

# UN NOUVEL ANTIGÈNE IMPLIQUÉ DANS LA PATHOGÉNIE DES GLOMÉRULONÉPHRITES EXTRAMEMBRANEUSES : VERS DE NOUVEAUX CONCEPTS PHYSIOPATHOLOGIQUES ?

par

H. DEBIEC\*, V. GUIGONIS\*\*, B. MOUGENOT\*, J.-P. HAYMANN\*,  
A. BENSMAN\*\*, G. DESCHÈNES\*\* et P. RONCO\*

Les glomérulonéphrites extramembraneuses (GEM) représentent une cause majeure de syndrome néphrotique et d'insuffisance rénale chronique. Elles peuvent être associées à des situations pathologiques diverses (infections, cancers, maladies auto-immunes, prise de médicaments néphrotoxiques), mais les formes dites primitives, sans cause reconnue, restent les plus fréquentes. Sur le plan histologique, elles sont caractérisées par l'accumulation de dépôts immuns sur le versant externe de la membrane basale glomérulaire (MBG), sous les semelles des pédicelles et les diaphragmes de fente, mais l'(ou les) antigène(s) cible(s) n'a pas été identifié(s) chez l'homme.

Nos connaissances sur la physiopathologie de la maladie proviennent principalement de l'étude de la néphrite de Heymann, qui est un modèle de GEM induit chez le rat immunisé avec une préparation membranaire de la bordure en brosse (BB) des tubes contournés proximaux [1]. Ce modèle expérimental a conduit à l'identification de la mégaline, une protéine membranaire exprimée dans la bordure en brosse chez tous les mammifères testés et à la surface des podocytes chez le rat uniquement [2, 3]. Bien que la mégaline ait été détectée dans la BB des tubes proximaux chez l'homme, on ne trouve la protéine ni dans les glomérules humains ni dans les dépôts immuns chez les malades atteints de GEM [4]. La recherche d'antigènes responsables des GEM humaines a mobilisé – sans succès – de nombreux laboratoires depuis la découverte de la mégaline au début des années 1980. Différents antigènes dont des antigènes viraux (hépatite B, hépatite C) et bacté-

\* Unité INSERM 489 et Service de Néphrologie B, Hôpital Tenon.

\*\* Service de Néphrologie pédiatrique, Hôpital Armand-Trousseau ; Assistance publique – Hôpitaux de Paris et Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), Paris, France

riens (*Helicobacter pylori*), des antigènes tumoraux, la thyroglobuline, ont été détectés dans les dépôts subépithéliaux, mais il n'y a pas de preuve réelle que ces antigènes soient pathogéniques [5-7]. Leur présence dans les dépôts pourrait être la conséquence de l'augmentation de perméabilité du capillaire glomérulaire. Des antigènes de la BB rénale ont également été mis en évidence dans les dépôts glomérulaires chez de rares patients, mais ils n'ont pas pu être identifiés précisément [8-10].

Il y a une vingtaine d'années, nous avons montré que des anticorps dirigés contre deux protéines enzymatiques, la dipeptidylpeptidase IV et l'endopeptidase neutre (EPN), pouvaient être impliqués dans la formation de dépôts extramembraneux quand ils étaient injectés chez le rat et le lapin, respectivement [11-13]. Ces antigènes sont exprimés par la BB et les podocytes, avec une expression phylogénétique variable, mais on les trouve également à la surface des podocytes humains [13-14]. Nous avons alors fait l'hypothèse qu'ils pourraient jouer un rôle dans la physiopathologie de certaines GEM humaines. Cette hypothèse a été confirmée 20 ans après pour l'EPN [15].

## UNE HISTOIRE DE FAMILLE

Tout commence par la naissance d'un enfant de sexe mâle, à 38 semaines de gestation, qui présente dès le premier jour de la vie, une oligo-anurie (volume urinaire, 10 ml/24 heures), une protéinurie massive (1,6 g/mmol de créatinine), et une insuffisance respiratoire aiguë. Son poids de naissance était de 3 260 g, et sa taille de 50 cm. Ses parents sont non apparentés, en bonne santé, et il n'existe pas d'histoire familiale de maladie rénale ou auto-immune. La mère, âgée de 24 ans à la naissance de l'enfant, avait eu un avortement spontané à 14 semaines de gestation, deux mois avant cette grossesse. Sa pression artérielle, ses analyses urinaires, et sa créatininémie ont été normales pendant toute la grossesse et après celle-ci. Elle ne prend aucun médicament. Cependant, une échographie effectuée à la 34<sup>ème</sup> semaine de la grossesse avait montré un oligohydramnios et une augmentation de la taille des reins du fœtus.

L'enfant a été ventilé dès la naissance et jusqu'à 10 jours de vie. Son taux de créatininémie a atteint une valeur maximale de 240  $\mu\text{mol/l}$  à 4 jours. Il a présenté une protéinurie de débit néphrotique dès la naissance, responsable d'une hypoalbuminémie (19 g/l à 7 jours). Il était également hypertendu.

En raison de la persistance du syndrome néphrotique, une biopsie rénale a été réalisée sous contrôle scannographique à 4 semaines. L'analyse du prélèvement a montré une forme sévère, inhabituelle de GEM. Les floculus étaient collabés dans la majorité des 40 glomérules (Planche couleurs I.A). La plupart des espaces urinaires étaient également distendus. Dans tous les glomérules, les parois capillaires étaient épaissies ; cet épaississement était plus visible dans les glomérules non collabés dont les anses capillaires montraient des images de massue (fig. 1B Planche couleurs II). L'atteinte glomérulaire était associée à une atrophie tubulaire importante (fig. 1A Planche couleurs II) et à des lésions sévères des artères interlobulaires et des artérioles (fig. 1B Planche couleurs II). Les études en immunofluorescence ont montré d'importants dépôts extramembraneux d'IgG (fig. 1C Planche couleurs II), de C3 et du complexe d'attaque membranaire du

complément C5b-9 dans tous les glomérules. Il n'y avait pas de dépôts immuns dans les tubes proximaux et les vaisseaux. L'examen au microscope électronique a révélé des altérations diffuses des parois des capillaires glomérulaires et une atrophie marquée de la BB. Des dépôts denses aux électrons, très abondants, ont été mis en évidence sur le versant externe de la MBG (fig. 1D Planche couleurs II). Ces dépôts contenaient des formations annulaires inhabituelles, et étaient souvent revêtus d'une couche de matrice extracellulaire issue de la *lamina densa*. Nous n'avons pas trouvé de dépôts subendothéliaux ou mésangiaux.

L'enquête étiologique n'a pas mis en évidence de cause infectieuse : les tests de syphilis, toxoplasmose, cytomégalovirose et d'infection par le virus de l'hépatite B étaient négatifs. Le test de Coombs était également négatif, et les composants du complément (C3 : 0,97 g/l ; C4 : 0,25 g/l) étaient normaux à l'âge de 35 jours. Des taux faibles de complexes immuns circulants (4 µg/ml) ont été mesurés dans le sérum 13 jours après la naissance, mais ils n'étaient plus détectables 40 jours après.

L'enfant est maintenant âgé de 22 mois (Novembre 2002). Son examen est normal. Son hypertension est contrôlée par le nicardipine (2 mg par kilo par jour). Le taux de créatininémie est normal (53 µmol/l), mais il persiste une protéinurie sélective (140 mg/mmol de créatinine urinaire) qui témoigne vraisemblablement d'une altération persistante du filtre glomérulaire.

## IDENTIFICATION DE L'ENDOPEPTIDASE NEUTRE, L'ANTIGÈNE CIBLE DES ANTICORPS MATERNELS NÉPHRITOGÈNES

En raison du développement précoce d'une GEM chez ce nourrisson, nous avons évoqué l'hypothèse du passage transplacentaire d'anticorps néphritogènes produits par la mère à la suite d'une immunisation antérieure. Cette hypothèse a été testée par un examen en immunofluorescence indirecte de sections de rein humain normal incubées avec les sérums de la mère et de son enfant. Un sérum obtenu neuf mois avant la grossesse (sept mois avant l'avortement spontané) était négatif (fig. 2A Planche couleurs II), alors que les sérums prélevés à trois mois de grossesse et après l'accouchement se fixaient avec une forte intensité sur les parois des capillaires glomérulaires et la BB dans tous les échantillons de rein humain testés (fig. 2B Planche couleurs II). Le même patron de fluorescence était observé avec le sérum du nourrisson à 13 jours (fig. 2C Planche couleurs II). Le fait qu'aucune réactivité ne restait détectable dans le sérum du nourrisson âgé de 40 jours (fig. 2D Planche couleurs II), était très en faveur d'une immunisation passive de l'enfant comparable à l'immunisation Rhésus.

La nature de l'antigène cible a été suspectée grâce à l'examen en immunofluorescence indirecte de sections de lapin et de rat incubées avec le sérum de la mère ou du nourrisson. Nous avons observé le même patron d'immunofluorescence chez le lapin que chez l'homme (fig. 2E Planche couleurs II), mais chez le rat, le marquage était restreint aux cellules pariétales de la capsule de Bowman et à la BB des segments corticaux profonds du tubule proximal (*pars recta*), (fig 2F Planche couleurs II). Ces différences d'expression interspèces de l'antigène étaient similaires à celles que nous avons constatées dans les années 1980 pour l'EPN, cette enzyme n'étant pas produite par les podocytes chez la souris et chez le rat [14]. En revanche,

la dipeptidylpeptidase IV est exprimée à la surface des podocytes dans toutes les espèces analysées [14]. Nous avons donc formulé l'hypothèse d'une implication de l'EPN dans la formation des dépôts extramembraneux. Cette hypothèse a été testée par des expériences de Western blot et d'immunoprécipitation. Les IgG de la mère et celles de l'enfant reconnaissent en Western blot, un seul antigène dont le poids moléculaire est d'environ 90 kD dans les extraits protéiques de la BB de rat, du cortex rénal de lapin, et de podocytes humains en culture (fig. 2G Planche couleurs II). Cet antigène a la même mobilité électrophorétique que l'EPN identifiée dans la même expérience par un anticorps monoclonal (fig. 2G Planche couleurs II). Pour confirmer l'identité avec l'EPN de l'antigène reconnu par les anticorps néphritogènes, une préparation de BB de rat a été immunoprécipitée par les IgG de la mère ou des IgG témoins. Les antigènes immunoprécipités ont été élués (remis en solution) et analysés par Western blot avec des anticorps anti-EPN, en même temps que la fraction de la BB qui n'a pas été retenue par les IgG. Les résultats ont montré que l'antigène EPN était détecté essentiellement dans la fraction immunoprécipitée par les IgG de la mère, alors que l'EPN n'a été identifiée que dans la fraction non immunoprécipitée dans l'expérience contrôle (fig. 2H Planche couleurs II). En outre, nous avons mesuré l'activité enzymatique caractéristique de l'EPN dans la fraction éluee des IgG de la mère, alors qu'elle était absente de la fraction éluee des IgG témoins.

Pour démontrer que les anticorps anti-EPN produits par la mère, qui ont été trouvés dans le sérum du nourrisson 13 jours après sa naissance, sont les anticorps néphritogènes, responsables de la GEM, nous avons réalisé deux types d'expériences. D'une part, nous avons transféré la maladie à des lapins en leur injectant soit les IgG de la mère, soit les IgG du père. Les lapins injectés avec les IgG de la mère ont développé des dépôts extramembraneux et une protéinurie, qui n'ont pas été observés chez les lapins injectés avec les IgG du père (fig. 3D et G Planche couleurs II). D'autre part, nous avons étudié la composition des dépôts extramembraneux par microscopie confocale à l'aide d'anticorps polyclonaux anti-EPN et anti-IgG humaine. Nous avons montré une colocalisation parfaite de l'IgG et de l'EPN au sein des dépôts, sur le versant externe de la membrane basale, dans la biopsie du nourrisson (fig. 3A à C Planche couleurs II), et dans celle d'un lapin injecté avec les IgG maternelles (fig. 3D à F Planche couleurs II).

Ces résultats expérimentaux permettent de conclure que la GEM de l'enfant, dont les premières manifestations ont été anténatales, est due au passage transplacentaire d'anticorps maternels dirigés contre l'EPN.

## MÉCANISMES DE LA FORMATION DES DÉPÔTS IMMUNS DANS LES GLOMÉRULES DU NOURRISSON

Les GEM ont longtemps été considérées comme un modèle de glomérulopathie immunologique due au dépôt dans les glomérules de complexes immuns préformés dans la circulation. Les études initiales portant sur la néphrite de Heymann « active » (induite par l'immunisation du rat avec la BB de rat) avaient suggéré que les dépôts extramembraneux résultaient d'une capture par la paroi du capillaire glomérulaire de complexes immuns circulants composés d'antigènes apparentés à la BB et des anticorps correspondants. Cette hypothèse reposait sur une double constatation : d'une part, la maladie était induite par une préparation membranaire

de BB de rat, alors que des extraits glomérulaires n'avaient pas d'effet néphritogène dans les mêmes conditions d'immunisation ; d'autre part, les Ig néphritogènes éluées (extraites) des glomérules de rats malades ne se fixaient pas sur des glomérules normaux, ce qui *a priori* excluait la responsabilité d'un antigène glomérulaire qui serait également exprimé dans la BB. Par la suite, le développement du modèle de néphrite de Heymann « passive » induite par l'injection chez le rat d'anticorps anti-BB produits chez le lapin a permis de montrer que les dépôts extramembraneux d'IgG pouvaient se former sans l'intervention de complexes immuns circulants. Les mécanismes moléculaires de la formation des dépôts ont été élucidés avec l'identification de l'antigène cible, la mégaline, dans les puits mantelés des podocytes de rat, où la protéine est localisée à la « semelle » des pédicelles faisant face à la paroi du capillaire glomérulaire [2].

Des taux faibles de complexes immuns circulants ont été détectés dans le sérum du nourrisson à 13 jours. Ces complexes n'étaient ensuite plus détectables. Ces complexes, que nous avons isolés du sérum, contenaient de l'EPN que nous avons identifiée par Western blotting avec des anticorps spécifiques (fig. 2I Planche couleurs II). Les polynucléaires neutrophiles sont une source importante d'EPN. Dans ces cellules, l'EPN est exprimée à la membrane, si bien que la fixation d'anticorps circulants anti-EPN pourrait induire le relargage de l'antigène au sein de complexes immuns dans la circulation. Cependant, la contribution des complexes immuns circulants à la formation des dépôts immuns extramembraneux chez le nourrisson reste hypothétique pour trois raisons : i) leur taux était faible ; ii) les manifestations de maladie sérique étaient absentes ; iii) nous n'avons pas observé de dépôts immuns mésangiaux et sous-endothéliaux (endomembraneux). Les complexes immuns responsables des dépôts extramembraneux pourraient également être formés *in situ* au niveau de la semelle des pédicelles où l'EPN est exprimée [16], comme c'est le cas dans la néphrite de Heymann « passive ». Les deux mécanismes ne sont pas exclusifs.

Contrairement à la mégaline, l'EPN est exprimée de manière diffuse sur la membrane des podocytes, comme l'est l'enzyme de conversion de l'angiotensine sur la membrane des oocytes matures [17]. *In vivo*, l'interaction de l'enzyme de conversion de l'angiotensine avec des anticorps divalents induit la formation de dépôts immuns granuleux par un mécanisme de concentration (*patching*) de l'antigène dans la membrane de l'oocyte, puis de relargage (*shedding*) des complexes immuns formés à la membrane [17]. Un mécanisme analogue peut être impliqué dans la formation des dépôts immuns dans les glomérules du nourrisson. On peut envisager que les complexes immuns relargués par les pédicelles soient séquestrés entre la *lamina rara externa* de la paroi du capillaire glomérulaire et les diaphragmes de fente formant ainsi des dépôts extramembraneux, alors que les complexes immuns relargués à partir du corps cellulaire des podocytes soient excrétés dans l'urine.

## POURQUOI LA MÈRE DE L'ENFANT S'EST-ELLE IMMUNISÉE CONTRE L'ENDOPEPTIDASE NEUTRE ?

En raison de l'absence de toute anomalie rénale glomérulaire et tubulaire chez la mère de l'enfant malgré la persistance de taux élevés d'anticorps anti-EPN, nous avons formulé l'hypothèse qu'elle pourrait être déficiente en EPN. Nous avons donc

analysé la présence de l'EPN dans les polynucléaires neutrophiles et dans les urines où l'EPN est sécrétée par les cellules tubulaires proximales, l'EPN représentant 4 p. 100 des protéines de la BB. L'analyse en FACS (trieur de cellules) des granulocytes de la mère incubés avec différents anticorps anti-EPN n'a pas permis de mettre en évidence l'EPN à la surface de ces cellules. L'absence d'EPN dans les granulocytes et les urines a été confirmée par une analyse en Western blot. Le sérum de la mère, qui ne reconnaissait pas ses propres granulocytes, réagissait cependant avec les granulocytes du père de l'enfant, témoignant ainsi d'un processus d'allo-immunisation. Selon toute vraisemblance, cette allo-immunisation est survenue au moment de l'avortement spontané, puisqu'un sérum obtenu avant cet avortement ne contenait pas d'anticorps anti-EPN. Au cours de la grossesse, l'EPN est fortement exprimée dans les syncytiotrophoblastes [18] ; elle peut aussi apparaître dans la circulation maternelle à la suite du passage de cellules fœtales qui expriment l'enzyme.

En collaboration avec Florence Coulet (Laboratoire du professeur Florent Soubrier, Hôpital Tenon), nous avons montré que l'absence d'EPN était la conséquence de deux mutations différentes, potentiellement responsables de la production de protéines tronquées dépourvues du site actif de l'enzyme.

Malgré l'absence d'EPN, la mère semble parfaitement bien portante. Elle est normotendue. Elle n'a aucune anomalie rénale : absence de micro-albuminurie et de protéinurie, et d'altérations du débit de filtration glomérulaire et des fonctions tubulaires. Elle n'a pas non plus de déficit immunitaire alors que l'EPN était jusqu'alors considérée comme une molécule essentielle au développement précoce du thymus [19] et à la maturation des lymphocytes B [20, 21]. L'absence de phénotype apparent suggère que d'autres enzymes se substituent à l'EPN pour accomplir ses fonctions. Le phénotype des souris chez lesquelles le gène *EPN* a été invalidé, est défini par une sensibilité accrue au choc infectieux, dont le mécanisme reste à déterminer [22]. Leur pression artérielle moyenne est inférieure de 20 p. 100 à celle des souris témoins, et ces souris présentent une augmentation de la perméabilité dans les microvaisseaux [23]. Il est possible que chez la souris, les mécanismes compensant l'absence d'EPN ne soient pas aussi développés que chez l'homme.

Une atteinte rénale induite par une réponse allo-immune à des antigènes rénaux a été décrite pour la première fois pour des antigènes de la membrane basale tubulaire chez le rat après transplantation rénale [24]. Notre observation rappelle les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'immunisation Rhésus.

## RÔLE POTENTIEL DU BLOCAGE DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE L'ENDOPEPTIDASE NEUTRE PAR LES ANTICORPS NÉPHRITOGÈNES

L'EPN (encore appelée néprilysine, enképhalinase, CD10, EC 3.4.24.11) est une métallopeptidase à zinc d'un poids moléculaire apparent compris entre 90 et 110 kD. Elle est identique à l'antigène commun des leucémies aiguës lymphoblastiques (CALLA), [25, 26]. Elle est exprimée dans le cerveau, à la surface des polynucléaires neutrophiles et des progéniteurs lymphocytaires, et sur les cellules épithéliales des tissus épithéliaux dont le rein, le foie, le sein, et le poumon [27, 28]. On la trouve aussi dans le sérum et l'urine [29, 30]. Cette enzyme est impliquée

dans le métabolisme de peptides ayant une action régulatrice, et elle joue un rôle important dans la terminaison des voies de signalisation stimulées par la fixation de ces peptides à la surface cellulaire [31]. Dans le rein humain, l'EPN est présente dans la BB, et à la surface des podocytes et des cellules musculaires lisses vasculaires [14, 32].

Afin de rechercher un effet potentiel des anticorps néphritogènes anti-EPN sur l'activité enzymatique, nous avons incubé des lysats de podocyte humain avec les IgG de la mère ou du père, et nous avons mesuré l'activité enzymatique de l'EPN après cette incubation. Les IgG maternelles, à la différence des IgG paternelles, inhibaient l'activité enzymatique de l'EPN, bloquant totalement cette activité à la concentration la plus forte comme le font les inhibiteurs spécifiques de l'enzyme, thiorphan et phosphoramidon [15].

La GEM diagnostiquée chez le nourrisson était particulière par l'existence de lésions artérielles sévères, inhabituelles dans ce contexte pathologique, et par un collapsus de la plupart des floculus glomérulaires suggérant une ischémie rénale majeure pendant le développement anténatal du rein. Étant donné que l'EPN inactive des peptides vaso-actifs comme la bradykinine, les peptides natriurétiques et les endothélines, nous faisons l'hypothèse que l'inhibition de l'activité enzymatique par les anticorps a induit une augmentation de la concentration de certains peptides vaso-actifs, en particulier de l'endothéline dont le rôle au cours du développement est très important. L'endothéline est un agent vasoconstricteur puissant et exerce des effets mitogènes sur les cellules musculaires lisses vasculaires, ces deux propriétés pouvant rendre compte des lésions vasculaires et glomérulaires observées.

Plusieurs antigènes ayant une activité enzymatique et exprimés de façon diffuse à la surface des podocytes ont été impliqués dans le développement de GEM chez certains rongeurs : l'EPN, la dipeptidylpeptidase IV et l'aminopeptidase A [11-13, 33]. Une injection unique d'une quantité relativement importante d'un anticorps monoclonal anti-aminopeptidase A capable de bloquer l'activité enzymatique *in vitro*, induit une albuminurie aiguë persistant pendant au moins 16 jours, accompagnée de dépôts d'IgG extramembranaires [33]. En raison du rôle clé joué par l'aminopeptidase A dans la dégradation intrarénale de l'angiotensine II, les auteurs ont initialement considéré que l'albuminurie était la conséquence de l'augmentation de la concentration d'angiotensine II. Cette hypothèse a d'abord été confortée par l'absence d'albuminurie après injection d'anticorps monoclonaux n'inhibant pas l'activité enzymatique et par la constatation que l'enalapril et le losartan réduisaient l'albuminurie de plus de 90 p. 100. Cependant, les souris déficientes en angiotensinogène développent également une albuminurie quand elles sont injectées avec une combinaison d'anticorps monoclonaux inhibant l'activité de l'aminopeptidase A [34], ce qui démontre que l'angiotensine II n'est pas nécessaire à l'induction de l'albuminurie dans ce modèle. D'autre part, les concentrations intrarénales d'angiotensine II sont élevées de façon significative chez les souris recevant une combinaison d'anticorps anti-aminopeptidase A néphritogènes, cette élévation pouvant être induite par l'albuminurie [34]. Les taux élevés d'angiotensine II pourraient être à l'origine du développement retardé de lésions glomérulaires. Dans notre observation, l'inhibition de l'activité de l'EPN par les anticorps néphritogènes à la surface du podocyte pourrait altérer la perméabilité des capillaires glomérulaires en raison de l'augmentation de la concentration locale de certains peptides vaso-actifs.

## DÉVELOPPEMENT D'UN MODÈLE EXPÉRIMENTAL CHEZ LE LAPIN

La mise au point d'un modèle expérimental de néphropathie chez le lapin nous a permis d'éclairer certains aspects de la physiopathologie de la néphropathie observée chez le nourrisson. Alors que nous n'avons pas trouvé de dépôts d'IgG dans les parois vasculaires chez l'enfant, des dépôts d'IgG maternelle ont pu être mis en évidence de façon précoce et transitoire chez le lapin. Cette observation suggère que les anticorps néphritogènes se déposent également dans les parois vasculaires où ils peuvent exercer un effet inhibiteur sur l'activité de l'EPN *in situ*. En revanche, nous n'avons pas observé de lésions de vascularite ni d'infiltrat inflammatoire chez le nourrisson et chez le lapin, ce qui n'est pas en faveur de la mise en jeu d'une réaction inflammatoire par les complexes immuns vasculaires. En outre, nous avons constaté que les dépôts extramembraneux qui se formaient chez les lapins injectés avec les IgG maternelles disparaissaient au cours du temps. Cependant, ces animaux développent une néphropathie évolutive caractérisée par des lésions glomérulaires d'allure ischémique et des zones d'atrophie tubulaire, responsables de l'apparition d'une insuffisance rénale progressive. Les mêmes lésions sont observées à un moindre degré chez les lapereaux nés de mères injectées avec les IgG maternelles dans les derniers jours de la gestation. Cette évolution péjorative peut être rapprochée de la persistance chez l'enfant, âgé de 22 mois (au moment de l'écriture de ce manuscrit), d'une hypertension artérielle, et d'une protéinurie significative. Elle est vraisemblablement la conséquence d'une réduction néphronique pendant la période anténatale et des lésions vasculaires qui en sont partiellement la cause et qui entretiennent par la suite le processus d'ischémie rénale.

## ALTÉRATIONS PHÉNOTYPIQUES DES PODOCYTES INDUITES PAR LES COMPLEXES IMMUNS EPN-ANTI-EPN

Nous avons mis en évidence des dépôts importants du complexe d'attaque membranaire du complément C5b-9, sur le versant externe de la paroi du capillaire glomérulaire suivant la même localisation dans les dépôts immuns que l'IgG et l'EPN [15]. Ces dépôts pourraient rendre compte de la présence inhabituelle de formations annulaires au sein des dépôts denses aux électrons observés en microscopie électronique. Ils posent la question des conséquences fonctionnelles de l'attaque des podocytes par le complément.

Des doses sublytiques de C5b-9 dans les cellules épithéliales glomérulaires en culture sont capables d'induire des modifications métaboliques et la synthèse *de novo* de prostaglandines et de protéases [35, 36]. Les podocytes peuvent également être « activés » *in vivo* [37], et se mettre à synthétiser des protéines jouant un rôle fonctionnel important, qui ne sont pas produites ou à un très bas niveau dans les cellules « au repos ». Il en est ainsi de la métalloprotéase matricielle-9 [38] et du cytochrome  $b_{558}$ , un composant du complexe d'oxydoréduction à NADPH [39]. En outre, des modifications importantes de la distribution de la néphrine, une protéine majoritaire des diaphragmes de fente qui joue un rôle essentiel dans leur continence, ont été observées chez les malades ayant un syndrome néphrotique

acquis idiopathique [40]. Dans les cas de GEM, un aspect anormalement granuleux, ou une perte d'expression de la néphrine, ont été observés. Dans les cultures de podocytes humains, les IgG<sub>4</sub> agrégées (dont la présence dans les dépôts immuns glomérulaires est caractéristique des GEM) comme l'insertion membranaire du complexe d'attaque du complément, induisent le relargage de la néphrine qui n'est plus détectable à la surface des cellules. Ces phénomènes ne s'observent plus en présence d'inhibiteurs du cytosquelette.

Nous faisons l'hypothèse que la fixation à la surface des podocytes d'anticorps néphritogènes anti-EPN et l'activation du complément peuvent modifier le phénotype podocytaire, provoquant des altérations du cytosquelette, le relargage de protéines importantes pour la fonction du podocyte, et la production de molécules toxiques (collagénases, radicaux oxygène, ...). Ayant caractérisé les anticorps néphritogènes, nous disposons d'un outil moléculaire précieux pour élucider les mécanismes pathogéniques impliqués dans le développement de l'albuminurie.

### LES ANTICORPS ANTI-EPN SONT-ILS IMPLIQUÉS DANS D'AUTRES CAS DE GEM ET DANS D'AUTRES NÉPHROPATHIES ?

Un cas de GEM anténatale ou néonatale similaire au nôtre a été rapporté en 1990 [41]. Nous avons montré que le sérum de la mère qui avait été conservé depuis 20 ans par le docteur de Heer (Leyden, Pays-Bas), contenait des anticorps anti-EPN. La mère, actuellement âgée de 41 ans, est également déficiente en EPN (Dr J. Nauta, Rotterdam, Pays-Bas). Il est vraisemblable que d'autres cas n'ont pas été diagnostiqués en raison de la sévérité du tableau clinique initial qui a pu conduire au décès du nouveau-né ou au contraire de sa bénignité puisque l'atteinte rénale initiale est partiellement régressive.

Nous avons commencé une étude ayant pour objectif la recherche systématique d'EPN dans les dépôts extramembraneux chez l'enfant et chez l'adulte. Cependant, il est possible que la présence de l'EPN dans les dépôts ne soit pas durable, comme le suggère notre modèle expérimental chez le lapin. En revanche, il se pourrait que l'immunisation anti-EPN soit à l'origine d'une maladie rénale progressive, avec une forte composante vasculaire, comme cela a été observé chez l'enfant et chez le lapin.

Nous avons également entrepris une étude de prévalence de la déficience en EPN qui pourrait être grandement sous-estimée en raison de l'absence de manifestation clinique, à l'exception de la pathologie néonatale.

### CONCLUSION

Nous avons identifié le premier antigène impliqué dans les GEM humaines et le premier cas de déficience en EPN. Dans ce modèle, l'EPN doit être considérée comme un antigène mais également comme une enzyme, les anticorps néphritogènes ayant la double propriété de se fixer sur l'antigène et de bloquer son activité enzymatique. Cette dualité doit être prise en compte dans l'analyse des mécanismes physiopathologiques des altérations podocytaires et de l'albuminurie.

## Remerciements

Ce travail est dédié au Professeur Gabriel Richet qui nous a enseigné qu'une observation clinique bien étudiée pouvait conduire à élucider des mystères de la biologie, à la mémoire du Professeur Giuseppe Andres pour ses découvertes en immunopathologie rénale et ses encouragements chaleureux, et à la famille D. pour sa participation active et compréhensive. Il a été financé par l'INSERM et l'Université Paris 6 et la Fondation de France (Don de M. et Mme Halpin). Nous remercions Catherine Bazaud pour son assistance secrétariale.

H. Debrec, V. Guignonis, B Mougnot ont contribué à part égale pour l'obtention des résultats originaux présentés dans cette revue.

## BIBLIOGRAPHIE

1. HEYMANN W, HACKEL DB, HARWOOD S et al. Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1959, **100**, 660-664.
2. KERJASCHKI D, FARQUHAR MG. Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (gp330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats. *J Exp Med*, 1983, **157**, 667-686.
3. SAITO A, PIETROMONACO S, LOO AK et al. Complete cloning and sequencing of rat gp330/« megalin », a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1994, **91**, 9725-9729.
4. KERJASCHKI D, HORVAT R, BINDER S et al. Identification of a 400 kD protein in the brush borders of human kidney tubules that is similar to gp330, the nephritogenic antigen of rat Heymann nephritis. *Am J Pathol*, 1987, **129**, 183-191.
5. JORDAN SC, BUCKINGHAM B, SAKAI R et al. Studies of immune-complex glomerulonephritis mediated by human thyroglobulin. *N Engl J Med*, 1991, **304**, 1212-1215.
6. RONCO PM. Paraneoplastic glomerulopathies : New insights into an old entity. *Kidney Int* 1999, **56**, 355-377.
7. HÖRL WH, KERJASCHKI D. Membranous glomerulonephritis (MGN). *J Nephrol*, 2000, **13**, 291-316.
8. NARUSE T, KITAMURA D, MIYAKAWA Y et al. Deposition of renal tubular epithelial antigens along the renal glomerular capillary walls of patients with membranous glomerulonephritis. *J Immunol*, 1973, **110**, 1163-1169.
9. DOUGLAS MF, RABIDEAU DP, SCHWARTZ MM et al. Evidence of autologous immune complex nephritis. *N Engl J Med*, 1981, **305**, 1326-1329.
10. ZANETTI M, MANDET C, DUBOUST A, et al. Demonstration of a passive Heymann-nephritis like mechanism in human kidney transplant. *Clin Nephrol*, 1981, **15**, 272-288.
11. RONCO P, ALLEGRI L, MELCION C et al. A monoclonal antibody to brush border and passive Heymann nephritis. *Clin Exp Immunol*, 1984, **55**, 319-332.
12. ASSMANN KJ, RONCO P, TANGELDER MM et al. Comparison of antigenic targets involved in antibody-mediated membranous glomerulonephritis in the mouse and rat. *Am J Pathol*, 1985, **121**, 112-122.
13. RONCO P, ALLEGRI L, BRIANTI E et al. Antigenic targets in epimembranous glomerulonephritis. Experimental data and potential application in human pathology. *Appl Pathol*, 1989, **7**, 85-98.
14. RONCO P, ARDAILLOU N, VERRON P et al. Pathophysiology of the podocyte : A target and a major player in glomerulonephritis, in *Advances Nephrol* (vol 23), in Grünfeld JP, Bach JF, Kreis H, Maxwell MH (ED), St.Louis, Mosby Yearbook Press, 1994, pp 91-131.
15. DEBIEC H, GUIGNONIS V, MOUGNOT B et al. Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral endopeptidase antibodies. *New Engl J Med*, 2002, **346(26)**, 2053-2060.
16. TAUC M, CHÂTELET F, VERRON P et al. Characterization of monoclonal antibodies specific for rabbit renal brush-border hydrolase. Application to immunohistological localization. *J Histochem Cytochem*, 1988, **36**, 523-532.

17. MATSUI S, CALDWELL PR, BRENTJENS JR et al. *In vivo* interaction of antibodies with cell surface antigens. A mechanism responsible for in situ formation of immune deposits in the zona pellucida of rabbit oocytes. *J Clin Invest*, 1985, **75**, 1369-1380.
18. INO K, SUZUKI T, UEHARA C et al. The expression and localization of neutral endopeptidase 24.11/CD10 in human gestational trophoblastic diseases. *Lab Invest*, 2000, **80(11)**, 1729-1738.
19. GUÉRIN S, MARI B, MAULON L et al. CD10 plays a specific role in early thymic development. *FASEB J*, 1997, **11**, 376-381.
20. SALLES G, CHEN CY, REINHERZ EL et al. CD10/NEP is expressed on Thy-1<sup>low</sup> B220<sup>+</sup> murine B-cell progenitors and functions to regulate stromal cell-dependent lymphopoiesis. *Blood*, 1992, **80**, 2021-2029.
21. SALLES G, RODEWALD HR, CHIN BS et al. Inhibition of CD10/neutral endopeptidase 24.11 promotes B-cell reconstitution and maturation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**, 7618-7622.
22. LU B, GERARD NP, KOLAKOWSKI LF Jr et al. Neutral endopeptidase modulation of septic shock. *J Exp Med*, 1995, **181**, 2271-2275.
23. LU B, FIGINI M, EMANUELI C et al. The control of microvascular permeability and blood pressure by neutral endopeptidase. *Nat Med*, 1997, **3**, 904-907.
24. LEHMAN DH, LEE S, WILSON CB et al. Induction of antitubular basement membrane antibodies in rats by renal transplantation. *Transplantation*, 1974, **17**, 429-431.
25. ERDOS EG, SKIDGEL RA. Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB J*, 1989, **3**, 145-151.
26. LETARTE M, VERA S, TRAN R et al. Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med*, 1988, **168**, 1247-1253.
27. METZGAR RS, BOROWITZ MJ, JONES NH et al. Distribution of common acute lymphoblastic leukemia antigen in nonhematopoietic tissues. *J Exp Med*, 1981, **154**, 1249-1254.
28. RONCO P, POLLARD H, GALCERAN M et al. Distribution of enkephalinase (membrane metalloendopeptidase, E.C. 3.4.24.11) in rat organs. Detection using a monoclonal antibody. *Lab Invest*, 1988, **58**, 210-217.
29. DESCHODT-LANCKMAN M, MICHAUX F, DE PREZ E et al. Increased serum levels of endopeptidase 24.11 (« enkephalinase ») in patients with end-stage renal failure. *Life Sci*, 1989, **45**, 133-141.
30. AVIV R, GURBANOV K, HOFFMAN A et al. Urinary neutral endopeptidase 24.11 activity : Modulation by chronic salt loading. *Kidney Int*, 1995, **47**, 855-860.
31. TURNER AJ, TANZAWA K. Mammalian membrane metallopeptidases : NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J*, 1997, **11**, 355-364.
32. DUSSAULE JC, STEFANSKI A, BÉA ML et al. Characterization of neutral endopeptidase in vascular smooth muscle cells of rabbit renal cortex. *Am J Physiol*, 1993, **264**, F45-F52.
33. ASSMANN KJ, VAN SON JP, DIJKMAN HB et al. A nephritogenic rat monoclonal antibody to mouse aminopeptidase A. Induction of massive albuminuria after a single intravenous injection. *J Exp Med*, 1992, **175**, 623-635.
34. GERLOFS-NIJLAND ME, ASSMANN KJ, DIJKMAN HB et al. Albuminuria in mice after injection of antibodies against aminopeptidase A : role of angiotensin II. *J Am Soc Nephrol*, 2001, **12**, 2711-2720.
35. QUIGG RJ, Cybulsky AV, Jacobs JB et al. Anti-Fx1A produces complement-dependent cytotoxicity of glomerular epithelial cells. *Kidney Int*, 1988, **34**, 43-52.
36. SALANT DJ, QUIGG RJ, CYBULSKY AV. Heymann nephritis. Mechanisms of renal injury. *Kidney Int*, 1989, **35**, 976-984.
37. KERJASCHKI D. Dysfunctions of cell biological mechanisms of visceral epithelial cell (podocytes) in glomerular diseases. *Kidney Int*, 1994, **45**, 300-313.
38. McMILLAN JI, RIORDAN JW, COUSER WG et al. Characterization of a glomerular epithelial cell metalloproteinase as matrix metalloproteinase-9 with enhanced expression in a model of membranous nephropathy. *J Clin Invest*, 1996, **97**, 1094-1101.
39. NEALE TJ, ULLRICH R, OJHA P et al. Reactive oxygen species and neutrophil respiratory burst cytochrome b558 are produced by kidney glomerular cells in passive Heymann nephritis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**, 3645-3649.

40. DOUBLIER S, RUOTSALAINEN V, SALVIDIO G et al. Nephryn redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol*, 2001, **158**, 1723-1731.
41. NAUTA J, DE HEER E, BALDWIN WM3RD et al. Transplacental induction of membranous nephropathy in a neonate. *Pediatr Nephrol*, 1990, **4**, 111-116.