) IL-12 and (D) TGF- β mRNA relative levels in h α 1^{+/+}, Fas^{-/-} and h α 1^{+/+} Fas^{-/-} mouse kidneys assessed by RT-PCR (n=6 mice at 5 months). Relative levels of cytokines were normalized to those in WT mice. Means \pm SEM are presented (ns for non-significant, * p<0.05 and **p<0.01).

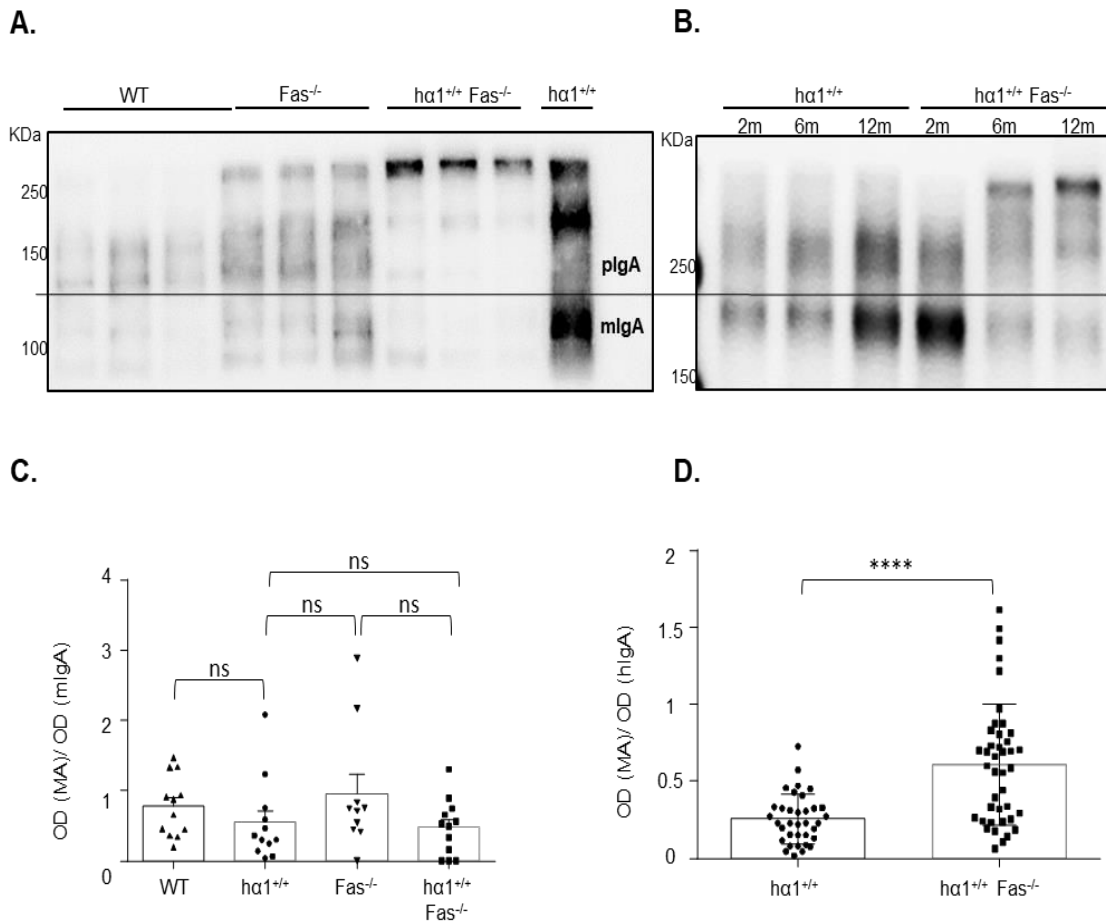


Figure 10: Mouse and human IgA plasma forms and glycosylation profiles. (A) Blots showing murine (at 6 months) and **(B)** human (at 2, 6 and 12 months) IgA monomeric (mIgA) and polymeric (pIgA) forms in WT, $ha1^{+/+}$, $Fas^{-/-}$ and $ha1^{+/+} Fas^{-/-}$ mice. Molecular mass scale is expressed in kilodaltons (kDa). Sialylation levels of **(C)** murine and **(D)** human IgA produced in WT, $ha1^{+/+}$, $Fas^{-/-}$ and $ha1^{+/+} Fas^{-/-}$ mice at 5 months (**** $p < 0.0001$).

Material and methods:

1- Animals:

Mouse procedures were conducted according to the European regulations (applied in France by decree no. 2013-118 of February 1, 2013). All applicable guidelines for animal use and care were followed. WT BALB/c mice were purchased from Janvier. $\alpha 1$ KI mice ($\alpha 1^{+/+}$) producing IgA with human C α 1-constant region (Duchez et al., 2010) were bred with MRL/lpr mice (Jackson Laboratory) characterized by the development of systemic autoimmunity. Heterozygous $\alpha 1^{+/-}$ Fas $^{+/-}$ mice were intercrossed and double homozygous $\alpha 1^{+/+}$ Fas $^{-/-}$ mice were then crossed for several generations. Fas genotype was screened by PCR using genomic DNA isolated from tail snips and plasma hIgA1 production was assessed by ELISA. Mice were bred and maintained in strict opportunistic pathogen free conditions in the animal facility of Limoges University with a 12-hour light and dark cycle and free access to food and water.

2- Survival analysis:

$\alpha 1^{+/+}$, Fas $^{-/-}$ and $\alpha 1^{+/+}$ Fas $^{-/-}$ mouse models (n=20-25 female mice/ genetic background) were monitored for 15 months to evaluate their life span. Mice were euthanized with CO₂ when they reached the moribund stage. Blood and different organs were collected and organs were snap frozen immediately.

3- Plasma immunoglobulin dosage:

Plasma levels of different immunoglobulin isotypes were evaluated by ELISA. Briefly, 96-well plates (Nunc) were coated overnight with rabbit anti-human IgA (Dako), anti-mouse IgM, anti-mouse total IgG or anti-mouse IgA (Southern Biotech). Non-specific sites were blocked with 3% BSA PBS buffer at 37°C for 45 minutes. Diluted plasma samples were added to wells and incubated for 2 hours at 37°C. After 3 washes, wells were incubated with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human IgA, anti-mouse IgM, anti-mouse IgG or anti-mouse IgA (Southern Biotech). Plates were washed, 1 mg/ml of p-nitrophenyl phosphate (p-NPP) was added (Sigma) and alkaline phosphatase activity was blocked with 3N NaOH. Optical density was measured at 405 nm using Multiskan FC photometer (Thermo Scientific).

4- Kidney Ig and mC3 deposits:

To analyze the deposition of immunoglobulins and C3 in glomeruli, kidney tissues were collected immediately after mouse sacrifice, snap-frozen in isopentane using SNAPFROST® (Excilone) and then stored at -80°C. Kidney tissues were cut into 8 μ m sections using cryostat (Leica) and fixed in acetone. Sections were blocked with Fc block and anti-Fc γ R and then incubated 90 min at 37°C with anti-human IgA (Southern Biotech), FITC, conjugated anti-

mouse IgG (Beckman Coulter), anti-mouse kappa light chain (Beckman Coulter) and anti-mouse C3 (Abcam). After 3 washes, sections were incubated in the dark with rabbit anti-podocin (Sigma) linked to Alexa Fluor 568 (Invitrogen) and goat anti-rat Alexa Fluor 647 secondary antibody (Invitrogen). Washing steps and antibody dilutions were performed in PBS. Nuclei were stained with Dapi before mounting with Mowiol 4-88 solution (Sigma). Sections were visualized under epifluorescent microscope (Nikon).

5- Renal histology:

Kidneys were fixed in 4% paraformaldehyde for 24h and embedded in paraffin. Sections were cut and processed for hematoxylin and eosin staining by the Anatomy-Histopathology department, Hôpital Dupuytren, CHU Limoges. Histopathological analysis was performed by a renal pathologist blinded for different mice groups to identify kidney lesions.

6- Kidney functional parameters:

Blood and urine samples were collected from age-matched mice at different times. Protein and creatinine levels in urine samples were measured using a Cobas 8000-0-1 analyzer in the Biochemistry department, Hôpital Dupuytren, CHU Limoges. Plasma creatinine levels were quantified by enzyme creatinine assay on the Konelab analyzer (Thermofisher) at the Faculty of Sciences, Limoges.

7- Cytokine expression:

Mouse IL-4 levels were assessed by mIL-4 Quantikine ELISA (R&D Systems) according to the manufacturer's protocol using sera from mice.

Total RNA was extracted from spleen and kidneys using GenElute Mammalian Total RNA Miniprep kit (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1µg total RNA using MultiScribe Reverse Transcriptase and random primers (Applied Biosystems). Quantitative real time PCR was performed with resulting cDNA and specific Taqman q-RT PCR probes using the StepOnePlus Real-time PCR System (Applied Biosystems). The relative abundance of mIL10, mIL12, mTGF-β and mTNF-α was normalized against GAPDH. Results are expressed as relative cytokine levels normalized to those of WT mice.

8- Western blot assay:

For detection of hIgA1 and mIgA monomeric and polymeric forms, 30 ng plasma IgA were subjected to SDS-PAGE (Biorad) under non-reducing conditions and then electrotransferred to PVDF membranes (Amersham). The human and murine α-chains were detected using Horse Radish Peroxidase (HRP)-linked goat anti-human IgA (Southern Biotech) and anti-

mouse IgA (Southern Biotech) antibodies respectively. Immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence detection system (ECL) according to the manufacturer's instructions (Biorad).

9- Circulating anti-ds DNA, autoreactive and polyspecific antibodies:

Anti-ds DNA, autoreactive and polyspecific circulating antibodies levels were assessed by ELISA. Briefly, 96-well plates were coated overnight with 1 µg/ml calf thymic DNA (Sigma), 10 µg/ml rabbit immunoglobulin fraction (Dako) or 10 µg/ml wild type mouse kidney lysate. Plates were blocked for 30 minutes at room temperature in 3% BSA-PBS and then washed with 0.01% Tween-20-PBS. Diluted sera were added and incubated at 37°C for 2 hours. Plates were washed with 0.01% Tween-20- PBS and then incubated with AP-conjugated goat anti-mouse kappa light chain or AP-conjugated anti-mouse IgG (Southern Biotech) for 1 hour at room temperature. Absorbance was measured at 405 nm

10- Anti-nuclear antibodies:

Circulating antinuclear antibodies (ANA) were analyzed using Kallestad HEp-2 Cell Line slides (Biorad) according to the manufacturer's instructions. Briefly, diluted plasma were incubated in slide wells coated with HEp-2 cells for 1 hour at 37°C. After washing, anti-mouse kappa biotinylated antibody (BD) was added for 45 min. Following incubation and washing, streptavidin 488nm (Molecular Probes life) was added for 30 min. Finally, nuclei were stained with DAPI and slides were mounted with Mowiol 4-88 solution (Sigma). Images were taken using an Epifluorescent microscope (Nikon).

11- Lectin Binding Assay:

96-well plates were coated with anti-human (Dako) or anti-mouse IgA (Southern Biotech). Plates were blocked with 3% BSA-PBS for 1h. Diluted serum in 3% BSA-PBS was added and incubated for 2 hours at 37°C. After washing, wells were incubated with biotinylated MA-II lectin (*Maackia amurensis* binding-*N*-acetylneuraminic acid, Vector Laboratories). Then, ExtrAvidin coupled to alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich) was added for 1 hour at room temperature. After washing, alkaline phosphatase activity was revealed with p-NPP, and optical density was read at 405 nm. OD of lectin was normalized to OD of the corresponding IgA OD, and results were expressed as OD (MA)/OD (IgA).

12- Repertoire analysis:

Repertoire analysis was performed on total RNA extracted from WT, *hc1^{+/+}*, *Fas^{-/-}* and *hc1^{+/+} Fas^{-/-}* mouse splenocytes using GenElute Mammalian Total RNA Miniprep kit (sigma). Methodology combines 5'RACE PCR, library preparation and sequencing. RACE PCR was

performed on 500 ng RNA with specific hIgA, mIgM and mIgG reverse primers using Protoscript II Reverse Transcriptase (New England Biolabs). Amplification was then performed with Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) according to the manufacturer's instructions. Adapters were added and the resulting amplicons were sequenced on an Illumina Miseq sequencer in Rennes, France. Repertoire analysis was done using the international ImMunoGeneTics information system (IMGT), IMGT/HighV-QUEST Web portal and Python.

13- Statistical analysis:

Data are presented as means \pm SEM of the indicated number of values. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software. Comparison between two conditions was performed with the non-parametric Mann-Whitney test. P-value $<$ 0.05 was considered statistically significant.

Author contributions:

B.W. and C.O. performed the experiments. B.W., C.O., F.B., M.C. and J.C.A. analyzed the data. M.C. and J.C.A. conceived the study. M.C., J.C.A., Y.E. and B.B. supervised the study. B.W., J.C.A. and M.C. wrote the manuscript.

Acknowledgments:

This study was supported by grants from Région Nouvelle-Aquitaine (appel d'offre 2017), Chaire d'Immuno-pathologie des Maladies Rénales - Limoges University and Association Limousine pour l'Utilisation du Rein Artificiel à Domicile (ALURAD). B.W. was supported by a doctoral fellowship from Lebanese University and Lebanese National Council for Scientific Research.

Special thanks to Sylvie Desforges for helpful technical assistance with animals, Cendrine LeCardeur for tissue section preparation and Claire Carrion for expert assistance with microscopy and flow cytometry.

The authors thank Dr. Hélène Chable from the Biochemistry department in CHU Dupuytren for urinalysis, Dr. François Paraf and Alain Chaunavel from the anatomy-pathology department for histology staining assistance and Laetitia Magnol from Faculty of Sciences - Limoges University for creatinine analysis.

We are also grateful to Dr. Jeanne Moreau for editing and commenting on the manuscript.

Bibliography:

Adachi, M., Suematsu, S., Suda, T., Watanabe, D., Fukuyama, H., Ogasawara, J., Tanaka, T., Yoshida, N., and Nagata, S. (1996). Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 2131–2136.

De Lema, G.P., Maier, H., Nieto, E., Vielhauer, V., Luckow, B., Mampaso, F., and SCHLÖNDORFF, D. (2001). Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* *12*, 1369–1382.

De Lema, G.P., Lucio-Cazaña, F.J., Molina, A.N.A., Luckow, B., Schmid, H., de Wit, C.O.R., Moreno-Manzano, V., Banas, B., Mampaso, F., and Schlöndorff, D. (2004). Retinoic acid treatment protects MRL/lpr lupus mice from the development of glomerular disease. *Kidney Int.* *66*, 1018–1028.

Diana, J., Moura, I.C., Vaugier, C., Gestin, A., Tissandie, E., Beaudoin, L., Corthesy, B., Hocini, H., Lehuen, A., and Monteiro, R.C. (2013). Secretory IgA Induces Tolerogenic Dendritic Cells through SIGNR1 Dampening Autoimmunity in Mice. *J. Immunol.* *191*, 2335–2343.

Drappa, J. (1993). The Fas protein is expressed at high levels on CD4+CD8+ thymocytes and activated mature lymphocytes in normal mice but not in the lupus-prone strain, MRL lpr/lpr. *Immunology* *90*.

Duchez, S., Amin, R., Cogne, N., Delpy, L., Sirac, C., Pascal, V., Corthesy, B., and Cogne, M. (2010). Premature replacement of with immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 3064–3069.

Hao, F. (2018). Abrogation of Lupus Nephritis in Somatic Hypermutation Deficient MRL/lpr Mice.pdf. *J. Immunol.* *200*.

Jacob, C.M.A., Pastorino, A.C., Fahl, K., Carneiro-Sampaio, M., and Monteiro, R.C. (2008). Autoimmunity in IgA Deficiency: Revisiting the Role of IgA as a Silent Housekeeper. *J. Clin. Immunol.* *28*, 56–61.

Jiang, C. (2007). Abrogation of lupus nephritis in Activation-Induced Deaminase deficient MRL/lpr Mice. *J. Immunol.* *178*.

Jiang, C. (2008). Activation-induced deaminase heterozygous MRL/lpr mice are delayed in the production of high-affinity pathogenic antibodies and in the development of lupus nephritis. *Immunology* *126*.

- Kaetzel, C.S. (2014). Cooperativity among secretory IgA, the polymeric immunoglobulin receptor, and the gut microbiota promotes host–microbial mutualism. *Immunol. Lett.* *162*, 10–21.
- Karlsson, M.R., Johansen, F.-E., Kahu, H., Macpherson, A., and Brandtzaeg, P. (2010). Hypersensitivity and oral tolerance in the absence of a secretory immune system. *Allergy* *65*, 561–570.
- Kaul, A., Gordon, C., Crow, M.K., Touma, Z., Urowitz, M.B., van Vollenhoven, R., Ruiz-Irastorza, G., and Hughes, G. (2016). Systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Dis. Primer* *2*, 16039.
- Mandik-Nayak, L., Seo, S., Sokol, C., Potts, K.M., Bui, A., and Erikson, J. (1999). MRL-lpr/lpr mice exhibit a defect in maintaining developmental arrest and follicular exclusion of anti–double-stranded DNA B cells. *J. Exp. Med.* *189*, 1799–1814.
- Mattu, T.S., Pleass, R.J., Willis, A.C., Kilian, M., Wormald, M.R., Lellouch, A.C., Rudd, P.M., Woof, J.M., and Dwek, R.A. (1998). The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc α receptor interactions. *J. Biol. Chem.* *273*, 2260–2272.
- Maverakis, E., Kim, K., Shimoda, M., Gershwin, M.E., Patel, F., Wilken, R., Raychaudhuri, S., Ruhaak, L.R., and Lebrilla, C.B. (2015). Glycans In The Immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A Critical Review. *J. Autoimmun.* *0*, 1–13.
- Monteiro, R.C. (2010). The Role of IgA and IgA Fc Receptors as Anti-Inflammatory Agents. *J. Clin. Immunol.* *30*, 61–64.
- Pilette, C., Detry, B., Guisset, A., Gabriels, J., and Sibille, Y. (2010). Induction of interleukin-10 expression through Fc α receptor in human monocytes and monocyte-derived dendritic cells: role of p38 MAPKinase. *Immunol. Cell Biol.* *88*, 486–493.
- Rodriguez, W., Mold, C., Marnell, L.L., Hutt, J., Silverman, G.J., Tran, D., and Clos, T.W.D. (2006). Prevention and reversal of nephritis in MRL/lpr mice with a single injection of C-reactive protein. *Arthritis Rheum.* *54*, 325–335.
- Rossato, E., Mkaddem, S.B., Kanamaru, Y., Hurtado-Nedelec, M., Hayem, G., Descatoire, V., Vonarburg, C., Miescher, S., Zuercher, A.W., and Monteiro, R.C. (2015). Reversal of Arthritis by Human Monomeric IgA Through the Receptor-Mediated SH2 Domain–Containing Phosphatase 1 Inhibitory Pathway. *Arthritis Rheumatol.* *67*, 1766–1777.

Saha, C., Das, M., Patil, V., Stephen-Victor, E., Sharma, M., Wymann, S., Jordi, M., Vonarburg, C., Kaveri, S.V., and Bayry, J. (2017). Monomeric Immunoglobulin A from Plasma Inhibits Human Th17 Responses In Vitro Independent of Fc α RI and DC-SIGN. *Front. Immunol.* 8.

Schroeder, K., Herrmann, M., and Winkler, T.H. (2013). The role of somatic hypermutation in the generation of pathogenic antibodies in SLE. *Autoimmunity* 46, 121–127.

Schwartz-Albiez, R., Monteiro, R.C., Rodriguez, M., Binder, C.J., and Shoenfeld, Y. (2009). Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 158, 43–50.

Zhang, J., Yang, R., Liu, Z., Hou, C., Zong, W., Zhang, A., Sun, X., and Gao, J. (2018). Recent advances in the management of systemic lupus erythematosus. *F1000 Res.* 7.

VI. Article 4

Discrete structural and functional differences between the membrane forms of human IgA1 and IgA2

Zeinab Dalloul¹, Batoul Wehbi^{1,2}, Stéphanie Durand-Panteix¹, Mylène Brousse³, Christelle Oblet¹, Florence Glaudet⁴, Jean-Claude Aldigier¹, Yolla El Makhour², Jeanne Cook-Moreau¹ & Michel Cogné^{1,5}

¹Limoges University, CNRS UMR 7276 and INSERM U1262, CRIBL, Faculty of Medicine, Limoges, France.

²Lebanese University, Immunology Unit MICSU, Faculty of Sciences, Beirut, Lebanon.

³B-cell design, Limoges, France.

⁴CHU Dupuytren, Limoges, France.

⁵Institut Universitaire de France, Paris, France.

Correspondence author: cogne@unilim.fr

ZD and BW contributed equally to this work

Abstract

B lymphocyte survival and function require expression of immunoglobulins (Ig) under the membrane B Cell Receptor (BCR) form, which by itself conveys a tonic survival signal, and supports cell activation upon specific antigen binding at the initiation of antibody responses. There are multiple indications that this signal varies between membrane forms of the various Ig classes. Among the five human Ig classes, IgA is the most abundant isotype mainly produced at the mucosal sites, and further diversified into two IgA sub-classes: a predominant IgA1 and IgA2, which differs in both structure and body distribution. In order to check for differences between these two B-cell populations, we explored various parameters among human circulating B-cells producing IgA, and by comparing two dedicated mouse knock-in models set up in order to promote expression of either human IgA1 or IgA2 on mouse B-lymphocytes. These models were obtained by knocking-in either of the human α genes in place of the endogenous switch μ ($S\mu$) region in the IgH locus. Striking differences appear in these models where IgA2 proved much less efficient than IgA1 to support B-cell survival, then only allowing IgA2 production in B-cells additionally producing a surrogate BCR, i.e. through expression of the LMP2A protein.

Keywords: IgA2, BCR, B cells, α 2KI model.

Introduction

B-lymphocytes express several types of receptors on their cell surface including the B cell receptor or BCR. This receptor is composed of an immunoglobulin associated with the disulfide-linked Ig α /Ig β (or CD79a/CD79b) heterodimer complex. Signal transduction is provided by the intracytoplasmic parts of the CD79a and CD79b which possess ITAM motifs (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). ITAM phosphorylation by BCR-associated kinases after BCR activation induces the signaling cascade within the B lymphocytes (Reth and Wienands, 1997). In humans, there are five classes of immunoglobulins: IgM, IgD, IgG, IgE and IgA. IgA is the main immunoglobulin produced in the mucosa constituting a first line of defense against infectious agents and toxins that invade the organism (Brandtzaeg, 2007). Monomeric, dimeric and polymeric forms of IgA have been identified. These forms are responsible for different functions during the immune response (Woof and Kerr, 2006). Two IgA subclasses are present in humans: IgA1 and IgA2. Circulating IgA only includes IgA1 whereas in the mucosa IgA1 and IgA2 coexist. The main structural difference between IgA1 and IgA2 is the absence of an 18 amino acid sequence in the IgA2 hinge region (compared to IgA1) (Woof and Kerr, 2004). The hinge region of IgA1 contains three to five O-linked carbohydrates which are absent in IgA2 (Rifai et al., 2000a). IgM-to-IgA switch is regulated by multiple cytokines (such as TGF- β and IL-10) and by interaction with T cells (Cerutti, 2008; Defrance et al., 1992).

As previously reported, S μ replacement by the human α 1 gene (α 1KI mice) showed a supportive role for humoral immune responses albeit a reduced number of B lymphocytes. Data also showed that IgA1 promotes activation and differentiation of plasma cells (Duchez et al., 2010a). To date, little is known about the role of IgA2 in conferring specific features to mIgA2⁺ cells compared to mIgM⁺ and mIgA1⁺ cells.

In this study, we checked whether, similarly to α 1 HC, α 2 HC substitution supported lymphopoiesis and modified B cell fate. For this purpose, we generated α 2KI mice by knocking-in the human C α 2 gene downstream of JH (joining gene).

Results

Generation of $\alpha 2$ KI mice

$\alpha 2$ KI mice were generated using the targeting strategy depicted in **Figure 1** and primers are listed in **Table 1**. The secreted and membrane forms of the human $\alpha 2$ HC coding genes were inserted in place of the $S\mu$ gene. The *Neo^R* cassette inserted downstream of the $\alpha 2$ gene and flanked by loxP sites was removed by mating $\alpha 2$ KI mice with E11a Cre transgenic mice.

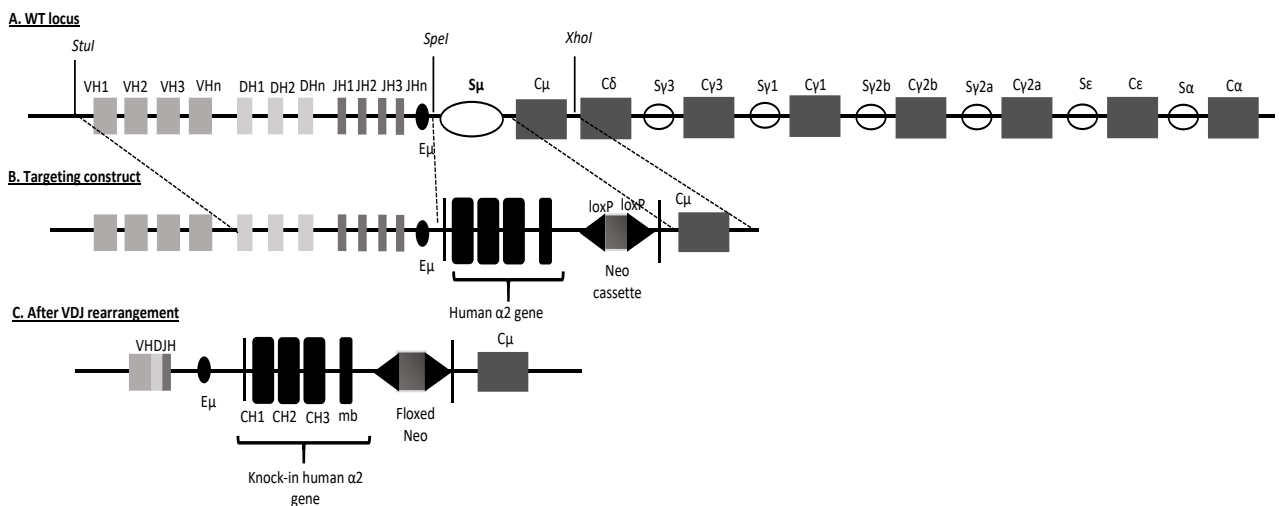


Figure 1: A. Unrearranged WT IgH locus structure. B. Structure of the targeting construct showing the $h\alpha 2$ gene with the floxed neo cassette. C. IgH locus after VDJ recombination and $S\mu$ replacement by $h\alpha 2$ gene in $\alpha 2$ KI mice.

Abnormal B cell development in $\alpha 2$ KI mice

To test $\alpha 2$ HC expression in mutant mice, flow cytometry analysis was conducted on bone marrow and spleen lymphocytes. Results showed that in homozygous $\alpha 2$ KI mice, the percentage of bone marrow B cell was severely decreased whereas it remained normal in heterozygous mice compared to WT. In addition, an expansion in relative percentage of proB/preB cells was observed while immature B cells were largely reduced in number. This can indicate a blockade at the proB/preB to immature B cell transition. Surprisingly, B220+ cells were barely detected in the spleen showing a 16-fold decrease in percentage in homozygous mice but only 2-fold decrease in $\alpha 2$ KI/+ mice. This reduction similarly affected the transitional, follicular and marginal zone B compartments. Consistent with the abolishment of B cell compartments, circulating hlgA2 was barely detectable in $\alpha 2$ KI/+ mice serum but totally absent in $\alpha 2$ KI homozygous mice (data not shown). Due to this low IgA2 production in heterozygous mice and its total absence in homozygous animals, we wondered whether the

human $\alpha 2$ HC did not assemble correctly with the murine light chain and consequently BCR density and functionality were affected. We crossed heterozygous mice with the “knock-In Kappa Switch mice” which expresses a functional human immunoglobulin light chain (hLC) to obtain a fully human IgA. Interestingly, $\alpha 2$ KI/+ KIKS/KIKS mice had increased spleen B populations compared to homozygous $\alpha 2$ KI mice. In addition, these mice showed a significant increase in plasma IgA2 synthesis. Later, we wished to ameliorate IgA2 production, so we tried to improve B cell development in $\alpha 2$ KI/+ mice by crossing heterozygous mice with D_HLMP2AKI mice, where the Epstein-Barr virus LMP2A protein, as a constitutively active BCR, is known to drive B cell development and plasma cell differentiation as previously described (Casola et al., 2004a). As a result for LMP2A survival signals on B cells, progenitor B cells can differentiate into mature B cells. We can observe a slight increase in bone marrow and splenic B cell percentages (**Table 2**).

Table 2: Percentage of different B cells populations in bone marrow and spleen analyzed by flow cytometry.

| | WT | $\alpha 2$ KI/+ | $\alpha 2$ KI/ $\alpha 2$ KI | $\alpha 2$ KI/+; KIKS/KIKS | $\alpha 2$ KI/+; DHLMP2A/+ | $\alpha 1$ KI/ $\alpha 1$ KI |
|--|-------|-----------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Bone marrow | | | | | | |
| B cells (B220+ CD19+) | 44,96 | 44,58 | 22,54 | 40,52 | 16,54 | 21,38 |
| Early | 5,19 | 8,95 | 5,60 | 3,27 | 43,27 | 4,70 |
| Pro-B/pre-B cells (CD43+B220+) | 8,66 | 14,30 | 88,55 | 13,08 | 38,79 | 90,00 |
| Large PreB | 16,12 | 6,61 | 5,79 | 41,06 | 17,03 | 5,24 |
| Small PreB | 24,94 | 11,25 | 0,06 | 4,59 | 0,91 | 0,05 |
| Immature B cells (B220 ^{low} IgM ^{low}) | 45,09 | 58,89 | 0,00 | 38,00 | 0,00 | 0,00 |
| Spleen | | | | | | |
| B cells (CD19+) | 32,73 | 40,22 | 1,16 | 12,47 | 9,08 | 3,08 |
| Transitional B cells (AA4.1+B220+) | 19,25 | 21,34 | 13,12 | 10,18 | 0,00 | 0,00 |
| FO B cells (CD23+CD21+B220+) | 66,73 | 66,38 | 40,01 | 46,68 | 0,00 | 0,00 |
| MZ B cells (CD23 ⁻ /low CD21+B220+) | 11,67 | 9,74 | 7,95 | 40,39 | 98,32 | 19,81 |
| B1b cells (CD5 ^{low} B220+) | 1,57 | 1,61 | 1,31 | 2,34 | 0,00 | 0,00 |
| Breg (CD23 ⁻ /CD21 ^{high}) | 0,27 | 0,27 | 0,22 | 0,22 | 0,50 | 46,47 |
| B1a (CD23 ⁻ / CD21 ^{low}) | 0,51 | 0,67 | 37,39 | 0,20 | 1,17 | 33,72 |

Immunoglobulins production by $\alpha 2$ KI mice

Concerning endogenous Ig production, similarly to $\alpha 1$ KI mice, homozygous $\alpha 2$ KI lacked IgM production as a consequence of S μ replacement with h α chains, whereas normally plasma IgM levels were detected in heterozygous mice (300-400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**Figure 2A**). Excepted for the homozygous $\alpha 2$ KI mice, murine IgG and IgA secretion was not abolished in all α KI mice (**Figure 2B and 2C**). Neither homozygous $\alpha 2$ KI/ $\alpha 2$ KI nor $\alpha 2$ KI/+ KIKS/KIKS mice produced human IgA2. In contrast, hIgA2 levels successfully increased about 45x in heterozygous $\alpha 2$ KI/+ crossed with D_HLMP2AKI mice in comparison with the $\alpha 2$ KI mice with a mean titer of 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figure 2D**).

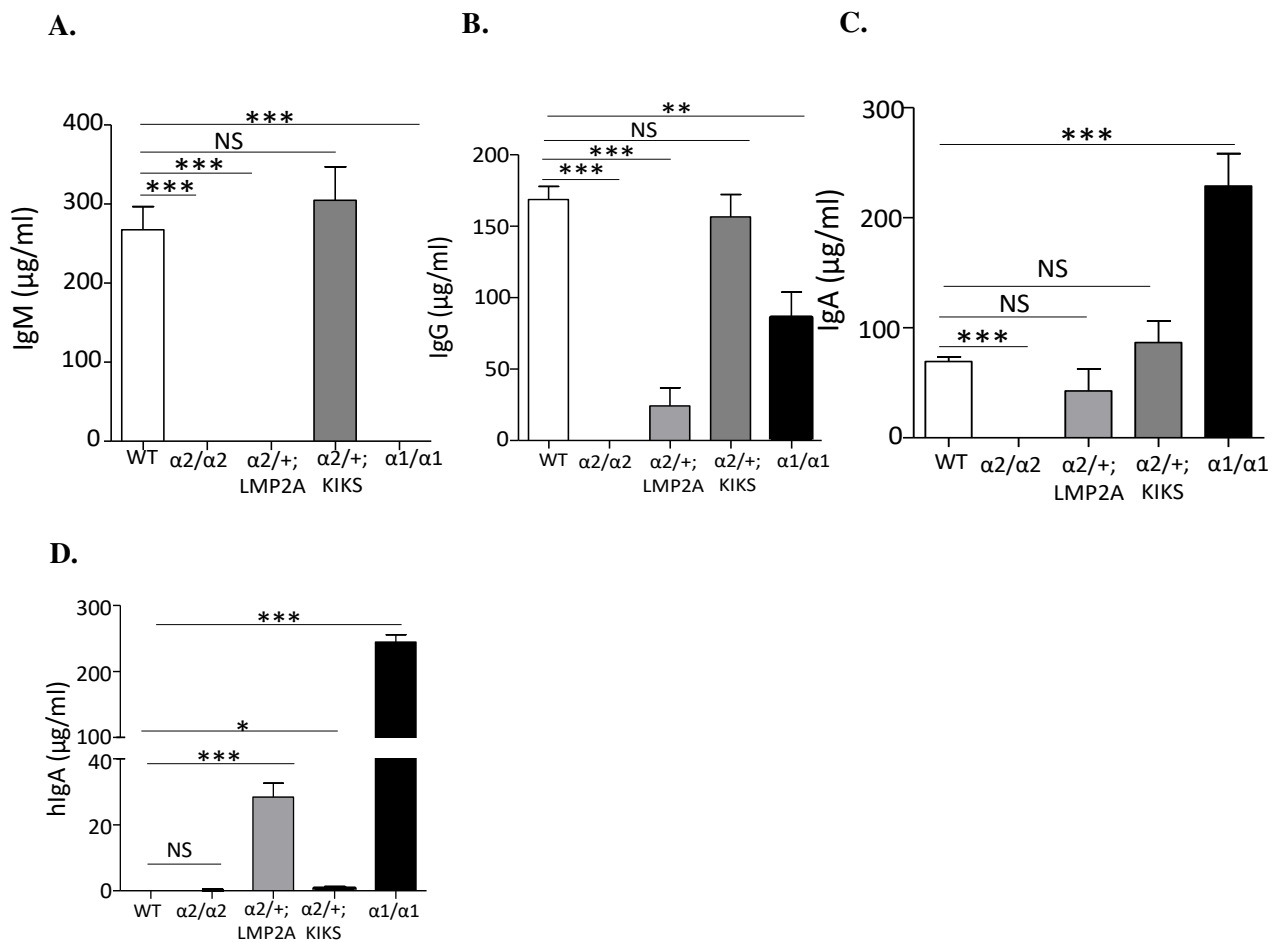


Figure 2: Plasma mIgM (A), mIgG (B), mIgA (C) and hIgA (D) production in different mouse models.

hlgA2+ plasma cell functionality

In order to study mutant B cell functionality and activation, we first investigated their presence in primary and peripheral lymphoid organs. Immunofluorescence on lymphoid tissue sections showed antibody secreting cells (ASCs) in the spleen as well as in the enteric lamina propria with hlgA2 deposits along intestinal crypts of $\alpha 2\text{KI}/+$ D_HLMP2AK1 mice (**Figure 3A**). We next conducted serial *i.p.* immunization of mice with ovalbumin. Despite a slight increase in total hlgA2 plasma levels compared to homozygous mice, no ova-specific IgA2 was found in heterozygous $\alpha 2\text{KI}/+$ LMP2AK1 mice. These data indicate that in these mice, B cells can produce normal IgA2 molecules but they seem to be unable to undergo normal differentiation and to yield antigen-specific hlgA2 (**Figure 3B**).

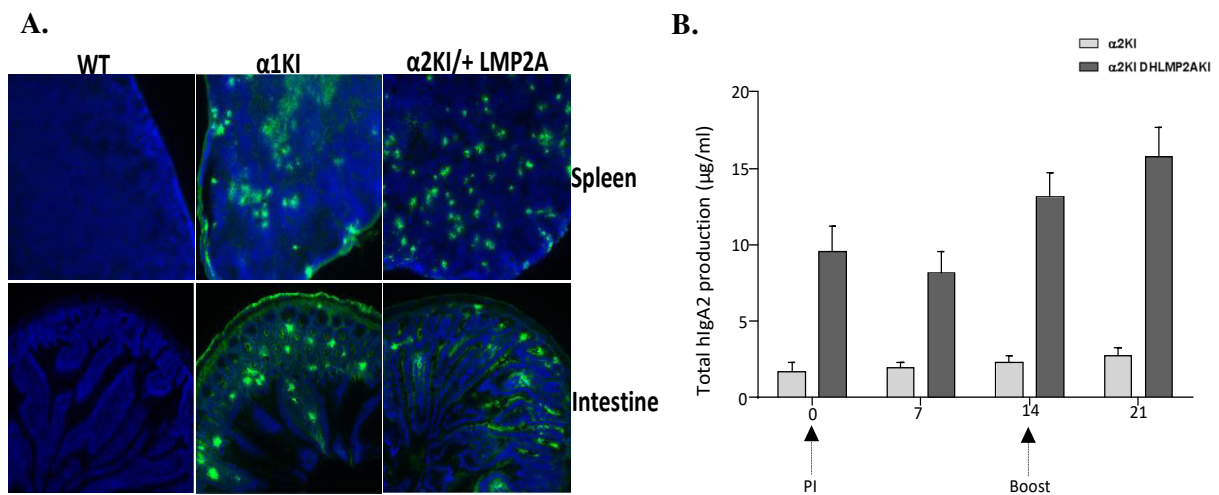


Figure 3: A. Immunofluorescence showing hlgA secreting cells in primary and peripheral lymphoid organs in WT, $\alpha 1\text{KI}$ and $\alpha 2\text{KI}/+$ D_HLMP2AK1 mice. **B.** Total hlgA2 plasma production after *i.p.* ovalbumin immunization of $\alpha 2\text{KI}$ and $\alpha 2\text{KI}/+$ D_HLMP2AK1 mice.

hlgA2 membrane and secreted forms

The membrane anchored α -chain of human IgA exists in two different forms, type I or type II isoforms (220 bp and 238 bp respectively) which are generated after alternative splicing of α -chain mRNA. It has already been reported that isoform type can differ between cells depending on the IgA isotype they produce (Leduc et al., 1997a). We studied the differential expression of type I and type II membrane α -mRNA by RT-PCR on splenocyte mRNA from α 1KI and α 2KI mice.

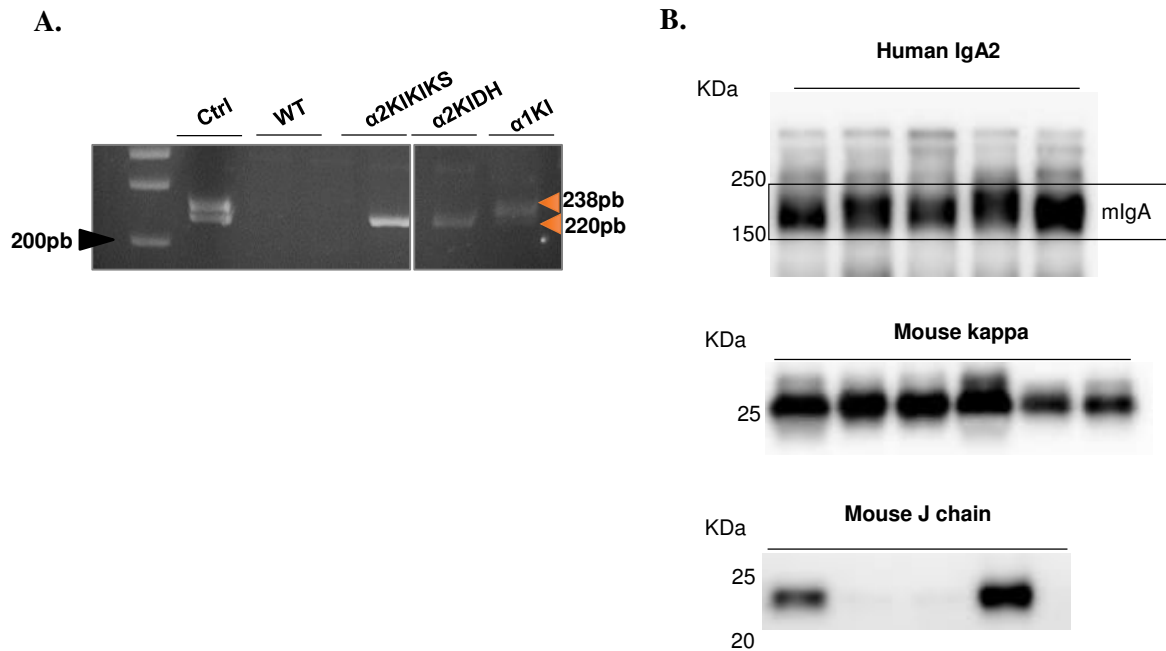


Figure 4: **A.** RT PCR showing 220bp band for hlgA isoform I and 238 bp for hlgA isoform II in different mouse models. Human tonsil extracts were used as positive control (Ctrl). **B.** Human IgA2, mouse kappa-light chain and J chain in α 2KI/+ D_H LMP2AKI mice plasma assessed by western blot.

Human tonsils used as a positive control showed both type I and type II isoforms. α 1KI mice carried both transcript isoforms with slight predominance of the type II whereas the α 2KI mice carried exclusively the type I isoform (**Figure 4A**). On the other hand, western blot analysis allowed us to identify IgA2 monomeric, dimeric and polymeric forms in the plasma of α 2KI mice. These immunoglobulins were normally assembled to kappa-light chain and with J chain in their oligomeric forms (**Figure 4B**). Interestingly, these data are consistent with previously reported findings.

Repertoire analysis of human $\alpha 1$ and $\alpha 2$

The repertoire diversity of both human IgA1 and IgA2 was investigated by Illumina high-throughput sequencing. Total RNA was extracted from patients' peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Results showed that during VDJ recombination, there was no significant difference in V usage by both $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes. In addition, IgHV3 and IgHV4 families seem to be the most frequently used by both α genes (**Figure 5A**). At the same time, V-region hypermutation was assessed; data demonstrated that hypermutation frequency was similar in both $\alpha 1$ and $\alpha 2$ V region. As expected mutational frequency was higher in the CDR than in the framework region (**Figure 5B**).

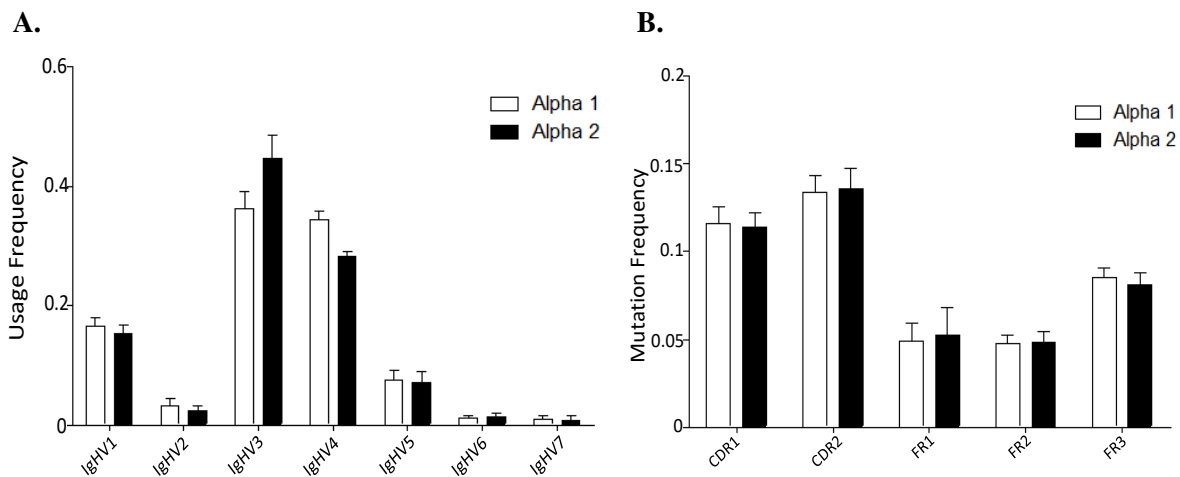


Figure 5: **A.** V usage and **B.** somatic hypermutation frequency in $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes assessed by Illumina sequencing.

Discussion

IgA is the predominant synthesized immunoglobulin in mammals. Human serum is 90% IgA1 but only 10% IgA2, whereas in external secretions, IgA2 can be increased up to 50% (Rifai et al., 2000b). Regulation of differential synthesis of the two IgA subclasses, which can reveal different functionalities, remains poorly understood. In a previous study, we demonstrated that there is differential signaling between IgA1 and IgA2 BCRs (Leduc et al., 1997b). Later, we examined the impact of forced IgA1 expression throughout murine B cell differentiation by knocking in the human C α Ig gene in place of the S μ region (Duchez et al., 2010b). Concerning IgA2 BCR effector functions, little is known about IgA2⁺ cell characteristics compared to IgA1⁺ and IgM⁺ cells. Similarly to α 1KI mice, we recently generated an α 2 knock-in mouse model in which the S μ region was replaced by an C α 2 Ig gene in order to distinguish transgenic IgA2 expression from endogenous murine class switching. In this study, we compared both α 1KI and α 2KI models for membrane and secretory forms of IgA and explored IgA2 BCR contribution to early B cell development and peripheral antigen-dependent maturation.

Homozygous α 2KI mice rapidly revealed a major defect in B cell development in comparison to WT or α 1KI littermates, suggesting that during early B lymphopoiesis, IgA2 pre-BCR or BCR exerts a toxic effect, or delivers insufficiently strong signals for B cell survival. Alternatively, low IgA2 production by heterozygous mice and its total absence in homozygous mice could be due to mis-association of human heavy chain constant domains and the endogenous mouse light chains. Since the primary question in these mice might be stability of the Ig molecule where human constant regions are paired with mouse constant domains, we crossed α 2KI mice with Knock-In Kappa Switch (KIKS) mice which express a functional human C κ light chain domain (Bonaud et al., 2015a). IgA2 secretion was improved in heterozygous α 2KI/ KIKS compared to homozygous and heterozygous α 2KI animals. Later, we checked whether, similarly to IgG4, IgA2 would be able to undergo Fab arm exchange (Rispen et al., 2014; vanderNeutKofschoten et al., 2007) and thus support B cell development. This light chain exchange can cause non-covalent linkage of the heavy chain with the light chain. Our results showed that the human IgA were unable to spontaneously form hybrid antibodies (Data not shown).

It was previously reported that the Epstein-Barr virus protein LMP2A supports B cell survival and differentiation as a constitutively active BCR (Casola et al., 2004b). In order to understand whether IgA2 BCR signaling strength was insufficient to support cell survival, we bred α 2KI mice with D μ LMP2A mice. Double heterozygous mice showed improved B cell development despite a partial early blockade reducing B cell numbers compared to WT mice. IgA2 secretion was also enhanced albeit with an altered ability to produce specific anti-ovalbumin antibodies.

Interestingly, our results revealed that, in these mice, plasma IgA2 were normally associated with kappa light chains and J chains.

Consistent with previously published data (Leduc et al., 1997b), we reported that IgA2 exclusively carried the type I membrane isoform in α 2KI mice, in contrast to α 1KI mice which produce both type I and type II membrane isoforms.

Repertoire analysis of human B cells showed no difference in V usage or in hypermutation frequencies between IgA1 and IgA2 isotypes.

Finally, exploration of the α 2KI mouse model identified functional differences between human IgA1 and IgA2 subclasses. This model can be useful in the characterization of IgA-related diseases.

Materials and Methods

Mice

Mouse experiments followed European regulations applied in France by decree no 2013-118 in February 2013. All wild type (WT) and transgenic mice used in this study were maintained in the Limoges University animal facilities at 21–23°C with a 12-h light/dark cycle. EIIa-Cre transgenic mice were a kindly gift from Dr. H. Westphal (Bethesda, MD). α 1KI and KIKS mice were generated as previously described (Duchez et al. 2010 and Bonaud et al., 2015).

α 2KI generation

The α 2KI construct included a 4.2-kb α 2 genomic fragment amplified from the DHL4 cell line (from a ClaI site added 150 bp upstream of CH1 to a ClaI site added downstream from the last polyadenylation signal). The construct is flanked by a ~5-kb long 5' arm (a StuI-SpeI fragment located upstream of mouse $S\mu$) and a ~5-kb long 3' arm (the $C\mu$ gene cloned as an XhoI fragment). A 1.3-kb ClaI-SalI Neo^R gene flanked by loxP sites was also inserted between the α 2 gene and the 3' arm, as previously described (Duchez et al., 2010a). CK35 embryonic stem (ES) cells were transfected with 8 μ g linearized targeting vector by electroporation and selected using G418 (400 μ g/mL). Recombinant clones were identified by PCR (primers listed in **Table1**). After germline transmission, mice were bred with EIIa cre mice to delete the Neo^R cassette.

Table1: Names and sequences of the primers used in this study.

| Primers | Sequence 5' -> 3' | Use |
|--------------------------------|-----------------------------------|--|
| 5' Arm 1 | GAAAGGACTAAGACCCAGG | ES cells and agouti mice screening (5' arm) |
| 5' Arm 2 | GCAGCATGGGGGAGGTG | |
| 3' Arm 1 | CATAGCGTTGGCTACCCG | ES cells and agouti mice screening (3' arm) |
| 3' Arm 2 | TTCTCTCTCATGCCCTGCTT | |
| Screening For mutant allele | CCCTATGTGGTGCTGGACTT | Mice screening |
| Screening Rev mutant allele | GCGAGGTGGCTAGGTACTTG | |
| Screening For wild type allele | CAGGTCGGCTGGACTAACTC | Mice screening |
| Screening Rev wild type allele | CATCTCACCCATCTCAGCTA | |
| 5' ClaI α 2 | TAATCGATCACCTGTCTCCTGGGGACATGGCAT | α 2 ClaI amplification and construction |
| 3' ClaI α 2 | TGATCGATTAGCCTCAGCCTCATTCAAGATCA | |

Mouse immunization

8-week-old mice $\alpha 2\text{KI}$ and $\alpha 2\text{KI}/+$ LMP2AKI were intraperitoneally primo-immunized with 50 μg ovalbumin (Sigma) per animal in 50% complete Freund adjuvant (Sigma). Mice were boosted 14 days later using antigen in 50% incomplete Freund adjuvant. Blood samples were collected during the protocol and serum was analyzed for the presence of total and ovalbumin-specific IgA2.

Isotype-specific ELISA

ELISA was performed on serum for the detection of murine IgM, IgG, IgA and human IgA2 secretion. Plates (Nunc) were coated with specific monoclonal antibodies for mIgM (Southern Biotech), mIgG (Southern Biotech), mIgA (Southern Biotech), hIgA1 and hIgA2 (Southern Biotech) overnight. After blocking with 3% PBS BSA, serum was added and incubated for 2h at 37°C. After washing, alkaline phosphatase (AP)-conjugates of goat anti-mIgM (Southern Biotech), anti-mIgG (Southern Biotech), anti-mIgA (Southern Biotech), goat anti-hIgA1 or hIgA2 (Southern Biotech) were incubated 1h at 37°C. After washing and addition of AP substrate (Sigma), absorbance was measured at 405 nm. Anti-Ova specific antibodies produced *in vivo* were evaluated in serum from immunized mice. Briefly, plates were coated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ovalbumin overnight. Serum was then incubated for 2h at 37°C and plates were treated as above.

Immunofluorescence on tissue sections

Mice were euthanized by CO_2 and spleens and intestines were collected immediately. Organs were snap-frozen in isopentane using SNAPFROST (Excilone) and stored at -80°C until use. Frozen 8 μm tissue sections were cut by using cryostat (Leica). After fixation in acetone, sections were incubated 1 hour at room temperature with goat F(ab)'₂ anti-human IgA1 and anti-human IgA2 (Southern Biotech). hIgA was revealed using anti-goat Alexa Fluor 488 secondary antibody (Invitrogen). Washes and antibody dilutions were performed in PBS. Nuclei were stained with Dapi before mounting with Mowiol 4-88 solution (Sigma). Sections were then observed under an epifluorescent microscope (Nikon).

Illumina sequencing for repertoire analysis

Repertoire analysis was performed on RNA extracted from human volunteer (non?) PBMCs. These experiments combined 5'RACE PCR and library preparation. RACE was performed on 500ng RNA using SMARTer RACE 5'/3' kit (Clontech) following the manufacturer's instructions and incubated at 72°C for 3 min and at 42°C for 2 min with a specific human IgA reverse primer: 5'- GGAAGTTTCTGGCGGTCACG -3'. Libraries were prepared on RACE products using two forward primers (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3' and 5'-

CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') and two human IgA reverse specific primers (5'- AAGAAGCCCTGGACCAGGC-3') and (5'- CGTCGAAGAAGCCCTGGACCAGGC-3'). Amplification was performed with Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) according to the following program: DNA was denatured 30s at 98°C and then submitted to 30 cycles consisting of 98°C for 10s, 65°C for 30s and 72°C for 30s, and 1 cycle at 72°C for 10 min. Adapters were then added and the resulting amplicons were sequenced on an Illumina Miseq sequencer.

Evaluation of hlgA isoforms

Total RNA was extracted from mouse splenocytes using GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma). cDNA was synthesized using High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific). PCR primers hybridizing to both the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes were a 5' forward primer identical to the downstream part of CH3 (5'-CACACAGAAGACCATCGACC-3') and a 3' reverse primer complementary to the membrane exon (5'-ccggctccgctcagtactg-3') (Leduc et al., 1997a). cDNA was amplified with Taq polymerase (Qiagen) for 25 cycles (94°, 30 seconds; 56°, 30 seconds; 72°, 30 seconds). PCR products were analyzed on 5% agarose gels.

Flow cytometry

In order to study different lymphoid populations in bone marrow and spleen, cells from 8-week old mice were stained with different conjugated antibodies listed in Table 3. After 30 minutes incubation, cells were washed with PBS stained with 7-AAD and then analyzed by flow cytometry using FACS Aria (société). For each sample, 50 000 events were acquired and data analyzed with FACS DIVA software.

Table3: Different conjugated antibodies used for flow cytometry.

| Bone marrow | | Spleen | |
|--------------------|-----------------------------|----------------|-------------------|
| B cell development | Plasma cell differentiation | Mature B cells | Activated B cells |
| B220 BV510 | B220 BV421 | CD19 APC H7 | B220 BV510 |
| CD19 APC H7 | CD138 APC | IgD BV421 | IgD BV 421 |
| C-Kit BV421 | IgM PE Cy7 | CD5 FITC | CD138 APC |
| CD43 PE | IgD FITC | CD21 PE | IgM PE Cy7 |
| CD25 APC | CD25 BV605 | CD23 PE Cy7 | IgG1 PE |
| CD24 FITC | CD43 PE | IgM APC | GI7 FITC |
| IgM PE Cy7 | | | |

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm SEM and overall differences between variables were evaluated by non-parametric Mann-Whitney test. P-value < 0.05 was considered significant.

References

- Bonaud, A., Lechouane, F., Le Noir, S., Monestier, O., Cogné, M., and Sirac, C. (2015a). Efficient AID targeting of switch regions is not sufficient for optimal class switch recombination. *Nature Communications* 6:7613.
- Bonaud, A., Lechouane, F., Le Noir, S., Monestier, O., Cogné, M., and Sirac, C. (2015b). Efficient AID targeting of switch regions is not sufficient for optimal class switch recombination. *Nat Commun* 6, 7613.
- Brandtzaeg, P. (2007). Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* 25, 5467–5484.
- Casola, S., Otipoby, K.L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J.L., Carroll, M.C., and Rajewsky, K. (2004a). B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat. Immunol.* 5, 317–327.
- Casola, S., Otipoby, K.L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J.L., Carroll, M.C., and Rajewsky, K. (2004b). B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nature Immunology* 5, 317.
- Cerutti, A. (2008). The regulation of IgA class switching. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 421–434.
- Defrance, T., Vanbervliet, B., Brière, F., Durand, I., Rousset, F., and Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J. Exp. Med.* 175, 671–682.
- Duchez, S., Amin, R., Cogne, N., Delpy, L., Sirac, C., Pascal, V., Corthesy, B., and Cogne, M. (2010a). Premature replacement of with immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. *PNAS* 107, 3064–3069.
- Duchez, S., Amin, R., Cogne, N., Delpy, L., Sirac, C., Pascal, V., Corthesy, B., and Cogne, M. (2010b). Premature replacement of with immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. *PNAS* 107, 3064–3069.
- Leduc, I., Drouet, M., Bodinier, M.C., Helal, A., and Cogné, M. (1997a). Membrane isoforms of human immunoglobulins of the A1 and A2 isotypes: structural and functional study. *Immunology* 90, 330–336.

Leduc, I., Drouet, M., BODINIER, M.-C., Helal, A., and Cogne, M. (1997b). Membrane isoforms of human immunoglobulins of the A1 and A2 isotypes: structural and functional study. *Immunology* *90*, 330–336.

Reth, M., and Wienands, J. (1997). Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 453–479.

Rifai, A., Fadden, K., Morrison, S.L., and Chintalacharuvu, K.R. (2000a). The N-glycans determine the differential blood clearance and hepatic uptake of human immunoglobulin (Ig)A1 and IgA2 isotypes. *J. Exp. Med.* *191*, 2171–2182.

Rifai, A., Fadden, K., Morrison, S.L., and Chintalacharuvu, K.R. (2000b). The N-Glycans Determine the Differential Blood Clearance and Hepatic Uptake of Human Immunoglobulin (Ig)a1 and Iga2 Isotypes. *J Exp Med* *191*, 2171–2182.

Rispens, T., Davies, A.M., Ooijevaar-de Heer, P., Absalah, S., Bende, O., Sutton, B.J., Vidarsson, G., and Aalberse, R.C. (2014). Dynamics of Inter-heavy Chain Interactions in Human Immunoglobulin G (IgG) Subclasses Studied by Kinetic Fab Arm Exchange. *J Biol Chem* *289*, 6098–6109.

vanderNeutKofschoten, M., Schuurman, J., Losen, M., Bleeker, W., Martínez-Martínez, P., Vermeulen, E., and denBleker, T.H. (2007). Anti-Inflammatory Activity of Human IgG4 Antibodies by Dynamic Fab Arm Exchange. *Science* *317*, 1554–1557.

Woof, J.M., and Kerr, M.A. (2004). IgA function--variations on a theme. *Immunology* *113*, 175–177.

Woof, J.M., and Kerr, M.A. (2006). The function of immunoglobulin A in immunity. *J. Pathol.* *208*, 270–282.

Conclusion et perspectives

En conclusion nous avons obtenu des résultats encourageants concernant la physiopathologie de la néphropathie à IgA et la compréhension des fonctions immunomodulatrices des IgA ; ces travaux ouvrent de nombreuses perspectives.

Nous avons pu démontrer et ceci pour la première fois, l'effet pathogène des IgA naturelles obtenues et seules présentes dans le modèle $h\alpha 1^{+/+}AID^{-/}$, où l'absence d'AID empêche la production d'anticorps « immuns » de forte affinité. Ces IgA, de type « anticorps naturels » dont les séquences sont quasi germline, acquièrent un phénotype néphritogène indépendamment de leur degré de glycosylation sans qu'elles soient autoréactives. Ce phénotype accélère leur dépôt au niveau mésangial à partir de l'âge de 6 semaines, induit une activation du complément et entraîne le développement de lésions rénales dont la progression mime la maladie chez l'homme. Ces lésions ont été confirmées par l'étude du transcriptome glomérulaire.

Nous avons montré que la substitution de la chaîne légère murine par une chaîne légère humaine chez le modèle $h\alpha 1^{+/+}KIKS^{+/+}$ n'a pas augmenté l'intensité des dépôts mésangiaux ni la toxicité des IgA. Ces résultats écartent l'hypothèse suggérant que le dépôt d'IgA chez le modèle $h\alpha 1^{+/+}$ soit dû à une instabilité des molécules d'IgA secondaire à une association illégitime de chaînes lourdes humaines avec des chaînes légères murines, et renforcent donc la validité de ce modèle. Ceci montre aussi que la survenue des dépôts n'implique pas la chaîne légère de l'immunoglobuline.

L'association d'IgA humaine au récepteur CD89 dont l'expression est induite sous le contrôle de ses propres promoteurs au niveau des cellules myéloïdes dans le modèle $h\alpha 1^{+/+}CD89^{+/+}$ ne paraît pas néphritogène. Nos résultats sont en concordance avec une étude récente, montrant qu'en plus de la formation des complexes IgA-CD89 d'autres facteurs sont nécessaires pour le développement des signes de l'IgAN.

Une augmentation de la production de l'IgA humaine secondaire à une inflammation intestinale n'a pas modifié la capacité de dépôt des IgA au niveau mésangial. Nos données suggèrent une intervention mineure des maladies inflammatoires du tube digestif dans le développement et la progression de l'IgAN. Il est fortement probable que la nature de l'inflammation, sa durée ainsi que les effecteurs immunitaires qu'elle implique aient un rôle important dans l'acquisition par les IgA de certaines propriétés néphritogènes.

Des données préliminaires de l'analyse des propriétés physico-chimiques des IgA des patients présentant une dysglobulinémie monoclonale ont montré que le degré de polymérisation des IgA peut augmenter leur capacité à se déposer ; par ailleurs, la stabilité moléculaire des IgA

semble être beaucoup plus impliquée dans le processus de dépôt que leur degré de glycosylation. L'étude des séquences nucléotidiques des IgA purifiées à partir de culture d'hybridomes montre à nouveau l'intervention potentielle des propriétés immunologiques dans le processus de dépôt : les IgA qui déposent au niveau du mésangium des souris sont celles qui ont subi le moins d'hypermutation somatique et donc présentent une moindre maturation (une moindre affinité pour des antigènes exogènes) en comparaison aux IgA qui ne se déposent pas. Ces observations donnent à réfléchir quant au rôle déclenchant des infections souvent suggéré par l'histoire clinique des patients, et pourrait impliquer davantage l'activation polyclonale B ou la dérégulation de la production globale des IgA, que des immunoglobulines ayant une activité anticorps définie.

Dans cette première partie évoquant le caractère pathogène de l'IgA, les résultats obtenus vont dans le même sens des données déjà publiées par le laboratoire. Nos résultats permettent de confirmer l'implication de la structure (et l'affinité pour l'antigène) de la région variable des IgA dans la pathogenèse de l'IgAN et de mettre en cause les réponses immunitaires probablement inappropriées. Il paraît intéressant de mieux étudier dans les modèles murins générés, les mécanismes moléculaires sous-jacents, les modifications structurales de la région variable, son éventuelle polyréactivité (telle qu'observée pour de nombreux anticorps naturels) ainsi que les différentes interactions pouvant être liées à l'apparition du phénotype toxique et néphritogène des IgA conduisant ainsi à l'atteinte rénale. L'étude de la capacité de ces IgA à activer les différentes voies du système complément doit être envisagée.

L'étude de l'origine des IgA produites, des populations cellulaires B1 et B2 ainsi que de l'homing des cellules B à IgA chez la souris est essentielle. Des modèles murins permettant le marquage spécifique et la localisation tissulaire des cellules B après injection de tamoxifène sont en cours de génération (Souris $\alpha 1^{+/+}$ AID Cre Tomato et $S\mu$ AID Cre Tomato).

Des analyses supplémentaires et plus approfondies des propriétés physico-chimiques et immunologiques sont aussi recommandées chez un nombre plus élevé de patients. L'ensemble de ces études complémentaires pourraient contribuer à élucider l'étiologie de l'IgAN et apporter des éléments utiles au diagnostic, au traitement et même à la prévention de cette maladie.

Dans la deuxième partie, l'expression forcée de l'IgA humaine chez des souris lupiques nous a permis de mieux étudier l'effet immunomodulateur et l'aspect protecteur de l'IgA dans la pathogenèse du lupus néphrétique. Les souris $\alpha 1^{+/+}$ Fas^{-/-} développent moins de lymphadénopathies et produisent moins d'anticorps auto-immuns, de cytokines et de facteurs pro-inflammatoires ; elles ne présentent pas d'atteinte rénale. Le (ou les) mécanisme(s) sous-

jaçant(s) expliquant cet effet anti-inflammatoire de l'IgA ne sont pas encore complètement identifiés. Il est possible que ces IgA présentant des niveaux élevés de sialylation favorisent une expansion des cellules T_{Reg}.

Une autre hypothèse pourrait être le rôle possible du BCR IgM. L'absence de ce BCR dans ce modèle pourrait éventuellement protéger contre la production d'immunoglobulines autoréactives. L'objectif principal des prochaines études sera d'identifier les mécanismes et les interactions médiant l'effet immunomodulateur observé de l'IgA.

Il est nécessaire de préciser le rôle de l'IgA murine dans le développement de la pathologie ; des souris lupiques déficientes pour l'IgA murine (souris $\mu\alpha^{-/-}$ Fas $^{-/-}$) sont en cours de génération.

Le rôle potentiel des récepteurs des hormones stéroïdiennes et surtout de l'œstradiol a été montré dans la pathogenèse du lupus qui affecte disproportionnellement les femmes (Mackern-Oberti et al., 2017; Rider et al., 2018). L'expression de ces récepteurs spécifiquement au niveau des cellules B à IgA peut être analysée. L'effet des hormones stéroïdiennes sur l'activation des DC dans nos souris peut aussi être étudié.

Cette étude est aussi intéressante dans l'éventualité de l'utilisation des IgA en thérapeutique ce qui nécessitera de pouvoir en vérifier l'innocuité.

Dans la dernière partie, nous avons étudié l'effet de l'expression du BCR IgA2 sur le développement lymphocytaire chez le modèle transgénique $\alpha 2KI$ où l'expression de l'IgA2 humaine a été forcée. Les résultats montrent un effet délétère (inhibiteur ou incapable de supporter la survie cellulaire) de ce BCR sur le développement précoce des progéniteurs B dans la moelle osseuse. Le nombre de lymphocytes est considérablement réduit et la production plasmatique d'IgA2 est à peine détectable. Ceci évoquerait une inefficacité fonctionnelle ou un rôle toxique du BCR IgA2 dans ce modèle.

Même si ce modèle doit être nuancé par la problématique de barrière d'espèce, avec un BCR humain exprimé chez la souris, il souligne des différences structurales et fonctionnelles entre BCR IgA1 et BCR IgA2. La compréhension des fonctions effectrices du BCR IgA2 pourrait aider à mieux interpréter le rôle physiologique de l'IgA2 et d'expliquer ses différences fonctionnelles avec l'IgA1.

L'ensemble de nos résultats mettent en évidence encore une fois la complexité des fonctions de l'immunoglobuline A. Cette promiscuité d'effets antagonistes lui permet d'intervenir d'une part dans la pathogenèse d'une maladie complexe (l'IgAN) et d'autre part dans la protection et la suppression de l'auto-immunité, témoignant de la complexité des interactions mises en jeu et du caractère régulateur de cette immunoglobuline.

Enfin, notre travail a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives et offert de nouvelles pistes exploitables et nécessaires pour étudier cette multitude de fonctions ce qui pourrait conduire à des innovations importantes dans les stratégies thérapeutiques des pathologies associées à l'immunoglobuline A.

Références bibliographiques

- Alamartine, E., Sauron, C., Laurent, B., Sury, A., Seffert, A., and Mariat, C. (2011). The Use of the Oxford Classification of IgA Nephropathy to Predict Renal Survival. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 6, 2384–2388.
- Andre, P.M., Le Pogamp, P., and Chevet, D. (1990). Impairment of jacalin binding to serum IgA in IgA nephropathy. *J. Clin. Lab. Anal.* 4, 115–119.
- Ballesteros-Tato, A., León, B., Graf, B.A., Moquin, A., Adams, P.S., Lund, F.E., and Randall, T.D. (2012). Interleukin-2 Inhibits Germinal Center Formation by Limiting T Follicular Helper Cell Differentiation. *Immunity* 36, 847–856.
- Baumgarth, N. (2016). B-1 Cell Heterogeneity and the Regulation of Natural and Antigen-Induced IgM Production. *Front. Immunol.* 7.
- Berthelot, L., Papista, C., Maciel, T.T., Biarnes-Pelicot, M., Tissandie, E., Wang, P.H.M., Tamouza, H., Jamin, A., Bex-Coudrat, J., Gestin, A., et al. (2012). Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors. *J. Exp. Med.* 209, 793–806.
- Bidgood, S.R., Tam, J.C.H., McEwan, W.A., Mallery, D.L., and James, L.C. (2014). Translocalized IgA mediates neutralization and stimulates innate immunity inside infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 13463–13468.
- Bonaud, A., Lechouane, F., Le Noir, S., Monestier, O., Cogné, M., and Sirac, C. (2015). Efficient AID targeting of switch regions is not sufficient for optimal class switch recombination. *Nat. Commun.* 6:7613.
- Cao, A.T., Yao, S., Gong, B., Nurieva, R.I., Elson, C.O., and Cong, Y. (2015). Interleukin (IL)-21 promotes intestinal IgA response to microbiota. *Mucosal Immunol.* 8, 1072–1082.
- Cerutti, A., and Rescigno, M. (2008). The Biology of Intestinal Immunoglobulin A Responses. *Immunity* 28, 740–750.
- Cheung, C.K., and Barratt, J. (2016). Is IgA Nephropathy a Single Disease? In *Pathogenesis and Treatment in IgA Nephropathy*, (Springer, Tokyo), pp. 3–17.
- Coppo, R. (2018). IgA Nephropathy: A European Perspective in the Corticosteroid Treatment. *Kidney Dis.* 4.
- Coppo, R., Roccatallo, D., Amore, A., Quattrocchio, G., Molino, A., Gianoglio, B., Amoroso, A., Bajardi, P., and Piccoli, G. (1990). Effects of a gluten-free diet in primary IgA nephropathy. *Clin. Nephrol.* 33, 72–86.
- Coppo, R., Amore, A., and Roccatallo, D. (1992). Dietary antigens and primary immunoglobulin A nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2, S173.
- Coulon, S., Dussiot, M., Grapton, D., Maciel, T.T., Wang, P.H.M., Callens, C., Tiwari, M.K., Agarwal, S., Fricot, A., Vandekerckhove, J., et al. (2011). Polymeric IgA1 controls erythroblast proliferation and accelerates erythropoiesis recovery in anemia. *Nat. Med.* 17, 1456–1465.
- De Angelis, M., Montemurno, E., Piccolo, M., Vannini, L., Lauriero, G., Maranzano, V., Gozzi, G., Serrazanetti, D., Dalfino, G., Gobbetti, M., et al. (2014). Microbiota and Metabolome Associated with Immunoglobulin A Nephropathy (IgAN). *PLoS ONE* 9, e99006.

- De Silva, N.S., and Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 137–148.
- Defrance, T., Vanbervliet, B., Brière, F., Durand, I., Rousset, F., and Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J. Exp. Med.* *175*, 671–682.
- Diana, J., Moura, I.C., Vaugier, C., Gestin, A., Tissandie, E., Beaudoin, L., Corthesy, B., Hocini, H., Lehuen, A., and Monteiro, R.C. (2013). Secretory IgA Induces Tolerogenic Dendritic Cells through SIGNR1 Dampening Autoimmunity in Mice. *J. Immunol.* *191*, 2335–2343.
- Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Mégret, J., Storck, S., Reynaud, C.-A., and Weill, J.-C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat. Immunol.* *10*, 1292–1299.
- Donadio, J.V., and Grande, J.P. (2002). IgA nephropathy. *N. Engl. J. Med.* *347*, 738–748.
- Duchez, S., Amin, R., Cogne, N., Delpy, L., Sirac, C., Pascal, V., Corthesy, B., and Cogne, M. (2010). Premature replacement of with immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 3064–3069.
- van Egmond, M., van Vuuren, A.H., Morton, H.C., van Spriel, A.B., Shen, L., Hofhuis, F.M.A., Saito, T., Mayadas, T.N., Verbeek, J.S., and van de Winkel, J.G. (1999). Human Immunoglobulin A Receptor (FcaRI, CD89) Function in Transgenic Mice Requires Both FcR g Chain and CR3 (CD11b/CD18). *Blood* *93*, 4387–4394.
- Emancipator, S.N. (1983). EXPERIMENTAL IgA NEPHROPATHY INDUCED BY ORAL IMMUNIZATION. *J. Exp. Med.* *157*.
- Emancipator, S.N., Rao, C.S., Amore, A., Coppo, R., and Nedrud, J.G. (1992). Macromolecular properties that promote mesangial binding and mesangiopathic nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* *2*, S149.
- Fabiano, R.C.G., Pinheiro, S.V.B., and Simões e Silva, A.C. (2016). Immunoglobulin A nephropathy: a pathophysiology view. *Inflamm. Res.* *65*, 757–770.
- Floege, J., and Feehally, J. (2016). The mucosa–kidney axis in IgA nephropathy. *Nat. Rev. Nephrol.* *12*, 147–156.
- Forbes, S.J. (2011). Transient Suppression of Shigella flexneri Type 3 Secretion by a Protective O-Antigen-Specific Monoclonal IgA.pdf. *MBio* *2*.
- Furtado, P.B., Whitty, P.W., Robertson, A., Eaton, J.T., Almogren, A., Kerr, M.A., Woof, J.M., and Perkins, S.J. (2004). Solution Structure Determination of Monomeric Human IgA2 by X-ray and Neutron Scattering, Analytical Ultracentrifugation and Constrained Modelling: A Comparison with Monomeric Human IgA1. *J. Mol. Biol.* *338*, 921–941.
- Gharavi, A.G., Moldoveanu, Z., Wyatt, R.J., Barker, C.V., Woodford, S.Y., Lifton, R.P., Mestecky, J., Novak, J., and Julian, B.A. (2008). Aberrant IgA1 Glycosylation Is Inherited in Familial and Sporadic IgA Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* *19*, 1008–1014.
- Gorosito Serrán, M., Fiocca Vernengo, F., Beccaria, C.G., Acosta Rodriguez, E.V., Montes, C.L., and Gruppi, A. (2015). The regulatory role of B cells in autoimmunity, infections and cancer: Perspectives beyond IL10 production. *FEBS Lett.* *589*, 3362–3369.

- He, L., Peng, Y., Liu, H., Yin, W., Chen, X., Peng, X., Shao, J., Liu, Y., and Liu, F. (2014). Th1/Th2 polarization in tonsillar lymphocyte form patients with IgA nephropathy. *Ren. Fail.* *36*, 407–412.
- Heineke, M.H., and van Egmond, M. (2017). Immunoglobulin A: magic bullet or Trojan horse? *Eur. J. Clin. Invest.* *47*, 184–192.
- Hotta, O., Furuta, T., Chiba, S., Tomioka, S., and Taguma, Y. (2002). Regression of IgA nephropathy: A repeat biopsy study. *Am. J. Kidney Dis.* *39*, 493–502.
- Hou, S., Landego, I., Jayachandran, N., Miller, A., Gibson, I.W., Ambrose, C., and Marshall, A.J. (2014). Follicular dendritic cell secreted protein FDC-SP controls IgA production. *Mucosal Immunol.* *7*, 948–957.
- Huang, J., Guerrero, A., Parker, E., Strum, J.S., Smilowitz, J.T., German, J.B., and Lebrilla, C.B. (2015). Site-specific Glycosylation of Secretory Immunoglobulin A from Human Colostrum. *J. Proteome Res.* *14*, 1335–1349.
- Imasawa, T., Nagasawa, R., Utsunomiya, Y., Kawamura, T., Zhong, Y., Makita, N., Muso, E., Miyawaki, S., Maruyama, N., Hosoya, T., et al. (1999). Bone marrow transplantation attenuates murine IgA nephropathy: Role of a stem cell disorder¹. *Kidney Int.* *56*, 1809–1817.
- Jacob, C.M.A., Pastorino, A.C., Fahl, K., Carneiro-Sampaio, M., and Monteiro, R.C. (2008). Autoimmunity in IgA Deficiency: Revisiting the Role of IgA as a Silent Housekeeper. *J. Clin. Immunol.* *28*, 56–61.
- Johansen, F.-E., Braathen, R., and Brandtzaeg, P. (2001). The J Chain Is Essential for Polymeric Ig Receptor-Mediated Epithelial Transport of IgA. *J. Immunol.* *167*, 5185–5192.
- Ju, T., Aryal, R.P., Stowell, C.J., and Cummings, R.D. (2008). Regulation of protein O-glycosylation by the endoplasmic reticulum-localized molecular chaperone Cosmc. *J. Cell Biol.* *182*, 531–542.
- Kaetzel, C.S. (2014). Cooperativity among secretory IgA, the polymeric immunoglobulin receptor, and the gut microbiota promotes host-microbial mutualism. *Immunol. Lett.* *162*, 10–21.
- Kaetzel, C.S., Robinson, J.K., and Lamm, M.E. (1994). Epithelial transcytosis of monomeric IgA and IgG cross-linked through antigen to polymeric IgA. A role for monomeric antibodies in the mucosal immune system. *J. Immunol.* *152*, 72–76.
- Karnib, H.H., Sanna-Cherchi, S., Zalloua, P.A., Medawar, W., D'Agati, V.D., Lifton, R.P., Badr, K., and Gharavi, A.G. (2007). Characterization of a large Lebanese family segregating IgA nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* *22*, 772–777.
- Kaufman, D.R., De Calisto, J., Simmons, N.L., Cruz, A.N., Villablanca, E.J., Mora, J.R., and Barouch, D.H. (2011). Vitamin A Deficiency Impairs Vaccine-Elicited Gastrointestinal Immunity. *J. Immunol.* *187*, 1877–1883.
- Kerr, M.A. (1990). The structure and function of human IgA. *Biochem. J.* *271*, 285–296.
- Kirylyuk, K., Novak, J., and Gharavi, A.G. (2013). Pathogenesis of Immunoglobulin A Nephropathy: Recent Insight from Genetic Studies. *Annu. Rev. Med.* *64*, 339–356.
- Kirylyuk, K., Novak, J., and Gharavi, A.G. (2014). The genetics and immunobiology of IgA nephropathy. *J. Clin. Invest.* *124*, 2325–2332.

- Knoppova, B., Reily, C., Maillard, N., Rizk, D.V., Moldoveanu, Z., Mestecky, J., Raska, M., Renfrow, M.B., Julian, B.A., and Novak, J. (2016). The Origin and Activities of IgA1-Containing Immune Complexes in IgA Nephropathy. *Front. Immunol.* 7.
- Laffleur, B., Denis-Lagache, N., Péron, S., Sirac, C., Moreau, J., and Cogné, M. (2013). AID-induced remodeling of immunoglobulin genes and B cell fate. *Oncotarget* 5, 1118–1131.
- de Lau, W., Kujala, P., Schneeberger, K., Middendorp, S., Li, V.S.W., Barker, N., Martens, A., Hofhuis, F., DeKoter, R.P., Peters, P.J., et al. (2012). Peyer's Patch M Cells Derived from Lgr5+ Stem Cells Require SpiB and Are Induced by RankL in Cultured "Miniguts." *Mol. Cell. Biol.* 32, 3639–3647.
- Launay, P., Grossetete, B., Arcos-Fajardo, M., Gaudin, E., Torres, S.P., Beaudoin, L., and Patey-Mariaud de Serre, N. (2000). Fca 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.
- Lindner, C., Thomsen, I., Wahl, B., Ugur, M., Sethi, M.K., Friedrichsen, M., Smoczek, A., Ott, S., Baumann, U., Suerbaum, S., et al. (2015). Diversification of memory B cells drives the continuous adaptation of secretory antibodies to gut microbiota. *Nat. Immunol.* 16, 880–888.
- Liu, L., Wang, L., Jiang, Y., Yao, L., Dong, L., Li, Z., and Li, X. (2015). Tonsillectomy for IgA Nephropathy: A Meta-analysis. *Am. J. Kidney Dis.* 65, 80–87.
- Mackern-Oberti, J.P., Jara, E.L., Riedel, C.A., and Kalergis, A.M. (2017). Hormonal Modulation of Dendritic Cells Differentiation, Maturation and Function: Implications for the Initiation and Progress of Systemic Autoimmunity. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 65, 123–136.
- Macpherson, A.J., McCoy, K.D., Johansen, F.-E., and Brandtzaeg, P. (2008). The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.* 1, 11–22.
- Macpherson, A.J., Geuking, M.B., and McCoy, K.D. (2012). Homeland Security: IgA immunity at the frontiers of the body. *Trends Immunol.* 33, 160–167.
- Maillard, N., Wyatt, R.J., Julian, B.A., Kiryluk, K., Gharavi, A.G., Fremeaux-Bacchi, V., and Novak, J. (2015). Current Understanding of the Role of Complement in IgA Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26.
- Malissen, M., Gillet, A., Ardouin, L., Bouvier, G., Trucy, J., Ferrier, P., Vivier, E., and Malissen, B. (1995). Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *EMBO J.* 14, 4641–4653.
- Mantis, N.J., Cheung, M.C., Chintalacheruvu, K.R., Rey, J., Corthesy, B., and Neutra, M.R. (2002). Selective Adherence of IgA to Murine Peyer's Patch M Cells: Evidence for a Novel IgA Receptor. *J. Immunol.* 169, 1844–1851.
- Mantis, N.J., McGuinness, C.R., Sonuyi, O., Edwards, G., and Farrant, S.A. (2006). Immunoglobulin A Antibodies against Ricin A and B Subunits Protect Epithelial Cells from Ricin Intoxication. *Infect. Immun.* 74, 3455–3462.
- Maverakis, E., Kim, K., Shimoda, M., Gershwin, M.E., Patel, F., Wilken, R., Raychaudhuri, S., Ruhaak, L.R., and Lebrilla, C.B. (2015). Glycans In The Immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A Critical Review. *J. Autoimmun.* 0, 1–13.

- McCarthy, D.D., Chiu, S., Gao, Y., Summers-deLuca, L.E., and Gommerman, J.L. (2006). BAFF induces a hyper-IgA syndrome in the intestinal lamina propria concomitant with IgA deposition in the kidney independent of LIGHT. *Cell. Immunol.* *241*, 85–94.
- McDole, J.R., Wheeler, L.W., McDonald, K.G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K.A., Newberry, R.D., and Miller, M.J. (2012). Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature* *483*, 345–349.
- Mesin, L., Ersching, J., and Victora, G.D. (2016). Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* *45*, 471–482.
- Mestecky, J., Raska, M., Julian, B.A., Gharavi, A.G., Renfrow, M.B., Moldoveanu, Z., Novak, L., Matousovic, K., and Novak, J. (2013). IgA Nephropathy: Molecular Mechanisms of the Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* *8*, 217–240.
- Meyer-Bahlburg, A. (2015). B-1 cells as a source of IgA: B-1 cell-derived IgA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1362*, 122–131.
- Mizoguchi, A., and Bhan, A.K. (2006). A case for regulatory B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *176*, 705–710.
- Molyneux, K., Wimbury, D., Pawluczyk, I., Muto, M., Bhachu, J., Mertens, P.R., Feehally, J., and Barratt, J. (2017). β 1,4-galactosyltransferase 1 is a novel receptor for IgA in human mesangial cells. *Kidney Int.* *92*, 1458–1468.
- Monteiro, R.C. (2010). The Role of IgA and IgA Fc Receptors as Anti-Inflammatory Agents. *J. Clin. Immunol.* *30*, 61–64.
- Monteiro, R.C., and van de Winkel, J.G.J. (2003). IgA Fc Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 177–204.
- Moor, K., Diard, M., Sellin, M.E., Felmy, B., Wotzka, S.Y., Toska, A., Bakkeren, E., Arnoldini, M., Bansept, F., Co, A.D., et al. (2017). High-avidity IgA protects the intestine by enchainning growing bacteria. *Nature* *544*, 498–502.
- Mora, J.R. (2006). Generation of Gut-Homing IgA-Secreting B Cells by Intestinal Dendritic Cells. *Science* *314*.
- Moura, I.C. (2004). Glycosylation and Size of IgA1 Are Essential for Interaction with Mesangial Transferrin Receptor in IgA Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* *15*, 622–634.
- Moura, I.C. (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*, 2667–2676.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* *102*, 553–563.
- Nagashima, K., Sawa, S., Nitta, T., Prados, A., Koliaraki, V., Kollias, G., Nakashima, T., and Takayanagi, H. (2017). Targeted deletion of RANKL in M cell inducer cells by the Col6a1-Cre driver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *493*, 437–443.
- Nakata, J., Suzuki, Y., Suzuki, H., Sato, D., Kano, T., Horikoshi, S., Novak, J., and Tomino, Y. (2013). Experimental evidence of cell dissemination playing a role in pathogenesis of IgA nephropathy in multiple lymphoid organs. *Nephrol. Dial. Transplant.* *28*, 320–326.

- Nangaku, M., Shankland, S.J., and Couser, W.G. (2005). Cellular Response to Injury in Membranous Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* *16*, 1195–1204.
- Neuberger, M.S., and Rada, C. (2007). Somatic hypermutation: activation-induced deaminase for C/G followed by polymerase η for A/T: Figure 1. *J. Exp. Med.* *204*, 7–10.
- Nishie, T., Miyaishi, O., Azuma, H., Kameyama, A., Naruse, C., Hashimoto, N., Yokoyama, H., Narimatsu, H., Wada, T., and Asano, M. (2007). Development of Immunoglobulin A Nephropathy- Like Disease in β -1,4-Galactosyltransferase-I-Deficient Mice. *Am. J. Pathol.* *170*, 447–456.
- Noel, L.-H. (2008). Atlas de Pathologie rénale (Médecine-Sciences).
- Novak, J., Moldoveanu, Z., Renfrow, M.B., Yanagihara, T., Suzuki, H., Raska, M., Hall, S., Brown, R., Huang, W.-Q., Goepfert, A., et al. (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*, 134–138.
- Oestreich, K.J., Mohn, S.E., and Weinmann, A.S. (2012). Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFH-like gene profile. *Nat. Immunol.* *13*, 405–411.
- Okazaki, K., Suzuki, Y., Otsuji, M., Suzuki, H., Kihara, M., Kajiyama, T., Hashimoto, A., Nishimura, H., Brown, R., Hall, S., et al. (2012). Development of a Model of Early-Onset IgA Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *23*, 1364–1374.
- Oortwijn, B.D., Roos, A., Royle, L., van Gijlswijk-Janssen, D.J., Faber-Krol, M.C., Eijgenraam, J.-W., Dwek, R.A., Daha, M.R., Rudd, P.M., and van Kooten, C. (2006). Differential Glycosylation of Polymeric and Monomeric IgA: A Possible Role in Glomerular Inflammation in IgA Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* *17*, 3529–3539.
- Oruc, Z., Oblet, C., Boumediene, A., Druilhe, A., Pascal, V., Le Rumeur, E., Cuvillier, A., El Hamel, C., Lecardeur, S., Leanderson, T., et al. (2016). IgA Structure Variations Associate with Immune Stimulations and IgA Mesangial Deposition. *J. Am. Soc. Nephrol.*
- Pabst, O. (2012). New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 821–832.
- Papista, C., Berthelot, L., and Monteiro, R.C. (2011). Dysfunctions of the Iga system: a common link between intestinal and renal diseases. *Cell. Mol. Immunol.* *8*, 126.
- Park, E.-K., Jeon, J.-S., Noh, H.-J., Won, J.-H., and Park, H.-S. (2008). Complete remission of IgA nephropathy after bone marrow transplantation for acute myeloid leukaemia. *NDT Plus* *1*, 420–422.
- Piccolo, M., De Angelis, M., Lauriero, G., Montemurno, E., Di Cagno, R., Gesualdo, L., and Gobbetti, M. (2015). Salivary Microbiota Associated with Immunoglobulin A Nephropathy. *Microb. Ecol.* *70*, 557–565.
- Pilette, C., Detry, B., Guisset, A., Gabriels, J., and Sibille, Y. (2010). Induction of interleukin-10 expression through Fc α receptor in human monocytes and monocyte-derived dendritic cells: role of p38 MAPKinase. *Immunol. Cell Biol.* *88*, 486–493.
- Pillebout, E., and Vérine, J. (2016). Glomérulonéphrite à dépôts mésangiaux d'immunoglobulines A. *Néphrologie Thérapeutique* *12*, 238–254.

- Qiu, W., Zhou, J., Zhu, G., Zhao, D., He, F., Zhang, J., Lu, Y., Yu, T., Liu, L., and 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–e1176.
- Rider, V., Abdou, N.I., Kimler, B.F., Lu, N., Brown, S., and Fridley, B.L. (2018). Gender Bias in Human Systemic Lupus Erythematosus: A Problem of Steroid Receptor Action? *Front. Immunol.* *9*.
- Rifai, A., Fadden, K., Morrison, S.L., and Chintalacharuvu, K.R. (2000). The N-Glycans Determine the Differential Blood Clearance and Hepatic Uptake of Human Immunoglobulin (Ig)a1 and Iga2 Isotypes. *J. Exp. Med.* *191*, 2171–2182.
- Rios, D., Wood, M.B., Li, J., Chassaing, B., Gewirtz, A.T., and Williams, I.R. (2016). Antigen sampling by intestinal M cells is the principal pathway initiating mucosal IgA production to commensal enteric bacteria. *Mucosal Immunol.* *9*, 907–916.
- Rochereau, N., Drocourt, D., Perouzel, E., Pavot, V., Redelinghuys, P., Brown, G.D., Tiraby, G., Roblin, X., Verrier, B., Genin, C., et al. (2013). Dectin-1 Is Essential for Reverse Transcytosis of Glycosylated SIgA-Antigen Complexes by Intestinal M Cells. *PLoS Biol.* *11*.
- Roos, A., Bouwman, L.H., van Gijlswijk-Janssen, D.J., Faber-Krol, M.C., Stahl, G.L., and Daha, M.R. (2001). Human IgA Activates the Complement System Via the Mannan-Binding Lectin Pathway. *J. Immunol.* *167*, 2861–2868.
- Rops, A.L., Jansen, E., van der Schaaf, A., Pieterse, E., Rother, N., Hofstra, J., Dijkman, H.B., van de Logt, A.-E., Wetzels, J., and van der Vlag, J. (2018). Interleukin-6 is essential for glomerular immunoglobulin A deposition and the development of renal pathology in Cd37-deficient mice. *Kidney Int.* *93*, 1356–1366.
- Sage, P.T., Ron-Harel, N., Juneja, V.R., Sen, D.R., Maleri, S., Sungnak, W., Kuchroo, V.K., Haining, W.N., Chevrier, N., Haigis, M., et al. (2016). Suppression by TFR cells leads to durable and selective inhibition of B cell effector function. *Nat. Immunol.* *17*, 1436–1446.
- Sategna-Guidetti, C., Ferfaglia, G., Bruno, M., Pulitano, R., Roccatello, D., Amore, A., and Coppo, R. (1992). Do IgA antigliadin and IgA antiendomysium antibodies show there is latent coeliac disease in primary IgA nephropathy? *Gut* *33*, 476–478.
- Schmitt, R., Carlsson, F., Mörgelin, M., Tati, R., Lindahl, G., and Karpman, D. (2010). Tissue Deposits of IgA-Binding Streptococcal M Proteins in IgA Nephropathy and Henoch-Schönlein Purpura. *Am. J. Pathol.* *176*, 608–618.
- Schmitt, R., Stahl, A. -I., Olin, A.I., Kristoffersson, A.-C., Rebetz, J., Novak, J., Lindahl, G., and Karpman, 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*, 317–326.
- Schwartz-Albiez, R., Monteiro, R.C., Rodriguez, M., Binder, C.J., and Shoenfeld, Y. (2009). Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* *158*, 43–50.
- Seo, G.-Y., Youn, J., and Kim, P.-H. (2009). IL-21 ensures TGF- β 1-induced IgA isotype expression in mouse Peyer's patches. *J. Leukoc. Biol.* *85*, 744–750.
- Serino, G., Sallustio, F., Curci, C., Cox, S.N., Pesce, F., De Palma, G., and Schena, F.P. (2015). Role of let-7b in the regulation of N -acetylgalactosaminyltransferase 2 in IgA nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* *30*, 1132–1139.

Shang, L., Fukata, M., Thirunarayanan, N., Martin, A.P., Arnaboldi, P., Maussang, D., Berin, C., Unkeless, J.C., Mayer, L., Abreu, M.T., et al. (2008). Toll-Like Receptor Signaling in Small Intestinal Epithelium Promotes B-Cell Recruitment and IgA Production in Lamina Propria. *Gastroenterology* 135, 529–538.e1.

Shekhar, S., and Xi, Y. (2012). The darker side of follicular helper T cells: from autoimmunity to immunodeficiency. *Cell. Mol. Immunol.* 9.

Shi, M.J., Park, S.R., Kim, P.H., and Stavnezer, J. (2001). Roles of Ets proteins, NF-kappa B and nocodazole in regulating induction of transcription of mouse germline Ig alpha RNA by transforming growth factor-beta 1. *Int. Immunol.* 13, 733–746.

Shibuya, A., and Honda, S. (2015a). Immune regulation by Fc α / μ receptor (CD351) on marginal zone B cells and follicular dendritic cells. *Immunol. Rev.* 268, 288–295.

Shibuya, A., and Honda, S. (2015b). Immune regulation by Fc α / μ receptor (CD351) on marginal zone B cells and follicular dendritic cells. *Immunol. Rev.* 268, 288–295.

Silvey, K.J., Hutchings, A.B., Vajdy, M., Petzke, M.M., and Neutra, M.R. (2001). Role of Immunoglobulin A in Protection against Reovirus Entry into Murine Peyer's Patches. *J. Virol.* 75, 10870–10879.

Smith, A.C., Molyneux, K., Feehally, J., and Barratt, J. (2006). O-Glycosylation of Serum IgA1 Antibodies against Mucosal and Systemic Antigens in IgA Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 3520–3528.

Stratta, P., Musetti, C., Barreca, A., and Mazzucco, G. (2014). New trends of an old disease: the acute post infectious glomerulonephritis at the beginning of the new millenium. *J. Nephrol.* 27, 229–239.

Suzuki, H., Moldoveanu, Z., Hall, S., Brown, R., Vu, H.L., Novak, L., Julian, B.A., Tomana, M., Wyatt, R.J., Edberg, J.C., et al. (2008). IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. *J. Clin. Invest.*

Suzuki, Y., Suzuki, H., Nakata, J., Sato, D., Kajiyama, T., Watanabe, T., and Tomino, Y. (2011). Pathological Role of Tonsillar B Cells in IgA Nephropathy. *Clin. Dev. Immunol.* 2011, 1–8.

Tezuka, H., Abe, Y., Iwata, M., Takeuchi, H., Ishikawa, H., Matsushita, M., Shiohara, T., Akira, S., and Ohteki, T. (2007). Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature* 448, 929–933.

Tezuka, H., Abe, Y., Asano, J., Sato, T., Liu, J., Iwata, M., and Ohteki, T. (2011). Prominent Role for Plasmacytoid Dendritic Cells in Mucosal T Cell-Independent IgA Induction. *Immunity* 34, 247–257.

Victora, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal Centers. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 429–457.

Wang, J., Anders, R.A., Wu, Q., Peng, D., Cho, J.H., Sun, Y., Karaliukas, R., Kang, H.-S., Turner, J.R., and Fu, Y.-X. (2004). Dysregulated LIGHT expression on T cells mediates intestinal inflammation and contributes to IgA nephropathy. *J. Clin. Invest.* 113, 826–835.

Wang, R., Fu, Y., Zhao, Q., Pan, L., and Zhang, W. (2009). Human Fc α / μ R and pIgR distribute differently in intestinal tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381, 148–152.

- Wang, Y.-Y., Zhang, L., Zhao, P.-W., Ma, L., Li, C., Zou, H.-B., and Jiang, Y.-F. (2014). Functional implications of regulatory B cells in human IgA nephropathy. *Scand. J. Immunol.* *79*, 51–60.
- Wei, M., Shinkura, R., Doi, Y., Maruya, M., Fagarasan, S., and Honjo, T. (2011). Mice carrying a knock-in mutation of *Aicda* resulting in a defect in somatic hypermutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense. *Nat. Immunol.* *12*, 264–270.
- Weisel, F.J., Zuccarino-Catania, G.V., Chikina, M., and Shlomchik, M.J. (2016). A Temporal Switch in the Germinal Center Determines Differential Output of Memory B and Plasma Cells. *Immunity* *44*, 116–130.
- Winsauer, C., Prepens, S., Schlienz, D., Nedospasov, S., and Kruglov, A.A. (2015). Novel mouse model to study T cell-dependent IgA induction in vivo. *J. Immunol. Methods* *421*, 54–60.
- Woof, J.M., and Kerr, M.A. (2004). IgA function - variations on a theme. *Immunology* *113*, 175–177.
- Woof, J.M., and Kerr, M.A. (2006). The function of immunoglobulin A in immunity. *J. Pathol.* *208*, 270–282.
- Woof, J.M., and Russell, M.W. (2011). Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunol.* *4*, 590–597.
- Wyatt, R.J., and Julian, B.A. (2013). IgA Nephropathy. *N. Engl. J. Med.* *368*, 2402–2414.
- Xu, L., Li, B., Huang, M., Xie, K., Li, D., Li, Y., Gu, H., and Fang, J. (2016). Critical Role of Kupffer Cell CD89 Expression in Experimental IgA Nephropathy. *PLOS ONE* *11*, e0159426.
- Xu, Z., Zan, H., Pone, E.J., Mai, T., and Casali, P. (2012). Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 517–531.
- Yamanaka, T., Tamauchi, H., Suzuki, Y., Suzuki, H., Horikoshi, S., Terashima, M., Iwabuchi, K., Habu, S., Okumura, K., and Tomino, Y. (2016). Release from Th1-type immune tolerance in spleen and enhanced production of IL-5 in Peyer's patch by cholera toxin B induce the glomerular deposition of IgA. *Immunobiology* *221*, 577–585.
- Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Haas, K.M., Poe, J.C., Fujimoto, M., and Tedder, T.F. (2008). A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* *28*, 639–650.
- Yanagawa, H., Suzuki, H., Suzuki, Y., Kiryluk, K., Gharavi, A.G., Matsuoka, K., Makita, Y., Julian, B.A., Novak, J., and Tomino, Y. (2014). A Panel of Serum Biomarkers Differentiates IgA Nephropathy from Other Renal Diseases. *PLoS ONE* *9*, e98081.
- Yang, M., Li, F., Xie, X., Wang, S., and Fan, J. (2014). CagA, a major virulence factor of *Helicobacter pylori*, promotes the production and underglycosylation of IgA1 in DAKIKI cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *444*, 276–281.
- Zhang, Y., and Zhang, H. (2018). Insights into the Role of Mucosal Immunity in IgA Nephropathy. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* *CJN.04370418*.
- Zheng, F., Kundu, G.C., Zhang, Z., Ward, J., DeMayo, F., and Mukherjee, A.B. (1999). Uteroglobin is essential in preventing immunoglobulin A nephropathy in mice. *Nat. Med.* *5*, 1018.

Zhiming, W., Luman, W., Tingting, Q., and Yiwei, C. (2018). Chemokines and receptors in intestinal B lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* *103*, 807–819.

Zhu, Y., Zou, L., and Liu, Y.-C. (2016). T follicular helper cells, T follicular regulatory cells and autoimmunity. *Int. Immunol.* *28*, 173–179.

(2007). *Mucosal immune defense: immunoglobulin A* (New York: Springer).

Valorisation du travail

Mes travaux de thèse ont fait l'objet de 4 publications (dont une est soumise et 3 autres en préparation) ainsi que de plusieurs communications orales et affichées lors de journées de Recherche et de congrès nationaux et internationaux.

- Journée de l'institut GEIST, Limoges, France, Décembre 2017
- 2^{ème} congrès de la société francophone de néphrologie, de dialyse et de transplantation (SFNDT), Nice, France, Octobre 2017
- Forum doctoral à l'Université Libanaise, Beyrouth, Liban, Septembre 2017
- Journée Rennes-Limoges, Limoges, France, Juillet 2017
- Séminaire thématique, Pouligny-Notre-Dame, France, Mars 2017
- Biobeirut 6 International Meeting, l'Université Libanaise, Beyrouth, Liban, Novembre 2016
- 14^{ème} symposium international de la néphropathie à IgA (IGANN), Tours, France, Septembre 2016
- Forum doctoral à l'Université Libanaise, Beyrouth, Liban, Mai 2016
- Séminaire thématique, Pouligny-Notre-Dame, France, Mars 2016

Annexe

I. Construction du modèle α -KO

Pendant la deuxième année de thèse, nous avons essayé d'élaborer un modèle transgénique déficient pour le gène codant l'immunoglobuline A murine : le modèle α -KO. Après 10 mois, nous avons arrêté le travail et nous avons importé les souris élaborées par une équipe américaine. La démarche de l'obtention du vecteur de ciblage du gène concerné ainsi que la stratégie de transfection de cellules souches embryonnaires (ES) et l'implantation du clone ES portant la mutation sont montrés ci-dessous :

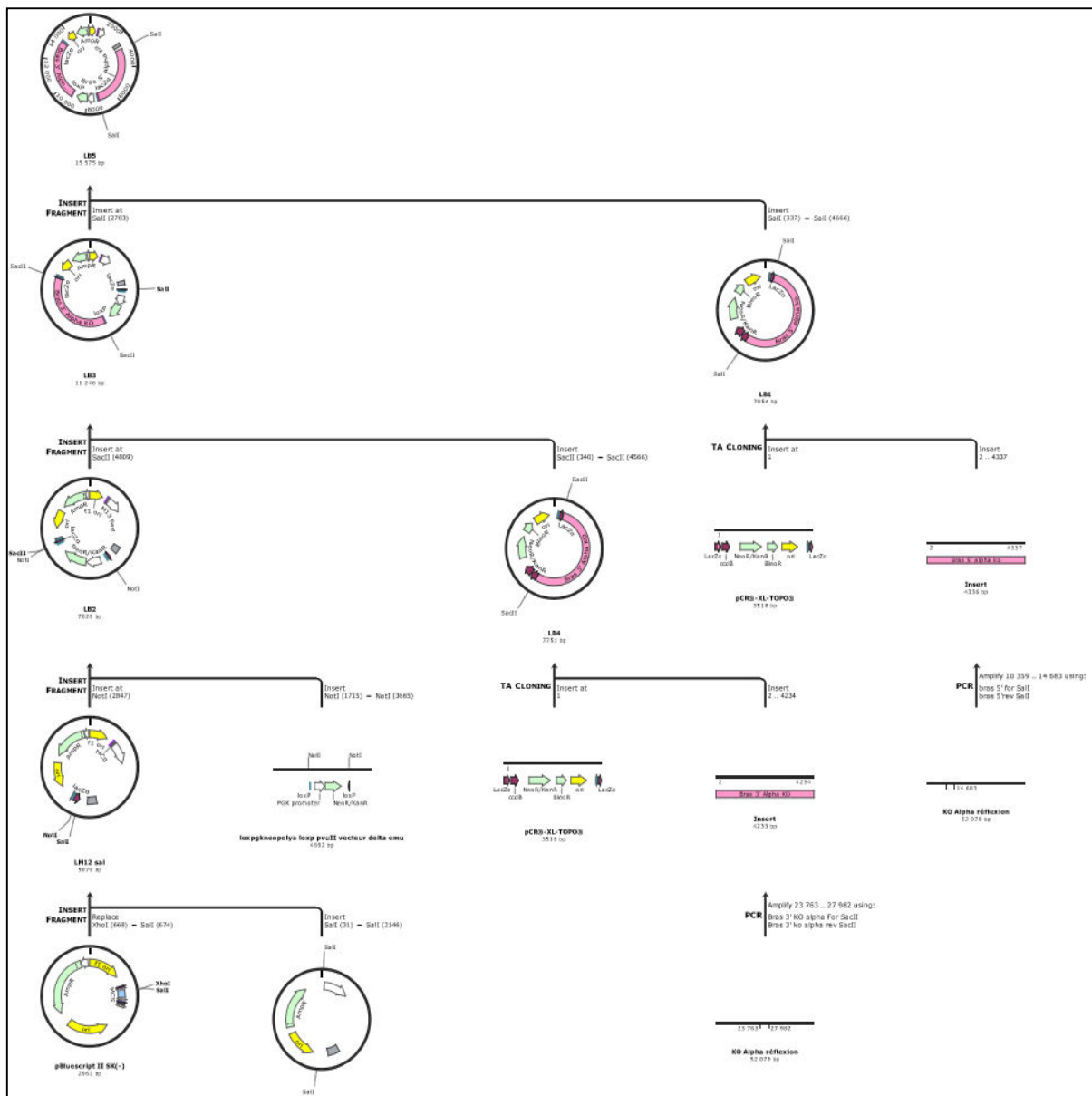


Figure 36: Construction du vecteur de ciblage du gène codant l'IgA murine

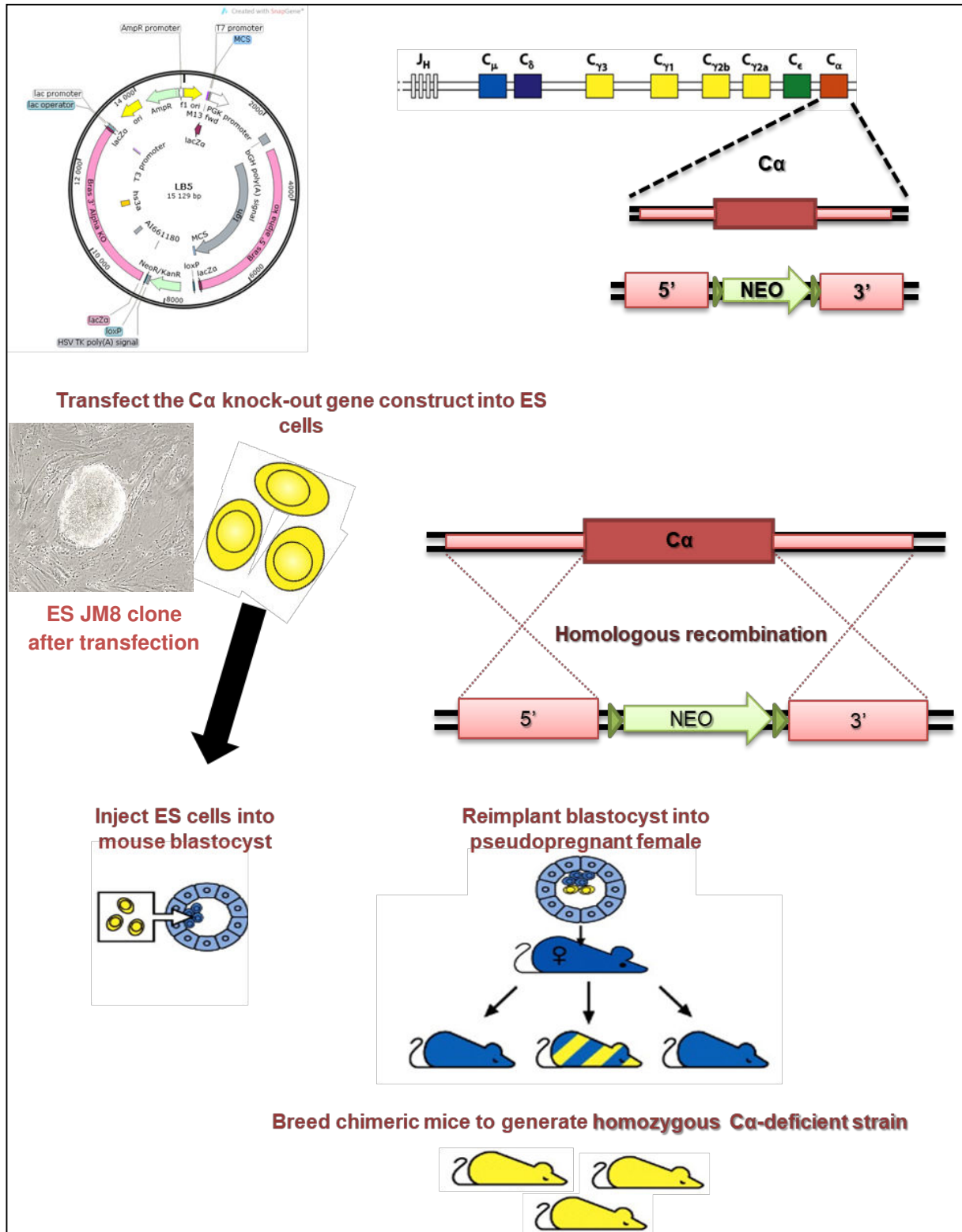


Figure 37: Transfection et implantation des cellules souches embryonnaires

II. Production d'IgA humanisées par la technique d'hybridomes

Des cellules d'hybridomes sécrétrices d'IgA humanisées ont été obtenues par la fusion de splénocytes de souris $\alpha 1\text{KI}$ immunisée par voie intramusculaire vis-à-vis d'un antigène particulier (par exemple le toxoïde tétanique TT) avec des cellules de myélome dites SP2/0.

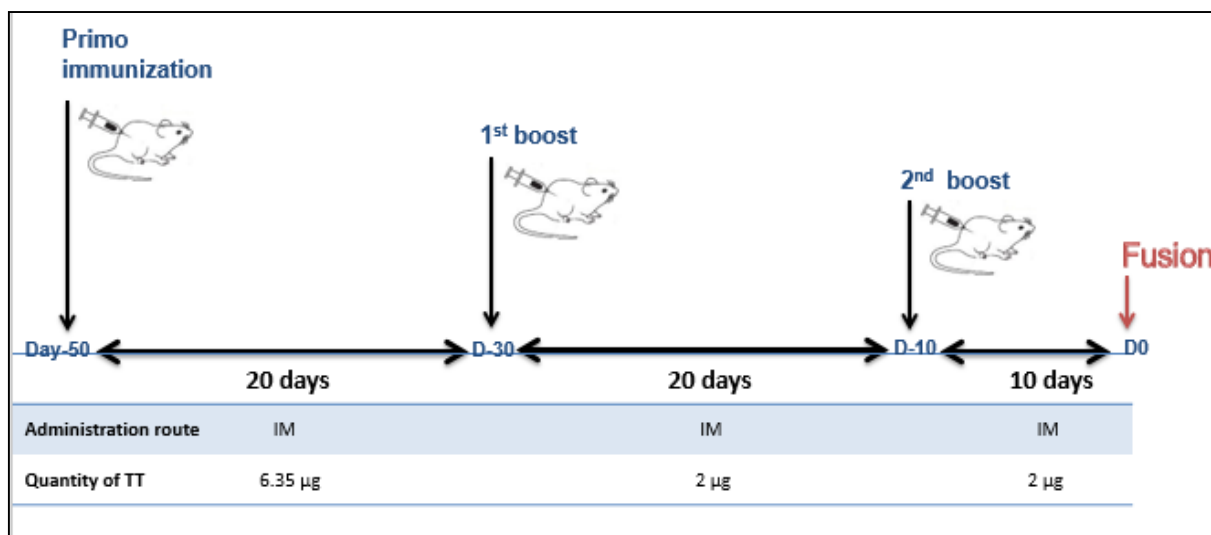


Figure 38: Protocole d'immunisation des souris

Nous avons utilisé la technique de fusion membranaire utilisant le polyéthylène glycol et le diméthylsulfoxyde (PEG-DMSO).

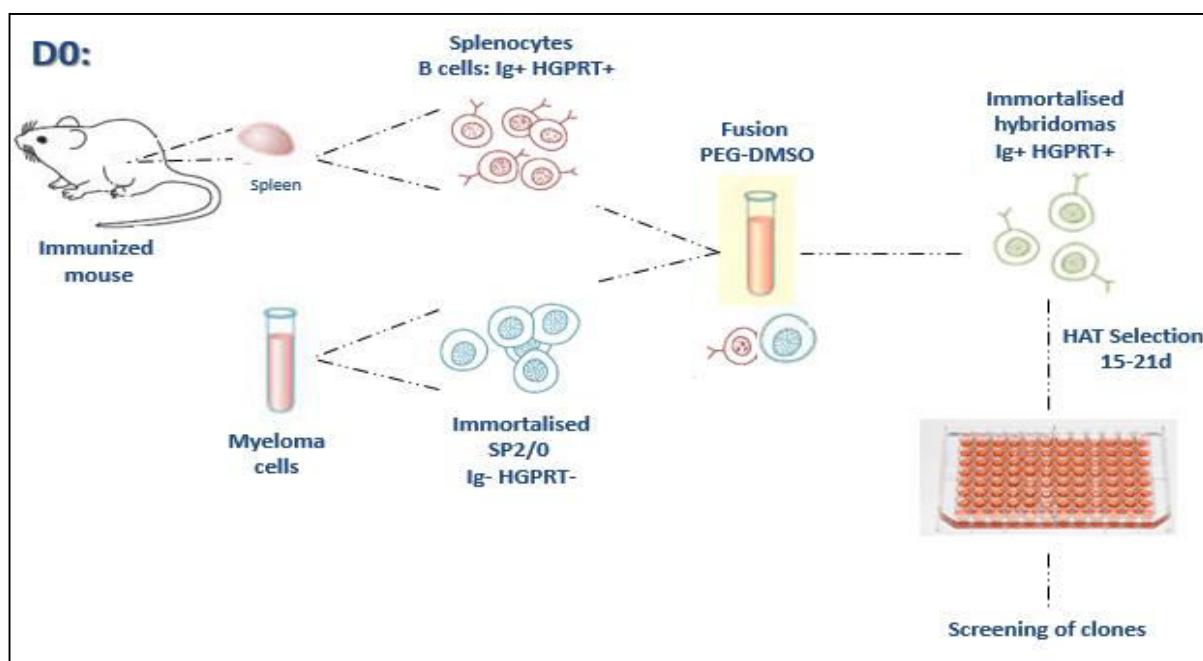


Figure 39 : Protocole de fusion PEG-DMSO

Après la fusion, les cellules sont soumises à une sélection HAT (Hypoxanthine –Aminoptérine-Thymidine) basée sur les voies de synthèse d'ADN qu'elles utilisent.




|  Splenocyte |  SP2/0 |  Hybridoma |
|--|---|---|
| <i>Mortal</i> | Immortal | Immortal |
| HGPRT+ | <i>HGPRT-</i> | HGPRT+ |
| De novo (blocked by aminoptérine) | De novo (blocked by aminoptérine) | Exogen |
| Exogen | | |
| <i>die</i> | <i>die</i> | Survive |

Figure 40 : Principe de sélection des clones

Seuls les clones d'hybridomes peuvent résister à cette sélection. Les surnageants de culture des clones survivants seront screenés par ELISA afin de sélectionner les clones d'intérêt.

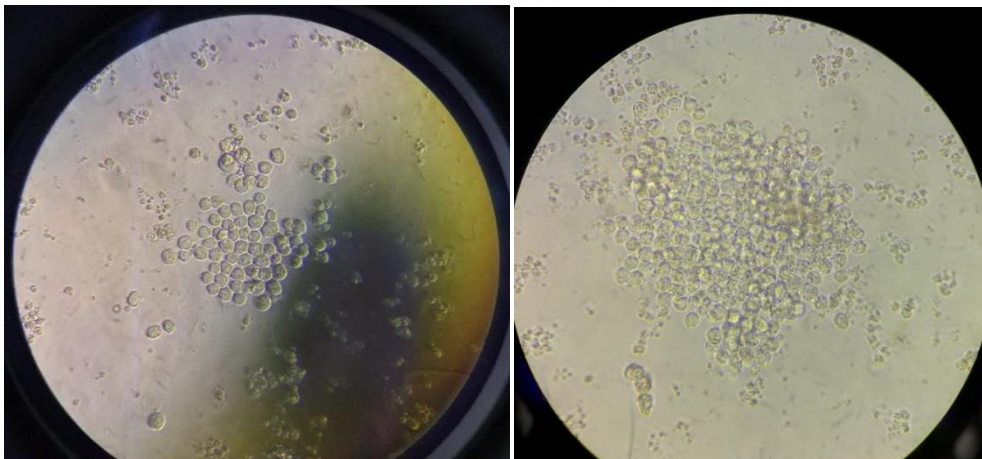


Figure 41: Clone d'hybridome à J9 et à J13 après fusion

III. Resume

Batoul WEHBE

Address : 2 Rue de Dr Marcland
CBRS-Faculty of Medicine- Limoges University
87025 Limoges- France
Phone : +33 06 29 65 07 37
E-mail: batoulhwehbi@gmail.com
batoul.wehbe@unilim.fr

Research Experience

- Thesis in Immunology (2015 - present)
CRIBL, UMR CNRS 7276 INSERM 1262 (Faculty of Medicine- Limoges- France)
"Modulator effects of Immunoglobulin A on immuno-pathological responses implicating the kidney"
- Master 2 Internship (2013 - 2014)
EDST (Faculty of Sciences- Beirut- Lebanon)
"Cytotoxic and anti-inflammatory effects of Lebanese propolis"

Additional Experience

- 2017: Supervision of Master 2 Research student, CRIBL, Limoges University, France
- 2015: Supervision of Master 2 Research student, EDST, Lebanese University, Lebanon

Education

- Ph.D. in Immunology (2014 - present)
Thesis Lebanese University (Lebanon) and Limoges University (France)
- Master 2 Research in Immunotherapy (2013 - 2014)
Very good - Ranking: 1/13
Faculty of Sciences I - Lebanese University (Lebanon)
- Master 1 in Applied Animal Biology (2012 - 2013)
Very good
Faculty of Sciences I - Lebanese University (Lebanon)
- BA in Biology (2009 - 2012)
Very good
Faculty of Sciences V - Lebanese University (Lebanon)
- High school diploma in Life Sciences (2008 - 2009) with distinction
Jbaa High school (Lebanon)

Funding

- 2017 - 2018: Term contract Ph.D. student with Limoges University
- 2014 - 2017: Doctoral fellowship from National Center of Scientific Research and the Lebanese University (bourse commune CNRS-UL)

Technical Skills

- **Cellular Biology:**
Cell lines culture- Embryonic stem cells culture and transfection- Hybridoma production- Fluorescence-activated cell sorting
- **Molecular Biology:**
Vectors and primers design- Enzymatic digestion and ligation- DNA, plasmid DNA and RNA extraction- PCR- qRT-PCR- Bacterial transformation and cloning- Southern blot- High throughput sequencing
- **Biochemistry:**
Protein extraction- Western blot- ELISA- EIA- GRIESS test- Immunofluorescence
- **Microscopy:**
Optical, Confocal and Epifluorescent
- **Organic Chemistry:**
Bioactive molecules extraction and fractionation- Maceration- Rotary evaporation- Liquid-liquid Extraction- Radical scavenging assay
- **Animal Experimentation:**
Animal handling- *in vivo* injections (in intraperitoneal, subcutaneous, intra-rectal and intra-nasal)- Dissection- Organ collection and section preparation using cryostat

Scientific communications

➤ Publications

- Nouredine H, Hage-Sleiman R, Wehbi B et al. Chemical characterization and cytotoxic activity evaluation of Lebanese propolis. *Biomed Pharmacother.* 2017;95:298–307
- Wehbi B, Oblet C, Boyer F et al. Mesangial deposition most often involves IgA molecules lacking affinity maturation. Submitted to *Journal of Clinical Investigation*

➤ National and International conferences

- Thematic seminar, Pouligny-Notre-Dame, France, 2016 (Oral presentation)
- Thematic seminar, Pouligny-Notre-Dame, France, 2017 (Oral presentation)
- GEIST research day, Limoges, France 2017 (Poster)
- Doctoral forum, Beirut, Lebanon, 2017 (Poster presented by Dr. El Makhour)
- Rennes-Limoges day, Limoges, France, 2017 (Poster)
- 14th international symposium of IgA nephropathy, Tours, France, 2016
- 2nd congress of francophone society of nephrology, dialysis and transplantation, Nice, France, 2017 (2 Posters)
- BioBeirut international meeting 6, Beirut, Lebanon, 2016 (Poster)
- BioBeirut international meeting 5, Beirut, Lebanon, 2015 (Auditor)

Trainings:

- “Writing scientific papers in English”, Beirut 2015
- “Health and Safety”, Limoges 2016
- “Define professional project for job search”, Limoges 2016
- “Ethics of higher Education”, Limoges 2016
- “Build your professional network”, Limoges 2016
- “Group Management”, Limoges 2016
- “Digital tools for literature and literature search”, Limoges 2016
- “Meeting Conduct and team animation”, Limoges 2017
- “Methodological tools to optimize your CV”, Limoges 2017
- “Methodological tools for writing a cover letter and preparing a job interview”, Limoges 2017
- “Animal Experimentation” (12h), Limoges 2017
- “Animal Experimentation” (25h), Limoges-Tours 2018

- “FlowLogic”, Limoges 2018
- “Immersion course in English”, Limoges 2018
- “Omic Data Analysis” (9 days), Limoges-Rennes 2018

IT Skills

- Computer literate: Microsoft Word, Excel, Power Point
- Softwares: GraphPad Prism, Image Lab, Image J, Volocity, R-studio, IPA, Anibio, FlowLogic
- Bioinformatic databases and tools: NCBI- EBI- DDBJ- UniProt- IMGT- SnapGene...

Language Skills

- English: Working proficiency scored on TOEIC in 2018 (830/990)
- French: Professional proficiency
- Arabic: Native speaker

Personal Qualifications/ Profile:

- Well organized
- Quick to learn
- Highly motivated
- Flexible

Interests:

- Gardening
- Photography
- Traveling

Referees

- Pr. Jean-Claude ALDIGIER
PU-PH at Limoges University, UMR CNRS 7276 INSERM 1262, France
Phone : 0033 05 19 56 42 74
E-mail : jean-claude.aldigier@unilim.fr
- Pr. Bassam BADRAN
Professor and Dean of Faculty of Sciences-I, Lebanese University, Lebanon
Phone : 00961 03 67 56 42
E-mail : bassam.badrans@ul.edu.lb
- Pr. Michel COGNE
PU-PH at Limoges University, UMR CNRS 7276 INSERM 1262, France
Phone : 0033 05 19 56 42 02
E-mail : michel.cogne@unilim.fr
- Dr. Yolla EL MAKHOUR
Professor at Lebanese University, Faculty of Sciences-V, Lebanon
Phone : 00961 03 06 09 78
E-mail : yollamakhour@yahoo.com

Rôles de l'immunoglobuline A (IgA) dans deux pathologies rénales

L'immunoglobuline A (IgA) est l'immunoglobuline la plus abondamment synthétisée chez les mammifères. Ses propriétés ambivalentes l'impliquent non seulement dans des fonctions de protection contre les agents pathogènes mais aussi dans des phénomènes de tolérance immunitaire vis-à-vis des germes commensaux du microbiote. Toutefois, les IgA peuvent développer des propriétés pathogènes.

Dans la première partie de mon travail de thèse, nous avons étudié les effets pathogènes de l'IgA. Les dépôts d'IgA sur le mésangium sont la caractéristique de l'IgAN. La physiopathologie de cette maladie est mal connue. L'hypothèse d'un défaut de glycosylation de l'IgA est souvent retenue ; ce défaut peut être la cause de sa polymérisation et de son antigénicité, il peut aussi favoriser le clivage du récepteur CD89. Nous avons analysé l'effet du défaut d'affinité de la région variable des IgA, de la substitution de la chaîne légère ainsi que de l'association des IgA à leur récepteur, le CD89 sur l'induction des lésions et le dysfonctionnement rénal chez quatre modèles murins différents générés au laboratoire et suivis pendant 12 mois. Nous avons également étudié les propriétés physico-chimiques des IgA de 28 patients ayant une dysglobulinémie et de 28 IgA produites par des hybridomes ; la relation entre ces propriétés et la capacité des IgA à se déposer a été observée.

Dans une seconde partie, nous avons étudié l'aspect immunomodulateur et les propriétés anti-inflammatoires conférées par l'IgA humaine surexprimée chez un modèle murin de lupus systémique (souris MRL/lpr).

Dans la dernière partie du travail, nous avons contribué à la caractérisation d'un modèle de souris transgénique exprimant l'IgA de classe 2 et à l'étude de l'effet de signalisation médiée par cette IgA2 sur le développement des populations lymphocytaires.

L'ensemble de ces travaux a montré l'effet pathogène des IgA naturelles ayant une faible affinité sur le développement de la néphropathie à IgA ; ainsi les analyses des IgA des patients et des hybridomes montrent que c'est la stabilité moléculaire de préférence au profil de glycosylation qui joue un rôle crucial dans leur capacité de dépôt. L'expression des IgA humaines chez les souris lupiques a considérablement prolongé leur durée de vie et a ralenti la survenue de l'auto-immunité et de l'atteinte rénale ce qui témoigne du rôle anti-inflammatoire des IgA. L'étude du modèle murin exprimant l'IgA2 humaine a montré que la signalisation via l'IgA2 joue un rôle inhibiteur sur le développement précoce de certaines sous-populations de cellules B.

L'ensemble de ces résultats montrent la multitude d'effets de l'IgA lui permettant d'intervenir d'une part dans la pathogenèse d'une maladie complexe (l'IgAN) et d'autre part dans la protection de l'auto-immunité, témoignant de la complexité des interactions mises en jeu et du caractère régulateur de cette immunoglobuline.

Mots-clés : Immunoglobuline A - modèle murin - néphropathie à IgA - immunomodulation - IgA2

Role of immunoglobulin A (IgA) on two renal pathologies

Immunoglobulin A (IgA) is the most synthesized immunoglobulin in mammals. IgA has ambivalent properties: it is implicated in the mechanisms of defense against pathogens but also in the immune tolerance of commensal microbiota. However, IgA can develop pathogenic properties.

In the first part of my thesis, we studied the pathogenic effects of IgA. IgA deposits are the main characteristic of IgA nephropathy (IgAN). IgAN physiopathology is not yet clearly understood. The hypothesis of a glycosylation defect is strongly adapted. This defect can be due to IgA polymerization or antigenicity. It can also induce shedding of CD89 (IgA Fc receptor) or other factors. We studied the effect of variable region altered affinity, the light chain substitution and the association of IgA with CD89 on the development of kidney lesions and impairment of kidney function in four mouse models followed up during 12 months. In addition, we studied the physico-chemical properties of 28 IgA purified from patients with dysglobulinaemia and 28 chimeric IgA produced by hybridomas. The effect of these properties on the propensity of IgA for mesangial deposition was explored.

In the second part, we studied the immunomodulatory and anti-inflammatory properties conferred by the overexpression of human IgA in a mouse model with systemic lupus (MRL/lpr model).

In the last part, we contributed to the characterization of a transgenic mouse model producing IgA class 2 and to the study of the effect of IgA2-mediated signaling on B lymphocyte development.

Altogether, obtained results show the pathogenic effect of low affinity-IgA on the development of IgA nephropathy. In addition, different analyses showed that molecular stability but not glycosylation profile is the determining factor for IgA deposition. On the other hand, IgA expression in lupus-prone mice extended their survival, delayed the onset of auto-immunity and ameliorated kidney functions in these animals which supports IgA anti-inflammatory properties. The study of IgA2-mediated signaling in the transgenic model showed the inhibitory effect of IgA2 on the early development of several B cell sub-populations.

All of these results show the multiple effects of IgA which contribute on one hand to the pathogenesis of a complex disease (IgAN) and on the other hand to protection from autoimmunity, demonstrating the complexity of interactions and the regulatory character of this immunoglobulin.

Keywords: Immunoglobulin A - mouse model - IgA nephropathy - immunomodulation - IgA2