

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

**ETUDE DES MECANISMES DE LA RECIDIVE DU
SYNDROME NEPHROTIQUE IDIOPATHIQUE APRES
TRANSPLANTATION RENALE**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale BIOLOGIE SANTE

Discipline : Biologie Médecine Santé

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

BRUNEAU Sarah

Le 12 mai 2009, devant le jury ci-dessous

PrésidentPhilippe LANG, Professeur, Paris

RapporteursGeorges DESCHÊNES, Professeur, Paris

.....Renato MONTEIRO, Directeur de Recherche, Paris

ExamineursPhilippe LANG, Professeur, Paris

.....Ludmilla LE BERRE, Docteur, Nantes

Directeur de thèseJacques DANTAL, Professeur, Nantes

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	Erreur ! Signet non défini.
SOMMAIRE	2
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	6
ABREVIATIONS.....	8
INTRODUCTION	9
I. Rappels sur la physiologie rénale	9
1. Principales fonctions du rein	9
2. Structure du rein	9
a) Le corpuscule rénal (corpuscule de Malpighi).....	10
b) Le tubule	12
3. Structure et fonctionnement du filtre glomérulaire	12
a) La filtration glomérulaire.....	12
b) Le mésangium.....	13
c) L'endothélium	14
d) La membrane basale glomérulaire (MBG)	15
e) L'épithélium viscéral glomérulaire (ou podocytes)	15
Les podocytes	15
Le diaphragme de fente	17
Signalisation du diaphragme de fente.....	19
II. Description du Syndrome Néphrotique Idiopathique.....	22
1. Définition et classifications	22
2. Les lésions glomérulaires minimales (LGM)	24
a) Aspects cliniques, incidence et évolution	24
b) Histologie.....	24
3. La Hyalinose Segmentaire et Focale (HSF)	26
a) Aspects cliniques, incidence et évolution	26
b) Histologie.....	27

c)	Variants histologiques	28
4.	Récidive du SNI après transplantation rénale	29
a)	Définition, incidence et évolution	29
b)	Facteurs de risque	30
	Evolution de la maladie initiale	30
	Histologie de la maladie initiale	31
	Âge au début de la maladie.....	31
	Caractéristiques liées au donneur.....	31
5.	Les anomalies du système immunitaire dans le SNI	32
a)	Perturbations des fonctions lymphocytaires	33
	Anomalies du phénotype	33
	Anomalies de distribution des cytokines	34
	Anomalies des voies de signalisation	37
b)	Anomalies des immunoglobulines	39
III.	Les traitements du Syndrome Néphrotique Idiopathique.....	40
1.	Traitement de première intention	40
2.	Traitement des rechutes	41
3.	Traitement du syndrome néphrotique idiopathique corticodépendant	42
4.	Traitement du syndrome néphrotique idiopathique corticorésistant.....	44
5.	Traitement de la récurrence	44
a)	La thérapie médicamenteuse	44
b)	Les traitements du plasma	45
	Les échanges plasmatiques	45
	L'immunoadsorption du plasma.....	46
IV.	Etiologie du syndrome néphrotique idiopathique.....	48
1.	Anomalies génétiques à l'origine d'un SNI.....	48
a)	Mutations impliquant des protéines de structure	49
	La néphrine.....	49
	La podocine	49

La CD2AP	50
L'α-actinine 4.....	50
TRPC6 (Transient Receptor Potential Cation channel 6).....	51
La laminine β2	51
b) Mutations impliquant des facteurs de transcription ou des protéines de signalisation.....	52
WT1	52
LMX1B.....	52
PLCE1 (Phospholipase C epsilon 1).....	53
SMARCAL1	53
2. Le(s) facteur(s) de perméabilité glomérulaire.....	55
a) Facteurs impliqués dans le SNI corticosensible.....	56
b) Facteurs impliqués dans le SNI corticorésistant.....	59
c) Facteur ou contre-facteur ?.....	62
3. Mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des lésions podocytaires	64
a) À l'interface podocytes - MBG.....	64
b) Au niveau du domaine apical	65
c) Au niveau du diaphragme de fente	66
d) Au niveau du cytosquelette d'actine	68
OBJECTIFS DE LA THESE	70
PARTIE EXPERIMENTALE.....	73
Partie 1 : Etude d'un facteur de perméabilité potentiel dans la récurrence du syndrome néphrotique idiopathique après transplantation rénale : la protéine ST2 soluble.....	73
I. Résumé de l'article	73
II. Article.....	74
III. Discussion	112
Partie 2 : Etude du rôle des immunoglobulines dans la récurrence du syndrome néphrotique idiopathique après transplantation rénale	120
I. Objectifs de l'étude	120

II. Méthodologie : la technique du SEREX (SErological analysis of antigens by Recombinant EXpression cloning) (Figure 18)	122
III. Résultats obtenus	129
IV. Discussion	134
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES.....	139
BIBLIOGRAPHIE.....	144
ANNEXES.....	170
Annexe 1 : Revue Bruneau <i>et al.</i>	170
Annexe 2 : Article Le Berre <i>et al.</i>.....	194

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Représentation schématique d'un néphron	101
Figure 2 : A. Représentation schématique d'un corpuscule rénal.....	11
B. Photographie d'un glomérule en microscopie électronique à balayage	11
Figure 3 : Représentation en microscopie électronique à transmission d'un capillaire et du filtre glomérulaire.	13
Figure 4 : Représentation des podocytes en microscopie électronique à balayage (A) et en microscopie électronique à transmission (B)	16
Figure 5 : Représentation des fentes de filtration en microscopie électronique à balayage (A) et en microscopie électronique à transmission (B)	17
Figure 6 : Représentation schématique de l'équipement moléculaire des pédicelles.	19
Figure 7 : Représentation schématique des voies de signalisation hypothétiques qui pourraient être impliquées dans la régulation des fonctions podocytaires et glomérulaires.....	21
Figure 8 : Représentation en microscopie électronique à transmission de la barrière de filtration glomérulaire d'un patient présentant un syndrome néphrotique à lésions glomérulaires minimales...	25
Figure 9 : Représentation en microscopie électronique à balayage des fentes de filtration glomérulaires d'un sujet sain (A) et d'un patient présentant un syndrome néphrotique à lésions glomérulaires minimales (B)	25
Figure 10 : Représentation en microscopie optique de glomérules présentant des lésions de hyalinose segmentaire et focale.	29
Figure 11 : Représentation schématique des mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans le développement des lésions podocytaires au cours du SNI.	69
Figure 12 : Concentration sérique de sST2 pour des mêmes patients prélevés avant et après transplantation rénale, et présentant (A) ou non (B) une récurrence de SNI.	113
Figure 13 : Concentrations sériques de sST2 chez des patients présentant un SNI/HSF.....	115
Figure 14 : Analyse bidimensionnelle de l'éluat de colonne anti-sST2 effectuée à partir du sérum d'un patient SNI récidivant (A) ou d'un patient allergique (B)	116
Figure 15 : Hypothèse reprenant certaines observations de la littérature, qui pourrait expliquer la polarisation Th2 observée au cours du SNI.....	119
Figure 16 : Représentation du phagemide pBluescript SK-.....	123
Figure 17 : Représentation du vecteur d'insertion Uni-ZAP XR.	124
Figure 18 : Représentation schématique de la technique du SEREX.	128

Figure 19 : Exemples obtenus par SEREX après immunoscreening primaire (A) et secondaire pour un clone « négatif » (B) ou « positif » (C)	129
Figure 20 : Signaux obtenus par SEREX avec les IgG purifiées chez chacun des groupes de patients pour les protéines GSTT1 (A) , IκB-ε (B) , KCTD3 (C) , SLC35B4 (D) et GAB3 (E)	131
Figure 21 : (A) Dosage par ELISA des IgG ayant pour cible la protéine GSTT1 chez des patients présentant un SNI avec (SNI-R) ou sans (SNI-NR) récurrence après transplantation rénale, des patients protéinuriques transplantés pour une pathologie rénale autre qu'un SNI (Non-SNI) et des donneurs sains (Sains).	132
(B) Exemple de résultats obtenus pour le génotypage GSTT1 chez un patient présentant un génotype GSTT1 <i>positif</i> et un patient présentant un génotype GSTT1 <i>null/null</i>	132
Figure 22 : Dosage des IgG ayant pour cible la protéine IκB-ε chez des patients présentant un SNI avec (SNI-R) ou sans récurrence (SNI-NR) après transplantation rénale, des patients protéinuriques transplantés pour une pathologie rénale autre qu'un SNI (Non-SNI) et des donneurs sains (Sains).	133
 Tableau 1 : Principales causes de syndromes néphrotiques secondaires.	23
Tableau 2 : Synthèse des données de la littérature concernant le niveau d'expression des cytokines dans le SNI	36
Tableau 3 : Principaux gènes mutés à l'origine d'un syndrome néphrotique idiopathique chez l'homme	54
Tableau 4 : Résumé des principaux facteurs de perméabilité candidats rapportés dans le SNI corticosensible et corticorésistant.	63
Tableau 5 : Protéines identifiées par la technique du SEREX, grâce au screening d'une banque d'ADNc de reins humains sains par les IgG de patients présentant une récurrence de SNI après transplantation rénale.....	130

ABREVIATIONS

AAV : adeno-associated virus	NF-HEV : nuclear factor of high endothelial venules
bFGF : basic fibroblast growth factor	NHERF2 : Na ⁺ /H ⁺ exchange regulatory factor2
CD2AP : CD2-associated protein	Palb : variable de perméabilité à l'albumine
CNF : syndrome nephrotic congenital de type finlandais	PAN : Aminonucléoside de puromycine
GAB3 : GRB2-associated binding protein 3	PBMC : peripheral blood mononuclear cells
GEM : glomerulonephrite extramembraneuse	PDGF : platelet-derived growth factor
GPA : glomerular polyanion	PH : pleckstrin-homology
GPF : glomerular permeability factor	PHA : phytohemagglutinine
GSTT1 : glutathione-S-transferase, theta 1	PI3K : phosphoinositide 3-OH kinase
GVV : glomerular volume variation	PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
HLA : human leukocyte antigen	PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
HSF : hyalinose segmentaire et focale	PLCE1 : phospholipase C epsilon 1
IFNγ : interféron gamma	ROC : receiver operator characteristics
Ig : immunoglobuline	SEREX : serological analysis of antigens by recombinant expression cloning
IGHG3 : immunoglobulin heavy constant gamma 3	SIRS : soluble immune response suppressor
IκBϵ : inhibitor of NF κ B, type epsilon	SLC35B4 : solute carrier family 35, member B4
IL : interleukine	SNi : syndrome néphrotique idiopathique
ILK : integrin linked kinase	ST2 : suppression of tumorigenicity 2
IPTG : isopropyl-beta-thio-galactoside	Tc-mip : truncated c-maf inducing protein
KCTD3 : potassium channel tetramerisation domain containing 3	TCR : T cell receptor
KO : knock-out	TGFβ : transforming growth factor beta
LGM : lésions glomérulaires minimes	Th1/2 : T helper 1/2
LMX1B : LIM homeobox transcription factor 1	TNFα : tumor necrosis factor alpha
LPS : lipopolysaccharide	TRPC6 : transient receptor potential classical 6
MBG : membrane basale glomérulaire	VEGF : vascular endothelial growth factor
MMF : mycophenolate mofetil	VPF : vascular permeability factor
	WT1 : Wilms' tumor

INTRODUCTION

I. Rappels sur la physiologie rénale

1. Principales fonctions du rein

Les reins ont une fonction essentielle d'élimination. Ils constituent en effet la voie principale d'excrétion des déchets métaboliques terminaux endogènes, tels que l'urée, l'acide urique, la créatinine et l'acide oxalique. Ils assurent la détoxification et l'élimination des produits chimiques exogènes (médicaments, antibiotiques, toxines) et de leurs métabolites. Les reins sont également chargés du maintien du volume et de la composition ionique des fluides de l'organisme par l'élimination des ions en excès (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , Li^+ , H^+ , CO_3^- , PO_4^{3-}). Ils participent au catabolisme des protéines de petits poids moléculaires et des hormones polypeptidiques telles que l'insuline, la calcitonine ou le glucagon. Ainsi, chaque minute, près d'un litre de sang passe dans les reins pour y être filtré. L'urine produite contient principalement de l'eau, de l'urée, de l'acide urique, de l'ammoniaque, des électrolytes et des toxiques exogènes. En revanche, elle est normalement dépourvue de protéines, de glucides et de lipides qui sont retenus dans le sang. La présence de ces substances dans l'urine est donc le signe d'une pathologie.

Parallèlement à ces fonctions exocrines, les reins sont également le site de production de nombreuses hormones et de médiateurs d'action locale. Ils participent ainsi à la régulation endocrine des volumes extracellulaires et de la pression artérielle par sécrétion de rénine et de prostaglandines, au contrôle du taux d'hémoglobine par synthèse d'érythropoïétine et à la régulation du métabolisme phosphocalcique.

2. Structure du rein

Le rein est composé du parenchyme rénal qui assure la fonction d'élimination, mêlé à un tissu interstitiel protecteur. Le parenchyme est constitué d'un très grand nombre de

néphrons, unités anatomiques fonctionnelles du rein responsables de la formation de l'urine. Chez l'être humain, chaque rein comprend entre 0,7 et 1,5 millions de néphrons (**Figure 1**).

Chaque néphron est composé d'un corpuscule rénal (comprenant la capsule de Bowman et le glomérule) qui assure l'ultrafiltration du plasma pour produire l'urine primitive, prolongé par le tubule rénal qui conduit l'urine vers les tubes collecteurs.

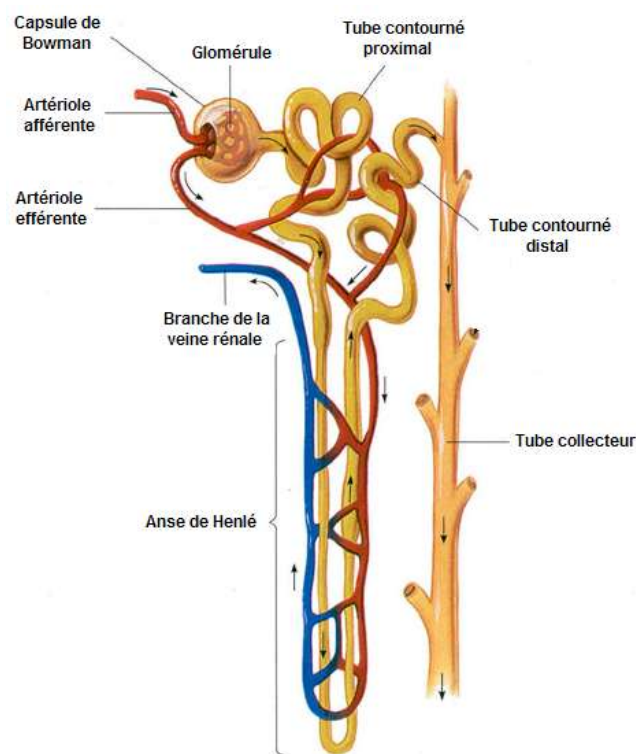


Figure 1 : Représentation schématique d'un néphron

a) Le corpuscule rénal (corpuscule de Malpighi)

Les corpuscules rénaux ont été décrits pour la première fois en 1687 par Malpighi. Ils sont formés d'un feuillet externe pariétal, la capsule de Bowman, et d'un feuillet interne viscéral, le floculus, qui assure l'ultrafiltration du plasma (**Figure 2**). Entre ces deux parois se trouve la chambre glomérulaire contenant l'urine primitive, directement connectée au système tubulaire au niveau du pôle urinaire. Le floculus est formé à partir d'une artériole afférente qui pénètre dans la capsule de Bowman et se divise en quatre à six branches, celles-ci se ramifiant en un réseau serré de capillaires anastomosés autour d'une tige

mésangiale centrale pour former un lobule glomérulaire. Ces capillaires se rassemblent ensuite pour constituer l'artériole efférente qui quitte le glomérule pour former un nouveau réseau de capillaires péri-tubulaires, permettant ainsi l'irrigation des tubules.

Les anses capillaires sont constituées de trois types d'éléments (**Figure 3**) qui constituent le filtre glomérulaire : l'endothélium largement fenestré des capillaires, recouvert par la membrane basale glomérulaire (MBG), sur laquelle viennent s'attacher les cellules épithéliales viscérales ou podocytes. Ces podocytes, qui forment donc la paroi interne de la chambre glomérulaire, sont des cellules hautement différenciées dont la forme est spécialement adaptée à leur fonction filtrante. Ils émettent de longs prolongements cytoplasmiques (digitations de premier ordre) d'où se détachent de nombreuses ramifications plus fines, les pédicelles. Ces prolongements cellulaires entourent les capillaires glomérulaires et s'interconnectent avec les pédicelles des podocytes adjacents, constituant ainsi un réseau complexe de fentes appelées fentes de filtrations. La structure et la fonction du filtre glomérulaire seront détaillées dans la partie I.3.

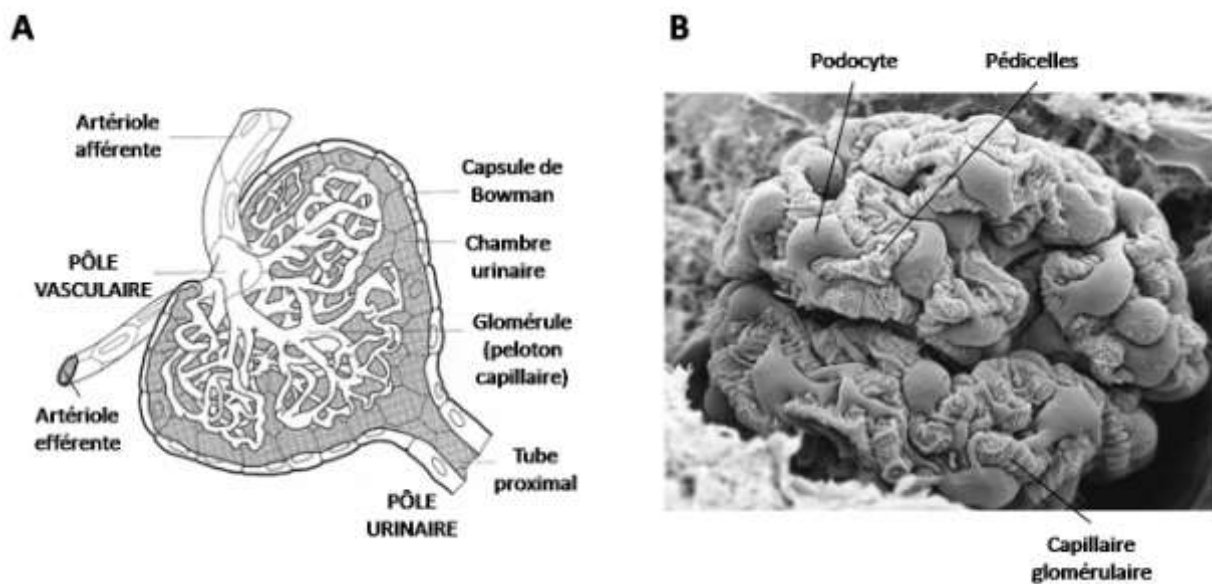


Figure 2 : A. Représentation schématique d'un corpuscule rénal (d'après Burkitt 1993).

B. Photographie d'un glomérule en microscopie électronique à balayage (photographie de Jonas Coersmeier).

b) Le tubule

Les tubules rénaux effectuent le transport de l'urine du corpuscule rénal au tube collecteur. Le passage de l'urine primitive dans les tubules permet sa transformation progressive en urine définitive par des mécanismes de sécrétion et de réabsorption. Chaque tubule peut être divisé en plusieurs parties (**Figure 1**), ces divisions prenant en compte les différences de structure histologique et fonctionnelle des segments concernés. On distingue ainsi :

- Le tube proximal, formé du tube contourné proximal, du tube proximal droit et du tube proximal médullaire, qui assure la réabsorption de la majeure partie de l'ultrafiltrat glomérulaire (environ 70%).
- L'anse de Henlé qui est responsable en grande partie de la concentration des urines.
- Le tube distal qui participe, par un réglage fin des bilans ioniques (sodium en particulier), à l'élaboration de l'urine définitive.

Chaque tubule déverse son contenu au niveau du tube collecteur. Du fait de son origine embryologique différente, ce dernier n'est pas considéré comme appartenant au néphron lui-même malgré le fait qu'il participe, dans une certaine mesure, à la formation de l'urine définitive, par ajustement final du bilan de l'eau et acidification terminale de l'urine.

3. Structure et fonctionnement du filtre glomérulaire

a) La filtration glomérulaire

La filtration glomérulaire est un phénomène qui résulte principalement de la différence de pression existant entre la lumière des capillaires glomérulaires et l'espace de Bowman. Dans les conditions physiologiques, elle aboutit à la formation d'un filtrat qui diffère du plasma sanguin par l'absence de cellules sanguines et de macromolécules de poids moléculaire supérieur ou égal à 70 000 Da. La filtration glomérulaire s'effectue à travers les trois couches successives du filtre glomérulaire : l'endothélium des capillaires, la membrane basale glomérulaire, et l'épithélium viscéral (Deen 2001) (**Figure 3**). La perméabilité de cette

barrière glomérulaire est sélective (permsélectivité) en fonction de la taille et de la charge des molécules filtrées (Brenner 1978). En effet, la barrière glomérulaire se comporte comme si elle était percée de pores fonctionnels uniformes (Deen 1979) dont le diamètre a pu être évalué grâce à l'emploi du ficoll à 1,8 nm en moyenne (Oliver 1992). De plus, les différents constituants de cette barrière contiennent des groupes anioniques qui vont empêcher le passage des macromolécules chargées négativement en facilitant au contraire celui des molécules électropositives (Pilia 1985). Ainsi, l'albumine, protéine de 3,5 nm de diamètre et chargée négativement, ne peut normalement pas passer la barrière de filtration glomérulaire et reste séquestrée dans le plasma.

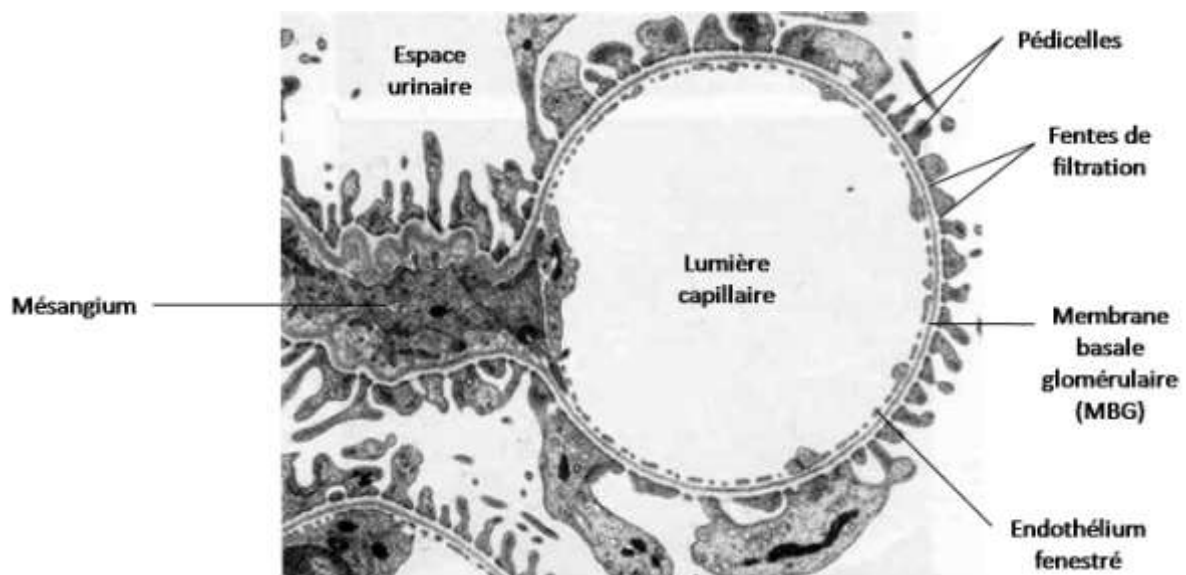


Figure 3 : Représentation en microscopie électronique à transmission d'un capillaire et du filtre glomérulaire.

b) Le mésangium

Le mésangium est la tige centrale de soutien autour de laquelle s'enroulent les capillaires glomérulaires (Kriz 1990). Il est composé de deux entités : la matrice extracellulaire et les cellules mésangiales. Ces dernières sont des péricytes spécialisés qui possèdent les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des cellules musculaires lisses et des macrophages. Leur rôle principal est de maintenir la structure du peloton capillaire, en partie par la sécrétion et l'entretien de la matrice extracellulaire, phénomène contrôlé essentiellement par des cytokines telles que l'IL-1, le PDGF et le TGF- β (Sterzel

1992). Les cellules mésangiales, en association avec les macrophages résidants du mésangium, ont également un rôle de phagocytose des macromolécules et des complexes immuns (Schlondorff 1987). Elles sécrètent des substances biologiquement actives telles que les prostaglandines ou les endothélines qui vont induire la contraction des artérioles glomérulaires afférente et efférente (Lopez-Farre 1991). Elles sont également capables de produire et de répondre à différentes cytokines comme l'IL-1 β , le TNF- α , le PDGF et le bFGF. Ces cytokines peuvent agir de façon paracrine puisqu'elles sont synthétisées et sécrétées par les macrophages activés, ou de façon autocrine puisqu'elles peuvent également être synthétisées par les cellules mésangiales elles-mêmes. Lors d'une lésion glomérulaire, elles peuvent initialement servir à stimuler une repopulation du peloton glomérulaire par les cellules mésangiales. Enfin, les cellules mésangiales, comme les cellules musculaires lisses, ont des propriétés contractiles (Kreisberg 1985). Leur contraction peut se faire en réponse à différents stimuli (Schlondorff 1987). Il peut s'agir de substances circulantes telles que l'angiotensine II ou des agents générés localement tels que les prostaglandines. En se contractant, elles influencent la filtration glomérulaire en contrôlant le flux sanguin dans les capillaires glomérulaires.

c) L'endothélium

L'endothélium des capillaires glomérulaires est composé d'une fine couche de cellules endothéliales aplaties, percée de nombreuses fenestrations circulaires de 70 à 100 nm de diamètre qui occupent 20 à 50% de la surface endothéliale totale (Bulger 1983). Les microfilaments d'actine qui entourent ces pores régulent leur forme et leur diamètre (Vasmant 1984). Du fait de sa forte densité en fenestrations, il a longtemps été considéré que l'endothélium ne participait pas réellement à la filtration glomérulaire. Cependant, Ryan et al. ont montré que l'albumine, d'un diamètre inférieur à celui des pores (seulement 3,5 nm) ne traverse pas la couche endothéliale glomérulaire (Ryan 1976). L'endothélium glomérulaire et ses fenestrations sont recouverts d'un glycocalyx filamenteux chargé négativement (Rostgaard 2002), composé de glycoprotéines et de protéoglycanes sulfatés comme la podocalyxine (Kershaw 1995). Ce glycocalyx constitue probablement la barrière principale empêchant le passage de certaines protéines. Il apparaît donc aujourd'hui que,

malgré l'existence de larges fenestrations, l'endothélium est un composant important de la barrière de filtration glomérulaire impliqué dans la perméabilité de taille et de charge.

d) La membrane basale glomérulaire (MBG)

La membrane basale glomérulaire est une structure amorphe de 300-350 nm d'épaisseur constituée d'une couche dense centrale (lamina densa) et de deux couches claires (lamina rara interna et lamina rara externa), qui reposent sur le peloton formé par les capillaires glomérulaires et le mésangium. Elle provient de la fusion des membranes basales endothéliale et épithéliale. Elle est constituée d'un réseau complexe de fibres de collagène IV auxquelles sont associées de la laminine, du nidogène (ou entactine) et des protéoglycanes tels que l'agrine et le perlécane (Hudson 1993). Ces composants permettent l'ancrage des différents types de cellules glomérulaires et assurent ainsi la stabilité architecturale des glomérules. Les interactions complexes inter- et intra-moléculaires de ses différents composants confèrent à la MBG une perméabilité de taille aux macromolécules (Walton 1992). De plus, les protéoglycanes spécifiques de la MBG possèdent des chaînes d'héparane-sulfate fortement électronégatives, qui semblent participer à la sélectivité de charge (Groffen 1999). Cependant, bien que la MBG ait été longtemps considérée comme la principale barrière de filtration des protéines plasmatiques (Caulfield 1974, Takami 1991) (Ghitescu 1992), son importance dans la perméabilité glomérulaire est encore débattue.

e) L'épithélium viscéral glomérulaire (ou podocytes)

LES PODOCYTES

Les podocytes sont des cellules extrêmement différenciées. Ils sont constitués d'un corps cellulaire volumineux qui enfle dans l'espace urinaire de la capsule de Bowman et de longs prolongements cytoplasmiques qui s'étendent autour des capillaires glomérulaires auxquels ils se fixent par de nombreux prolongements secondaires ou pédicelles (**Figure 4**). Les pédicelles des podocytes adjacents s'intriquent les uns dans les autres en ménageant un espace d'une largeur constante de 30-40 nm (Furukawa 1991), les fentes de filtration (**Figure 5**), qui sont traversées par une structure extracellulaire complexe appelée diaphragme de

fente. Les podocytes sont des cellules polarisées comprenant un domaine apical ou luminal et un domaine basal, séparés par le diaphragme de fente. Le domaine basal correspond à la semelle des pédicelles qui s'ancre dans la MBG. La surface apicale et le diaphragme de fente sont recouverts par un glycocalyx riche en sialoglycoprotéines comme la podocalyxine et la podoendine qui confèrent aux podocytes leur forte charge négative (Huang 1985, Sawada 1986) et donc un rôle crucial dans la perméabilité de charge.

Les podocytes possèdent un cytosquelette très développé essentiel au maintien de leurs prolongements. Au niveau du corps cellulaire, celui-ci est constitué essentiellement de microtubules et de filaments intermédiaires comme la vimentine et la desmine, alors que dans les pédicelles s'accumulent des microfilaments et un fin cortex de filaments d'actine (Drenckhahn 1988) auxquels s'associe la synaptopodine. Les filaments d'actine prennent également part au niveau des pédicelles à un appareil contractile complet composé d'actine, de myosine-2, d' α -actinine-4, de taline et de vinculine, qui permet aux podocytes de s'adapter, voir de s'opposer aux forces de distension.

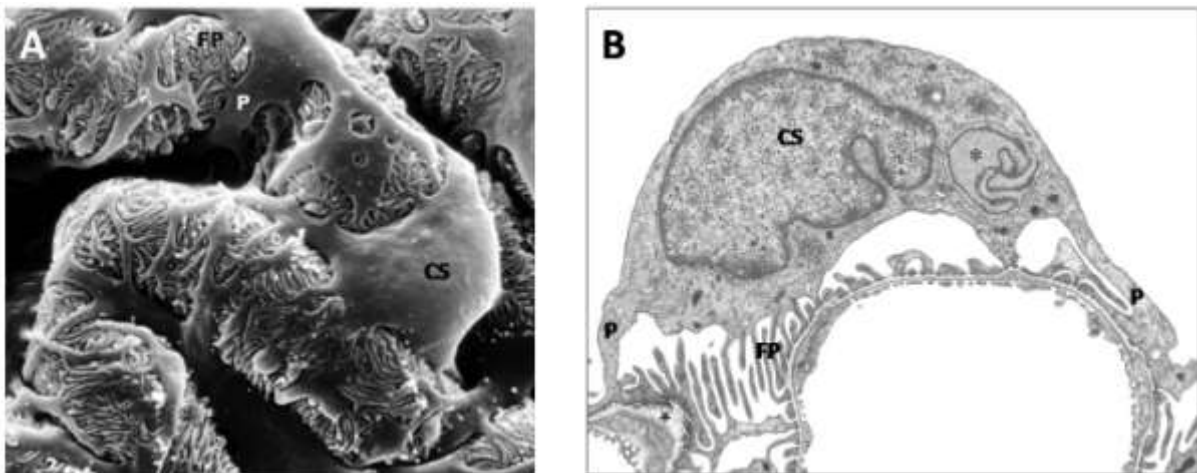


Figure 4 : Représentation des podocytes en microscopie électronique à balayage (A) et en microscopie électronique à transmission (B) (d'après Pavenstädt, 2003). Le corps cellulaire des podocytes (CS) émettent des prolongements primaires (P) qui se ramifient en de nombreux pédicelles (FP).

Les podocytes sont ancrés à la MBG par deux complexes d'adhésion majeurs, essentiels au maintien de l'architecture des pédicelles (Smoyer 1998) : d'une part, les intégrines $\alpha_3\beta_1$ situées au niveau de la semelle pédicellaire (Adler 1992, Korhonen 1990) qui

se lie au collagène IV, à la fibronectine, à la laminine et au nidogène de la MBG en points de contact focaux (Dedhar 1992) ; d'autre part, les complexes de dystroglycanes dont l'expression est restreinte à la membrane cellulaire basale des podocytes et qui se lie à la laminine, à l'agrane et au perlécane de la MBG (Regele 2000).

Il est important de noter que les podocytes, de par leur fort degré de différenciation, sont incapables de proliférer. Le moindre stress mécanique déclenche des tentatives de prolifération avortées (visualisées par des podocytes binucléés) qui provoquent leur entrée en apoptose (Kriz 1996, Nagata 1992). Cette incapacité à repeupler les glomérules lésés à partir de podocytes fonctionnels (podocytopénie) contribue fortement à la propagation des dommages glomérulaires.

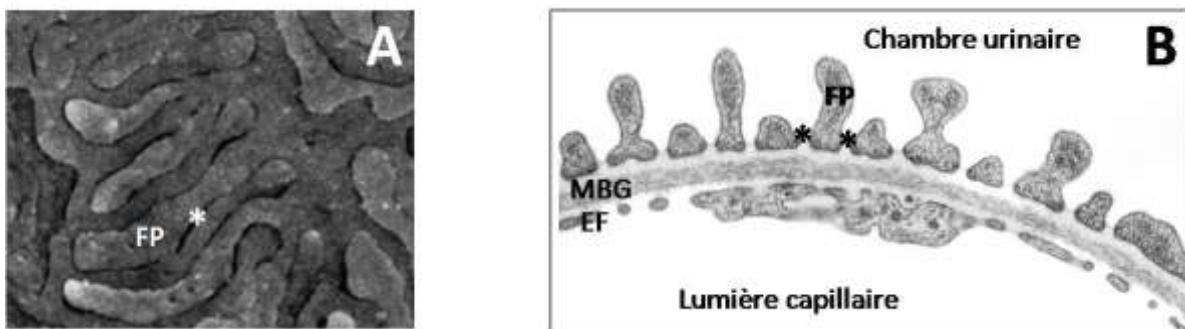


Figure 5 : Représentation des fentes de filtration en microscopie électronique à balayage (A) et en microscopie électronique à transmission (B) (d'après Shirato, 2002 et Pavenstädt, 2003). Les pédicelles (FP) de deux podocytes adjacents s'intriquent pour former les fentes de filtration (*). MBG = Membrane basale glomérulaire. EF = Endothélium fenestré.

LE DIAPHRAGME DE FENTE

Dès 1972, Karnovsky et Ainsworth ont montré le rôle de tamis moléculaire taille-sélectif du diaphragme de fente (Karnovsky 1972). Sur la base d'études en microscopie électronique, Rodewald et Karnovsky ont proposé un modèle dans lequel le diaphragme de fente constitue une structure ordonnée contenant des pores assez petits pour entraver le passage dans les urines de protéines de la taille de l'albumine (Rodewald 1974). Cependant, les connaissances quant à la composition moléculaire de cette structure sont restées obscures jusqu'à 1998, avec la découverte de la néphrine (Kestila 1998), première protéine

constitutive du diaphragme de fente (Ruotsalainen 1999). Par la suite, plusieurs protéines localisées au niveau du diaphragme de fente ont été découvertes (**Figure 6**), en particulier les protéines transmembranaires NEPH-1 (Liu 2003), FAT (Inoue 2001), la P-cadhérine (Reiser 2000), et très récemment le canal ionique TRPC6 (Reiser 2005). Des protéines intracellulaires ont également été montrées comme indispensables pour une structure fonctionnelle du diaphragme de fente. Il s'agit en particulier de la podocine, protéine membranaire intégrale (Boute 2000), et de la CD2AP qui colocalise au niveau intracellulaire du diaphragme de fente (Shih 1999). Cette dernière est capable d'interagir avec les domaines intracellulaires de la néphrine et de la podocine (Schwarz 2001). De plus, des études *in vitro* ont montré que la néphrine et NEPH-1, qui colocalisent au niveau du diaphragme de fente, peuvent former des homo- et des hétérodimères par leurs domaines extracellulaires (Gerke 2003, Khoshnoodi 2003), et interagir avec la podocine au niveau intracellulaire (Huber 2001, Sellin 2003). On ne sait toujours pas précisément comment s'assemble le diaphragme de fente, mais il a été proposé que les molécules de néphrine de deux pédicelles voisins interagissent en son centre pour former une structure en fermeture éclair restreignant le passage des macromolécules à un espace rectangulaire d'environ 4 sur 14 nm et excluant ainsi l'albumine (Tryggvason 1999, Wartiovaara 2004).

Ces avancées majeures ont permis de commencer à définir la composition et la structure du diaphragme de fente, jusqu'alors mystérieuses. Cependant, cette description est encore incomplète et de nouvelles protéines constitutives de cette structure restent encore probablement à découvrir.

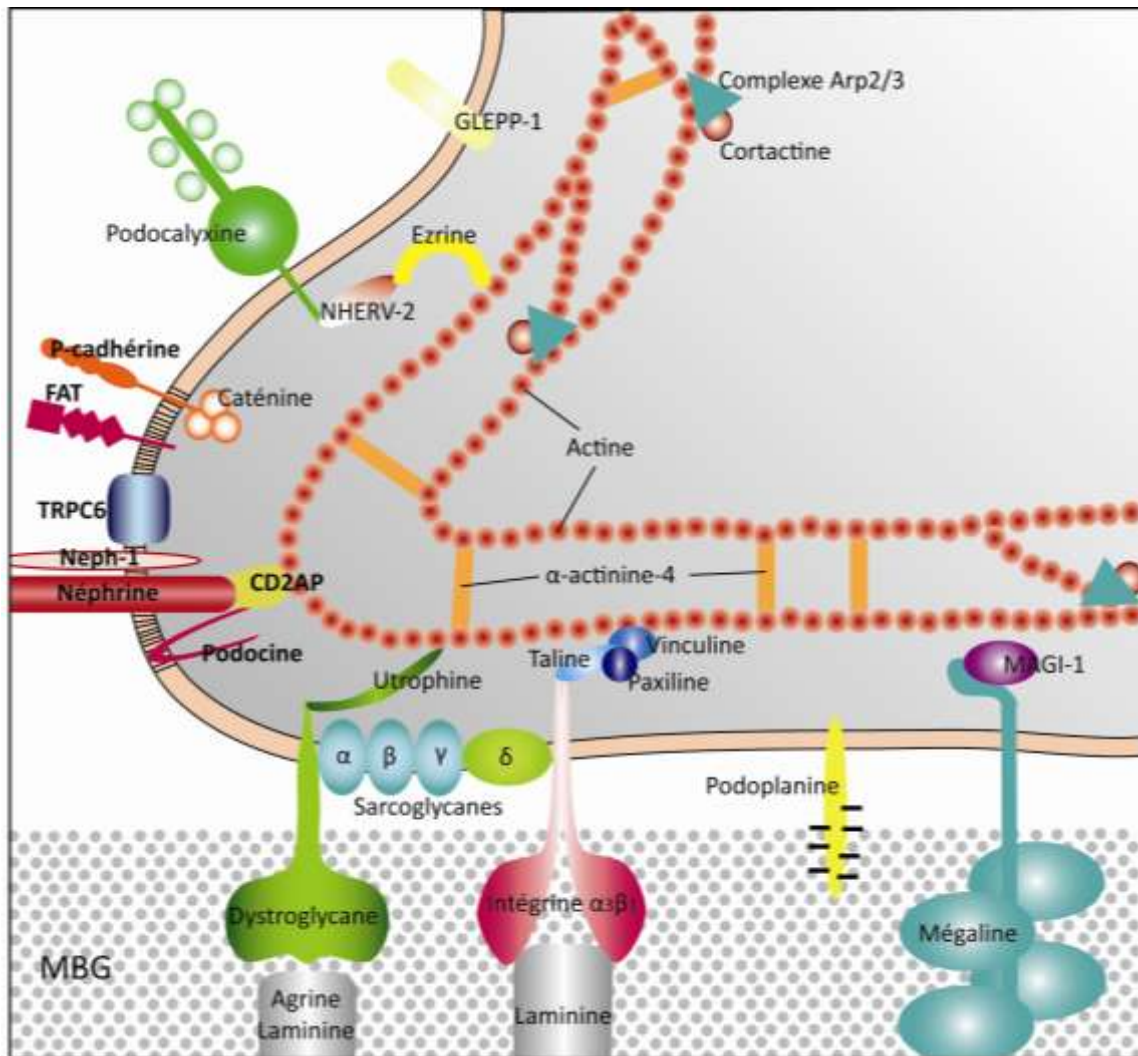


Figure 6 : Représentation schématique de l'équipement moléculaire des pédicelles (modifié d'après Kerjaschki, 2001).

SIGNALISATION DU DIAPHRAGME DE FENTE

Il apparaît aujourd'hui que le diaphragme de fente n'a pas uniquement une fonction de barrière de filtration sélective, mais qu'il est également capable d'induire des signaux de transduction qui vont réguler différents programmes biologiques complexes dans le podocyte, tels que les réarrangements du cytosquelette, la polarité, la différenciation et l'inhibition de la prolifération, la viabilité, l'endocytose et la mécanotransduction (**Figure 7**).

La transduction du signal dans les podocytes est initiée par la phosphorylation des résidus tyrosines des queues cytoplasmiques de la néphrine et de NEPH-1 (Lahdenpera 2003). Une étude a montré que fyn, une protéine kinase de la famille Src, est responsable de

cette phosphorylation (Verma 2003). Il en résulte une augmentation de la liaison des molécules de podocine à la néphrine et un renforcement de la signalisation (Li 2004). La podocine permet en effet, par son interaction avec les molécules de néphrine, un recrutement de ces dernières au niveau des radeaux lipidiques de la membrane plasmique des pédicelles, ce qui est indispensable pour une initiation correcte de la signalisation (Huber 2003b). Il semble que fyn puisse servir à stabiliser le complexe néphrine-podocine au niveau des radeaux lipidiques en se liant également à la podocine.

La sous-unité régulatrice p85 de la PI3 kinase (*phosphoinositide 3-OH kinase*) a été la première identifiée comme pouvant interagir avec les tyrosines phosphorylées de la néphrine (Huber 2003a). Cette liaison permet le recrutement et l'activation de la sous-unité catalytique p110 qui va convertir les phospholipides membranaires PIP2 (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*) en PIP3 (*phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*). Les protéines de signalisation possédant des domaines d'interaction PH (*Pleckstrin-Homology*) s'accumulent alors en se liant directement aux lipides phosphorylés. Celles-ci vont réguler différents programmes cellulaires cruciaux tels que la survie, la dynamique du cytosquelette d'actine, l'endocytose et le métabolisme cellulaire (Cantley 2002). Ainsi, la sérine-thréonine kinase AKT se lie aux lipides phosphorylés de la membrane par ses domaines PH ce qui provoque son activation et, en conséquence, une diminution de l'apoptose des podocytes (Huber 2003a). La protéine AKT va également réprimer l'expression de la collagénase et induire la synthèse de laminine et de collagène IV (Li 2001b, Mawal-Dewan 2002). Elle pourrait ainsi contribuer au maintien d'une MBG intacte et donc à l'intégrité du filtre glomérulaire.

La néphrine n'est pas la seule protéine du diaphragme de fente à pouvoir induire un signal anti-apoptotique dans les podocytes. En effet, la CD2AP peut également interagir directement avec p85 et la recruter au niveau du diaphragme de fente (Huber 2003a). En association avec la néphrine, la CD2AP va alors activer fortement la PI3 kinase, renforçant ainsi l'activité anti-apoptotique de AKT.

L'étude de la signalisation du diaphragme de fente en est encore à ses débuts. En effet, les travaux réalisés jusqu'ici font souvent l'objet de controverses et sont d'autant plus compliqués à réaliser que les connaissances sur l'architecture moléculaire du diaphragme de fente sont encore incomplètes.

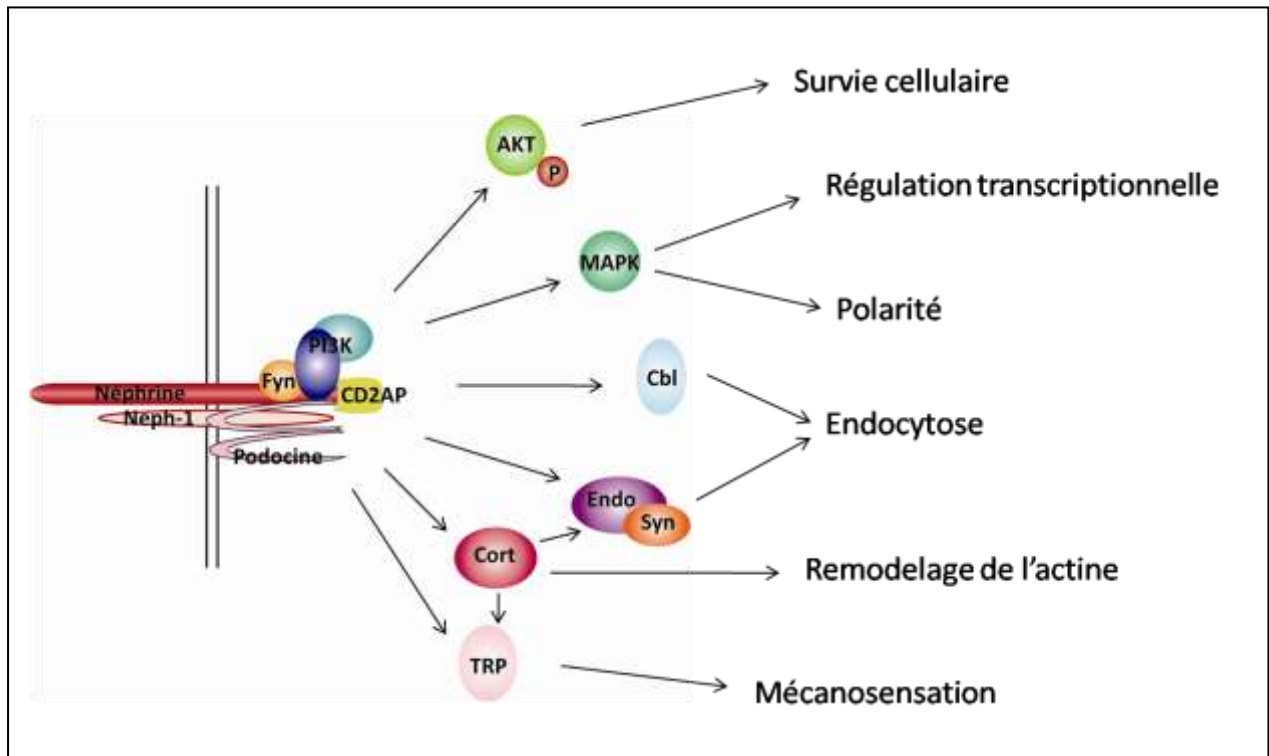


Figure 7 : Représentation schématique des voies de signalisation hypothétiques qui pourraient être impliquées dans la régulation des fonctions podocytaires et glomérulaires (modifié d'après Benzing, 2004).
Cbl : Casitas B-lineage lymphoma ; Endo : Endophiline ; Syn : Synaptojanine ; Cort : Cortactine.

II. Description du Syndrome Néphrotique Idiopathique

1. Définition et classifications

Le syndrome néphrotique est une entité anatomo-clinique caractérisée par une protéinurie abondante due à une atteinte de la barrière de filtration glomérulaire. Cette protéinurie est responsable d'une perte d'albumine supérieure aux capacités de synthèse hépatique, provoquant ainsi une hypoalbuminémie. Le syndrome néphrotique répond donc à une définition strictement biologique associant une protéinurie supérieure à 3 g/24 h chez l'adulte (et supérieure à 50 mg/kg/jour chez l'enfant), une hypoalbuminémie inférieure à 30 g/L et une hypoprotidémie inférieure à 60 g/L. Quelle que soit son étiologie, le syndrome néphrotique conduit à différentes complications, en particulier un syndrome œdémateux, une hyperlipidémie, des anomalies de la coagulation (hypercoagulabilité, thrombose) et un risque accru d'infection par les bactéries encapsulées (pneumocoque, hémophilus...).

On distingue de façon schématique les syndromes néphrotiques primitifs des syndromes néphrotiques secondaires, pour lesquels une étiologie précise (infectieuse, toxique, tumorale...) peut être mise en évidence, ou qui s'intègrent dans le cadre d'une maladie générale (**Tableau 1**). Au contraire, les syndromes néphrotiques primitifs sont dits idiopathiques et désignent un groupe de glomérulopathies dont l'étiologie est inconnue et qui représentent près de 90% des néphropathies d'origine glomérulaire de l'enfant et 15 à 20% de celles de l'adulte (Audard 2008).

En fonction des lésions histologiques, le syndrome néphrotique idiopathique se divise en trois sous-types : le Syndrome Néphrotique à Lésions Glomérulaires Minimales (LGM), la Hyalinose Segmentaire et Focale (HSF) et la Prolifération Mésangiale Diffuse (PMD). La suite de cet exposé se focalisera uniquement sur la LGM et la HSF. Ces deux entités ont des présentations cliniques relativement similaires et le fait qu'elles puissent représenter deux stades d'évolution d'une seule et même maladie a fait l'objet d'un long débat. De nombreux auteurs considèrent que les lésions de LGM sont capables d'évoluer vers des lésions de HSF et qu'il s'agit de deux glomérulopathies apparentées. Une étude a montré en particulier que

sur 49 patients présentant une LGM, plus de la moitié évoluaient vers une HSF dans une période de 10 ans (Ahmad 2000). Il faut noter également que la récurrence du SNI après transplantation rénale se manifeste initialement d'un point de vue histologique par des lésions de LGM qui évolueront ensuite vers des lésions de HSF. Cependant, le lien entre LGM et HSF est encore obscur et certains auteurs considèrent toujours ces deux entités comme deux maladies différentes (Mathieson 2007).

Causes des syndromes néphrotiques secondaires

<u>INFECTIONS</u>	Hépatites B et C HIV-1 Malaria Syphilis Toxoplasmose
<u>MEDICAMENTS ET DROGUES</u>	Pénicillamine, Pamidronate Anti-inflammatoires non-stéroïdiens Interféron Or, mercure, lithium Héroïne
<u>DESORDRES IMMUNITAIRES OU ALLERGIQUES</u>	Maladie de Castleman, maladie de Kimura Piqûres d'insectes Allergènes alimentaires Pollen, poussière domestique Venins ou poisons végétaux
<u>NEOPLASIES</u>	Lymphomes hodgkiniens ou non Leucémie, carcinome, sarcome
<u>AUTRES MALADIES RENALES</u>	Lupus érythémateux systémique Reflux vésico-urétéral Uropathie malformative
<u>AUTRES</u>	Diabète, hypertension, obésité Prééclampsie Réduction de la masse rénale

Tableau 1 : Principales causes de syndromes néphrotiques secondaires.

2. Les lésions glomérulaires minimes (LGM)

a) Aspects cliniques, incidence et évolution

Le syndrome néphrotique à lésions glomérulaires minimes (anciennement appelé « néphrose lipoïdique ») représente 80 à 85% des SNI de l'enfant avec un pic de prévalence entre 4 et 8 ans (Churg 1970, White 1970), et environ 20% des SNI de l'adulte (Haas 1995). Il se manifeste initialement par l'apparition brutale d'un œdème facial ou périorbital ou d'une tension abdominale (Tune 1997). La protéinurie est souvent très abondante (de 6 à 10 g/24 h) et accompagnée d'une hypoalbuminémie profonde (inférieure à 15-20 g/24 h). Cette protéinurie est dite sélective, car elle se compose à environ 80% d'albumine (Adamson 1986).

Lorsqu'il n'est pas compliqué par une HSF surajoutée ou par une hypercellularité mésangiale sévère, le SNI/LGM est considéré comme relativement bénin. En effet, moins de 5% des cas évoluent vers l'insuffisance rénale terminale. 80 à 90% des patients développent une rémission complète grâce à la corticothérapie (Schena 1988). Cependant, les sujets répondeurs ont tendance à développer des épisodes de rechute lors de l'arrêt ou de la diminution de la posologie des corticoïdes (Siegel 1972).

b) Histologie

Le SNI/LGM est caractérisé par des glomérules qui apparaissent normaux ou très modérément altérés en microscopie optique, sans dépôt d'immunoglobulines visible en immunofluorescence (Mathieson 2007). En revanche, l'analyse par microscopie électronique révèle d'importantes lésions de l'épithélium glomérulaire, avec un effacement des fentes de filtration et une fusion des pédicelles podocytaires (**Figures 8 et 9**). Les dépôts immuns électron-denses sont normalement absents mais peuvent être exceptionnellement observés en petite quantité au niveau du mésangium. Une hypercellularité mésangiale minime peut également être retrouvée.

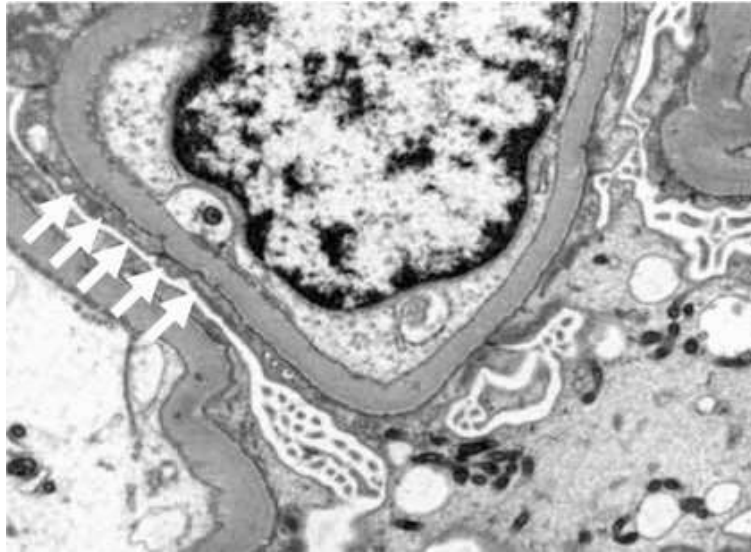


Figure 8 : Représentation en microscopie électronique à transmission de la barrière de filtration glomérulaire d'un patient présentant un syndrome néphrotique à lésions glomérulaires minimales (d'après Mathieson, 2004). Les flèches indiquent l'effacement des pédicelles.

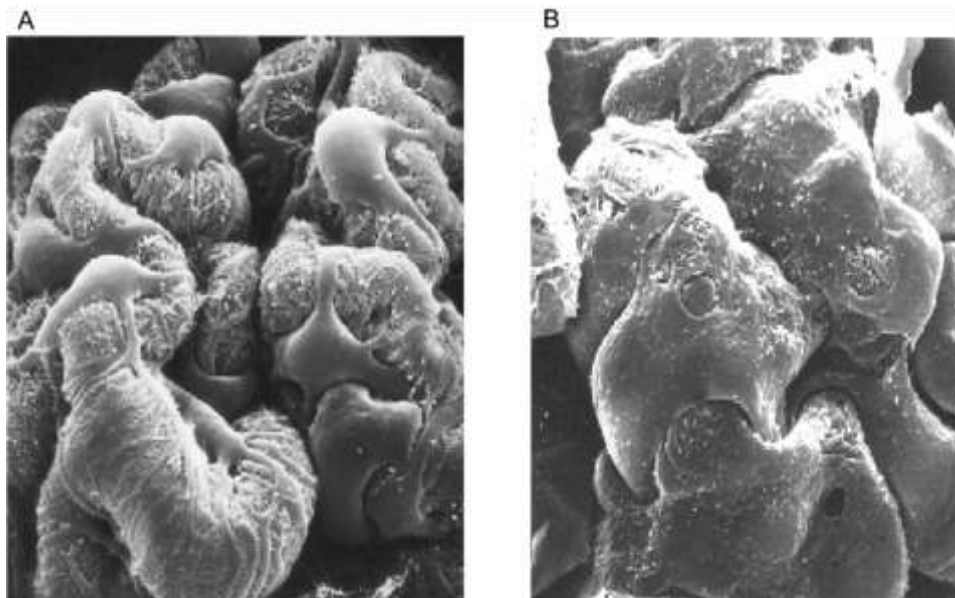


Figure 9 : Représentation en microscopie électronique à balayage des fentes de filtration glomérulaires d'un sujet sain (A) et d'un patient présentant un syndrome néphrotique à lésions glomérulaires minimales (B) (d'après Mathieson, 2004).

3. La Hyalinose Segmentaire et Focale (HSF)

a) Aspects cliniques, incidence et évolution

Décrite en 1957 par Rich (Rich 1957), la hyalinose segmentaire et focale se distingue du SNI/LGM d'un point de vue clinique par l'existence d'une hématurie microscopique, d'une hypertension artérielle et d'une altération variable de la fonction rénale au moment du diagnostic (syndrome néphrotique « impur ») (Habib 1973). La HSF primitive représente 7 à 20% des lésions glomérulaires des patients néphrotiques (Cameron 1996, Habib 1971). Sa prévalence semble avoir augmenté au cours des années (Haas 1995), probablement en partie du fait de l'identification de nouveaux variants histologiques. Elle représente aujourd'hui entre 30 et 50% des syndromes néphrotiques de l'adulte (Haas 1997). Dans les populations noires et hispaniques, sa prévalence est deux à quatre fois supérieure à celle observée dans les populations caucasiennes (Dragovic 2005).

Le pronostic de la HSF est beaucoup moins favorable que celui du SNI/LGM, principalement du fait de l'efficacité limitée de la corticothérapie chez ces patients. Plus de 80% des cas évoluent vers l'insuffisance rénale chronique terminale (Cameron 1996), nécessitant un recours à l'hémodialyse et/ou la transplantation rénale. Cependant, environ 30% des patients développeront une récurrence de leur maladie initiale après transplantation (Dantal 1995). Le niveau de la protéinurie au moment du diagnostic est souvent un facteur prédictif de l'évolution de la maladie. Ainsi, une protéinurie supérieure à 3-3.5 g/24 h a été systématiquement associée à une progression défavorable de la HSF primitive, 50% des patients évoluant vers l'insuffisance rénale terminale en 6 à 8 ans (Cameron 1978). De plus, une protéinurie massive supérieure à 10 g/24 h présage une évolution encore plus mauvaise, l'insuffisance rénale terminale étant atteinte dans les 3 ans chez la majorité des patients (Brown 1978, Velosa 1983). L'autre critère clinique d'intérêt pronostique est le degré de créatinémie (Rydel 1995, Velosa 1983). En effet, une créatinémie supérieure à 1.3 mg/dL chez les patients présentant une HSF est associée à une survie rénale significativement moindre que celle des patients présentant une créatinémie inférieure (27% de survie à 10 ans contre 100%) (Korbet 1998). En revanche, la progression de la HSF ne semble pas être

influencée par l'âge, le sexe, l'existence d'une hématurie ou d'une hypertension artérielle (Banfi 1991, Pei 1987, Rydel 1995).

b) Histologie

La hyalinose segmentaire et focale se caractérise histologiquement par des lésions de sclérose qui touchent certains lobules du glomérule (caractère segmentaire), tous les glomérules n'étant pas atteints (caractère focal) (**Figure 10**). Ces lésions consistent en un épaissement de la matrice extracellulaire du mésangium, une adhésion du peloton capillaire à la capsule de Bowman (synéchies floculo-capsulaires) et la présence de dépôts hyalins (Korbet 1998). Elles s'accompagnent en général d'une hypercellularité mésangiale modérée (Hyman 1973).

Le développement des lésions de HSF débute par une atteinte podocytaire visible en microscopie électronique par un effacement des pédicelles analogue à celui observé au cours du SNI/LGM. Cette atteinte peut survenir selon quatre mécanismes majeurs : une altération des composants du diaphragme de fente ou une interférence avec sa structure ; une dérégulation du cytosquelette d'actine des podocytes ; une altération de la MBG ou de son interaction avec la semelle pédicellaire ; ou une altération de la surface de charge négative des podocytes (Asanuma 2003, Kwoh 2006). Les podocytes lésés perdent alors leur caractère adhésif (Kemeny 1995) et se détachent de la MBG (Grishman 1975). À partir de ce stade, les lésions de HSF deviennent irréversibles. Du fait de leur incapacité à proliférer, les podocytes lésés ne sont pas remplacés (Fogo 2003) et laissent place à des aires de MBG dénudées. Celles-ci vont alors s'attacher aux cellules épithéliales pariétales de la capsule de Bowman ce qui conduit à l'adhésion du peloton capillaire à la capsule de Bowman, site au niveau duquel les podocytes et les cellules pariétales vont finalement disparaître. Selon Kriz et Lemley, ces zones de synéchies permettraient la fuite de protéines plasmatiques vers l'espace péri-tubulaire où elles stimuleraient les fibroblastes pour donner lieu à une fibrose péri-glomérulaire et tubulo-interstitielle (Kriz 1999). Enfin, les zones de sclérose s'encadrent des cellules pariétales restantes qui vont entrer en continuité avec les podocytes qui subsistent et vont ainsi s'étendre progressivement aux lobules voisins.

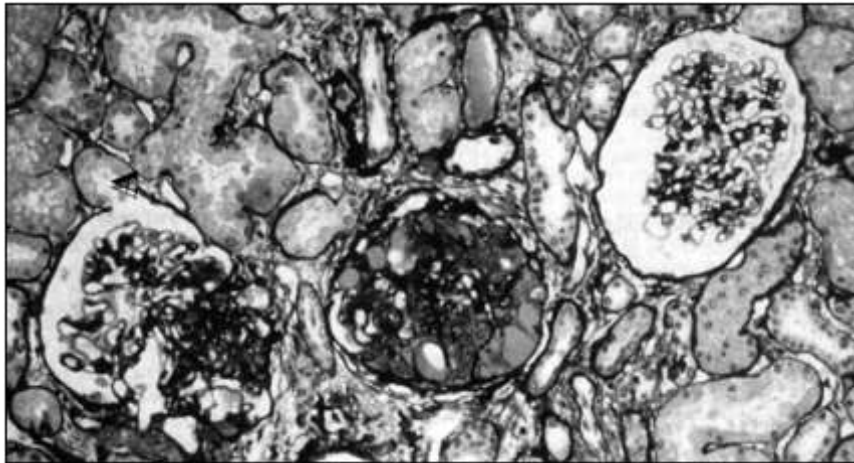


Figure 10 : Représentation en microscopie optique de glomérules présentant des lésions de hyalinose segmentaire et focale (d'après Cameron, 1996). De gauche à droite, sont représentés un glomérule partiellement lésé, un glomérule entièrement lésé, et un glomérule non-lésé.

c) Variants histologiques

Différents variants histologiques de la HSF ont été décrits au cours des années. Une classification histologique, basée principalement sur la localisation en microscopie optique des zones de sclérose glomérulaires à partir des biopsies de patients, a récemment été proposée (D'Agati 2004). On distingue ainsi :

- Les lésions de HSF « classiques » dans lesquelles seulement certains glomérules présentent des aires segmentaires de sclérose et de collapsus du mésangium.
- Le « collapsing variant » qui se caractérise par un collapsus et une sclérose du peloton capillaire entier, associés à une hypertrophie et une hyperplasie excessives des podocytes dans au moins un des glomérules de la biopsie.
- Le « tip variant » caractérisé par au moins une lésion segmentaire impliquant la partie du glomérule attenante à l'embouchure du tube proximal. Des cellules spumeuses sont souvent observées dans ce type de lésions.
- Le variant « péri-hilaire » qui se caractérise par une sclérose et une hyalinose situées au niveau du pôle vasculaire dans plus de la moitié des glomérules sclérotiques.

- Le variant « cellulaire » caractérisé par la détection d'au moins un glomérule présentant une hypercellularité segmentaire de l'endothélium capillaire qui obstrue la lumière capillaire.

Ces différents variants diffèrent également d'un point de vue clinique. Par exemple, le « collapsing variant » tend à progresser plus rapidement vers l'insuffisance rénale terminale et apparaît en général dans le cadre du HIV. De plus, il est possible que des mécanismes différents soient impliqués dans la pathogenèse de chacun de ces variants.

4. Récidive du SNI après transplantation rénale

a) Définition, incidence et évolution

Les premiers cas de récurrence de HSF ont été décrits en 1972 par Hoyer (Hoyer 1972). Il s'agit de la néphropathie récidivante la plus grave pour la fonction du greffon. Son incidence se situe entre 20 et 30% pour une première greffe chez l'adulte et 50% en pédiatrie (Hubsch 2005, Newstead 2003). La grande majorité des patients ayant développé une première récurrence de SNI présenteront également une récurrence sur les transplants ultérieurs (environ 80%) (Cameron 1991, Ramos 1994, Stephanian 1992). Malgré quelques cas de rémissions spontanées (Franco 1987, Stephanian 1992), 50% des récurrences sont responsables de la perte du greffon (Cameron 1991, Dantal 1991).

Il n'existe toujours pas à ce jour de réel consensus sur la définition clinique de la récurrence après transplantation. Celle-ci est suspectée en premier lieu par l'apparition généralement rapide d'une protéinurie importante après la greffe. Le seuil de cette protéinurie peut être fixé à 1 g/24 h chez l'adulte (Dantal 1991, Kim 1994) ou à 50 mg/kg/jour chez l'enfant (Cochat 1993) mais il reste encore à discuter et varie selon les équipes. La récurrence doit impérativement être confirmée par la mise en évidence sur le greffon de lésions glomérulaires compatibles avec un SNI. Sur les biopsies précoces, il s'agit alors de lésions de LGM constatées en microscopie électronique par la fusion des pédicelles, les lésions de HSF apparaissant plus tardivement (dans les semaines ou les années qui

suivent). Un détachement des podocytes, qui constitue la première lésion caractéristique de la HSF, peut également être retrouvé (Verani 1986).

En fonction de son délai d'apparition, la récurrence de HSF peut être divisée en trois catégories : 1) la récurrence immédiate, qui survient dans les 48 heures après la transplantation et/ou la reprise de la diurèse ; 2) la récurrence précoce qui survient dans les 3 mois et 3) la récurrence tardive qui survient après 3 mois. Dans 90% des cas, il s'agit d'une récurrence immédiate ou précoce. La récurrence tardive a également été décrite comme « de novo » (Hayes 1991, Leunissen 1989) et pourrait correspondre en réalité à des lésions de HSF non spécifiques, liées par exemple à une réduction néphronique ou à un rejet chronique (Ettenger 1977, Habib 1987).

b) Facteurs de risque

Il n'existe pas à ce jour de facteur prédictif de la récurrence du SNI après transplantation, mais les différentes études publiées ont permis de faire émerger certaines populations à risque.

EVOLUTION DE LA MALADIE INITIALE

La rapidité d'évolution de la maladie initiale, de son diagnostic à l'insuffisance rénale terminale, a été montrée comme facteur de risque de la récurrence. Il semble en effet que plus cette évolution est rapide, plus le risque de récurrence est grand. De nombreux auteurs citent le seuil de 3 ans (50% de récurrence contre 10-20% au-delà), mais celui-ci est discuté (Cameron 1991, Maizel 1981).

La durée de prise en charge des patients en hémodialyse ne semble pas avoir d'influence sur la fréquence de récurrence sur une première greffe. Celle-ci peut néanmoins jouer sur les transplantations ultérieures, un long délai d'attente en hémodialyse ayant parfois permis d'obtenir des retransplantations fructueuses (Cameron 1989, Hosenpud 1985).

HISTOLOGIE DE LA MALADIE INITIALE

Tous les variants histologiques du SNI sont susceptibles de récidiver après la greffe, mais le risque est augmenté en présence d'une prolifération mésangiale sur les reins propres. L'existence d'une prolifération mésangiale diffuse est en particulier un élément prédictif très important (Cameron 1989, Habib 1987, Lewis 1982, Maizel 1981) qui fait passer le taux de récurrence de 20 à 80% chez l'enfant (Striegel 1986). Il faut noter que la rapidité d'évolution de la maladie initiale est augmentée en présence d'une prolifération mésangiale diffuse, toutes deux facteurs de risques de la récurrence.

ÂGE AU DEBUT DE LA MALADIE

Chez l'adulte, la récurrence est possible quel que soit l'âge d'installation de la maladie initiale (Artero 1992, Dantal 1991). En revanche, ce critère est très important en pédiatrie, les enfants de moins de 15 ans étant plus susceptibles de développer une récurrence que les adultes (Banfi 1990, Senggutuvan 1990). Les résultats diffèrent en fonction des études mais globalement, il semble que le risque de récurrence soit plus important chez les enfants dont la maladie initiale est apparue entre les âges de 6 et 15 ans (Habib 1987, Rizzoni 1991, Senggutuvan 1990). Cependant, d'autres auteurs montrent un risque de récurrence accru lorsque la maladie initiale est apparue avant l'âge de 5 ans (Cameron 1991).

CARACTERISTIQUES LIEES AU DONNEUR

Certains critères tels que l'âge et le sexe du donneur, l'appariement entre le sexe du donneur et du receveur ou la compatibilité HLA en cas de transplantation à partir de donneurs cadavériques, n'ont pas montré d'influence sur l'incidence de la récurrence (Dantal 1991). La possibilité d'une augmentation de la fréquence de récurrence lorsqu'il s'agit d'un donneur vivant et non d'un donneur cadavérique a été proposée, en particulier en pédiatrie (Baum 2004, First 1995).

5. Les anomalies du système immunitaire dans le SNI

L'implication du système immunitaire dans le SNI est fortement suggérée et a beaucoup été étudiée dans le SNI à lésions glomérulaires minimes. Les éléments en faveur de cette hypothèse sont cependant tous indirects, puisque l'observation des glomérules des malades n'a jamais permis de mettre en évidence un phénomène d'inflammation, ni d'infiltrat de lymphocytes T ou d'autres cellules immunitaires, ni de dépôt d'Ig ou de complément. Les études se sont donc particulièrement concentrées sur la recherche d'un médiateur soluble sécrété par les cellules immunitaires.

En 1974, Shalhoub a été le premier à suggérer qu'une anomalie des lymphocytes T pourrait être à l'origine de la sécrétion par ces cellules d'un facteur de perméabilité circulant capable de s'attaquer à la barrière de filtration glomérulaire (Shalhoub 1974). Cette hypothèse est basée sur différents arguments cliniques, comme l'association du SNI à des hémopathies lymphoïdes chroniques telles que des leucémies (Moulin 1992, Sahiner 2004, Yahata 2000), des lymphomes de Hodgkin (Couser 1977, Peces 1991, Stephan 1997) ou des thymomes (Karras 2005, McDonald 1992). De plus, une rémission définitive du SNI peut survenir suite à une infection par le virus de la rougeole, connu pour inhiber la lymphoprolifération T (Sun 1998) et provoquer une apoptose massive des précurseurs T intrathymiques (Auwaerter 1996). Au contraire, un syndrome néphrotique peut survenir au cours d'une activation du système immunitaire déclenchée par une infection virale (Burstein 1993, Tanawattanacharoen 2000). De nombreuses observations ont également décrit une association du syndrome néphrotique avec des réactions allergiques dues à des antigènes inhalés (Florida 1992, Reeves 1975, Williamson 1970, Wittig 1970), des antigènes alimentaires (Genova 1987, Lagrue 1989, Law-Chin-Yung 1977, Sandberg 1977), des vaccinations (Kuzemko 1972, Macario 1995), ou des piqûres d'insectes (Cuoghi 1988, Tareyeva 1982). L'incidence d'une atopie est d'ailleurs significativement plus élevée chez les patients présentant un SNI comparé aux individus sains, de 17 à 40% dans le SNI/LGM contre 10 à 23% normalement selon les études (Lin 1990, Meadow 1981, Yap 1983). L'implication du lymphocyte T est également suggérée par la capacité des différents traitements immunosuppresseurs à induire une rémission (*cf. partie III. sur les traitements du SNI*). Ce point doit cependant être considéré avec précaution puisque ces molécules pourraient agir directement au niveau rénal et/ou glomérulaire. En effet, les podocytes et les cellules

endothéliales glomérulaires expriment des récepteurs aux glucocorticoïdes au travers desquels les corticostéroïdes pourraient agir sur la barrière de filtration (Waage 1990, Yan 1999). C'est d'ailleurs probablement le cas pour la ciclosporine A, dont l'action semble être dirigée au moins en partie sur les podocytes (Faul 2008).

De nombreux travaux ont rapporté des anomalies du système immunitaire dans le SNI/LGM, affectant à la fois l'immunité humorale et l'immunité à médiation cellulaire. La difficulté majeure repose sur le fait qu'il est souvent compliqué d'obtenir un groupe de patients homogène. Le degré de protéinurie peut varier d'un patient à l'autre, et certains sont sous traitement immunosuppresseur au moment du prélèvement, ce qui peut affecter la production de nombreux facteurs dont celle de facteur(s) de perméabilité. De plus, le syndrome néphrotique est souvent associé à une hyperlipidémie qui peut à elle seule moduler l'activité du système immunitaire (Lenarsky 1982) et peut-être ainsi altérer la production de facteurs circulants.

a) Perturbations des fonctions lymphocytaires

ANOMALIES DU PHENOTYPE

Le résultat le plus reproduit au cours de l'étude des sous-populations lymphocytaires montre un déséquilibre de la répartition T CD4+ / T CD8+ au profit des lymphocytes T CD8+ chez les patients SNI/LGM, en rechute comme en rémission, comparé aux individus sains (Daniel 1997, Frank 2000, Lama 2002, Topaloglu 1994). Ceci évoque une altération de l'engagement dans la maturation CD4 ou CD8 au niveau du thymus.

Des études ont également rapporté lors des rechutes du SNI/LGM une expansion des lymphocytes T CD4+ exprimant le marqueur CD25 (Neuhaus 1995), et des lymphocytes T CD4+ et CD8+ mémoires exprimant le marqueur CD45RO (Yan 1998). L'expression de CD25 au cours des poussées pourrait refléter le recrutement d'une sous-population de lymphocytes T CD4+ CD25+ aux propriétés suppressives. Ceci pourrait d'ailleurs expliquer la diminution de l'immunité à médiation cellulaire observée dans le SNI/LGM grâce aux tests cutanés d'hypersensibilité retardée, ainsi que la diminution de la prolifération T induite par

les mitogènes chez ces patients (Fodor 1982, Matsumoto 1984). Le rôle exact des lymphocytes T suppresseurs dans le SNI reste cependant encore à établir.

Ces différents résultats suggèrent fortement une implication des lymphocytes T activés au cours de la néphrose. Cependant, il est encore difficile de déterminer si l'activation T est la cause ou la conséquence du SNI. Le profil lymphocytaire T a récemment été analysé plus spécifiquement chez les patients présentant une récurrence de SNI/HSF, dans un travail basé sur l'étude du polymorphisme de la région variable du TCR (TcLandscape®). Ceci a permis de montrer que le processus responsable de la récurrence de HSF n'implique pas d'activation du TCR ou d'expansion clonale spécifique des cellules T, sans pour autant exclure complètement le rôle de ces cellules dans la production d'un éventuel facteur de perméabilité (Herve 2006b).

Les altérations lymphocytaires au cours du SNI ne semblent pas limitées au seul compartiment T, puisqu'une expansion de la population lymphocytaire B au cours des poussées a également été rapportée, bien que celle-ci ait été peu étudiée. L'hypogammaglobulinémie et le déficit en sous classes d'IgG2 fréquemment observée évoque un trouble de la coopération T/B au cours du SNI (Cheung 2004, Kemper 2002). Ceci pourrait expliquer l'effet bénéfique potentiel du traitement au rituximab (anticorps anti-CD20) dans certaines formes de SNI (*cf. partie III. sur les traitements du SNI*).

ANOMALIES DE DISTRIBUTION DES CYTOKINES

Il semble que les patients SNI/LGM expriment un profil lymphocytaire plutôt de type Th2. Ceci est suggéré en particulier par le fait que le SNI est souvent associé à l'atopie et à l'allergie (Meadow 1981, Reeves 1975, Wittig 1970), phénomènes typiquement liés à une réponse immunologique Th2. L'effet bénéfique du traitement au lévamisole, associé à une augmentation des réponses Th1 et à la sous-régulation des réponses Th2 excessives semble également conforter cette hypothèse.

De nombreux travaux se sont intéressés au profil cytokinique des patients SNI/LGM, grâce à différentes méthodes : le dosage des cytokines dans le sérum des patients, dans le surnageant de culture de leurs PBMC stimulés ou non à l'aide de différents mitogènes, l'analyse des niveaux d'expression de l'ARNm des cytokines dans les PBMC, ou encore le marquage des cytokines intracellulaires dans les lymphocytes T (Araya 2006). Les résultats obtenus sont cependant extrêmement fluctuants et souvent contradictoires. Ceci peut s'expliquer par différentes raisons. D'une part, les groupes de patients analysés dans certaines études semblent être relativement hétérogènes, puisque la vérification du SNI/LGM sur biopsie n'est pas toujours réalisée, le diagnostic étant souvent basé sur la corticosensibilité de ces patients. De ce fait, des patients présentant un SNI/HSF sont parfois inclus dans les cohortes de patients SNI/LGM analysées. De plus, certains patients sont sous traitement immunosuppresseur au moment du prélèvement, ce qui peut faire considérablement varier la sécrétion de cytokines. Lorsque les analyses sont effectuées à partir du surnageant de culture des PBMC stimulés, les résultats peuvent varier selon le type de mitogène utilisé et la durée de la stimulation, qui peuvent à la base déterminer le type de profil de sécrétion cytokinique. Par exemple, la PHA (*phytohémagglutinine*), mitogène fréquemment utilisé, stimule la sécrétion de cytokines Th1 à 24h, puis la sécrétion de cytokines Th2 à 72h (Araya 2006). Par ailleurs, les mitogènes ne stimulent pas seulement les lymphocytes, mais également d'autres cellules immunitaires telles que les monocytes ou les cellules dendritiques, qui vont également sécréter des cytokines. Enfin, le marquage des cytokines intracellulaires donne des résultats difficiles à analyser puisqu'il ne reflète pas forcément la sécrétion de ces molécules, et la répartition Th1/Th2 est basée sur un profil de sécrétion des cytokines.

Les résultats des différentes études réalisées sont regroupés dans le **tableau 2**. Celles-ci ont toutes été réalisées à partir d'un panel de cytokines présélectionné. Pour s'affranchir de cet inconvénient, l'équipe de Sahali a utilisé la technique du clonage soustractif et différentiel pour analyser les gènes des PBMCs d'un patient SNI/LGM en poussée et en rémission en l'absence de tout traitement (Sahali 2002). Ce travail a permis de mettre en évidence, entre autres, une répression de l'expression du récepteur $\beta 2$ de l'IL-12, spécifique de la voie Th1, au cours des phases de poussée. Cette observation suggère une différenciation précoce des lymphocytes T CD4+ vers la voie Th2.

CYTOKINE	AUGMENTEE	DIMINUEE	INCHANGEE
IL-1			● ● ●
IL-2	● ● ● ● ● ●	● ●	● ● ● ● ● ● ● ● ● ●
sIL-2R	● ● ● ● ● ●	●	● ●
IL-4	● ● ● ● ● ●	● ●	● ● ● ● ● ● ● ● ● ●
IL-6		●	●
IL-8	● ● ● ●	●	● ●
IL-10	● ● ● ●	● ●	● ●
IL-12	● ●		
IL-13	● ● ●		
IL-18	● ●		●
TNF- α	● ● ● ● ● ● ● ●		● ● ● ● ● ● ● ●
IFN- γ	● ● ●	● ●	● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ●
TGF- β			●

Tableau 2 : Synthèse des données de la littérature concernant le niveau d'expression des cytokines dans le SNI. Chaque point correspond aux données rapportées dans la littérature. ● Dosage dans le sérum des patients SNI/LGM en poussée ; ● Dosage dans le surnageant des PBMC (stimulés ou non) des patients SNI/LGM en poussée ; ● Analyse de l'ARNm des PBMC des patients SNI/LGM en poussée ; ● Marquage des cytokines intracellulaires dans les lymphocytes T des patients SNI/LGM en poussée.

Il n'existe pas de preuve formelle quant à l'implication de ces différentes cytokines dans le développement des lésions glomérulaires au cours du SNI, mais il est certain que les podocytes sont potentiellement capables de répondre à des médiateurs solubles produits par les cellules immunitaires. En effet, les podocytes expriment des récepteurs à l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 (Parry 2001, Van Den Berg 2000) et au TNF- α (Aten 2000). De plus, quelques études

ont rapporté la capacité de certaines cytokines à agir directement sur les podocytes, en particulier l'IL-4 et l'IL-13. Les souris transgéniques qui surexpriment le gène de l'IL-4 développent une protéinurie accompagnée de lésions glomérulaires similaires à la HSF (Erb 1997, Ruger 2000). La surexpression de l'IL-13 chez le rat provoque quant à elle une néphropathie similaire au SNI/LGM de l'homme (Lai 2007). L'incubation de podocytes en culture avec de l'IL-4 ou de l'IL-13 induit une altération de l'expression de certaines protéines, du transport ionique et de l'activité d'enzymes lysosomales telles que la cathepsine L et l'héparanase (Van Den Berg 2000, Van Den Berg 2002). Cependant, à l'heure actuelle, l'action d'une seule cytokine semble encore insuffisante pour expliquer l'induction de la maladie *in vivo*, et le rôle réel des cytokines dans le développement des lésions glomérulaires chez l'homme n'a pas encore été éclairci.

ANOMALIES DES VOIES DE SIGNALISATION

Devant l'abondance de preuves indirectes rapportant une anomalie des lymphocytes T dans le SNI/LGM, des études plus récentes ont été entreprises afin d'analyser les mécanismes moléculaires mis en jeu au sein de ces cellules. Ces travaux ont permis de rapporter des anomalies des voies de régulation et d'activation des lymphocytes T chez les patients SNI/LGM.

Une étude de l'équipe de Sahali par clonage soustractif différentiel chez un patient SNI/LGM en poussée et en rémission a permis de mettre en évidence 84 transcrits surexprimés au cours de la phase néphrotique (Sahali 2002). Parmi eux, beaucoup sont impliqués dans la voie de signalisation NFκB, tels que l'IL-1β, la MAP kinase p38, Traf6 et la sous-unité α2 du protéasome (Macropain). Une étude précédente avait d'ailleurs montré une forte activation de la voie NFκB dans les lymphocytes T CD4+ des patients au cours des poussées de SNI/LGM (Sahali 2001). De façon intéressante, il a été montré que cette activation persiste tant que la maladie est active, alors que dans les situations physiologiques, le facteur NFκB activé induit l'expression de son propre inhibiteur IκB pour réprimer l'activation de cette voie. Il semble donc que la boucle de rétrocontrôle négatif soit interrompue chez les patients SNI/LGM en poussée, d'autant que l'expression de l'inhibiteur IκB-α est faible, voir même indétectable pendant cette phase. Différents mécanismes

pourraient contribuer à la dérégulation de la voie NFκB dans les lymphocytes T des malades. Il semble que celle-ci soit liée, au moins en partie, à une suractivation du protéasome, ainsi qu'à une augmentation de la dégradation de l'ARNm codant pour IκB-α associée à un défaut de transactivation du gène IκB-α.

Le travail de cette équipe a également permis de faire émerger une autre voie de signalisation qui semble dérégulée dans le SNI/LGM, la voie c-maf (Sahali 2002). c-maf est un facteur de transcription dont l'expression basale est très faible, voire même indétectable dans les lymphocytes T normaux. En revanche, ce facteur est spécifiquement exprimé dans les lymphocytes T CD4+ au cours du SNI/LGM (Valanciute 2004). Il est détecté sous forme active dans les noyaux au cours des poussées, et sous forme inactive dans le cytoplasme au cours des rémissions. De plus, le clonage soustractif différentiel a également permis de détecter la surexpression d'un gène impliqué dans la voie c-maf et jusqu'alors inconnu, qui a été nommé Tc-mip (*Truncated c-maf inducing protein*). Tc-mip est produit par épissage alternatif de l'ARNm primaire codant pour le gène c-mip. Cette protéine n'est pas présente chez l'individu normal ou chez les patients atteints d'une autre glomérulopathie. En revanche, elle est fortement exprimée chez les patients présentant un SNI/LGM, principalement au niveau des lymphocytes T CD4+ de type Th2. La transfection d'une lignée de lymphocytes T (Jurkat) avec un vecteur d'expression contenant la séquence codante de Tc-mip montre que cette protéine pourrait intervenir dans la transduction de signaux proximaux à partir du TCR pour conduire à l'activation de c-maf (Valanciute 2004).

Une suractivation de la voie c-maf dans le SNI/LGM semble surprenante, puisque la seule cytokine connue régulée par c-maf est l'IL-4 (Ho 1996) dont le niveau d'expression est pourtant faible au cours des poussées. Il semble que ce phénomène soit dû à un blocage de la transactivation par c-maf du gène de l'IL-4, provoqué par la suractivation de NFκB dans les phases de poussée. En effet, l'inhibition de NFκB dans les lymphocytes T des patients induit une augmentation de l'expression de l'IL-4. De plus, la cotransfection de cellules Jurkat avec les séquences codantes de c-maf et de la sous-unité p65 de NFκB provoque une inhibition de l'induction de l'IL-4.

Il faut noter que l'activation concomitante des voies NFκB et c-maf n'est pas un phénomène habituel et pourrait expliquer la difficulté à obtenir des résultats reproductibles en ce qui concerne l'expression des cytokines dans le SNI/LGM.

b) Anomalies des immunoglobulines

L'association du SNI à une hypogammaglobulinémie est un phénomène aujourd'hui parfaitement établi (Bernard 1988). Celle-ci n'est pas liée à une fuite urinaire d'Immunoglobulines, qui est faible ou absente chez les patients atteints d'un SNI. Les IgG sont globalement diminuées dans le SNI/LGM, mais les différentes sous-classes ne sont pas affectées de la même façon. En effet, alors que les taux d'IgG1 et d'IgG2 circulants sont considérablement réduits (ainsi que leur synthèse *in vitro*), les sous-classes d'IgG3 et 4 sont relativement épargnées (Warshaw 1989). Les IgA tendent également à diminuer progressivement au cours du SNI corticorésistant, bien que certaines études aient rapportés des taux normaux (Chan 1987, Mishra 1997). Les taux d'IgG et d'IgA semblent retrouver des valeurs normales au cours des rémissions (Heslan 1982, Yokoyama 1987). Les IgM sont quant à elles fortement augmentées et conservent des taux élevés pendant les phases de rémission (Aro 1984, Chan 1987, Giangiacomo 1975, Mishra 1997), ce qui suggère une anomalie du switch IgM/IgG chez les patients SNI. Les IgE, comme suggéré par l'association du SNI à un terrain atopique, présentent des taux significativement augmentés chez les patients présentant un syndrome néphrotique (Schulte-Wissermann 1979, Yokoyama 1985). Ces taux restent élevés pendant les phases de rémission, ce qui tend à montrer que ces anomalies ne sont pas seulement une conséquence de la maladie ou de ses traitements.

Ces anomalies de répartition des immunoglobulines pourraient être le reflet d'une dérégulation des cytokines vers un profil Th2, celles-ci étant particulièrement impliquées dans le switch vers la production d'IgG4 et d'IgE dans les lymphocytes B (Mosmann 1989).

III. Les traitements du Syndrome Néphrotique Idiopathique

Le syndrome néphrotique idiopathique nécessite en premier lieu la prise en charge des patients à l'aide d'un traitement symptomatique initié au moment de la phase aigüe et qui devra être maintenu jusqu'à la rémission : régime sans sel, diurétiques, traitements anti-protéïnuriques tels que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) et les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA2). Celui-ci est indispensable en particulier lors de l'échec partiel ou total du traitement spécifique du syndrome néphrotique, afin de ralentir la dégradation de la fonction rénale, d'améliorer la qualité de vie des patients et d'éviter les manifestations thromboemboliques pouvant mettre en jeu le pronostic vital. En parallèle, différents types de traitements spécifiques du syndrome néphrotique seront bien sûr utilisés. Ceux-ci ne sont généralement pas employés trop précocement puisqu'il subsiste une faible possibilité de rémission spontanée (Cameron 1974, Habib 1971) et qu'il peut être nécessaire de traiter préalablement les éventuelles infections.

1. Traitement de première intention

Le traitement initial du SNI/LGM repose sur la corticothérapie (Prednisone) à 1 mg/kg/jour chez l'adulte (Glasscock 1993, Korbet 1995) ou 60 mg/m²/jour chez l'enfant (Bargman 1999). En pédiatrie, la corticothérapie dure au total quatre mois et demi, dont une phase de 45 jours de décroissance progressive des doses de prednisone. En cas de succès du traitement, la protéinurie disparaît habituellement entre le 8^e et le 15^e jour. Chez l'adulte, la durée de la corticothérapie varie en fonction de l'évolution du patient. La réponse est en général plus longue à obtenir que chez l'enfant (Korbet 1995, Nakayama 2002), et conditionne le risque de rechutes. La posologie initiale de prednisone est maintenue pendant 3 semaines en cas de rémission complète rapide, ou pendant 12 semaines en l'absence de rémission ou en cas de rémission incomplète. Les doses sont ensuite diminuées progressivement sur un total de 16 semaines.

Comme pour le SNI/LGM, le traitement de première intention de la HSF primitive est la corticothérapie (Korbet 2002, Meyrier 2004). Le schéma thérapeutique recommandé consiste en des doses de 1 mg/kg/jour de prednisone pendant 12 à 16 semaines. Les doses sont ensuite diminuées progressivement sur 3 mois en cas de rémission complète, ou sur 6 mois en cas de rémission partielle. En revanche, si le syndrome néphrotique persiste après 16 semaines de traitement, les patients sont considérés comme corticorésistants et la corticothérapie est alors arrêtée. Dans ce cas, la recherche d'une éventuelle anomalie génétique est recommandée. En effet, si celle-ci est avérée, le traitement corticoïde pourra être suspendu et les mesures thérapeutiques symptomatiques seront alors privilégiées afin de freiner l'évolution vers l'insuffisance rénale.

Près de 90% des patients présentant un SNI/LGM entrent en rémission après la corticothérapie (Skena 1988), contre seulement 40 à 80% (selon les études publiées) des patients présentant une HSF primitive (Chun 2004, Ponticelli 1999, Rydel 1995, Stirling 2005).

2. Traitement des rechutes

Malgré le taux relativement important de corticosensibilité, les enfants comme les adultes sont exposés à un risque de rechute après l'arrêt de la corticothérapie, ou lors des phases de diminution de la posologie. Les patients présentant un SNI/LGM sont particulièrement exposés au risque de rechute, qui varie de 16 à 70% selon les études (Fujimoto 1991, Waldman 2007). Une réponse favorable est généralement obtenue suite à une seconde cure de prednisone selon des modalités similaires à celles du traitement initial. Cependant, en cas d'effets secondaires trop importants ou de contre-indication aux corticoïdes, un traitement par ciclosporine A peut être envisagé (Cattran 2007, Matsumoto 2001). Le tacrolimus a également été testé et a permis d'obtenir une forte diminution des niveaux de protéinurie des patients sans pour autant obtenir de rémission complète (Duncan 2004).

3. Traitement du syndrome néphrotique idiopathique corticodépendant

Environ 50% des enfants et 16% des adultes présentant un SNI/LGM sont corticodépendants (Habib 1971, Meyrier 1988, Nolasco 1986), c'est-à-dire qu'ils développent des épisodes de rechute lors de la phase de décroissance de la corticothérapie ou dans les deux semaines qui suivent l'arrêt du traitement. Plusieurs thérapies alternatives peuvent être envisagées chez ces patients (Bargman 1999, Durkan 2001) :

- Les agents alkylants sont utilisés depuis les années 1950, en association avec de faibles doses de corticoïdes. Le plus fréquemment, il s'agit du cyclophosphamide (Endoxan®) administré par voie orale à la dose de 2 mg/kg/jour pendant 8 à 12 semaines (Bargman 1999). L'effet de ce traitement dépend de différents paramètres, tels que la dose cumulative, le niveau de corticodépendance et l'âge du patient au début de la maladie. Il permet d'induire un maintien en rémission chez 25 à 60% des patients corticodépendants (Kemper 2000, Latta 2001). Le risque principal à prendre en considération, en particulier chez les garçons pré-pubères, est sa toxicité gonadique. Le chlorambucil à une dose de 0,2 mg/kg/jour pendant 8 semaines peut également être utilisé, mais son utilisation reste limitée du fait du risque important d'attaques cardiaques associé (Latta 2001).

- Les inhibiteurs de la calcineurine sont également un traitement de choix chez les patients corticodépendants. La ciclosporine A (Neoral®, Sandimmun®) est fréquemment utilisée à la posologie initiale de 4 mg/kg/jour chez l'adulte ou 150 mg/m²/jour chez l'enfant, en association avec de faibles doses de corticoïdes (Cattran 2007, Eddy 2003, Meyrier 1991). Elle permet l'obtention d'une rémission chez 60 à 85% des patients (Eddy 2003, Korbet 1995, Niaudet 1994). Cependant, des rechutes surviennent dans la majorité des cas lors de la phase de diminution de la posologie ou après l'arrêt. Une prolongation du traitement peut alors être nécessaire, mais celle-ci expose à un risque important de néphrotoxicité. Le tacrolimus (FK506, Prograf®) peut également être utilisé (Loeffler 2004). Ses avantages principaux sont le risque diminué de néphrotoxicité, d'hypertension et d'hyperlipidémie, ainsi que des effets secondaires d'ordre esthétique réduits.

- Le lévamisole est un immunostimulant qui peut être utilisé chez les enfants corticodépendants à la dose de 2,5 mg/kg un jour sur deux pendant 2 mois, suivi d'une phase de diminution progressive de sa posologie. Ce traitement permet ainsi de diminuer les doses de corticoïdes et est efficace dans la moitié des cas environ (Bagga 1997, Davin 2005, Niaudet 1984). Il est généralement bien toléré, bien que de rares effets secondaires aient été observés, tels qu'une leucopénie, des éruptions cutanées ou une toxicité hépatique (Bagga 2000).

- Le mycophénolate mofétil (MMF, Cellcept®, Myfortic®) est envisagé depuis quelques années pour la prise en charge des patients corticodépendants. Chez l'adulte, la dose initiale est de 2 g/jour en association avec de faibles doses de corticoïdes (Choi 2002, Day 2002). Chez l'enfant, la dose de 1,2 g/m² permet un maintien en rémission malgré l'arrêt de la corticothérapie, une majorité de patients rechutant néanmoins après l'arrêt du traitement (Bagga 2003, Day 2002). Un nombre croissant d'études montre que le MMF pourrait être un traitement alternatif intéressant chez les patients corticodépendants, avec une bonne efficacité dans le développement de rémissions et des effets secondaires minimes (Fujinaga 2007, Hogg 2006).

- Le rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20, a été testé ces 3 dernières années chez des patients corticodépendants, et semble pouvoir induire une rémission avec des effets secondaires minimes (Francois 2007, Gilbert 2006, Guignon 2008, Hofstra 2007, Smith 2007, Yang 2008). La dose utilisée est en général de 375 mg/m² par semaine, sur 1 à 4 semaines. L'utilisation du rituximab pourrait être intéressante en particulier chez les patients présentant les effets secondaires liés au traitement prolongé par le cyclophosphamide ou la ciclosporine A. Cependant, les cas rapportés sont encore relativement rares et il faudra attendre les résultats d'une étude prospective randomisée à large échelle pour déterminer le réel bénéfice de ce traitement, les groupes de patients pouvant en bénéficier, et fixer la dose optimale à utiliser.

4. Traitement du syndrome néphrotique idiopathique corticorésistant

Malgré les progrès effectués ces dernières années dans la prise en charge du syndrome néphrotique idiopathique, la rémission durable n'est pas toujours obtenue, en particulier chez les patients présentant une HSF. Différentes voies thérapeutiques, proches de celles utilisées pour le traitement du SNI corticodépendant, sont alors possibles. La ciclosporine A à 4 mg/kg/jour en association avec de faibles doses de corticoïdes (Cattran 2007, Korbet 2002, Meyrier 2004) a montré des taux de rémission d'environ 70% à 26 semaines (Cattran 1999, Ponticelli 1993). Le tacrolimus a également été utilisé chez les patients résistants aux corticoïdes et à la ciclosporine A, et a permis d'obtenir des rémissions complètes ou partielles (Segarra 2002), mais aucun essai à large échelle n'a encore été réalisé pour ce traitement. Contrairement au SNI/LGM, les études récentes n'ont pas permis de retenir les agents alkylants (cyclophosphamide, chlorambucil) pour le traitement des HSF corticodépendantes ou corticorésistantes (Meyrier 2004). Des données encourageantes suggèrent également un effet bénéfique du MMF à la dose de 2 g/jour sur 6 mois, celle-ci devant être adaptée aux données pharmacocinétiques (Cattran 2004, Choi 2002). Ces résultats devront néanmoins être confirmés à plus large échelle avant d'envisager son utilisation systématique. Enfin, quelques publications récentes ont rapporté des cas de rémission chez des enfants corticorésistants traités au rituximab, mais il s'agit encore de cas isolés (Bagga 2007, Nakayama 2008, Peters 2008, Suri 2008).

5. Traitement de la récurrence

a) La thérapie médicamenteuse

En règle générale, il semble que la thérapie médicamenteuse seule soit relativement inefficace dans le traitement de la récurrence du SNI après transplantation. En effet, malgré quelques rares cas de rémission rapportés chez l'enfant après bolus de méthylprednisolone (Mauer 1979), les patients récidivants sont généralement résistants aux corticoïdes et au cyclophosphamide (Pinto 1981).

La ciclosporine A, tout comme le tacrolimus, ne semble pas améliorer le taux de rémission (Banfi 1990, McCauley 1993, Schwarz 1991, Tomlanovich 1988). Elle pourrait toutefois moduler la sévérité clinique de la récurrence, comme suggéré par l'évolution atténuée de la récurrence sur une seconde transplantation traitée par ciclosporine A en comparaison avec la récurrence sur un premier greffon n'en ayant pas reçu (Artero 1992). Certains cas de rémissions prolongées ont également été rapportés après traitement avec une posologie élevée de ciclosporine A pour obtenir des taux plasmatiques supérieurs à 250 ng/mL (Ingulli 1990), mais de telles doses peuvent poser des problèmes de néphrotoxicité.

Très récemment, quelques cas de rémission ont été rapportés après traitement de patients récidivants au rituximab (Gossmann 2007, Hristea 2007, Nozu 2005, Pescovitz 2006), mais ces résultats sont controversés et l'échec de ce traitement chez 6 autres patients a déjà été rapporté (Marks 2007, Yabu 2008).

b) Les traitements du plasma

LES ECHANGES PLASMATIQUES

Etant donné la rapidité de la récurrence de HSF après transplantation rénale, l'existence de facteur(s) plasmatique(s) capable(s) de porter atteinte au greffon est suggérée depuis longtemps et différents traitements visant à diluer ou à éliminer ce(s) facteur(s) du plasma ont été proposés. En 1988, Laufer fut ainsi le premier à rapporter une rémission du syndrome néphrotique chez 2 enfants traités par échanges plasmatiques après récurrence de la HSF (Laufer 1988). Ce traitement consiste en l'élimination d'environ 1,5 volume du plasma du patient remplacé de façon concomitante par une solution de substitution contenant 5% d'albumine. Depuis, de nombreuses expériences positives ont été rapportées (Artero 1994, Cochat 1993, Dantal 1991, Li 1993, Torretta 1995), avec des cas de diminution transitoire de la protéinurie ou même de rémissions prolongées. Les quelques études histologiques réalisées ont montré une diminution de la fusion des pédicelles podocytaires ou une restitution complète des lésions glomérulaires, parallèlement à l'évolution de la protéinurie (Artero 1992). Cependant, il n'existe pas d'étude contrôlée et les différents rapports sont souvent basés sur de petites séries de patients, dont certains se sont montrés réfractaires à ce traitement. Récemment, quelques études ont comparé l'évolution des patients traités par

échanges plasmatiques à celle rapportée par le passé des patients traités différemment (Deegens 2004, Valdivia 2005). Le taux de survie du greffon à 5 ans a ainsi été évalué à 85% pour les patients traités par échanges plasmatiques, contre 30% pour les autres. La plupart des patients n'entrent toutefois en rémission qu'après un traitement prolongé et des sessions répétées d'échanges plasmatiques, la médiane ayant été estimée à 58 sessions. De plus, la rémission est transitoire et la protéinurie remonte en moyenne 21 jours après l'arrêt des sessions d'échanges plasmatiques.

Aujourd'hui, la plupart des centres utilisent un traitement plus agressif combinant les échanges plasmatiques, de fortes doses de ciclosporine A, de cyclophosphamide et/ou de mycophénolate mofetil (Dall'Amico 1999, Nathanson 2005, Raafat 2004, Salomon 2003). Les taux de rémission ainsi obtenus sont aussi variables que ceux obtenus pour un traitement par échanges plasmatiques seuls, mais l'utilisation simultanée de ces substances semble néanmoins améliorer l'efficacité des échanges plasmatiques en prolongeant leurs effets sur la protéinurie (Cochat 1993, Cochat 1996).

Globalement, il semble que de tels protocoles soient à l'heure actuelle les plus appropriés dans le traitement de la récurrence de HSF après transplantation. Les réponses obtenues sont néanmoins très variables selon les patients, ce traitement s'avère parfois totalement inefficace, et il est encore impossible de prédire quels patients y répondront favorablement.

L'IMMUNOADSORPTION DU PLASMA

Devant l'efficacité des échanges plasmatiques et les anomalies de répartition des immunoglobulines rapportées dans le SNI (*détaillées en II.5.b.*), un traitement précoce de la récurrence de HSF par immunoadsorption du plasma sur colonne de protéine A a été proposé (Belson 2001, Dantal 1994). Celui-ci permet l'élimination sélective des immunoglobulines G de sous-classes 1, 2 et 4, et dans une moindre mesure des IgG3, des IgM et des IgA (Langone 1982). Les premiers résultats obtenus se sont montrés très encourageants puisque sur 10 patients traités, un seul a récidivé immédiatement, 8 ont montré une rémission partielle avec une chute de plus de 80% de leur protéinurie et un est resté en rémission complète. Malheureusement, cet effet s'est révélé seulement transitoire puisque les niveaux de

protéinurie des patients sont tous revenus aux valeurs initiales après 28 jours. De plus, la spécificité d'action des immunoadsorptions sur protéine A a été remise en cause car ce traitement semble réduire également la protéinurie liée à certains syndromes néphrotiques secondaires (Esnault 1999).

Afin de vérifier si l'effet bénéfique des immunoadsorptions sur protéine A était réellement lié à la déplétion du plasma en immunoglobulines, un protocole d'immunoadsorption du plasma sur colonnes d'affinité anti-Ig humaines (Therasorb) a été testé (Dantal 1998). Ces essais ont montré un effet bénéfique similaire à celui obtenu avec la protéine A, ce qui renforce fortement l'hypothèse d'une implication des immunoglobulines dans cette pathologie.

IV. Etiologie du syndrome néphrotique idiopathique

L'origine du syndrome néphrotique idiopathique et ses mécanismes physiopathologiques ont fait l'objet de nombreuses recherches. Toute la difficulté de ces études repose sur le fait que sous ce terme de « syndrome » sont regroupées des pathologies différentes conduisant à des symptômes et des lésions glomérulaires identiques. C'est pourquoi les patients présentant initialement un SNI n'auront pas les mêmes évolutions cliniques et répondront plus ou moins bien aux traitements ou à la transplantation rénale. L'implication du système immunitaire et de facteur(s) circulant(s) semble aujourd'hui indéniable, en particulier dans les formes récidivant après transplantation. Parallèlement à cela, les progrès considérables réalisés ces dernières années concernant l'architecture moléculaire des podocytes et du diaphragme de fente ont permis de commencer à discerner différentes formes génétiques du syndrome néphrotique. Au cours de ce chapitre, je détaillerai les différents acteurs pouvant être impliqués dans l'apparition et le développement d'un SNI.

1. Anomalies génétiques à l'origine d'un SNI

Bien que les syndromes néphrotiques idiopathiques ne soient habituellement pas considérés comme des maladies héréditaires, différentes formes génétiques et familiales ont été décrites au cours des années. Ces formes sont généralement corticorésistantes et plus rarement corticosensibles (Fuchshuber 2001). Les anomalies génétiques rapportées jusqu'à présent affectent toujours des gènes codant pour des protéines essentielles à l'assemblage et au maintien des structures podocytaires (*détaillées en 1.3.e.*), tant au niveau du diaphragme de fente que du cytosquelette d'actine ou des complexes d'adhésion à la MBG (**Tableau 3**).

a) Mutations impliquant des protéines de structure

LA NEPHRINE

La forme familiale la plus sévère est due à une mutation du gène *NPHS1* codant pour la néphrine, qui conduit au syndrome néphrotique congénital de type finlandais (CNF) (Beltcheva 2001, Kestila 1998). Comme son nom l'indique, le CNF est particulièrement répandu en Finlande avec une incidence de 1 sur 8200 naissances (Huttunen 1976), mais il est également retrouvé dans d'autres pays. Il se caractérise par une protéinurie massive d'apparition très précoce, parfois même *in utero*, et une progression rapide vers l'insuffisance rénale. La mutation de *NPHS1* conduit à la production d'une néphrine non-fonctionnelle et donc à l'absence ou au dysfonctionnement du diaphragme de fente. Les études en microscopie électronique montrent ainsi l'effacement des pédicelles podocytaires, le rétrécissement des fentes de filtration et l'absence de diaphragme de fente (Wartiovaara 2004). Environ 70 mutations de *NPHS1* ont été décrites (Beltcheva 2001, Koziell 2002, Lenkkeri 1999), dont 2 comptent pour 94% des mutations totales dans la population finlandaise (Fin_{major} et Fin_{minor}).

Le CNF est insensible à la corticothérapie ou au cyclophosphamide et le seul traitement possible reste la transplantation rénale (Holmberg 1995). Celle-ci est généralement curative, mais le risque de récurrence existe néanmoins. Au moins la moitié des patients greffés développent des anticorps dirigés contre la forme normale de la néphrine introduite par le greffon, qui sont à l'origine de la récurrence (Patrakka 2002).

LA PODOCINE

La mutation du gène *NPHS2* codant pour la podocine est à l'origine d'un syndrome néphrotique corticorésistant familial, caractérisé par l'apparition d'une protéinurie pendant la petite enfance, une résistance aux traitements immunosuppresseurs et une progression rapide vers des lésions de LGM puis de HSF (Boute 2000). Des mutations de *NPHS2* peuvent également être à l'origine de syndromes néphrotiques sporadiques, congénitaux et de formes familiales de HSF d'apparition tardive (Caridi 2003, Karle 2002, Tsukaguchi 2002, Weber 2004). Plus de 30 mutations du gène *NPHS2* ont été rapportées dont une est particulièrement fréquente (R138Q) et est souvent retrouvée dans le nord de l'Europe. Il

semble que ces différentes mutations conduisent à l'absence de podocine et par conséquent à un mauvais adressage de la néphrine dans les fentes de filtration ou à une signalisation du diaphragme de fente compromise (Nishibori 2004).

Toutes les formes de néphropathies causées par une mutation de *NPHS2* sont résistantes à la corticothérapie (Caridi 2003, Frishberg 2002, Ruf 2004). De plus, environ 8% des patients présentant une mutation de la podocine développent une récurrence de leur syndrome néphrotique après transplantation, par des mécanismes encore inconnus (Ruf 2004).

LA CD2AP

Le fait que des mutations de la CD2AP puissent être impliquées dans le développement d'un syndrome néphrotique a essentiellement été montré par des expériences chez la souris. Les souris KO pour le gène de la CD2AP montrent une fonction immunitaire compromise, mais elles développent également une protéinurie 2 semaines après la naissance et meurent finalement d'insuffisance rénale à 6-7 semaines (Shih 1999). Au niveau rénal, les lésions sont similaires à une HSF. Chez l'homme, 2 patients présentant une HSF primitive ont montré une mutation d'un allèle du gène de la CD2AP qui semble empêcher son expression (Kim 2003). Le gène de la CD2AP est donc pour le moment considéré comme un gène de susceptibilité pour le développement d'un syndrome néphrotique, et des études familiales montrant réellement un lien entre des mutations de la CD2AP et une atteinte rénale devront être réalisées afin d'établir son rôle pathogénique.

L'ACTININE 4

La HSF de type 1 (FSGS1) est due à la mutation du gène *ACTN4* codant pour l' α -actinine 4 (Kaplan 2000), qui provoque une augmentation de son affinité pour l'actine F. Ceci semble conduire à un assemblage anormal des filaments d'actine dans les podocytes (Yao 2004). Les souris exprimant dans leurs podocytes une α -actinine 4 de cette haute affinité développent un phénotype glomérulaire semblable à la HSF. De plus, les souris KO pour le

gène *ACTN4* présentent une architecture podocytaire anormale et évoluent vers l'insuffisance rénale terminale (Kos 2003, Michaud 2003).

TRPC6 (TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL CATION CHANNEL 6)

Des mutations du gène *TRPC6* ont été récemment identifiées dans une forme familiale autosomique dominante de HSF (FSGS2) (Reiser 2005, Winn 2005). La protéine TRPC6 est un canal cationique non-sélectif qui est impliqué dans l'augmentation des concentrations intracellulaires en calcium en réponse à l'activation de récepteurs couplés aux protéines G ou aux récepteurs tyrosine kinases (Schlondorff 2006). Dans le podocyte, elle est associée au diaphragme de fente au niveau duquel elle pourrait participer à la signalisation. Une protéine TRPC6 mutante pourrait ainsi être à l'origine d'une entrée de calcium d'amplitude anormale conduisant à la pathogenèse de la HSF.

LA LAMININE B2

La mutation du gène codant pour la laminine $\beta 2$ est à l'origine d'une forme rare et létale du syndrome néphrotique, le syndrome de Pierson (Zenker 2004a). Celui-ci se manifeste par la présence d'une sclérose mésangiale diffuse et d'anomalies oculaires typiques caractérisées par une microcorie (rétrécissement figé de la pupille) (Pierson 1963, Zenker 2004b). Les patients atteints du syndrome de Pierson présentent une protéinurie massive à la naissance qui progresse rapidement vers l'insuffisance rénale terminale et conduit au décès avant l'âge de 2 mois. Ce phénotype rénal semble dû à une défaillance de la MBG au niveau de laquelle se trouve la laminine $\beta 2$.

b) Mutations impliquant des facteurs de transcription ou des protéines de signalisation

WT1

Les mutations du gène *WT1* (*Wilms' Tumor*) sont à l'origine de deux pathologies : le syndrome de Denys-Drash et le syndrome de Frasier (Haber 1990, Klamt 1998). Ces deux syndromes associent un pseudohermaphrodisme mâle à une glomérulopathie progressive (Denys 1967, Drash 1970, Frasier 1964) et prédisposent au développement de néphroblastomes ou tumeurs de Wilm's (pour le syndrome de Denys-Drash) ou de gonadoblastomes (pour le syndrome de Frasier). Ces deux néphropathies sont corticorésistantes et évoluent à plus ou moins long terme vers l'insuffisance rénale terminale, la seule thérapie possible étant finalement la transplantation rénale. Le gène *WT1* code pour un facteur de transcription qui contrôle l'expression de nombreux gènes podocytaires clé. Ces néphropathies pourraient donc être dues à une mauvaise régulation de ces gènes (Guo 2002) bien que des expériences chez la souris suggèrent des effets systémiques des mutations de *WT1* (Patek 2003).

LMX1B

Des mutations du gène codant pour le facteur de transcription LMX1B sont à l'origine du syndrome Nail-Patella (McIntosh 1998, Vollrath 1998). Celui-ci se manifeste par des atteintes symétriques des ongles, du squelette (genoux, coudes et ailes iliaques en particulier), des yeux (glaucome, hypertension oculaire...) et des reins (Bongers 2002). Le degré d'atteinte rénale varie considérablement d'un patient à l'autre. Dans la majorité des cas, des lésions typiques de la membrane basale glomérulaire sont observées, consistant en un épaississement irrégulier et des dépôts de fibres de collagène. Au niveau rénal, LMX1B est exprimé par les podocytes dans lesquels il régule l'expression de protéines podocytaires clés, en particulier la néphrine, la podocine, la CD2AP et les chaînes de collagène $\alpha 3(IV)$ et $\alpha 4(IV)$ (Miner 2002, Rohr 2002). La néphropathie du syndrome Nail-Patella est donc probablement due à une dérégulation de l'expression de ces gènes.

PLCE1 (PHOSPHOLIPASE C EPSILON 1)

Sept familles ont été identifiées récemment avec un syndrome néphrotique d'apparition précoce dû à la mutation du gène *PLCE1* (Hinkes 2006). Celui-ci code pour une isoforme de la phospholipase C, impliquée dans la signalisation intracellulaire. Les patients affectés développent une protéinurie entre l'âge de 2 mois et 9 ans, avec des lésions histologiques de HSF et une sclérose mésangiale diffuse. Contrairement aux autres syndromes néphrotiques d'origine génétique, certains patients répondent favorablement à la corticothérapie ou à la ciclosporine A.

SMARCAL1

Des mutations du gène *SMARCAL1* sont responsables du syndrome de Schimke qui se présente par une dysplasie spondylo-épiphysaire, un déficit immunitaire, des accidents vasculaires cérébraux et un syndrome néphrotique (Coleman 2000). Ce gène code pour une protéine de la famille SNF2 impliquée dans les remaniements de la chromatine qui surviennent au cours de la réplication de l'ADN et la régulation de l'expression de gènes. *SMARCAL1* pourrait donc être impliqué dans la régulation de l'expression de certaines protéines podocytaires clés et sa mutation dans le syndrome de Schimke induirait ainsi la dérégulation de ces gènes.

GENE ET LOCUS	PROTEINE	PATHOLOGIE	TRANSMISSION	ROLES DE LA PROTEINE
NPHS1 , 19q13.1	Néphrine	Syndrome néphrotique congénital de type finlandais (CNF ou NPHS1, OMIM n°256300)	AR	Protéine clé du diaphragme de fente, qui interagit avec la podocine et la CD2AP et initie la signalisation intracellulaire.
NPHS2 , 1q25-31	Podocine	Syndrome néphrotique corticorésistant précoce (SNRS ou NPHS2 , OMIM n°604766)	AR	Interagit avec la néphrine et la CD2AP et participe à la signalisation intracellulaire en recrutant la néphrine dans les radeaux lipidiques.
ACTN4 , 19q13	α-actinine 4	Syndrome néphrotique à lésions de HSF (FSGS1 , OMIM n°603278)	AD	Se lie au cytosquelette d'actine et permet son assemblage correct.
TRPC6 , 11q21-22	TRPC6	Syndrome néphrotique à lésions de HSF (FSGS2 , OMIM n°603965)	AD	Canal cationique du diaphragme de fente impliqué dans les variations de la concentration calcique intracellulaire (rôle dans la signalisation ?)
CD2AP , 6p12	CD2AP	Syndrome néphrotique à lésions de HSF (FSGS3 , OMIM n°607832)	?	Interagit avec la néphrine, la podocine et le cytosquelette d'actine au niveau du diaphragme de fente, et participe à la signalisation intracellulaire.
LAMB2 , 3p21	Laminine β2	Syndrome de Pierson (OMIM n°150325)	AR	Chaîne présente dans la laminine-11 (α5:β2:γ1) de la MBG.
WT1 , 11p13	WT1	Syndrome de Denys-Drash (OMIM n°194080) et Syndrome de Frasier (OMIM n°136680)	AD	Facteur de transcription qui contrôle l'expression de nombreux gènes podocytaires clés.
LMX1B , 9q34.1	LMX1B	Syndrome Nail-Patella (OMIM n°161200)	AD	Facteur de transcription qui régule l'expression de gènes podocytaires cruciaux (néphrine, podocine, CD2AP, collagène α3(IV) et α4(IV)...)
PLCE1 , 10q23	PLCE1	Syndrome néphrotique précoce (NPHS3 , OMIM n°610725)	AR	Enzyme qui participe à la signalisation intracellulaire dans les podocytes.
SMARCAL1 , 2q34-q36	SMARCAL1	Syndrome de Schimke (OMIM n°242900)	AR	Protéine de la famille SNF2 impliquée dans les remaniements de la chromatine lors de la réplication de l'ADN et de la régulation de l'expression de gènes.

Tableau 3 : Principaux gènes mutés à l'origine d'un syndrome néphrotique idiopathique chez l'homme. AR = Autosomale Récessive ; AD = Autosomale Dominante

2. Le(s) facteur(s) de perméabilité glomérulaire

Au delà des formes génétiques du syndrome néphrotique se situent les formes dont l'origine est encore inconnue, mais pour lesquelles l'intervention d'un facteur extra-rénal est fortement suggérée. En 1972, Hoyer fut le premier à poser l'hypothèse d'un facteur circulant qui viendrait porter atteinte à la barrière de filtration glomérulaire et serait ainsi à l'origine de la pathogenèse du SNI/HSF (Hoyer 1972). Cette hypothèse est aujourd'hui admise par de nombreux auteurs et se base en particulier sur le fait que le SNI/HSF puisse récidiver très rapidement après transplantation rénale. Au contraire, la transplantation de reins d'un donneur présentant un SNI chez un receveur atteint d'une autre pathologie rénale conduit à la disparition de la protéinurie, ce qui exclut à priori la possibilité d'une anomalie intra-rénale (Ali 1994, Rea 2001). À cela s'ajoute l'effet des différents traitements du plasma, capables d'induire une rémission de la protéinurie, probablement par leur capacité à éliminer ou à diluer le facteur de perméabilité de la circulation (*cf. partie III. sur les traitements du SNI*). Cet effet bénéfique reste cependant transitoire, ce qui tend à montrer une production du facteur en continu. De plus, certains cas rares de transmission de la protéinurie d'une mère atteinte de SNI/HSF à son fœtus ont été rapportés (Kemper 2001, Lagrue 1991). La protéinurie du nouveau-né retrouve un niveau normal quelques semaines après la naissance, ce qui conforte l'hypothèse d'un facteur présent dans la circulation maternelle capable dans ce cas de traverser la barrière placentaire.

Dans le SNI corticosensible, l'implication d'un facteur de perméabilité semble moins évidente, puisque par définition celui-ci ne requiert pas de transplantation et qu'il n'existe donc pas d'observation de récives. L'hypothèse d'un facteur circulant pathogénique est cependant suggérée par un grand nombre de résultats expérimentaux. Ceux-ci ont permis de distinguer de nombreux candidats différents de ceux décrits dans le SNI corticorésistant.

Que ce soit dans le SNI corticosensible ou dans le SNI corticorésistant, de nombreuses études se sont focalisées sur la recherche du ou des facteur(s) circulant(s) présent(s) chez les patients, dans leur plasma, leur urine ou leur surnageant de culture lymphocytaire, et à l'aide de différentes techniques *in vivo* et *in vitro* (**Tableau 4**). Cependant, ces travaux n'ont pu aboutir à la détermination formelle d'un facteur de perméabilité ou à un mécanisme

d'action concret. Ces difficultés montrent la grande complexité des mécanismes à l'origine du SNI et l'implication très probable de différents acteurs.

a) Facteurs impliqués dans le SNI corticosensible

Une grande variété de facteurs circulants potentiellement impliqués dans la pathogenèse du SNI corticosensible a été décrite au fil des différentes études. Cependant, la plupart n'ont été que partiellement caractérisés biochimiquement et certains ne sont pas complètement spécifiques du SNI.

Le VPF (*Vascular Permeability Factor*) est l'un des premiers facteurs à avoir été proposé dans le SNI/LGM (Lagrué 1975a, Lagrué 1975b). Celui-ci a été trouvé, grâce au test d'Ovary, dans le surnageant des lymphocytes T stimulés à la concanavaline A (con A) de patients SNI/LGM. Cette technique a pour but de visualiser les changements de perméabilité vasculaire au niveau cutané (et non glomérulaire), après injection intradermique à des cobayes du surnageant de cultures lymphocytaires (Pick 1969). Le VPF a été décrit comme une lymphokine produite par les lymphocytes T CD4+ (Heslan 1986, Tomizawa 1990). Sa production semble stimulée par l'IL-2, l'IL-12 et l'IL-15 et inhibée par l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13, ce qui suggère qu'il s'agirait plutôt d'une cytokine Th1 (Matsumoto 1997b, 1998, 1999a, b). Il a également été montré une inhibition de sa production par la ciclosporine A et les stéroïdes (Maruyama 1992, Matsumoto 1997a). Malheureusement, la spécificité du VPF pour le SNI/LGM est faible puisqu'il a également été décrit dans d'autres glomérulopathies (Bakker 1982a). De plus, sa capacité à influencer la perméabilité glomérulaire *in vivo* n'est pas convaincante.

L'étude des surnageants de culture d'hybridomes T ou de lymphocytes T stimulés à la Con A a également permis de mettre en évidence d'autres facteurs de perméabilité similaires au VPF. Bakker a ainsi rapporté un facteur nommé GPA (*Glomerular PolyAnion*) présent dans le surnageant des lymphocytes T activés des patients SNI/LGM, capable d'affecter les charges de la barrière de filtration glomérulaire sur des sections de rein *in vitro* (Bakker 1982b, Bakker 1986).

Un autre facteur nommé GPF (*Glomerular Permeability Factor*) a également été trouvé dans le surnageant de PBMC stimulés à la con A, et a été montré comme capable d'induire une protéinurie chez le rat (Boulton Jones 1983, Maruyama 1989, Tanaka 1992, Yoshizawa 1989). De la même façon, l'injection au rat du surnageant de culture d'hybridomes T dérivés des cellules de patients SNI/LGM a permis d'induire une protéinurie et une diminution du nombre de sites anioniques glomérulaires (Koyama 1991), mais cette expérience n'a jamais été reproduite.

Ces facteurs n'ont cependant jamais été caractérisés.

L'étude du sérum et de l'urine des patients SNI/LGM a quant à elle permis de mettre en évidence un suppresseur soluble de la prolifération cellulaire, nommé SIRS (*Soluble Immune Response Suppressor*), qui a été détecté grâce à sa capacité à inhiber la formation des plages cellulaires de lymphocytes T stimulés (Cheng 1989, Schnaper 1985). Celui-ci a cependant été retrouvé également dans d'autres formes de syndromes néphrotiques. Le facteur régulateur du SIRS, capable de stimuler sa sécrétion par les lymphocytes T CD8+, a pu être retrouvé dans le surnageant des lymphocytes T CD4+ des patients SNI/LGM (Schnaper 1990). La détection d'un tel facteur, capable d'inhiber les fonctions T, et de son propre régulateur, montre clairement l'implication de l'immunité dans le SNI. Cependant, aucune relation directe entre ce facteur et des modifications de la perméabilité glomérulaire n'a pu être établie.

Toujours en étudiant le plasma et l'urine de patients SNI/LGM, Levin a mis en évidence, grâce à la méthode de Whiteman, une molécule hautement cationique qui serait capable de neutraliser les charges négatives de la MBG et d'ainsi provoquer une fuite de protéines plasmatiques (Levin 1989). Cependant, les autres équipes n'ont pas toujours pu reproduire ces résultats (Murugasu 1990), et certaines ont finalement montré qu'ils seraient dus à un effet non-spécifique inhérent au syndrome néphrotique (Klinger 1997, Ramjee 1996).

L'un des facteurs les mieux caractérisés et les plus étudiés dans le SNI/LGM est l'hémopexine. Initialement décrite par Bakker comme un facteur de perméabilité inconnu

capable de diminuer le nombre de sites anioniques de la MBG dans des expériences sur des reins de rats perfusés *ex vivo* (Bakker 1988), elle a dans un premier temps été nommée 100KF avant d'être identifiée comme l'hémopexine (Cheung 1999, Cheung 2000). Cette molécule est produite par les cellules mésangiales stimulées par le TNF- α (Kapojs 2003) et elle possède une activité protéase capable de diminuer le nombre d'ectoapyrases et de sialoglycoprotéines glomérulaires (Bakker 2005a). Son activité protéasique est augmentée chez les patients SNI/LGM au cours des poussées, mais elle est diminuée lors des rémissions du SNI/LGM, chez les patients SNI/HSF et chez les patients présentant une autre glomérulopathie primitive (Bakker 2005b). Les patients SNI/LGM pourraient donc posséder une isoforme anormalement active de l'hémopexine capable d'altérer la MBG. Une étude très récente sur des podocytes et des cellules endothéliales glomérulaires *in vitro* a montré que l'hémopexine active peut induire un remodelage important de l'actine dans les podocytes selon un mécanisme dépendant de la néphrine, et qu'elle peut également affecter la perméabilité de la barrière de filtration glomérulaire en dégradant le glycocalyx endothélial (Lennon 2008).

Le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) a également été proposé comme facteur de perméabilité potentiel dans le SNI corticosensible (Webb 1999). Plusieurs travaux suggèrent en effet qu'il pourrait agir au niveau des fenestrations de l'endothélium glomérulaire puisque celles de l'endothélium continu sont induites par ce facteur (Roberts 1995, 1997). *In vivo*, le VEGF peut être produit par les podocytes, et ses récepteurs sont présents au niveau des cellules mésangiales et de l'endothélium glomérulaire (Thomas 2000). *In vitro*, il est capable d'altérer la perméabilité de monocouches endothéliales (Chang 2000, Esser 1998, Hippenstiel 1998). Cependant, bien qu'une augmentation de l'ARNm de VEGF ait pu être mise en évidence par hybridation *in situ* sur les biopsies de patients SNI/LGM (Bailey 1999), l'analyse du plasma et des urines des patients SNI/LGM en rémission ou en poussée n'a pas permis de révéler de différence (Webb 1999). De plus, l'injection de VEGF au rat pour tenter d'induire une protéinurie a été un échec, remettant en cause le rôle de ce facteur dans la pathogenèse du SNI corticosensible.

Enfin, certains auteurs se sont intéressés à l'héparanase, une enzyme synthétisée par les cellules immunitaires et capable de digérer les héparanes sulfates. Cette enzyme est un candidat séduisant dans la pathogenèse du SNI, puisqu'elle pourrait dégrader les sites anioniques héparanes sulfates au niveau des capillaires glomérulaires, qui sont essentiels à la perméabilité de charge de la barrière de filtration glomérulaire (Sewell 1989). En 2005, une étude a montré une expression dérégulée de l'héparanase chez des enfants SNI/LGM en poussée comparée aux mêmes enfants en rémission et à des sujets sains (Holt 2005). Cependant, une étude récente a remis en cause l'hypothèse même d'une atteinte des héparanes sulfates de la MBG dans le SNI/LGM, en montrant que ceux-ci ne sont pas significativement modifiés chez les patients SNI/LGM protéinuriques (Wijnhoven 2007).

b) Facteurs impliqués dans le SNI corticorésistant

En 1984, Zimmerman fut le premier à transférer à un rat l'activité protéinurique du sérum d'un patient atteint d'une récurrence de SNI/HSF, par simple injection intra-aortique (Zimmerman 1984). Cette première expérience a permis d'étayer l'hypothèse d'un facteur de perméabilité circulant capable de reproduire l'atteinte glomérulaire une fois injecté dans un environnement sain. Le facteur transféré dans cette expérience semble très spécifique de la récurrence du SNI/HSF puisque l'injection du sérum de patients n'ayant pas développé de récurrence après transplantation ou de patients atteints d'une autre forme de syndrome néphrotique n'a pas permis d'induire de protéinurie ou d'albuminurie chez le rat.

Comme je l'ai décrit précédemment, les immunoabsorptions du plasma sur colonnes de protéine A ou Ig-Therasorb ont un effet bénéfique transitoire sur la protéinurie. Dantal *et al.* se sont donc intéressés au matériel retenu sur ces colonnes et ont ainsi montré que l'injection au rat des éluats de colonnes induisait une augmentation de la protéinurie (Dantal 1994). Le facteur actif a été estimé à un poids moléculaire inférieur à 100 kD, ce qui suggère que celui-ci n'est pas une immunoglobuline entière, bien qu'il soit retenu sur des supports destinés principalement à l'adsorption des Ig (Dantal 1998). Des expériences de précipitation au sulfate d'ammonium ont montré que ce facteur se situait dans la fraction de 70% de sulfate d'ammonium. L'analyse de cette fraction par SDS-PAGE a permis de distinguer à 43

kD une bande spécifique des patients récidivants correspondant à l'orosomucoïde, une molécule connue pour son rôle dans le maintien de la perméabilité glomérulaire. Malheureusement, l'injection au rat de cette protéine, purifiée à partir des patients SNI récidivant ou non, n'a pas permis d'induire une protéinurie (Le Berre 2000).

La seconde approche utilisée pour la recherche de facteurs de perméabilité a été développée par l'équipe de Savin (Savin 1992). Il s'agit d'un test d'activité *in vitro* basé sur l'utilisation de glomérules de rat isolés maintenus dans un milieu hypotonique. Lorsque la barrière de filtration glomérulaire est intacte, elle est imperméable aux protéines et le glomérule soumis au choc hypooncotique gonfle par transfert d'eau. Au contraire, lorsque la barrière de filtration est lésée (en présence d'un facteur de perméabilité par exemple), la fuite d'albumine devient possible, le transfert d'eau ne se fait plus et le volume du glomérule reste inchangé. Après incubation des glomérules avec des sérums de patients, la variation éventuelle du volume glomérulaire est estimée grâce à un système vidéo d'analyse d'image et est exprimée en tant que variable de perméabilité à l'albumine, Palb.

Grâce à ce système, Savin *et al.* ont pu confirmer l'existence d'une activité protéinurique dans le sérum des patients SNI/HSF, et ce même avant la transplantation. Les patients dont le sérum pré-transplantation induisait une Palb supérieure ou égale à 0,5 ont ainsi montré un risque accru de récurrence après transplantation (Savin 1996). Après précipitation des protéines plasmatiques au sulfate d'ammonium, le facteur a été trouvé ici encore dans la fraction de 70%, et sa masse moléculaire a été estimée entre 30 et 50 kD (Sharma 1999), bien qu'elle ait été estimée à 100-120 kD dans des études précédentes (Savin 1992). L'injection au rat de la fraction contenant ce facteur a pu induire une augmentation significative de la protéinurie (Sharma 2002). Plus récemment, cette technique a conduit à l'identification de CLC1 (*Cardiotrophin Like Cytokine 1*), une protéine de la famille de l'IL-6 trouvée dans le plasma d'un patient présentant une récurrence de SNI/HSF (Savin *et al.*, ASN Renal Week 2008). Cette protéine a été proposée comme facteur de perméabilité, puisqu'elle est capable d'induire une augmentation de la perméabilité à l'albumine des glomérules de rats isolés et que son injection au rat provoque une protéinurie. De façon intéressante, les trois récepteurs de CLC1 connus (gp130, CNTFR et LIFR) sont exprimés à la surface des podocytes. De plus, l'ARNm de CLC1 a été montré

surexprimé dans les PBMCs de 15 patients présentant une récurrence de SNI/HSF, en comparaison avec des patients transplantés pour une autre pathologie rénale. Ces résultats préliminaires doivent cependant encore être confirmés sur un nombre plus important de patients, et le mécanisme d'action potentiel de cette protéine doit encore être déterminé.

Le test sur glomérules isolés a été repris par Godfrin en 1996, mais en remplaçant le système vidéo par un compteur de particules permettant d'analyser les variations de volume (GVV : *Glomerular Volume Variation*) sur un nombre beaucoup plus important de glomérules (Godfrin 1996). Ce système a permis de montrer une augmentation de la GVV suite à l'incubation des glomérules avec les sérums de patients SNI/HSF prélevés avant transplantation, contrairement aux glomérules incubés avec les sérums de patients néphrotiques contrôles. Contrairement aux résultats de Savin, ce test n'a pas permis de prédire la récurrence, bien que la GVV soit diminuée après incubation des glomérules avec les sérums prélevés après transplantation chez les patients ne récidivant pas par rapport aux patients récidivants (Godfrin 1997).

Le test d'activité sur glomérules isolés développé par Savin a permis de décrire, selon les études, une grande variété de molécules capables d'augmenter la perméabilité à l'albumine *in vitro* : la protamine (Savin 1992), les superoxydes (Dileepan 1993), le complément (Li 1994, Savin 1994), le monoxyde d'azote (Li 2001a), le TNF- α (McCarthy 1998), le TGF- β (Sharma 2000a), les anticorps anti-intégrine β 1 (Adler 1996) ou les eicosanoïdes (Sharma 2000a).

Plus récemment, Musante a isolé à partir du sérum de patients SNI/HSF six protéines capables d'induire une augmentation de Palb : la fibuline, la clusterine, la vitronectine, des isoformes de l'albumine, la chaîne gamma du fibrinogène et une sérine protéase (Musante 2002). Cependant, l'implication réelle de ces différentes molécules dans la pathogenèse du SNI/HSF n'a jamais été clairement démontrée.

c) Facteur ou contre-facteur ?

Devant la grande diversité des facteurs de perméabilité candidats rapportés, il est aujourd'hui difficile d'établir une conclusion globale quant à la pathogenèse du SNI. Une hypothèse alternative intéressante propose l'existence de facteurs non pas « toxiques » mais protecteurs, normalement requis pour la survie du podocyte, et qui seraient absents chez les malades. La première étude à avoir évoqué cette possibilité a montré, grâce à des tests sur glomérules isolés, que le plasma de sujets sains était capable de prévenir l'induction d'une perméabilité glomérulaire par le plasma de patients SNI/HSF récidivants (Sharma 2000b). De façon intéressante, le sérum de patients néphrotiques présentant une mutation de la podocine a été montré capable d'induire une augmentation de Palb sur des glomérules isolés, avant et après récurrence du syndrome néphrotique (Carraro 2002), l'addition de l'urine de ces mêmes patients permettant de prévenir cet effet (Carraro 2003). En revanche, l'urine de sujets sains n'a pas permis d'inhiber l'augmentation de Palb, ce qui suggère qu'un contre-facteur de perméabilité normalement présent dans la circulation serait perdu dans les urines des patients NPHS2. Ces résultats doivent cependant être considérés avec précaution puisque la perte du facteur protecteur pourrait seulement être une conséquence des lésions de la barrière de filtration. Plus récemment, une étude de l'équipe de Saleem sur une lignée de podocytes humains immortalisés a permis de montrer que du plasma normal pouvait inverser la délocalisation de protéines du diaphragme de fente et l'altération des flux de calcium dans les podocytes qui sont induits par l'incubation avec le plasma de patients SNI/HSF (Coward 2005).

L'hypothèse d'un facteur protecteur pourrait expliquer les difficultés à transférer une protéinurie à l'animal ou à obtenir des résultats reproductibles *in vitro*. Cependant, certaines observations cliniques, en particulier l'effet bénéfique des traitements du plasma sur la protéinurie, semblent plutôt en faveur de l'existence d'un facteur de perméabilité en excès (Herve 2006a). Au vu des différents résultats obtenus, l'existence d'une balance facteur de perméabilité / facteur protecteur dérégulée dans le SNI semble probable.

	FACTEUR CANDIDAT	AUTEUR	ECHANTILLONS ETUDIES	METHODE	ACTIVITE BIOLOGIQUE
CORTICOSENSIBLE	VPF (Vascular Permeability Factor)	<i>Lagrue 1975</i>	Surnageant de lymphocytes T SNI/LGM stimulés à la con A	Test d'Ovary	Agit sur la perméabilité vasculaire
	GPA (Glomerular PolyAnion)	<i>Bakker 1982, 1986</i>	Surnageant de lymphocytes T SNI/LGM stimulés à la con A	Incubation sur des coupes de reins	Affecte les charges de la barrière de filtration
	GPF (Glomerular Permeability Factor)	<i>Yoshizawa 1989</i> <i>Koyama 1991</i>	Surnageant de PBMC stimulés à la con A et d'hybridomes T SNI/LGM	Injection en IV au rat	Induit une protéinurie Diminue le nombre de sites anioniques glomérulaires
	SIRS (Soluble Immune Response Suppressor)	<i>Schnaper 1985</i> <i>Cheng 1989</i>	Sérums SNI/LGM	Inhibition de la formation des plages cellulaires	Régule la prolifération des lymphocytes T
	Molécule hautement cationique	<i>Levin 1989</i>	Plasmas et urines SNI/LGM	Méthode de Whiteman	Neutralise les charges négatives de la MBG
	100KF ou Hémapexine	<i>Bakker 1988, 2005</i> <i>Cheung 1999</i> <i>Lennon 2008</i>	Plasmas et PBMC SNI/LGM	Test d'Ovary, infusions intra-artérielles Incubation sur des lignées de podocytes et de cellules endothéliales	Dégrade le glycocalyx endothélial Remodèle l'actine des podocytes
	VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	<i>Bailey 1999</i> <i>Webb 1999</i>	Biopsies rénales, plasmas et urines SNI/LGM	Analyse de l'ARNm, injection au rat	Agit sur les fenestrations endothéliales ?
	Héparanase	<i>Holt 2005</i>	PBMC, plasmas et urines SNI/LGM	Tests d'activité, analyse de l'ARNm	Dégrade les héparanes sulfates des capillaires glomérulaires ?
CORTICORESISTANT	Non-caractérisé	<i>Zimmerman 1984</i>	Sérums de récives HSF	Infusion aortique chez le rat	Induit protéinurie et albuminurie
	HSF (Human Focal Sclerosis Factor)	<i>Savin 1992, 1996</i>	Plasmas SNI/HSF	Test de perméabilité sur glomérules isolés <i>in vitro</i>	Augmente la perméabilité à l'albumine
	Protéine non-Ig	<i>Dantal 1994</i>	Eluats de colonnes de protéine A issus de plasmas de récives de HSF	Injection au rat en IV	Induit une albuminurie

Tableau 4 : Résumé des principaux facteurs de perméabilité candidats rapportés dans le SNI corticosensible et corticorésistant.

3. Mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des lésions podocytaires

La mise au point récente des lignées de podocytes humains et murins immortalisés (Mundel 1997a, Saleem 2002) a permis d'envisager de nouvelles stratégies d'étude du ou des facteur(s) de perméabilité, et en particulier des mécanismes moléculaires induits par ce(s) facteur(s) dans les podocytes au cours du SNI. Les études effectuées montrent que l'atteinte podocytaire peut survenir selon quatre axes majeurs, correspondant aux différents « domaines » des podocytes : au niveau du diaphragme de fente, à l'interface podocytes – MBG, au niveau du domaine apical et au niveau du cytosquelette d'actine (**Figure 11**). Il est cependant possible que ces différents axes se connectent pour prendre part à un mécanisme plus global, qui reste encore à préciser.

a) À l'interface podocytes - MBG

En 2004, Kojima a montré dans deux modèles distincts d'effacement des pédicelles une réduction de l'intensité des α -dystroglycanes normalement localisés au niveau basal des pédicelles, associée à leur endocytose et à leur redistribution dans des granules cytoplasmiques (Kojima 2004). Ceci a pour conséquence un réarrangement irrégulier des fibres de la lamina rara externa.

L'importance des hétérodimères d'intégrine $\alpha 3$, $\beta 1$ a également été montrée dans le développement des lésions podocytaires, en particulier dans le modèle de protéinurie induite par l'aminonucléoside de puromycine (PAN). Cette substance est connue pour sa capacité à induire chez le rat des lésions podocytaires similaires à la LGM et donc une protéinurie.

Reiser a ainsi montré *in vivo* et *in vitro* dans le modèle PAN une augmentation de la capacité de migration des podocytes qui semble être à l'origine de leur détachement, de façon dépendante de l'intégrine $\alpha 3$ (Reiser 2004a). Ce phénomène passerait par une augmentation d'une protéase lysosomale, la cathepsine L, qui est redistribuée dans les pédicelles dans ce modèle.

Il semble également que le développement des lésions podocytaires puisse être médié par un mécanisme impliquant ILK (*Integrin Linked Kinase*), la sérine thréonine kinase associée au domaine cytoplasmique de l'intégrine $\beta 1$. Celle-ci est en effet activée dans différentes conditions protéinuriques (Kretzler 2001). L'incubation des podocytes en culture avec le PAN provoque une augmentation de l'ILK. Ceci conduit à la translocation nucléaire de la β -caténine et à l'accumulation du facteur de transcription LEF1. De plus, la diminution de l'adhésion des podocytes à leur matrice induite par le PAN est abrogée lorsque les cellules sont incubées en parallèle avec un inhibiteur d'ILK (Teixeira Vde 2005). Une étude récente a également montré sur la lignée de podocytes murins que le plasma de patients SNI/HSF récidivant, contrairement au plasma de patients non-récidivant, pouvait induire un détachement des podocytes de leur matrice de laminine via une augmentation de l'activité de l'ILK (Hattori 2008).

b) Au niveau du domaine apical

Le glycocalyx qui recouvre la partie apicale des podocytes pourrait également être la cible d'une agression extérieure conduisant à la désorganisation des podocytes dans le SNI. La podocalyxine, une sialoglycoprotéine localisée dans ce domaine apical, a été tout particulièrement étudiée. Cette protéine appartient à un complexe multimérique connecté au cytosquelette d'actine. Elle interagit au niveau de son domaine cytoplasmique avec la protéine NHERF2 (*Na⁺/H⁺ exchange regulatory factor 2*), ce qui permet un recrutement de la GTPase RhoA au niveau du domaine apical et finalement l'interaction du complexe podocalyxine/NHERF2 avec les fibres d'actine via l'eitrine (Schmieder 2004). Il a été montré qu'une atteinte de la podocalyxine peut provoquer sa dissociation du cytosquelette d'actine, conduisant finalement à l'effacement des pédicelles (Takeda 2001). L'hypothèse d'une atteinte de cette protéine au cours des lésions podocytaires est également évoquée par le fait que cette protéine ait été retrouvée dans les urines de patients présentant différentes formes de glomérulopathies (Hara 2005).

c) Au niveau du diaphragme de fente

La découverte de formes familiales du syndrome néphrotique dues à des mutations des protéines constitutives du diaphragme de fente a permis de montrer l'importance de ce complexe dans le maintien de la structure et de la fonction podocytaires. Il apparaît également que la signalisation intracellulaire initiée au niveau du diaphragme de fente par la néphrine et la CD2AP joue un rôle primordial dans le maintien de l'intégrité et du fonctionnement des fentes de filtration. Comme je l'ai détaillé précédemment, cette signalisation régule des programmes biologiques variés, en particulier la protection contre l'apoptose des podocytes. Il est donc probable qu'une altération des composants du diaphragme de fente et de leur signalisation intervienne dans le développement des lésions podocytaires au cours du SNI. Une telle atteinte pourrait en particulier compromettre le maintien de la survie cellulaire, résultant en une diminution progressive du nombre de podocytes et conduisant ainsi à la glomérulosclérose (Durvasula 2006). Globalement, malgré les nombreux progrès effectués dans ce domaine, la structure du diaphragme de fente et la signalisation induite à ce niveau sont encore relativement mal connues. Il est donc aujourd'hui difficile de faire émerger un mécanisme moléculaire précis du développement des lésions podocytaires dans les formes immunes du SNI, mais différentes pistes commencent à être distinguées.

En 2005, l'équipe de Saleem a montré que l'incubation de la lignée podocytaire humaine avec le plasma de patients SNI induit une délocalisation des molécules de néphrine, de podocine et de CD2AP au niveau cytoplasmique, alors que les cellules incubées avec des plasmas « non-néphrotiques » présentent une distribution membranaire normale de ces protéines (Coward 2005). Cette délocalisation est accompagnée d'une altération de la voie intracellulaire calcique médiée par la phosphorylation de tyrosines kinases. L'importance des mouvements calciques dans les podocytes est également mise en évidence dans la forme familiale du syndrome néphrotique due à une mutation du canal TRPC6, localisé au niveau du diaphragme de fente. Cette mutation « gain de fonction » conduit en effet à une augmentation de l'influx calcique dans les podocytes, qui semble être à l'origine du développement des lésions (Reiser 2005, Winn 2005). De façon intéressante, il a été montré récemment une augmentation de l'expression de la protéine TRPC6 dans les podocytes au

cours des formes non-génétiques de syndrome néphrotique (Moller 2007). L'étude de ce type de canaux et de leur fonctionnement dans les podocytes est toute récente, et permettra probablement de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le SNI.

En 2004, une étude de l'équipe de Mundel a permis de montrer le rôle potentiel de la protéine B7-1, normalement exprimée à la surface des lymphocytes B et des cellules présentatrices d'antigènes, dans la réponse des podocytes aux agressions (Reiser 2004b). Cette protéine est en effet activée au cours du syndrome néphrotique induit par le LPS. Les souris traitées au LPS montrent une désorganisation du cytosquelette d'actine podocytaire via la voie du TLR-4, mais également une réorganisation de la néphrine, de la CD2AP et de ZO-1 qui semble passer par une activation de B7-1. Le rôle exact de cette protéine dans le podocyte n'a cependant pas encore été déterminé.

Une étude récente a permis de distinguer l'activation d'une nouvelle voie de signalisation dans le SNI, jusqu'alors peu étudiée dans le rein mature, la voie Notch1 (Niranjan 2008). Cette étude montre une augmentation au niveau des podocytes de ICN1, le domaine intracellulaire de Notch1 exprimé au cours de l'activation de cette voie, dans la néphropathie diabétique et la HSF. De plus, la surexpression de ICN1 dans les podocytes *in vivo* provoque l'apparition d'une protéinurie associée à une glomérulosclérose. Il semble que l'apoptose des podocytes induite par le TGF- β soit médiée par la voie Notch1, via l'activation de p53. Enfin, l'inhibition pharmacologique de la voie Notch ou la délétion dans les podocytes de Rbpj, un partenaire de Notch1, permet de prévenir l'apparition de la protéinurie induite par le PAN. Ces résultats très intéressants pourraient permettre d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le SNI.

d) Au niveau du cytosquelette d'actine

Le cytosquelette d'actine podocytaire constitue la structure centrale à laquelle sont reliés les composants des différents domaines des podocytes. Les protéines qui y sont associées et qui régulent sa dynamique ont donc une fonction essentielle dans le maintien de l'architecture podocytaire, qui est indispensable au bon fonctionnement de la barrière de filtration (Faul 2007).

Des études récentes montrent qu'une atteinte de la synaptopodine, protéine associée au cytosquelette d'actine dans les podocytes, pourrait être un évènement clé du développement des lésions podocytaires. La synaptopodine joue un rôle essentiel de coordination de la formation des fibres d'actine par l' α -actinine 4 (Asanuma 2005). Une étude très intéressante de l'équipe de Mundel a récemment montré que l'action de la ciclosporine A dans le traitement du SNI ne semble pas être due qu'à l'inhibition de la fonction T, mais cible aussi plus spécifiquement le podocyte au niveau de la synaptopodine afin de stabiliser l'architecture du cytosquelette d'actine (Faul 2008). Ces auteurs ont montré que la ciclosporine A peut bloquer la déphosphorylation de la synaptopodine médiée par la calcineurine, ce qui permet de préserver son interaction avec la protéine 14-3-3 β . Le maintien de cette interaction est essentiel, puisqu'il permet de protéger la synaptopodine de la dégradation médiée par la cathepsine L.

Ce travail permet de faire le lien avec d'autres mécanismes moléculaires rapportés au niveau du diaphragme de fente dans le développement des lésions podocytaires. Il est possible par exemple que, comme dans le cœur où la calcineurine est activée par TRPC6 (Kuwahara 2006), une augmentation de l'influx calcique soit induite dans les podocytes suite à une atteinte de TRPC6, ce qui pourrait initier l'activation de la calcineurine et conduire finalement à la dégradation de la synaptopodine. Ceci aurait pour conséquence dramatique une déstructuration de l'architecture podocytaire conduisant au développement des lésions de HSF. Il faut noter que la surexpression de TRPC6 dans les podocytes provoque la disparition des fibres de stress d'actine (Faul 2007), ce qui copie parfaitement les lésions observées lorsque la synaptopodine est dégradée (Asanuma 2006).

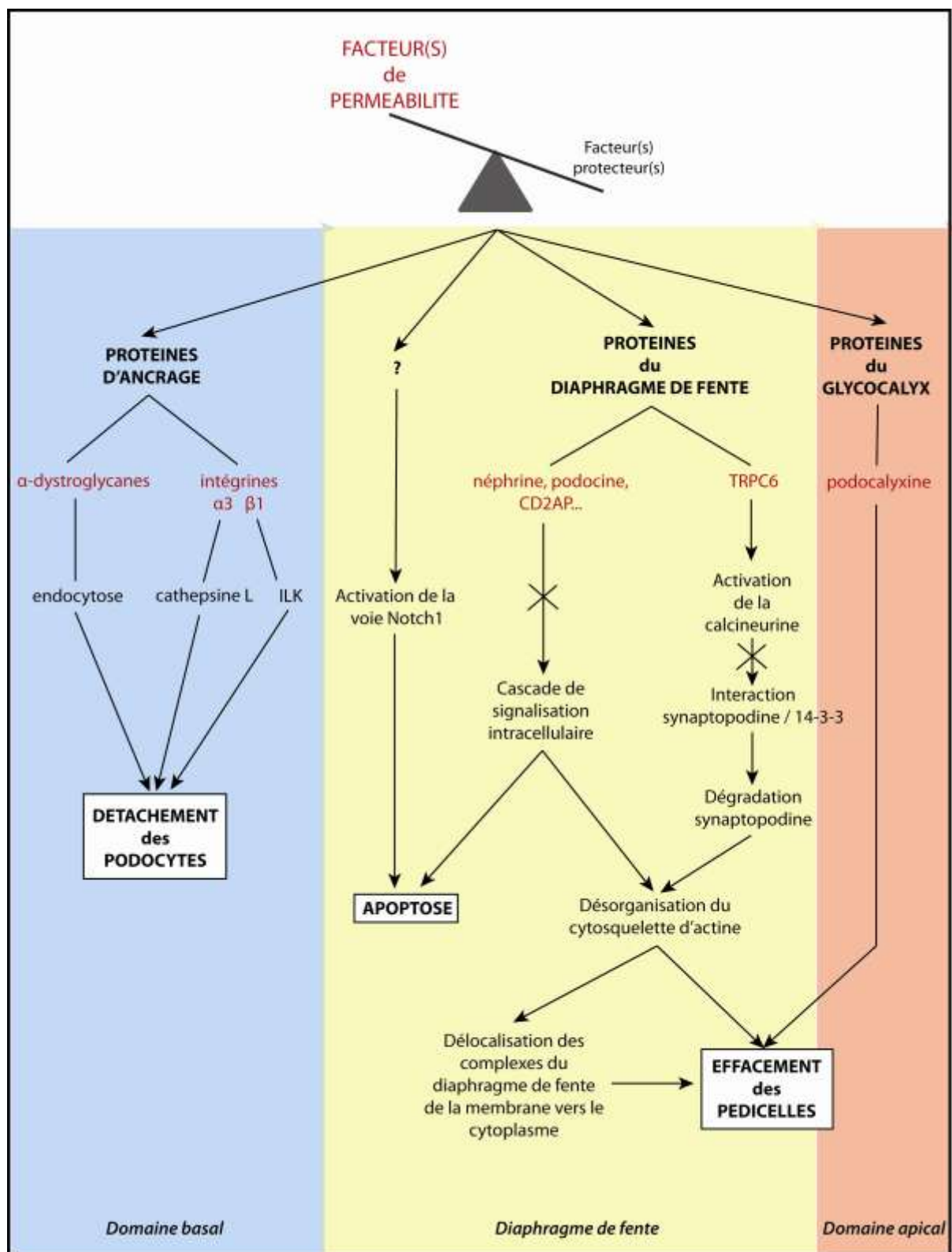


Figure 11 : Représentation schématique des mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans le développement des lésions podocytaires au cours du SNI.

OBJECTIFS DE LA THESE

Les mécanismes physiopathologiques du Syndrome Néphrotique Idiopathique corticorésistant, et en particulier de sa récurrence après transplantation rénale, restent encore incompris. De nombreuses études se sont concentrées sur la recherche d'un facteur de perméabilité capable d'altérer l'intégrité morphologique et fonctionnelle de la barrière de filtration glomérulaire. La cible de ce facteur semble être le podocyte, cellule essentielle pour la filtration glomérulaire normale. Récemment, les nombreuses avancées sur les connaissances des protéines qui structurent les fentes de filtration ont permis de mieux comprendre les lésions primitives du podocyte au cours du SNI corticorésistant. Cependant, la nature du facteur de perméabilité, sa ou ses cible(s) podocytaire(s) et les mécanismes par lesquels celui-ci va induire le développement d'une protéinurie néphrotique restent à ce jour encore inconnus.

Au cours de ce travail, nous avons tenté de cerner les mécanismes immunologiques aboutissant au développement du SNI dans une population de patients résistant à tout traitement et présentant une récurrence immédiate après transplantation rénale, qui constitue un groupe très représentatif de la « forme immune » du SNI dans laquelle l'intervention d'un (ou plusieurs) facteur(s) de perméabilité est fortement suggérée. Dans cette perspective, deux axes ont été développés :

Dans une première partie, nous avons étudié le rôle de la protéine ST2 soluble comme facteur de perméabilité potentiel dans la récurrence du SNI. En effet, cette protéine est un produit de la voie de signalisation c-maf, qui a été montrée récemment comme activée de façon anormale au cours des poussées de SNI (Sahali 2002, Valanciute 2004). De plus, ST2 est un marqueur des lymphocytes Th2, profil qui semble favorisé chez les patients présentant un SNI (*cf. Introduction, partie II.5.A*). Enfin, la protéine sST2 est fortement relarguée dans la circulation au cours de l'inflammation allergique des voies respiratoires, ce qui fait un lien fort avec certains cas de syndromes néphrotiques au cours desquels les périodes de poussées sont accompagnées de crises allergiques respiratoires (Cheung 2004).

De par ces diverses observations, la protéine sST2 nous a semblé un candidat intéressant pour un rôle pathogénique dans le SNI. Nous avons donc étudié cette protéine chez les patients présentant un SNI corticorésistant récidivant après transplantation, en comparaison avec les patients ne développant pas de récurrence après la greffe ou avec des patients protéinuriques transplantés pour une pathologie rénale autre qu'un syndrome néphrotique. Pour ce faire, la concentration de sST2 a été dosée dans les sérums des différents groupes de patients avant ou après transplantation. L'existence d'un éventuel isoforme de cette protéine chez les patients récidivant a été recherchée par analyse bidimensionnelle et spectrométrie de masse. Nous avons ensuite tenté de déterminer si la protéine sST2 était capable de léser la barrière de filtration glomérulaire, et plus particulièrement les podocytes, grâce à des expériences *in vitro* sur une lignée de podocytes murins immortalisés. Enfin, la capacité de cette protéine à induire le développement d'une protéinurie néphrotique chez le rat a été testée par injection d'un AAV (*Adeno-Associated Virus*) codant pour la protéine sST2 humaine, ou par injection, directement dans l'artère rénale de rats sains, de la protéine sST2 purifiée chez un rat sain (Lewis 1W) ou néphrotique (Buffalo/Mna). Les résultats obtenus sont décrits dans la **partie 1** de la partie expérimentale et font l'objet d'un article accepté pour publication dans *l'American Journal of Kidney Diseases* (AJKD).

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons cherché à déterminer si une composante auto-immune pouvait prendre part à la récurrence du SNI après transplantation rénale, sous la forme d'une ou plusieurs immunoglobuline(s) dirigée(s) contre des protéines rénales normales. En effet, l'implication d'une immunoglobuline dans la physiopathologie du SNI n'est pas à exclure. Malgré l'absence d'anticorps détectés sur le rein greffé au cours de la récurrence, l'engagement d'une ou plusieurs Ig est fortement suggéré par l'effet bénéfique des immunoadsorptions du plasma des patients sur colonnes de Protéine A ou sur colonnes anti-Ig humaines (Dantal 1994, Dantal 1998). De plus, ce phénomène a déjà été observé dans le cadre du syndrome néphrotique congénital finlandais (dû à une mutation de la néphrine), au cours duquel une récurrence après transplantation peut survenir par la production d'anticorps dirigés contre la forme normale de la néphrine apportée par le greffon, et ce malgré l'absence de dépôts d'Ig sur le rein (Patrakka 2002). Ces observations montrent l'intérêt d'étudier l'existence éventuelle d'immunoglobulines ayant pour cible des constituants de la

barrière de filtration glomérulaire au cours de la récurrence du SNI. Pour ce faire, nous avons utilisé une technique de screening particulièrement exhaustive appelée SEREX (« Serological analysis of antigens by Recombinant Expression cloning »). Cette technique est basée sur l'immunoscreening d'une banque d'expression d'ADNc de reins humains normaux à l'aide de sérums de patients, et permet de détecter d'éventuelles protéines rénales reconnues par des anticorps présents chez les patients. Le détail de cette technique et les résultats obtenus sont détaillés dans la **partie 2** de la partie expérimentale.

PARTIE EXPERIMENTALE

Partie 1 : Etude d'un facteur de perméabilité potentiel dans la récurrence du syndrome néphrotique idiopathique après transplantation rénale : la protéine ST2 soluble

I. Résumé de l'article

Après transplantation rénale, le Syndrome Néphrotique Idiopathique (SNI) corticorésistant récidive rapidement chez 30 à 50% des patients, ce qui suggère la présence de facteur(s) circulant(s) capable(s) de porter atteinte à la barrière de filtration glomérulaire. Récemment, une association entre les phases de poussée de SNI et une polarisation Th2 atypique impliquant l'activation du facteur de transcription c-maf a été rapportée. Nous avons donc recherché une possible implication de la protéine ST2 soluble (sST2), produit de la voie c-maf et marqueur des cellules Th2, dans la récurrence du SNI.

Pour cela, nous avons dosé la protéine sST2 dans le sérum de patients transplantés rénaux et avons ainsi trouvé que les concentrations sériques en sST2 étaient significativement augmentées chez les patients présentant une récurrence de SNI après transplantation (n=31), contrairement aux patients ne présentant pas de récurrence de leur SNI (n=40) ou à des patients transplantés rénaux dont l'origine de la protéinurie n'est pas liée à un SNI (n=34). L'analyse de sST2 par électrophorèse bidimensionnelle et spectrométrie de masse a montré que les patients récidivant expriment un isoforme normal de cette protéine. *In vitro*, l'incubation d'une lignée murine de podocytes immortalisés avec les sérums de patients récidivant a conduit à d'importantes altérations morphologiques de ces cellules. Cependant, la protéine sST2 purifiée à partir de ces sérums a été incapable de reproduire de tels dommages. De plus, l'induction de hauts niveaux de sST2 chez le rat n'a pas permis d'induire une augmentation de leur protéinurie.

Globalement, ces résultats suggèrent que la protéine sST2 est un marqueur de la récurrence du SNI après transplantation qui peut avoir un intérêt diagnostique dans les situations cliniques ambiguës. Toutefois, sST2 ne semble pas être directement impliqué dans le développement du SNI.

II. Article

Potential role of soluble ST2 protein in Idiopathic Nephrotic Syndrome following kidney transplantation.

Sarah Bruneau¹, Ludmilla Le Berre, PhD¹, Caroline Hervé, PhD¹, Asta Valanciuté, PhD², Maud Kamal, PhD², Jeanne Naulet¹, Laurent Tesson¹, Yohann Foucher, PhD¹, Jean-Paul Souillou, MD¹, Djillali Sahali, MD, PhD², and Jacques Dantal, MD, PhD^{1*}

¹ INSERM, U643, Nantes, F44093 France; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITERT) Nantes, F44000 France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France.

² INSERM, U841 Eq 21, Créteil, F94010 France; Hôpital Henri Mondor, Créteil, F94010 France.

DS and JD contributed equally to this work.

Correspondance to Pr. Jacques Dantal, ITERT/INSERM U643, CHU Hôtel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes cedex 01, France, jacques.dantal@chu-nantes.fr

Tel: +33 (0)2-40-08-74-41

Fax: +33 (0)2-40-08-74-11

Short title: sST2 in INS recurrence

Accepté pour publication dans *American Journal of Kidney Diseases*

This work was supported in part by the “Fondation Progreffe” and AMGEN.

Financial conflict of interest:

Sarah Bruneau: None

Ludmilla Le Berre: None

Caroline Hervé: None

Asta Valanciuté: None

Maud Kamal: None

Jeanne Naulet: None

Laurent Tesson: None

Yohann Foucher: None

Jean-Paul Soulillou: None

Djillali Sahali: None

Jacques Dantal: None

ABSTRACT

BACKGROUND: Corticosteroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome (INS) recurs rapidly after transplantation in 30-50% of recipients, suggesting the presence of one or more circulating factors that alter the glomerular filtration barrier. We investigated the possible role in INS recurrence of the soluble ST2 protein (sST2), a marker of Th2 cells and a product of the c-maf pathway, that both seem to be activated during INS relapse. STUDY DESIGN: Retrospective observational study. SETTING AND PARTICIPANTS: Patients with biopsy-proven corticosteroid resistant INS who had undergone kidney transplantation between September 1983 and April 2007 (n=71). A control group consisting of proteinuric transplant patients with kidney failure unrelated to INS (n=34). PREDICTOR: Patients who developed a recurrence of INS after transplantation (n=31) were compared to recipients in whom INS did not recur (n=40) and to the control group. Recurrence of INS was defined as urine protein excretion > 2 g/d immediately after transplantation, which persisted above 1 g/d despite the treatment, with a kidney graft biopsy showing minimal change glomerulonephritis or focal segmental glomerulosclerosis. OUTCOMES AND MEASUREMENTS: The sST2 protein was analyzed both quantitatively and qualitatively in patients' sera and its activity was tested *in vitro* on a mouse podocyte cell line and *in vivo* in the rat. RESULTS: sST2 levels were significantly increased after transplantation in patients with INS recurrence compared to the two other groups (617.5 pg/mL vs. 23 pg/mL, $p < 0.001$ and 158.5 pg/mL, $p < 0.01$ respectively). However, recurrent patients displayed a normal sST2 isoform, and the sST2 protein was unable to induce podocyte injury *in vitro*, or to trigger proteinuria in rats. LIMITATIONS: Pre and post transplant sera do not always represent paired samples. CONCLUSIONS: These data suggest that sST2 is a marker of INS recurrence that does not seem to be involved in the development of INS.

INTRODUCTION

Idiopathic Nephrotic Syndrome (INS) is a glomerulopathy of unknown etiology characterized by a massive albuminuria without histological evidence of inflammatory injury or immune complex deposits. Recently, genetic abnormalities have been shown to be involved in INS. However, patients with treatment-resistant INS who progress to end-stage renal failure with focal and segmental glomerular sclerosis (FSGS) usually do not exhibit genetic alterations (1). After transplantation, recurrence of the initial disease is observed in 30-50% of patients, leading to graft loss in approximately 50% of cases (2, 3). In 90% of these patients, nephrotic syndrome recurs within the first few hours after transplantation, suggesting the involvement of a circulating albuminuric factor. The beneficial effect of plasmapheresis also supports this hypothesis (2, 4, 5). Several attempts have been made to determine the nature of this putative albuminuric factor, but its molecular characterization has remained elusive.

The recent observation of an association between INS relapse and an atypical Th2 polarization, characterized by c-maf activation and IL-4 downregulation (6), raises the question of the implication of T cells in the pathophysiology of this disease. In this study, we investigated the role of a soluble factor, sST2, whose promoter contains the c-maf recognition element (MARE) (DS, unpublished), as a putative albuminuric factor in INS patients who recur after transplantation. In humans, the ST2 gene codes for two main products by alternative splicing. One is a heavily glycosylated transmembrane protein of 61.5 – 80 kDa called ST2L that is composed of an extracellular region with three immunoglobulin domains and an intracellular toll-interleukin-1 receptor (TIR) domain. The other is a soluble secreted protein of 50-60 kDa, sST2, which is made up of only the extracellular part of ST2L. The

soluble form is secreted by activated Th2 cells that express ST2L at their surface (7). In mice, the ST2 protein has been described as a stable marker of a subset of activated Th2 cells independent of the production of IL-4, IL-5, and IL-10 (8), although it is not a universal marker of this T cell phenotype. Interestingly, several investigations have suggested an important role for ST2 in allergic airway inflammation (9-11), and it is well known that there is a relationship between respiratory allergies and proteinuria in some cases of nephrotic syndrome (12). The fact that sST2 is associated with a Th2-biased immune response and that its expression can be induced by the c-maf transcription factor indicate its potential role in INS pathology, and particularly in recurrence. In this paper, we investigate the possible role of sST2 in human kidney transplant recipients with INS recurrence.

METHODS

Detailed methods are available in the supplemental methods section.

Patients: 71 patients suffering from biopsy-proven corticosteroid resistant INS who had undergone kidney transplantation between September 1983 and April 2007 were included. All patients were treated with an immunosuppressive regimen including calcineurin inhibitors (CNI) and antimetabolic drugs (Mycophenolate Mofetil or Azathioprine) and/or with corticosteroids, plasmapheresis or immunoadsorption. Pre-transplant sera were collected within the 12 hours before surgery and kept frozen at -20°C. Patients who presented proteinuria above 2 g/d immediately after transplantation, which persisted above 1 g/d despite the treatment during the follow-up, with a kidney graft biopsy showing minimal change glomerulonephritis or isolated FSGS lesions without any other transplant-specific lesions were defined as “recurrent” patients (R, n=31). On the contrary, “non-recurrent” INS patients (NR, n=40) had less than 1 g/d of proteinuria one week after transplantation, which remained lower than 0.5 g/d thereafter. The control group consisted of 34 proteinuric transplant patients with non-INS-related end stage renal failure (diabetes, obstructive uropathy, reflux nephropathy, IgA glomerulonephritis, nephroangiosclerosis, chronic interstitial nephropathy, polycystic kidney diseases) (Table 1). In this group, the proteinuria was related to different kidney graft lesions: allograft glomerulonephritis, recurrence of IgA nephritis, or diabetes. Among these three cohorts, sera of 20 patients were collected both before and after transplantation (9 for “INS recurrence”, 10 for “INS non-recurrence” and 1 for “non-INS”).

All of these patients gave informed consent to participate in this study according to French legislative guidelines.

Analysis of sST2 binding to Protein A: Please see the supplemental methods section for details.

Quantification of human sST2 protein: The concentration of soluble ST2 protein in the sera of INS patients and controls was determined with a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (Human ST2/IL-1 R4 DuoSet kit, R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

Purification of human and rat sST2: Human and rat sST2 were purified on immunoaffinity columns in accordance with the Seize Primary Immunoprecipitation Kit instructions (Pierce).

Bidimensional electrophoresis: Please see the supplemental methods section for details.

Mass spectrometry: Spots of interest were manually excised from the gel. Proteins contained in these spots were submitted to trypsin digestion, and their identity was confirmed by LC-ESI-MS/MS. Digestion, HPLC, and sequencing were performed at the Biopolymers – Interactions – Structural Biology Platform at the INRA research center (Nantes, France).

Mouse podocyte cell culture: Culture of conditionally immortalized mouse podocytes, kindly provided by Dr. M. Saleem, was carried out as described in detail previously (13).

In vitro effect of plasma samples and sST2 on podocytes: Differentiated mouse podocytes were incubated with human plasma or serum from transplanted INS patients, both before and after sST2 depletion. Purified sST2 proteins from these samples were also tested. After 48h of incubation, an immunofluorescence staining of the F-actin cytoskeleton and of its points of

contact with the extracellular matrix was performed. Please see the supplemental methods section for details.

In vivo effect of sST2 in the rat:

Animals: Overexpression of sST2 was induced by injection of an AAV8-hST2 vector into healthy male Sprague-Dawley rats (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) or by injection into healthy male Lewis 1W rats (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) of purified sST2 protein from other Lewis 1W rats or from 6 month-old male nephrotic Buffalo/Mna rats. The Buffalo/Mna strain maintained in our lab was originally kindly provided by Dr Saito (Central Experimental Institute, Yokohama, Japan). At the time of experimentation, Buffalo/Mna rats had a proteinuria level between 0.4 and 0.8 g/mmol. Animal care was in accordance with our national institutional guidelines.

Construction of the AAV8-hST2 vector: Please see the supplemental methods section for details.

Intra-arterial injection of purified rat sST2: Intra-arterial injection was chosen to optimize the exposure of the kidney to sST2 proteins. Please see the supplemental methods section for details on this procedure.

Proteinuria measurements: Rats were placed in metabolic cages for 24 h with free access to water and the total urinary protein concentration (g/L) was measured by a colorimetric method using a Hitachi autoanalyzer (Boehringer). The urinary creatinine (mmol/L) was measured by the Jaffé method. Proteinuria was expressed according to this formula:

Proteinuria (g/mmol) = urinary protein (g/L) / urinary creatinine (mmol/L) and was considered to be abnormal when above 0.2 g/mmol.

Statistical analyses: The nonparametric Wilcoxon rank-sum test was used to compare sST2 levels among each cohort of patients. Receiver-Operating-Characteristic (ROC) curve analysis was performed with R software (<http://www.r-project.org/>) to determine the cut-off points of sST2 concentration in the serum that yielded the highest combined sensitivity and specificity for the diagnosis of INS recurrence (see Figure 2 legend for an explanation).

The Friedman test and a Dunn's multiple comparison test were used for comparison of rat proteinuria levels before and at different points after injection of the AAV8-hST2 or purified sST2 protein.

For each statistical test, *p* values less than 0.05 were considered to be significant.

RESULTS

The human sST2 protein is retained onto Protein A column:

We and others have shown that immunoadsorption of the plasma of patients with recurrent nephrotic syndrome onto Protein A transiently decreases or abolishes proteinuria (5). In order to determine if the sST2 protein could be retained onto Protein A, human sST2 was produced by COS-7 cells transfected with a human sST2-expressing plasmid, and passed through a Protein A column. A control was realized by transfecting COS-7 cells with a control plasmid. The presence of sST2 in Protein A column eluates was then determined by western blot analysis. Two bands were detected in the expecting size range (between 50-60 kDa) in the eluate of Protein A columns after incubation with the supernatant of sST2-expressing cells, whereas no signal was apparent for the control eluate (Figure 1), thus showing that the sST2 protein was retained onto Protein A. The two molecular weights detected seem to correspond to two different glycosylation states of the sST2 protein due to its expression by COS-7 cells.

High sST2 levels are associated with INS recurrence after renal transplantation:

sST2 serum concentrations were measured before and after renal transplantation in: 1) patients with INS recurrence; 2) patients with INS that did not recur (“non-recurrence”); and 3) patients with non-INS disease in their native kidneys and who displayed high levels of proteinuria post-transplant as a result of other causes. The clinical characteristics of these patients are summarized in Table 1. We did not detect any significant differences in serum sST2 concentrations among these three cohorts before transplantation (Figure 2). In contrast, sST2 levels were strongly increased in recurrent patients after transplantation (median = 617.5

pg/mL vs. 124 pg/mL before transplantation, $p < 0.01$), while, in comparison, they remained low in the non-recurrent group (median = 23 pg/mL, $p < 0.001$) and in the group of patients without INS (median = 158.5 pg/mL, $p < 0.01$).

Determination of the capacity of sST2 concentrations to distinguish INS recurrence and INS non-recurrence by Receiver Operator Characteristic (ROC) curve analysis (Figure 3A) revealed an excellent discriminative power (AUC = 0.9, 95% confidence interval 79% - 99%), with a sensitivity of 80% and a specificity of 97% at a cut-off value of 205 pg/mL of circulating sST2. ROC curve analysis was then applied to compare patients with INS recurrence and patients with non-INS glomerular diseases, all of whom displayed similar proteinuria levels after transplantation. As shown in Figure 3B, sST2 levels also discriminated between these two cohorts (AUC = 0.75, 95% confidence interval 59% - 89%), with a sensitivity of 55% and a specificity of 86% at a cut-off value of 602 pg/mL of serum sST2. Moreover, we did not find any correlation between sST2 concentrations and proteinuria levels in these two groups of patients (Figure 4).

Altogether, these results show that post-transplant INS recurrence is tightly associated with an upregulation of sST2 in patients with INS and that measurement of serum sST2 in proteinuric patients after transplantation can discriminate recurrent patients from the others.

Recipients with recurrent INS do not accumulate a specific sST2 isoform:

The possibility of an abnormal sST2 isoform was suggested by the observation of high sST2 levels in some patients under acute pathological conditions (27-29) or during allergic airway inflammation (9-11) which are not known to be associated with proteinuria. sST2 immunopurified from the plasma of a patient with INS recurrence was analyzed by bidimensional electrophoresis (Figure 5). Three clusters of spots had a degree of intensity

sufficient for analysis. The cluster #1 was the only one to display the same characteristics as those described for sST2 present in “normal” human serum, *i.e.*, a molecular weight of 57 kDa and an isoelectric point of 8.40 (SwissProt-Expasy database). These three clusters were analyzed by mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) and upon sequencing, six peptides matching with the sST2 protein sequence (14% sequence coverage) were identified only in cluster #1, where it showed all of the expected characteristics and electrophoretic behavior, suggesting that recurrent patients display the normal isoform of the sST2 protein.

Sera from patients with INS recurrence but not purified sST2 induce podocyte cell line injury in vitro:

An immortalized mouse podocyte cell line (13) was used to investigate whether the serum and purified sST2 of recurrent patients could alter morphological characteristics of podocytes. Incubation of these cells with serum or plasma from recurrent patients after transplantation induced cell body contraction, nucleus retraction, and loss of cell processes (Figure 6), whereas the cell morphology was well conserved in podocytes exposed to serum from non-recurrent patients, confirming a previous report (14). However, we found these modifications with only 70% of the sera tested from recurrent patients, indicating a limit to the sensitivity of this test. In contrast, we found no podocyte injury after incubation with sera from non-recurrent patients. Analysis of the cell distribution of F-actin and vinculin by dual-labeling immunofluorescence showed some major architectural modifications of podocytes incubated with sera from recurrent patients, which exhibited a considerable redistribution of actin filaments around the nucleus, with a rarefaction of cortical actin and a scarce expression of vinculin (Figure 6B and 6E). In contrast, podocytes incubated with serum from non-recurrent patients displayed a normal phenotype. Altogether, these results support the concept

that the serum and plasma of recurrent INS patients contain (a) factor(s) capable of directly inducing morphological damage in podocytes.

In order to determine whether the sST2 protein was implicated in the podocyte injury, we purified sST2 from reactive plasma and tested the activity of the different fractions (initial plasma, sST2-depleted plasma, and purified sST2 protein) on differentiated podocytes. sST2 levels were measured by ELISA in each fraction to check that a complete sST2 depletion was achieved and that the purification process did not lead to sST2 degradation. We found that podocytes exposed to sST2-depleted plasma exhibited the same architectural modifications as podocytes incubated with the initial plasma (Figure 7). Furthermore, podocytes exposed to sST2 proteins purified from the same samples displayed a normal phenotype, suggesting that sST2 does not directly alter podocyte architecture.

Achieving high circulating levels of sST2 does not trigger proteinuria in the rat:

Because the absence of an *in vitro* effect of sST2 on the mouse podocyte cell line does not necessarily exclude a role for sST2 in INS recurrence, we also investigated whether this protein could induce proteinuria and glomerular damage in the rat by two experimental approaches. First, we treated Sprague-Dawley rats with an adeno-associated virus (AAV) coding for the human sST2 protein. Intravenous administration of this AAV did not induce proteinuria in these rats (Figure 8B), although it did induce high circulating sST2 levels (Figure 8A). Second, in order to exclude a species-specific effect and to focus as much as possible on the potential effects of sST2 on the kidney, we injected the sST2 protein purified from the blood of a Lewis 1W or a nephrotic Buffalo/Mna rat directly into the renal vasculature of a healthy Lewis 1W rat, after checking for the presence of sST2 in the purified fraction and estimate its quantity (approximately 35 ng) by western blot analysis (data not

shown). Figure 8 shows that administration of sST2 from both Lewis 1W rats and Buffalo/Mna rats was not associated with an increase in urinary protein.

Altogether, these results suggest that sST2 does not act directly on the kidney during INS recurrence.

DISCUSSION

In non-genetic forms of idiopathic nephrotic syndrome, the primary disorder seems to involve the immune system. To date, little is known about the immune mechanisms that ultimately lead to the disorganization of the glomerular filtration barrier, and since the first report of INS recurrence following renal transplantation, the pathophysiology of this disease has become a challenge for nephrologists (15). It has been postulated for a long time that INS results from a T cell dysfunction, leading to the release of a circulating factor responsible for glomerular damage (16). In this regard, INS patients who recur after transplantation represent an interesting cohort in which an immune origin is highly suspected. Over the past two decades, several teams, including our own, have attempted without success to identify a circulating factor in INS. On the basis of an active serum component binding to protein A, we suggested that the permeability factor displays some immunoglobulin-like properties (5). These findings were also supported by Savin et al., who suggested that a circulating factor with an apparent molecular weight of around 50 kDa (4) binds to protein A.

Here we hypothesized that this factor could be sST2, since this protein contains three Ig-like domains, binds with high affinity to protein A, and has a molecular weight of 50-60 kDa. A role for sST2 in INS recurrence was also suggested indirectly by a study showing that the transcription factor c-maf was up-regulated during INS relapse compared with remission (6), which provides an interesting connection with the ST2 protein, whose gene promoter contains the c-maf recognition element (MARE) (DS, unpublished). Moreover, several studies have shown that the ST2 protein is a selective marker of Th2 cells (7, 8, 17, 18), correlating with the atypical Th2 polarization described in INS (19-21). Finally, sST2 seems to be tightly associated with allergic airway inflammation (9-11), which has also been associated with some cases of nephrotic syndrome (12).

In this study, we found that the production of sST2 was strongly increased after transplantation in recipients with INS recurrence. In contrast, non-recurrent and non-INS patients had no such increase in serum sST2 levels. From a ROC analysis, we found that INS recurrence was significantly associated with high serum sST2 concentrations after transplantation. Moreover, this up-regulation did not correlate with the proteinuria levels. Globally, these first experiments suggest that proteinuric patients with a high blood sST2 concentration after transplantation are likely suffering from INS recurrence. Although we cannot propose sST2 as a validated biomarker of INS recurrence in all clinical situations, it could be useful in some infrequent conditions for which the diagnosis of recurrence is ambiguous. Of note, no difference was detected between the tested groups before transplantation, precluding the relevance of sST2 measurement as a test to predict INS recurrence.

Since increased production of sST2 appears to be associated with INS recurrence, and despite the fact that sST2 is not over-expressed in these patients before transplantation, we tested the hypothesis that this protein could be a permeability factor related to the development of INS. Indeed, we could not exclude a role for sST2 in INS, since we had demonstrated in a previous study that post-transplant, but not pre-transplant sera from recurrent patients could alter glomerular albumin permselectivity *in vitro* (22), although this finding was not consistent (4, 23). Since sST2 is also increased in the sera of patients in acute pathological conditions such as myocardial infarction, sepsis, trauma, and exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis (24-26), none of which are associated with proteinuria, we first studied the possibility of the existence of an abnormal sST2 isoform in recurrent INS patients. However, a bidimensional analysis of the sST2 protein purified from the plasma of recurrent patients revealed the same isoform as that described in healthy individuals.

To further explore a putative role of sST2 in INS recurrence, the serum activity in recurrent and non-recurrent patients was tested on a mouse podocyte cell line before and after sST2 depletion. In addition, the activity of sST2 protein alone purified from these sera was measured. As described in previous studies (14, 27) that underlined the toxic activity of nephrotic plasma on podocytes *in vitro*, we also found significant morphological damage in podocytes incubated with sera from recurrent patients, whereas cells exposed to sera from non-recurrent patients exhibited a normal morphology. However, despite the serum activity being exclusively constrained to sera from patients with recurrence, the sensitivity of this assay was low, as several sera from recurrent patients were unable to induce these damages. Plasma samples from recurrent patients that showed activity *in vitro* were then depleted of sST2 and tested again on podocytes, but eluates containing purified sST2 proteins were not toxic, whereas the initial activity was present in sST2-depleted samples. Although mouse and human sST2 proteins share only 67% of homology, a species-specific effect is excluded by the fact that sera from patients with recurrent INS were able to induce podocyte damages.

Finally, we tested the sST2 activity *in vivo* in Sprague-Dawley rats, using an adeno-associated virus containing the human sST2 gene sequence. Despite a high and durable expression of the sST2 protein, these animals did not develop proteinuria. However, this could be due to a species-specific effect as human and rat sST2 proteins share only 63% of sequence homology. In order to exclude this possibility, we injected the sST2 protein purified from healthy Lewis 1W or nephrotic Buffalo/Mna rat sera directly into the renal artery of Lewis 1W rats. We chose to test the sST2 protein of the Buffalo/Mna rat as the transplantation of a kidney from a healthy Lewis 1W rat in the Buffalo/Mna rat leads to the recurrence of its nephrotic syndrome (28), suggesting the involvement of a permeability factor in this rat. The effect of sST2 was concentrated as much as possible on the kidney by injecting the totality of sST2 purified from a rat in the renal artery of a Lewis 1W. Nevertheless, none of the injected

animals developed proteinuria, further suggesting that this protein alone is not capable of inducing kidney damage.

Altogether, these results show that although sST2 is significantly increased in recurrent INS patients after transplantation, this protein is not directly involved in the development of nephrotic proteinuria. sST2 is known to be strongly up-regulated in the sera of patients with various disorders associated with an abnormal Th2 response, including systemic lupus erythematosus, asthma, and idiopathic pulmonary fibrosis (26, 29, 30). In the case of INS recurrence, this increase might be a reflection of an atypical Th2 activation rather than the cause of the disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Pr. Christophe LEGENDRE (Hôpital Necker, Paris), Dr. Nicole LEFRANCOIS (Hôpital E. Herriot, Lyon), Pr. Georges MOURAD (Hôpital Lapeyronie, Montpellier), and Pr. Pierre MERVILLE (Hôpital Pellegrin, Bordeaux) for the help provided in the acquisition of serum samples and patient consent. We thank Dr. Moin SALEEM for kindly providing the immortalized mouse podocyte cell line, and Dr. Alice TOROMANOFF for providing the pZA-RSV-WPRE vector.

REFERENCES

1. Pollak MR. Focal segmental glomerulosclerosis: recent advances. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008;17 (2):138-142.
2. Dantal J, Baatard R, Hourmant M, Cantarovich D, Buzelin F, Soulillou JP. Recurrent nephrotic syndrome following renal transplantation in patients with focal glomerulosclerosis. A one-center study of plasma exchange effects. *Transplantation*. 1991;52 (5):827-831.
3. Pinto J, Lacerda G, Cameron JS, Turner DR, Bewick M, Ogg CS. Recurrence of focal segmental glomerulosclerosis in renal allografts. *Transplantation*. 1981;32 (2):83-89.
4. Savin VJ, Sharma R, Sharma M, et al. Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med*. 1996;334 (14):878-883.
5. Dantal J, Bigot E, Bogers W, et al. Effect of plasma protein adsorption on protein excretion in kidney-transplant recipients with recurrent nephrotic syndrome. *N Engl J Med*. 1994;330 (1):7-14.
6. Valanciute A, le Gouvello S, Solhonne B, et al. NF-kappa B p65 antagonizes IL-4 induction by c-maf in minimal change nephrotic syndrome. *J Immunol*. 2004;172 (1):688-698.
7. Lecart S, Lecoite N, Subramaniam A, et al. Activated, but not resting human Th2 cells, in contrast to Th1 and T regulatory cells, produce soluble ST2 and express low levels of ST2L at the cell surface. *Eur J Immunol*. 2002;32 (10):2979-2987.
8. Lohning M, Stroehmann A, Coyle AJ, et al. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95 (12):6930-6935.
9. Coyle AJ, Lloyd C, Tian J, et al. Crucial role of the interleukin 1 receptor family member T1/ST2 in T helper cell type 2-mediated lung mucosal immune responses. *J Exp Med*. 1999;190 (7):895-902.
10. Lambrecht BN, De Veerman M, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Thielemans K, Pauwels RA. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest*. 2000;106 (4):551-559.
11. Gajewska BU, Swirski FK, Alvarez D, et al. Temporal-spatial analysis of the immune response in a murine model of ovalbumin-induced airways inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;25 (3):326-334.

12. Cheung W, Wei CL, Seah CC, Jordan SC, Yap HK. Atopy, serum IgE, and interleukin-13 in steroid-responsive nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2004;19 (6):627-632.
13. Mundel P, Reiser J, Zuniga Mejia Borja A, et al. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res.* 1997;236 (1):248-258.
14. Coward RJ, Foster RR, Patton D, et al. Nephrotic plasma alters slit diaphragm-dependent signaling and translocates nephrin, Podocin, and CD2 associated protein in cultured human podocytes. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16 (3):629-637.
15. Hoyer JR, Vernier RL, Najarian JS, Raij L, Simmons RL, Michael AF. Recurrence of idiopathic nephrotic syndrome after renal transplantation. *Lancet.* 1972;2 (7773):343-348.
16. Shalhoub RJ. Pathogenesis of lipid nephrosis: a disorder of T-cell function. *Lancet.* 1974;2 (7880):556-560.
17. Xu D, Chan WL, Leung BP, et al. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J Exp Med.* 1998;187 (5):787-794.
18. Yanagisawa K, Naito Y, Kuroiwa K, et al. The expression of ST2 gene in helper T cells and the binding of ST2 protein to myeloma-derived RPMI8226 cells. *J Biochem (Tokyo).* 1997;121 (1):95-103.
19. Yap HK, Cheung W, Murugasu B, Sim SK, Seah CC, Jordan SC. Th1 and Th2 cytokine mRNA profiles in childhood nephrotic syndrome: evidence for increased IL-13 mRNA expression in relapse. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10 (3):529-537.
20. Grimbirt P, Valanciute A, Audard V, et al. Truncation of C-mip (Tc-mip), a new proximal signaling protein, induces c-maf Th2 transcription factor and cytoskeleton reorganization. *J Exp Med.* 2003;198 (5):797-807.
21. Sahali D, Pawlak A, Valanciute A, et al. A novel approach to investigation of the pathogenesis of active minimal-change nephrotic syndrome using subtracted cDNA library screening. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13 (5):1238-1247.
22. Godfrin Y, Dantal J, Perretto S, et al. Study of the in vitro effect on glomerular albumin permselectivity of serum before and after renal transplantation in focal segmental glomerulosclerosis. *Transplantation.* 1997;64 (12):1711-1715.
23. Dall'Amico R, Ghiggeri G, Carraro M, et al. Prediction and treatment of recurrent focal segmental glomerulosclerosis after renal transplantation in children. *Am J Kidney Dis.* 1999;34 (6):1048-1055.
24. Shimp M, Morrow DA, Weinberg EO, et al. Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2 predict mortality and clinical outcome in acute myocardial infarction. *Circulation.* 2004;109 (18):2186-2190.

25. Brunner M, Krenn C, Roth G, et al. Increased levels of soluble ST2 protein and IgG1 production in patients with sepsis and trauma. *Intensive Care Med.* 2004;30 (7):1468-1473.
26. Tajima S, Oshikawa K, Tominaga S, Sugiyama Y. The increase in serum soluble ST2 protein upon acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.* 2003;124 (4):1206-1214.
27. Hattori M, Akioka Y, Chikamoto H, et al. Increase of integrin-linked kinase activity in cultured podocytes upon stimulation with plasma from patients with recurrent FSGS. *Am J Transplant.* 2008;8 (7):1550-1556.
28. Le Berre L, Godfrin Y, Gunther E, et al. Extrarenal effects on the pathogenesis and relapse of idiopathic nephrotic syndrome in Buffalo/Mna rats. *J Clin Invest.* 2002;109 (4):491-498.
29. Kuroiwa K, Arai T, Okazaki H, Minota S, Tominaga S. Identification of human ST2 protein in the sera of patients with autoimmune diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;284 (5):1104-1108.
30. Oshikawa K, Kuroiwa K, Tago K, et al. Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164 (2):277-281.

TABLES

	AFTER TRANSPLANTATION		
	INS Recurrence n=31	INS Non-recurrence n=40	Non-INS n=34
Gender	17M / 14F	22M / 18F	26M / 8F
Mean age at Tx (years)	28.7 [18-52]	39 [12-58]	41 [20-58]
Duration of HD (months)	37.8 [0-140]	38 [0-127]	31.4 [0-104]
Transplantation Number	Tx1=26, Tx2=4, Tx3=1	Tx1=33, Tx2=6, Tx3=1	Tx1=30, Tx2=4
Time of serum harvesting (months after Tx)	14 [1-134]	38 [1-184]	60 [6-165]
Serum creatinine (mg/dL)	1.98 [0.90-4.75]	1.58 [0.84-2.58]	2.79 [1.31-4.92]
Proteinuria (g/24h)	5.0 [1.3-10.5]	0.14 [0-0.46]	4.3 [3-6.2]
IS regimen	CNI + MMF or AZA 100% under CS	CNI + MMF or AZA 46% under CS	All CNI + MMF or AZA But one AZA 88% under CS

Table 1. Clinical characteristics of INS patients with or without recurrence after kidney transplantation (Tx) and proteinuric controls (non-INS).

Note: Serum creatinine in mg/dL may be converted to $\mu\text{mol/L}$ by multiplying by 88.4.

Tx: Transplantation, HD: Hemodialysis, IS: Immunosuppressive, CNI: Calcineurin Inhibitors, MMF: Mycophenolate Mofetil, AZA: Azathioprine, CS: Corticosteroids.

Patients were roughly matched for number of transplantations, HLA compatibility, pre-transplant panel reactive antibodies, type of treatment, duration of delayed graft function, and maintenance immunosuppressive therapy. Intrinsically to the definition of the group, INS recurrent patients were younger than non-INS patients ($p<0.001$) and their proteinuria levels were significantly higher compared to non-recurrent patients ($p<0.0001$). In addition, sera were obtained later after transplantation for non-INS patients ($p<0.01$) compared to recurrent patients, but the proteinuria levels remained similar between the two groups.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: The human sST2 protein is retained onto Protein A column. Human sST2 was produced by COS-7 cells transfected with the pEFBOS-hST2 plasmid and passed through a Protein A column. Eluates were analyzed by western blot to assess the binding of sST2 to Protein A. Two immunoreactive bands were detected between 50 and 60 kDa in Protein A eluates after adsorption of the supernatant from sST2-expressing cells (COS-hST2 lane), but not in Protein A eluates after adsorption of the supernatant from COS-7 cells transfected with a control plasmid (COS-WT lane). Molecular weight markers are indicated on the right.

Figure 2: Serum concentrations of soluble ST2 protein. The level of sST2 was measured by ELISA before and after transplantation (Tx) in the sera of INS patients with (R, n=22 and n=19) or without recurrence (NR, n=22 and n=28) and in the sera of proteinuric transplant patients (non-INS, n=13 and n=22). Significantly higher levels of circulating sST2 were found in recurrent patients post vs. pre-transplantation, as well as vs. the other cohorts after transplantation. Statistical differences according to the Wilcoxon rank-sum test are presented: *** = $p < 0.001$; ** = $p < 0.01$.

Figure 3: Capacity of sST2 to diagnose INS recurrence after transplantation.

Receiver-Operator-Characteristic (ROC) curve analysis was used to measure the ability of sST2 to correctly distinguish patients with INS recurrence from patients with INS non-recurrence (**A**) and from proteinuric non-INS patients (**B**). The ROC is represented as a graphical plot of the sensitivity vs. (1 – specificity) as the discrimination threshold varies. The

sensitivity (or “true positive fraction”) represents the capacity of the test to distinguish patients with recurrence, and the sensitivity is its ability to detect non-recurrent or proteinuric control patients. Thus, (1 – specificity) is also called “false positive fraction”. Finally, the capacity of the test to discriminate recurrent and control patients is measured by the area under the ROC curve (AUC), with an AUC of 1.0 corresponding to a perfect test.

Figure 4: Relationship between sST2 concentration and proteinuria level. No correlation was detected between serum sST2 concentrations and proteinuria levels after transplantation in recurrent INS and proteinuric control patients. The correlation coefficients between these two parameters are $R^2 = 0.17$ for INS recurrence and $R^2 = 0.056$ for non-INS.

Figure 5: Two-dimensional analysis of the sST2 protein in recurrence. The eluate obtained after immunoprecipitation of sST2 from the plasma of a recurrent INS patient was tested by bidimensional electrophoresis using a pH range of 3 to 10. Areas indicated on the gels were further analyzed by mass spectrometry.

Figure 6: Effects of sera from INS patients with and without recurrence on podocytes *in vitro*. Differentiated podocytes were incubated with different sera from transplanted patients. A final concentration of 10% serum was applied to the cells for 48 h. Representative panels for each experiment are indicated. **(A)** Fetal Calf Serum (FCS) alone. **(B)** Reactive serum from a patient with INS recurrence. **(C)** Serum from a patient with INS non-recurrence. Immunofluorescence double staining was performed with anti-F actin (red), anti-vinculin (green) antibodies, and DAPI (blue) on podocytes following incubation with FCS **(D)**,

reactive serum from a patient INS recurrence (E), and serum from a patient with INS non-recurrence (F).

Figure 7: Effects of the different fractions from anti-sST2 columns on podocytes *in vitro*.

sST2 of reactive plasma samples from patients with INS recurrence was purified on an anti-sST2 column. The activity of each fraction was tested on the podocyte cell line (10%, 48 h). Representative panels for each experiment are shown. (A) Fetal Calf Serum (FCS) alone. (B) Initial plasma. (C) sST2-depleted plasma. (D) Purified sST2. Immunofluorescence with anti-F actin (red), anti-vinculin (green) antibodies and DAPI (blue) after incubation with FCS (E), initial plasmas (F), sST2-depleted plasmas (G), and purified sST2 proteins (H).

Figure 8: Effects of intravascular administration of AAV8-sST2 into healthy SPD rats.

(A) Serum sST2 concentrations were measured by ELISA at different time points after injection. (B) Proteinuria levels were measured in the urine after injection. Data are expressed as mean protein (g/L)/creatinine (mmol/L) $\pm$ SD (scale bars). The proteinuria threshold of 0.2 g/mmol is represented by the dotted horizontal line.

Figure 9: Proteinuria after injection of purified sST2 into the rat vasculature. Urine was collected at different time points after injection. Data are expressed as mean protein (g/L)/creatinine (mmol/L) $\pm$ SD (scale bars). The proteinuria threshold of 0.2 g/mmol is represented by the dotted horizontal line.

FIGURE 1

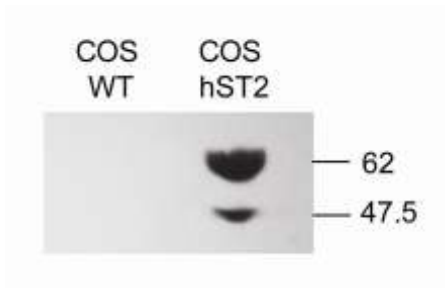


FIGURE 2

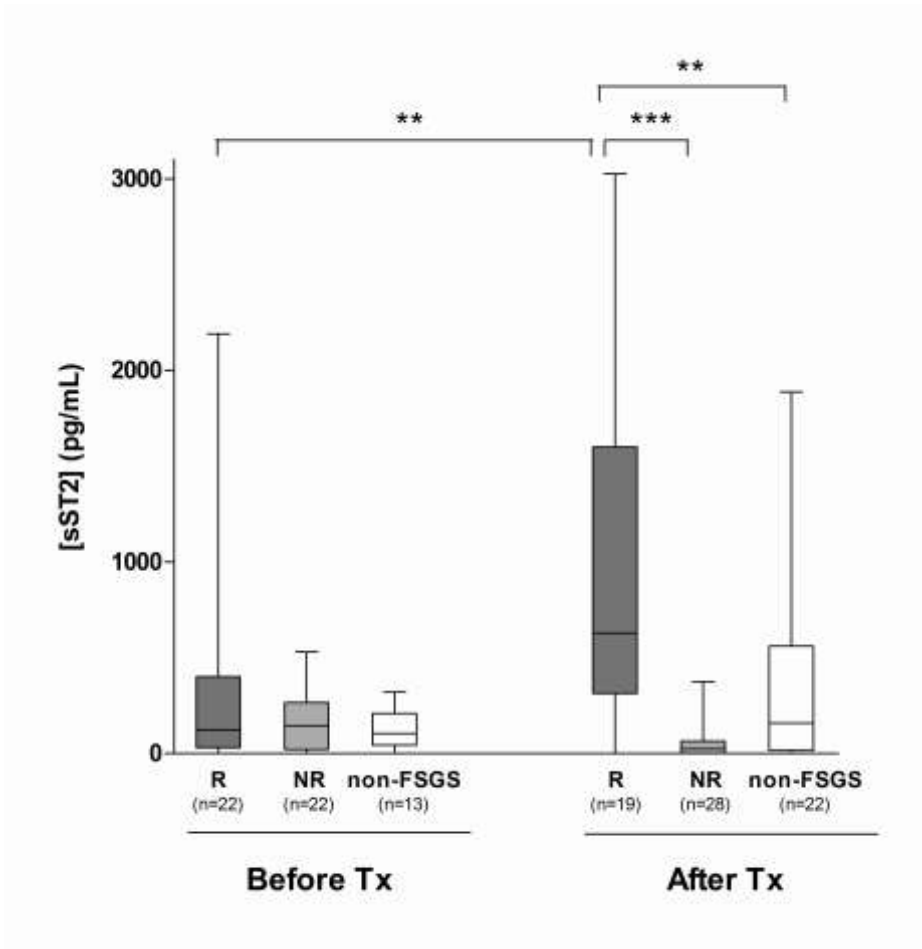


FIGURE 3

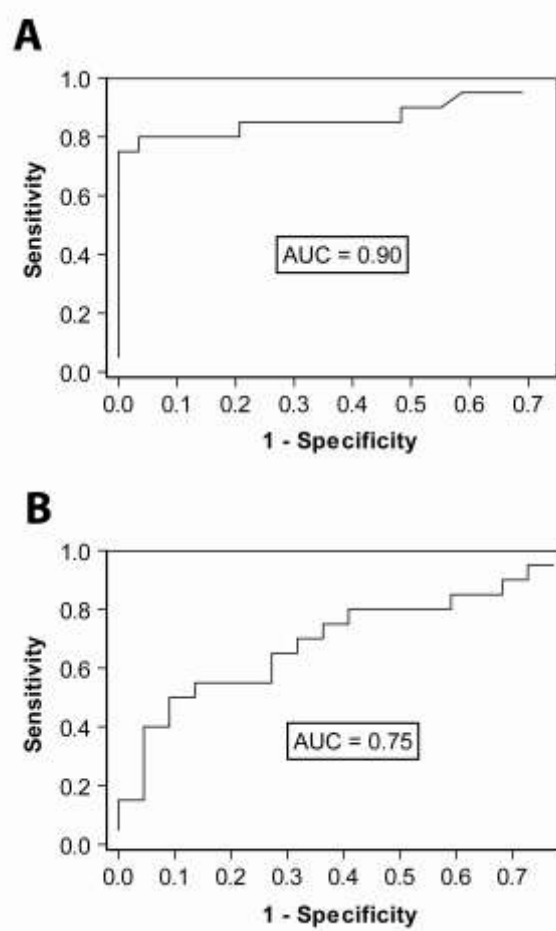


FIGURE 4

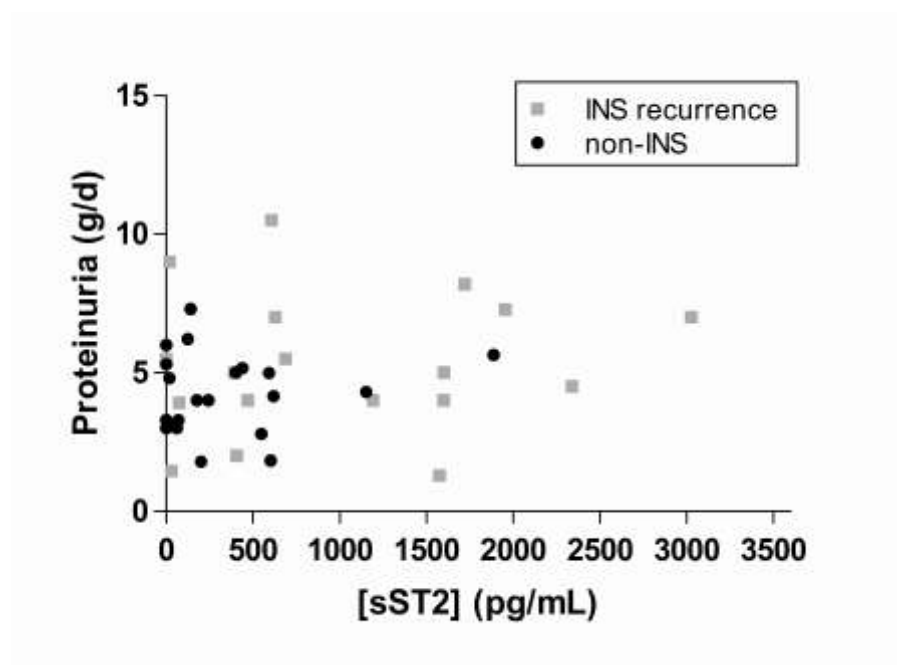


FIGURE 5

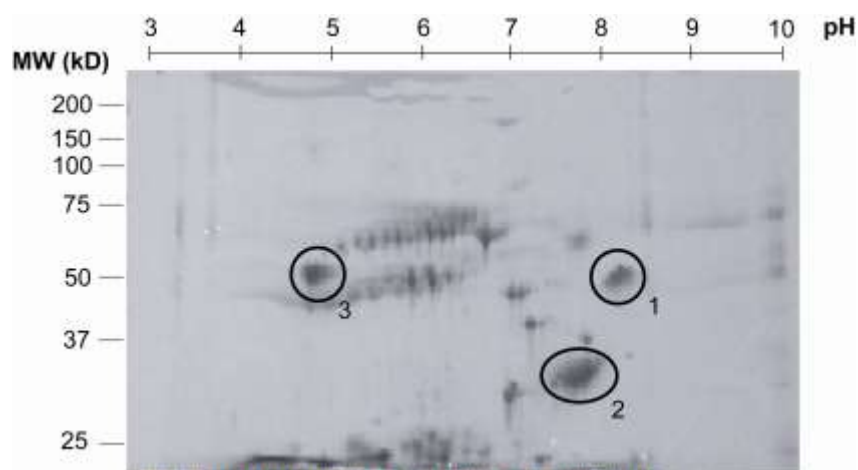


FIGURE 6

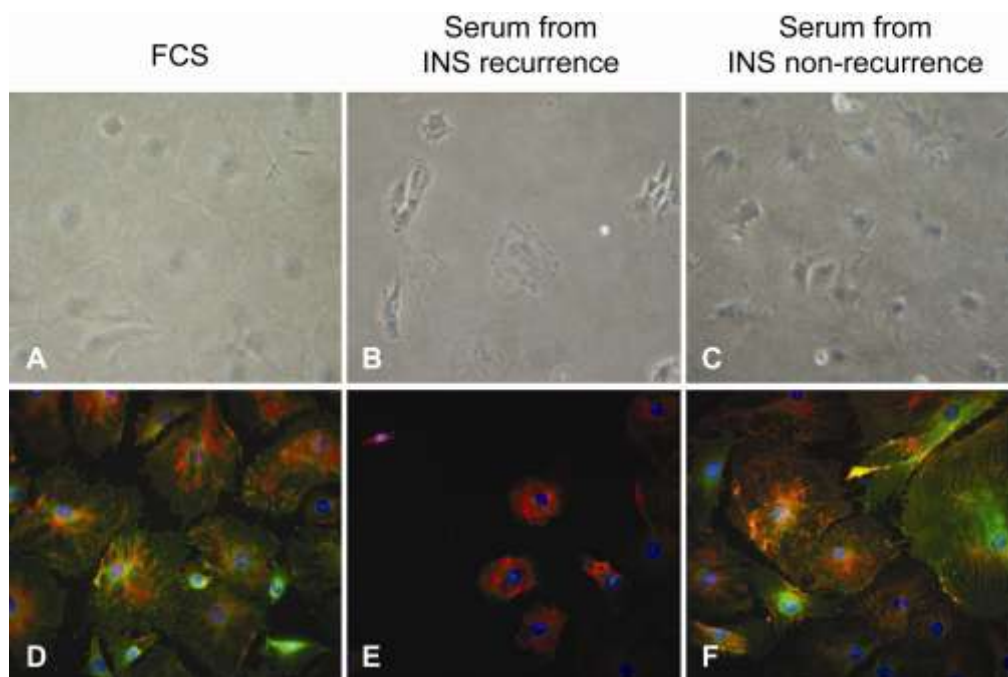


FIGURE 7

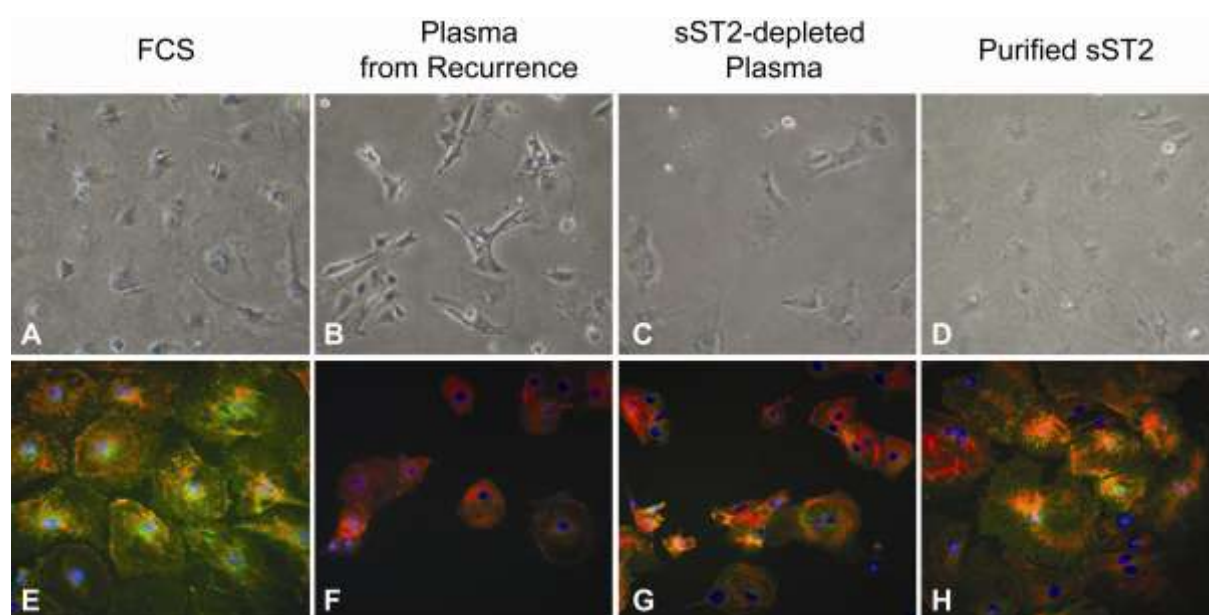


FIGURE 8

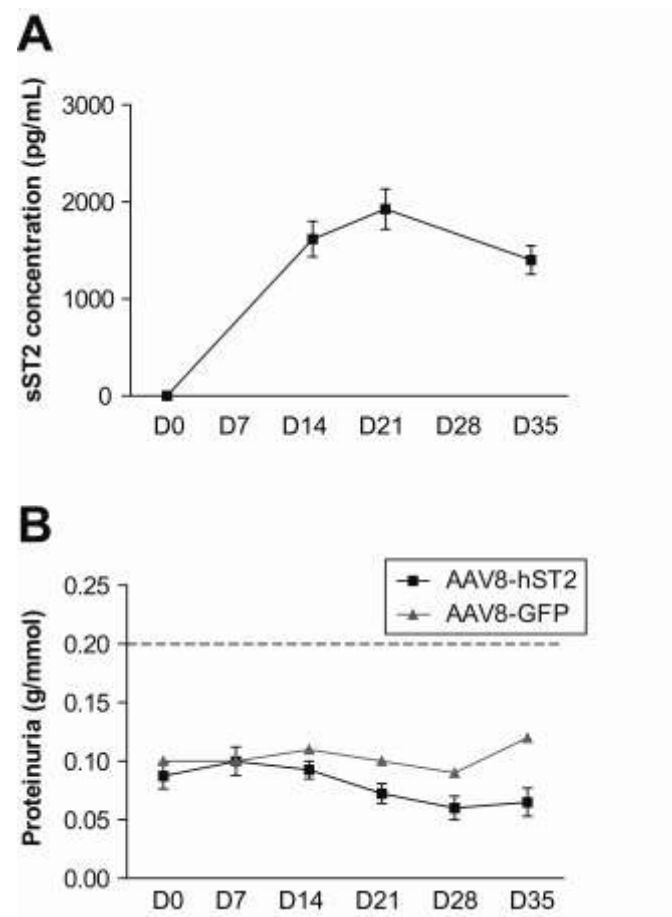
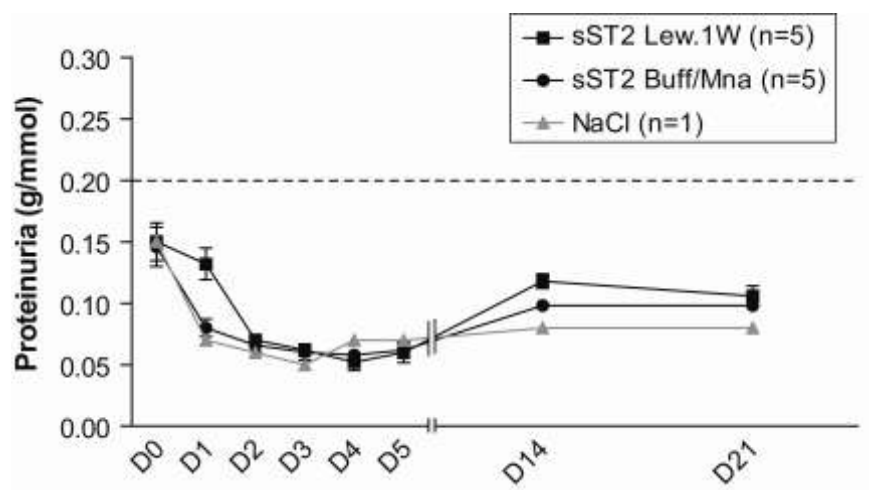


FIGURE 9



Supplemental methods for « High levels of soluble ST2 protein after idiopathic nephritic syndrome recurrence following kidney transplantation » by Bruneau S. *et al.*

Analysis of sST2 binding to Protein A: COS-7 cells were grown in DMEM containing 10% fetal calf serum (FCS), 100 µg/mL streptomycin and 100 U/mL penicillin. Transfections of these cells with the human sST2-expressing plasmid pEFBOS-hST2 (1) or with a control plasmid pcDNA3,1 (Invitrogen) were performed using the Lipofectamine 2000 reagents (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. One day after transfection, supernatants were collected and passed through a Protein A column (Amersham). Bound proteins were eluted with 0.1 M glycine and the presence of sST2 was determined by western blot analysis, using an anti-human ST2 antibody (MBL).

Purification of human and rat sST2: For human sST2, an immunoaffinity column was prepared by coupling 150 µg of anti-human ST2 antibody (R&D Systems) onto agarose beads in accordance with the Seize Primary Immunoprecipitation Kit instructions (Pierce). Plasma samples were passed through the column using a peristaltic pump at a flow rate of 0.5 mL/min. Bound proteins were eluted in 2.5 mL of 0.1 M glycine and subjected to trichloroacetic acid (TCA) precipitation before bidimensional electrophoresis or neutralized with 1 M Na₂HPO₄ for *in vitro* experiments.

Rat sST2 was purified from the serum as for human plasma using an immunoaffinity column prepared by coupling anti-rat ST2 antibody (Santa Cruz Biotechnology) onto agarose beads. Elution fractions were collected in cellulose tubular membranes (molecular weight cut-off = 12000 D, Interchim), concentrated three-fold using polyethylene glycol (PEG) (molecular weight 35000 D, Merck), and dialyzed against PBS (3 changes) for 2 days for future injection into the renal artery of Lewis 1W rats (around 35 ng per rat).

Bidimensional electrophoresis: After TCA precipitation, human sST2 purified from the immunoaffinity column was rehydrated for 20 min in 180 μ L of 8 M Urea, 2% CHAPS (w/v), 50 mM dithiothreitol, 0.2% Bio-Lyte 3/10 ampholytes (w/v), and 0.01% bromophenol blue (w/v) (Bio-Rad). The sample was loaded on an immobilized pH gradient gel strip (pH 3 to 10; Bio-Rad), and isoelectric focusing was conducted in the IPGphor system (Amersham Biosciences) using the following steps: 20 V for 12 h; 500 V for 1 h; 1000 V for 1 h; and 6000 V for 4 h. Afterwards, the strip was equilibrated for 10 min at room temperature (RT) with equilibration buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M Urea, 30% Glycerol (v/v), and 2% SDS (w/v)) containing 1% DTT (w/v) and then for 10 min at RT with equilibration buffer containing 2% Iodoacetamide (w/v). The strip was sealed with 0.1% agarose containing 0.005% bromophenol blue at the top of a 10% SDS-PAGE precast gel (Bio-Rad), and electrophoresis was performed using a Criterion System (Bio-Rad) until the bromophenol blue reached the bottom of the gel. Finally, the gel was fixed and stained for 2 h in 25% ethanol, 10% acetic acid, 0.2% and Coomassie Blue and was destained in 25% ethanol and 10% acetic acid.

Mass spectrometry: Spots of interest were manually excised from the gel. Proteins contained in these spots were submitted to trypsin digestion, and their identity was confirmed by LC-ESI-MS/MS. Briefly, peptides were separated by high performance liquid chromatography (HPLC) on a 75 μ m x 15 mm Pepmap C18 reversed-phase column, and elution was performed with a gradient of acetonitrile/water 0.1% formic acid. Peptides were then submitted to sequencing on a Q-TOF Global spectrometer and analyzed with OVNIP software (INRA, Nantes, France). Digestion, HPLC, and sequencing were performed at the

Biopolymers – Interactions – Structural Biology Platform at the INRA research center (Nantes, France).

In vitro effect of plasma samples and sST2 on podocytes: FCS within the medium of differentiated podocytes was substituted with the same concentration (10%) of human plasma or serum from transplanted INS patients. Plasma samples that exhibited an activity were also tested after immunoadsorption of the sST2 proteins they contained, in parallel with the purified sST2. Each sample was tested in triplicate. After 48 h of incubation, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 minutes for immunofluorescence staining: after blocking 30 minutes with 10% NGS, podocytes were stained with TRITC-labeled phalloidin (Sigma) for F-actin cytoskeleton visualization, with a monoclonal anti-vinculin antibody (Sigma) and the appropriate FITC-conjugated secondary antibody for the detection of the points of contact between the actin cytoskeleton and the extracellular matrix, and with DAPI for nuclear staining.

Construction of the AAV8-hST2 vector: An AAV8 vector expressing human sST2 (hST2) driven by the ubiquitous RSV promoter was generated in the pZA-RSV-WPRE vector (kindly provided by A. Toromanoff (2)). For this purpose, the hST2 cDNA fragment (995 bp) was removed from pEFBOS-hST2 (1) using BstXI, blunted and ligated downstream of the RSV promoter and the β -globin/IgG chimeric intron from the pCI mammalian expression vector (Promega) into pZA-RSV-WPRE, cut by EcoRI and BamHI, and blunt-ended to give the pZA-RSVhST2WPRE. The AAV8 vector also contained the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE) and SV40 polyadenylation signal flanked by inverted tandem repeats (ITRs). Recombinant AAV8 was manufactured as described

elsewhere (3) and purified by cesium chloride density gradients followed by extensive dialysis against PBS.

Intra-arterial injection of purified rat sST2: After measuring their preinjection proteinuria levels, the animals were anesthetized with isoflurane, a right nephrectomy was performed, the aorta was clamped above and below the left renal artery, and approximately 35 ng of purified sST2 were slowly injected into the left renal artery segment. The total ischemia time was about 10 minutes. After recovering, the rats were placed in metabolic cages in order to collect their urine for 24 h after the injection. In all, two groups of 5 rats received purified sST2 from Lewis 1W and Buffalo/Mna rats. Control rats were injected with the same volume of an isotonic saline solution using the same procedure.

Supplemental references:

1. Tominaga S, Yokota T, Yanagisawa K, Tsukamoto T, Takagi T, Tetsuka T. Nucleotide sequence of a complementary DNA for human ST2. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1171 (2):215-218.
2. Toromanoff A, Cherel Y, Guilbaud M, et al. Safety and efficacy of regional intravenous (r.i.) versus intramuscular (i.m.) delivery of rAAV1 and rAAV8 to nonhuman primate skeletal muscle. *Mol Ther*. 2008;16 (7):1291-1299.
3. Chenuaud P, Larcher T, Rabinowitz JE, et al. Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle. *Mol Ther*. 2004;9 (3):410-418.

III. Discussion

Les travaux de l'INSERM U841 réalisés par clonage soustractif différentiel chez un patient SNI/LGM en poussée et en rémission ont permis de mettre en évidence un profil lymphocytaire atypique à prédominance Th2, caractérisé par une activation de la voie de signalisation c-maf (Sahali 2002, Valanciute 2004). Ceci nous a conduits à nous intéresser à la protéine ST2, marqueur Th2 et produit de la voie c-maf, dans la pathogénie du SNI et de sa récurrence post-transplantation.

La protéine ST2 (« *Suppression of Tumorigenicity 2* », également appelée IL1RL1, DER4, T1 et FIT-1) est un membre de la superfamille des Toll-like/IL-1-récepteurs (Tominaga 1989). Le gène T1/ST2 produit deux isoformes d'ARNm grâce à un système de double promoteur, qui sont à l'origine de la production des deux formes principales de la protéine ST2 (Iwahana 1999) : une forme transmembranaire appelée ST2L et une forme soluble appelée sST2. La protéine ST2L est constituée d'une partie extracellulaire comportant trois domaines Ig et d'une partie intracellulaire constituée d'un domaine TIR (*Toll/Interleukin 1 Receptor*). La forme soluble sST2 comporte uniquement la partie extracellulaire de ST2L. L'expression de ST2L est restreinte à la surface des cellules Th2 et des mastocytes, mais est absente des cellules Th1 ou des autres cellules immunitaires (Lohning 1998, Xu 1998, Yanagisawa 1997). C'est pourquoi ST2L a été proposé comme marqueur spécifique des cellules Th2. Certaines études suggèrent qu'il s'agirait plus précisément d'un marqueur des cellules Th2 effectrices (Gajewska 2001, Meisel 2001). La forme soluble sST2 est sécrétée par les cellules Th2 activées qui expriment ST2L à leur surface (Lecart 2002). L'expression de sST2 est largement inductible et sa concentration sérique peut augmenter en association à différentes pathologies, en particulier au cours de l'inflammation allergique des voies respiratoires (Coyle 1999, Gajewska 2001). Ceci est un autre argument en faveur d'une possible implication de sST2 dans le SNI, puisqu'une association entre des poussées de syndrome néphrotique et des crises allergiques respiratoires a souvent été observée (Cheung 2004). De plus, nous avons montré dans cette étude que la protéine sST2 était retenue sur les colonnes de Protéine A, probablement grâce à ses domaines Ig, faisant ainsi

un lien avec l'effet bénéfique sur la protéinurie des immunoadsorptions plasmatiques sur colonnes de Protéine A (Dantal 1994).

Au cours de ce travail, nous avons donc analysé les concentrations sériques de sST2, avant et après transplantation, chez des patients présentant un SNI avec ou sans récurrence, ainsi que chez des patients transplantés protéinuriques d'une autre origine. Ceci nous a permis de mettre en évidence une augmentation significative des taux circulants de sST2 au cours de la récurrence. Etant donné qu'il s'agit d'une étude rétrospective, les patients des groupes « pré-transplantation » et « post-transplantation » n'étaient pas tous appariés. Cependant, l'analyse des taux de sST2 chez les patients pour lesquels des échantillons prélevés avant et après la greffe étaient disponibles (8 dans le groupe « récurrence » et 10 dans le groupe « non-récurrence ») confirme l'augmentation des taux de sST2 en association avec la récurrence du SNI (**Figure 12**).

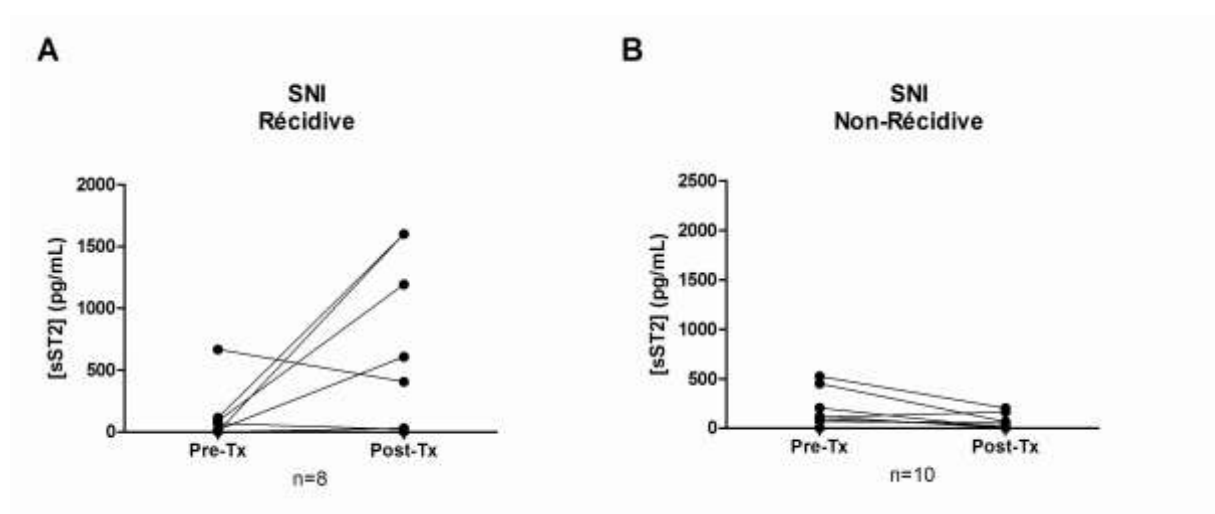


Figure 12 : Concentration sérique de sST2 pour des mêmes patients prélevés avant et après transplantation rénale, et présentant (A) ou non (B) une récurrence de SNI.

Malheureusement, aucune différence n'a pu être détectée entre les trois groupes analysés avant transplantation, ce qui exclut la possibilité d'utiliser le dosage de sST2 dans l'optique de prédire la récurrence. Toutefois, comme le montre l'analyse statistique à l'aide des

courbes ROC (*Receiver Operator Characteristics*), les concentrations sériques de sST2 peuvent permettre de distinguer les patients SNI récidivant des patients transplantés protéinuriques non-SNI, et ce indépendamment de leur niveau de protéinurie. Le dosage de sST2 pourrait donc présenter un intérêt diagnostique dans certaines situations cliniques ambiguës, comme dans les cas où la protéinurie reste modérée ou lorsqu'il existe un doute sur la nature de la pathologie initiale, situations pour lesquelles il est souvent difficile de poser un diagnostic clair de récurrence de SNI.

L'augmentation de la protéine sST2 au cours de la récurrence du SNI pose la question de sa possible implication dans le développement des lésions de la barrière de filtration glomérulaire. Le fait que les patients récidivant présentent des taux normaux de sST2 avant transplantation pourrait suggérer que cette protéine n'est pas directement impliquée dans la physiopathologie du SNI. Cependant, des travaux antérieurs réalisés à Nantes ont montré que l'activité du (ou des) facteur(s) de perméabilité était indétectable dans les sérums prélevés avant la transplantation. En effet, en contradiction avec les résultats obtenus par l'équipe de Savin (Savin 1996), nous avons montré que les sérums de patients récidivant prélevés avant transplantation n'induisaient pas d'augmentation de la perméabilité à l'albumine de glomérules de rats isolés *in vitro*, contrairement aux sérums des mêmes patients prélevés après transplantation (Godfrin 1997). Il est possible que la production du facteur de perméabilité soit un événement précoce dans le développement des lésions glomérulaires et que sa présence soit indétectable dans les sérums prélevés juste avant la greffe, lorsque les lésions en sont à un stade très avancé et que la cible du facteur a disparu. Cette hypothèse semble confortée par des expériences effectuées à l'INSERM U841 au cours de la maladie initiale, qui ont montré que les patients présentant un SNI rapidement évolutif, ayant plus de risque de récidiver, exprimaient des taux de sST2 plus importants que ceux à évolution plus lente (**Figure 13**).

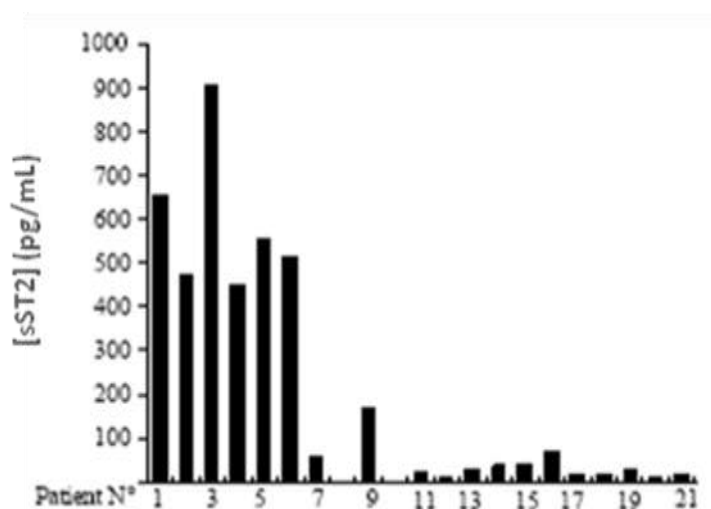


Figure 13 : Concentrations sériques de sST2 chez des patients présentant un SNI/HSF. La protéine sST2 a été dosée par ELISA dans le sérum de patients présentant une forme sévère (Patients N° 1 à 6) ou modérée (Patients N° 7 à 13) de SNI/HSF, ainsi que chez 8 sujets normaux (N°14 à 21).

Nous avons tout d'abord posé l'hypothèse que les patients SNI récidivant possédaient un isoforme anormal de la protéine sST2, puisque des concentrations importantes de sST2 sérique ont également été décrites dans une variété de pathologies qui ne sont généralement pas connues pour être associées à une protéinurie : le sepsis et le trauma (Brunner 2004), l'infarctus du myocarde (Shimpo 2004), l'insuffisance cardiaque chronique (Weinberg 2003), la fibrose pulmonaire idiopathique (Tajima 2003), la polyarthrite rhumatoïde (Kuroiwa 2001), l'asthme et l'inflammation allergique des voies respiratoires (Oshikawa 2001). Cependant, l'analyse par électrophorèse bidimensionnelle et spectrométrie de masse de la protéine sST2 purifiée chez les patients récidivant a montré que ces patients semblaient bien exprimer l'isoforme normal de sST2. Nous n'avons malheureusement pu réaliser ces expériences que sur deux patients puisqu'elle nécessite de pouvoir purifier une grande quantité de sST2 et donc un volume important de sérum ou de plasma. Nous avons tenté d'effectuer cette analyse chez un sujet allergique exprimant des taux importants de sST2 circulant, mais de la même façon, les quantités de protéines obtenues après purification se sont révélées insuffisantes pour permettre une analyse par spectrométrie de masse. Cependant, le profil obtenu sur gel bidimensionnel était très similaire à celui obtenu chez les patients SNI récidivant (**Figure 14**).

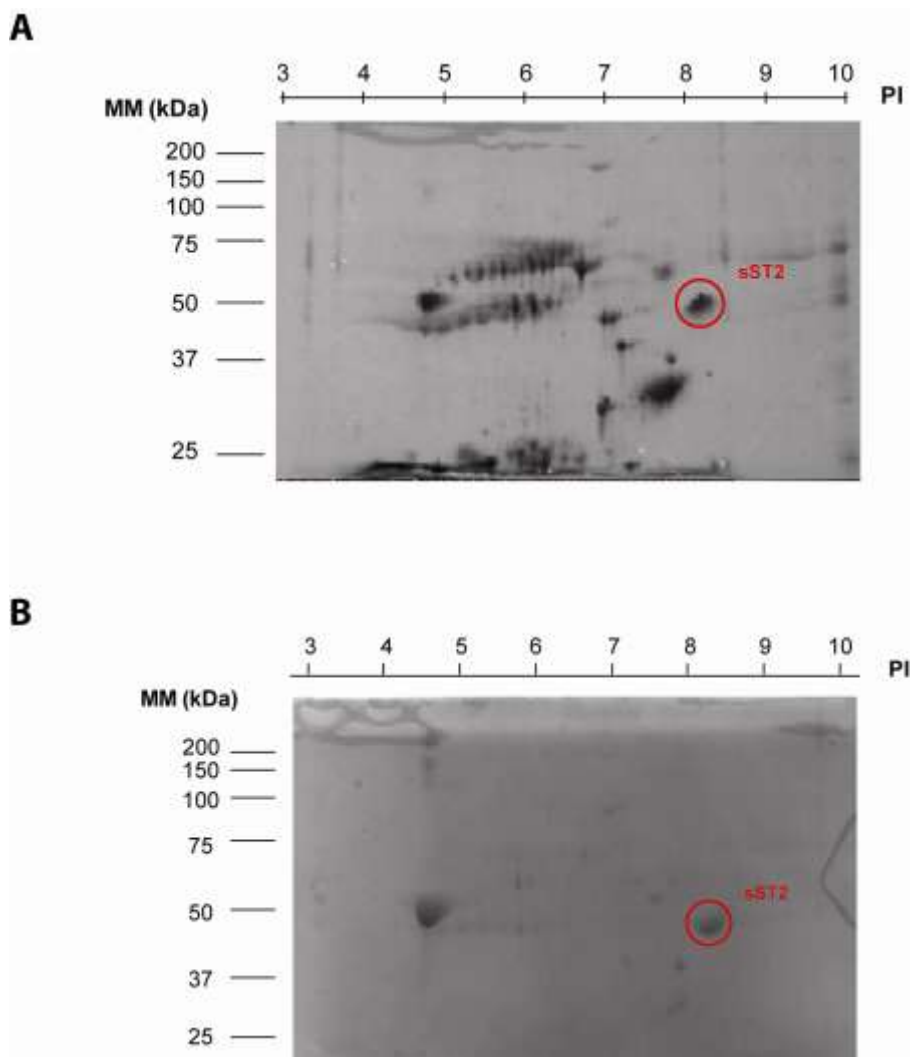


Figure 14 : Analyse bidimensionnelle de l'éluat de colonne anti-sST2 effectuée à partir du sérum d'un patient SNI récidivant (A) ou d'un patient allergique (B). L'intensité obtenue sur le gel B est plus faible que sur le A car le volume de sérum initial était beaucoup moins important.

Nous avons ensuite cherché à savoir si la protéine sST2 était capable de porter atteinte à la barrière de filtration glomérulaire, et en particulier aux podocytes, pour induire le développement d'une protéinurie néphrotique. Nous avons pour cela utilisé un test d'activité *in vitro* basé sur l'utilisation de la lignée de podocytes murins immortalisés développée par P. Mundel (Mundel 1997b). Nous avons ainsi montré que l'incubation de ces cellules avec les sérums de patients présentant une récurrence de SNI provoquait des lésions podocytaires importantes caractérisées par un réarrangement du cytosquelette d'actine autour des noyaux et une raréfaction des points d'ancrage de ces cellules à leur matrice, qui

conduit finalement au détachement des podocytes, confirmant ainsi les résultats obtenus dans une étude récente de Hattori (Hattori 2008). En revanche, les sérums des patients SNI ne récidivant pas ou des patients protéinuriques d'une autre origine n'ont pas permis d'induire de telles lésions. Ceci montre l'intérêt d'utiliser cette lignée podocytaire comme outil pour la recherche du facteur de perméabilité et de son mécanisme d'action. Il faut cependant noter que ce test d'activité a une sensibilité limitée puisque seulement 70% des sérums de patients récidivant testés ont permis d'induire des lésions podocytaires. C'est d'ailleurs également le cas dans l'étude de Hattori, dans laquelle sur 6 sérums de patients récidivant testés, seulement 3 ont permis d'induire un détachement podocytaire. Cependant, cette activité est retrouvée exclusivement chez les patients récidivant et est totalement absente dans les autres groupes, ce qui montre la spécificité de ce test. Nous avons donc utilisé ce système pour tester l'activité de la protéine sST2 purifiée à partir des sérums capables d'induire des lésions podocytaires *in vitro*, et avons montré que cette protéine seule n'était pas capable de reproduire ces dommages. Cette absence d'activité ne semble pas être due à une dégradation de sST2 lors du processus de purification puisque sa présence dans les éluats de colonne a été vérifiée par ELISA. De plus, il ne peut pas s'agir d'une perte de son activité liée à l'utilisation d'un tampon d'élution acide, étant donné que les sérums déplétés pour sST2 conservent leur activité sur la lignée podocytaire, suggérant que le facteur « toxique » est conservé dans le sérum après adsorption de sST2.

Nous avons cherché à confirmer ces résultats *in vivo* chez le rat, d'une part par injection d'un AAV (*Adeno-Associated Virus*) codant pour la protéine sST2 humaine, et d'autre part, pour exclure tout effet dû à la barrière d'espèces, par injection intra-artérielle de la protéine sST2 purifiée chez des rats sains (Lewis 1W) ou néphrotiques (Buffalo/Mna). Aucune de ces expériences n'a permis d'induire une augmentation de la protéinurie des animaux injectés, ce qui confirme que la protéine sST2 seule n'est pas capable d'agir en tant que facteur de perméabilité pour induire le développement de lésions glomérulaires et/ou d'une protéinurie néphrotique.

Il semble donc que l'augmentation des taux de sST2 circulant au cours de la récive du SNI ne soit pas à l'origine de la maladie, mais serait plutôt un reflet de la polarisation Th2 atypique observée chez ces patients. L'augmentation de sST2 pourrait être liée à une tentative de l'organisme de contrecarrer l'activation Th2. En effet, alors que la protéine membranaire ST2L est un médiateur de l'activation des cellules Th2, le récepteur soluble

sST2 est au contraire impliqué dans l'atténuation de ces réponses (Kakkar 2008). D'un point de vue moléculaire, la liaison du récepteur ST2L présent à la surface des cellules Th2 à son ligand, l'IL-33 (ou NF-HEV pour *Nuclear Factor from High Endothelial Venules*), provoque une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à l'activation des cellules Th2 (Kakkar 2008). La protéine sST2 agit quant à elle en tant que « decoy receptor », qui se lie à l'IL-33 circulant pour bloquer son interaction avec ST2L et ainsi inhiber l'activation Th2 (Trajkovic 2004). Nous avons cherché à mesurer les concentrations sériques d'IL-33 chez les patients présentant une récurrence de SNI, mais les niveaux obtenus étaient très faibles, et dans la majorité des cas même indétectables. Il est possible que ceci soit dû à la séquestration de l'IL-33 par sST2. En effet, ce phénomène a déjà été suggéré dans une étude au cours de laquelle la pré-incubation avec la protéine sST2 recombinante de cellules stimulées pour produire de l'IL-33 conduisait à une chute des taux d'IL-33 dans le surnageant de culture (Sanada 2007).

Le système IL-33/ST2 semble être impliqué dans une variété de pathologies telles que des désordres inflammatoires (asthme, allergies respiratoires, urticaire), des maladies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde en particulier) et des désordres cardiovasculaires (infarctus du myocarde, athérosclérose) (pour revue, voir (Kakkar 2008)). L'IL-33 est une protéine relativement atypique puisqu'elle peut agir à la fois comme cytokine et comme facteur de transcription (Carriere 2007). Elle est normalement détectée en association à la chromatine dans les noyaux des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, ainsi que dans les cellules épithéliales des tissus en contact avec l'environnement (peau, tractus gastro-intestinal...) (Moussion 2008). La façon dont cette protéine est sécrétée dans la circulation est encore incertaine. Une étude récente a suggéré qu'elle serait relarguée par les cellules mortes ou mourantes lors du trauma ou de l'infection. Elle fonctionnerait alors comme une sorte de « signal d'alarme » pour alerter le système immunitaire d'un dommage cellulaire ou tissulaire (Moussion 2008). La libération de l'IL-33 conduirait en effet au recrutement et à l'activation de cellules cibles qui co-expriment les formes membranaires et solubles de ST2 (lymphocytes Th2 et mastocytes). Le recrutement de ces cellules et l'activation Th2 induite au cours de ce processus serait alors à l'origine du déclenchement de la boucle de rétrocontrôle négatif impliquant la production de sST2, dans le but de réguler la réponse immunitaire Th2 induite. Ceci pourrait expliquer pourquoi une augmentation des taux sanguins de sST2 est observée en association à différentes pathologies. Il est possible qu'un

phénomène de ce type soit également mis en jeu au cours du développement des lésions glomérulaires dans le SNI. Cependant, l'expression de l'IL-33 n'a jamais été mise en évidence dans les podocytes. De plus, bien que l'IL-33 soit aujourd'hui considéré comme un marqueur moléculaire de l'endothélium, il n'est normalement pas exprimé dans les cellules endothéliales des microcapillaires glomérulaires (Moussion 2008). Son expression a cependant pu être détectée dans les tissus lésés de patients présentant certaines pathologies autoimmunes, telles que la polyarthrite rhumatoïde (synovie) et la maladie de Crohn (intestins) (Carriere 2007, Schmitz 2005). L'analyse de l'expression de l'IL-33 au niveau des glomérules, en particulier chez les patients présentant une récurrence de SNI, pourrait donc permettre de clarifier son rôle dans la polarisation Th2 observée chez ces patients et dans l'augmentation des taux de sST2 au cours de la récurrence.

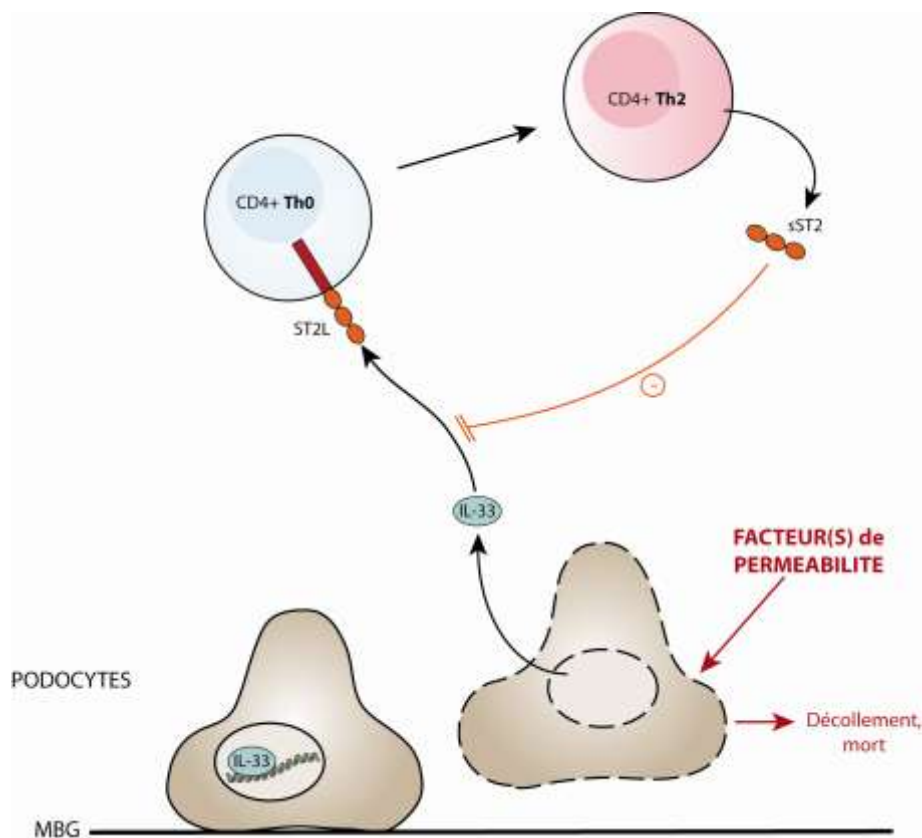


Figure 15 : Hypothèse reprenant certaines observations de la littérature, qui pourrait expliquer la polarisation Th2 observée au cours du SNI.

Les lésions podocytaires pourraient conduire à la libération d'IL-33, qui irait alors se fixer à son récepteur ST2L sur les cellules T CD4+ Th0 pour induire une polarisation Th2. Les cellules Th2 activées seraient alors à l'origine de la sécrétion du récepteur soluble sST2 dans une tentative de réguler négativement l'activation Th2 par fixation à l'IL-33 et ainsi inhibition de sa liaison à ST2L.

Partie 2 : Etude du rôle des immunoglobulines dans la récurrence du syndrome néphrotique idiopathique après transplantation rénale

I. Objectifs de l'étude

Ces dernières années, plusieurs études ont décrit l'existence d'anomalies du système immunitaire au cours du SNI et ont émis l'hypothèse qu'une réponse lymphocytaire T anormale pouvait être à l'origine de la synthèse d'un facteur de perméabilité (pour revue, voir (van den Berg 2004)). Cependant, la majorité de ces travaux concerne les formes de SNI corticostéroïdes sensibles et très peu d'études ont été réalisées sur les formes corticostéroïdes résistantes. De plus, l'hypothèse d'un rôle des lymphocytes T repose essentiellement sur des arguments indirects, en particulier l'effet bénéfique des immunosuppresseurs pour les formes corticostéroïdes sensibles, ce qui ne s'applique pas au SNI corticostéroïdes résistant. Bien que cette résistance aux corticostéroïdes et aux autres traitements immunosuppresseurs puisse refléter des mécanismes impliquant des sous-populations de lymphocytes T non modulables par ces traitements, la simple hypothèse d'une origine lymphocytaire T ne semble pas suffisante pour expliquer la pathogenèse du SNI corticostéroïdes résistant et sa récurrence après transplantation rénale. En particulier, l'hypothèse de l'implication de lymphocytes B à l'origine de la sécrétion d'un anticorps ayant pour cible une protéine glomérulaire n'est pas à exclure. En effet, bien que cela ait été peu étudié, une expansion de la population lymphocytaire B a été rapportée au cours des poussées de SNI. De plus, la diminution des IgG et l'augmentation des IgM pendant les poussées suggèrent un trouble de la coopération T/B (Cheung 2004, Kemper 2002). L'implication des cellules B semble également confortée par les cas de rémission du SNI rapportés après traitement au Rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20 qui a pour effet une déplétion quasi-complète des lymphocytes B (Bagga 2007, Gossman 2007, Hristea 2007, Nakayama 2008, Nozu 2005, Pescovitz 2006, Suri 2008), bien qu'il n'existe pas encore d'étude à large échelle pour ce traitement. De plus, malgré l'absence de dépôt d'immunoglobuline sur le greffon au cours de la récurrence du SNI, l'engagement d'une ou plusieurs Ig est fortement suggéré par l'effet bénéfique des immunoadsorptions du plasma sur colonnes de Protéine A ou sur colonnes anti-Ig humaines (Dantal 1994, Dantal 1998). Un tel phénomène a déjà été observé pour le syndrome

néphrotique congénital finlandais, au cours duquel la production d'anticorps ayant pour cible la forme normale de la néphrine apportée par le greffon (néoantigène) peut conduire à une récurrence du syndrome néphrotique, et ce malgré l'absence de dépôt d'Ig sur le rein (Patrakka 2002). Ceci n'a cependant pas été retrouvé dans d'autres formes génétiques du SNI, notamment dans les cas de mutation de la podocine (Becker-Cohen 2007) et dépend fortement de la nature de la mutation (non-sens, faux-sens, aboutissant ou non à la production d'une protéine tronquée ou à l'absence de la protéine).

Au cours de ce travail, nous avons donc cherché à déterminer si les patients présentant une récurrence de SNI après transplantation rénale possédaient une ou plusieurs immunoglobulines dirigées contre des protéines rénales normales, grâce au screening d'une banque lambda d'ADNc de reins à l'aide de sérums de patients (technique du SEREX).

II. Méthodologie : la technique du SEREX (SErological analysis of antigens by Recombinant EXpression cloning) (Figure 18)

Patients

Quatre groupes de patients ont été inclus dans cette étude : un groupe de patients présentant un SNI corticorésistant récidivant après transplantation rénale (« SNI récidive »), un groupe de patients présentant un SNI corticorésistant sans récidive après transplantation (« SNI non-récidive »), un groupe de patients contrôles présentant un rejet chronique d'allogreffe de rein (« non-SNI ») et un groupe de volontaires sains (« sains »). L'immunoscreening de la banque a été effectué à partir de pools de trois sérums pour chacun des groupes.

Les patients du groupe « SNI récidive » ont été sélectionnés sur la base d'une protéinurie immédiate après transplantation rénale supérieure à 3g/jour, et avec une réponse positive au traitement par échanges plasmatiques. Au contraire, les patients du groupe « SNI non-récidive » n'ont jamais développé de protéinurie après la greffe. Les sérums de ces deux groupes de patients ont été prélevés avant la transplantation afin d'éviter les effets liés à l'alloimmunisation. Le groupe « non-SNI » est constitué de patients transplantés rénaux pour une pathologie rénale autre qu'un syndrome néphrotique, et qui ont développé une glomérulopathie d'allogreffe vérifiée histologiquement, avec la présence d'anticorps anti-donneurs et des dépôts de C4d. Les patients de ce groupe présentaient une protéinurie supérieure à 2g/jour au moment du prélèvement. Ce groupe est un contrôle important puisqu'il constitue à la fois un « contrôle négatif » vis-à-vis du groupe « SNI récidive » (traitements similaires, niveaux de protéinurie équivalents), mais qu'il peut également être utilisé comme « contrôle positif » de la technique et pour l'étude de l'alloréactivité, puisqu'il s'agit de sérums prélevés post-transplantation.

Présentation de la banque

Ce travail a été effectué à partir d'une banque commerciale d'ADNc de reins humains intégrés dans le système d'expression Uni-ZAP XR (*Stratagene*). Cette banque a été construite à partir de 8 reins d'hommes et de femmes caucasiens ayant entre 24 et 55 ans. Les fragments d'ADNc synthétisés à partir de l'ARNm extrait de ces reins ont été insérés dans le vecteur Uni-ZAP XR au sein du phagemide pBluescript SK- (**Figure 16**). L'insertion se situe au niveau du gène de la β -galactosidase, sous le contrôle du promoteur LacZ, ce qui permet l'induction de l'expression protéique grâce à l'IPTG. De plus, le polylinker au niveau duquel se fait l'insertion est flanqué par les promoteurs T3 et T7 qui peuvent ensuite être utilisés pour le séquençage des inserts (**Figure 17**). Le phagemide est empaqueté dans un bactériophage lambda pour permettre l'expression de la banque dans les lignées de bactéries *E. coli* XL-1 Blue MRF'.

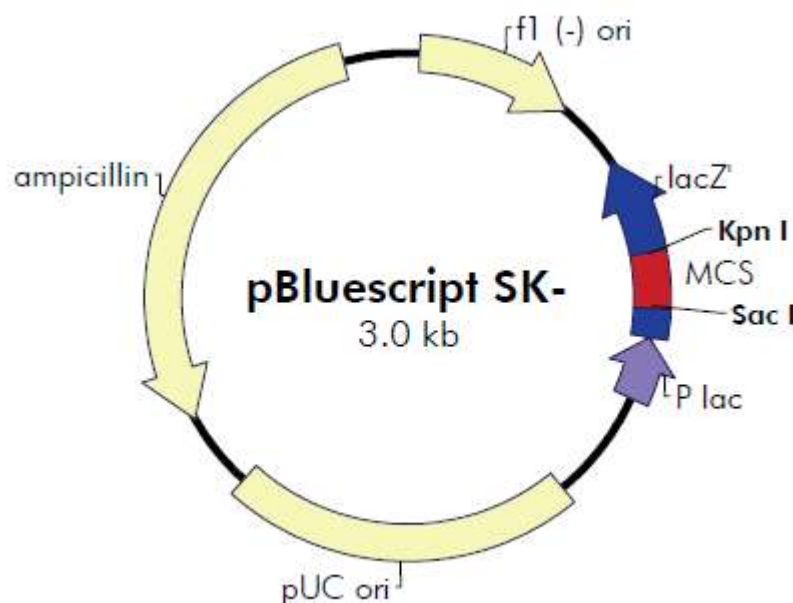


Figure 16 : Représentation du phagemide pBluescript SK-. P lac : Promoteur LacZ ; MCS : Site de clonage multiple, au niveau duquel se fait l'insertion des fragments d'ADNc ; LacZ' : Fragment α de la séquence codante de la β -galactosidase ; f1 (-) ori : Origine de réplication du bactériophage f1 ; ampicillin : gène de résistance à l'ampicilline ; pUC ori : Origine de réplication procaryote.

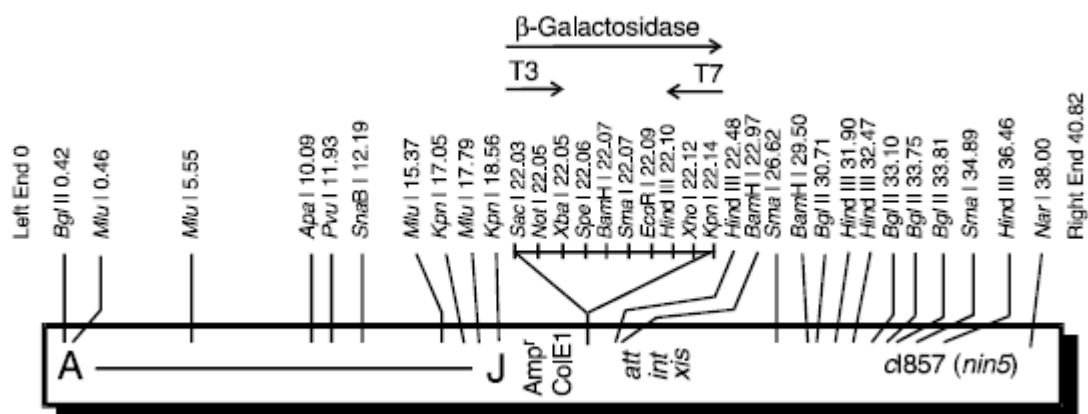


Figure 17 : Représentation du vecteur d'insertion Uni-ZAP XR.

Préparation des échantillons de sérum

Les sérums utilisés pour le screening ont été préabsorbés sur un lysat de bactéries *E.coli* et de phages (*Stratagene*) afin d'éliminer les anticorps réactifs contre des antigènes relatifs au système d'expression. Les IgG sériques ont ensuite été purifiées sur Protéine G, afin de limiter le bruit de fond. Pour cela, les pools de trois sérums de chaque groupe ont été passés sur une colonne de Protéine G (*Amersham*), et après lavage au PBS, les IgG retenues ont été éluées à la glycine 0,1M, puis dosées par mesure de la DO à 280 nm. L'éluat obtenu a ensuite été neutralisé au Na_2HPO_4 afin d'obtenir un pH = 7.0 et de procéder à l'étape d'immunoscreening de la banque.

Immunoscreening de la banque

Screening primaire

Pour le screening primaire de la banque, 600 μL de bactéries XL-1 Blue MRF' à une DO_{600} de 0.5 ont été mises en présence de 5.0×10^4 pfu de banque et étalées sur des boîtes NZY agar (0.5% NaCl, 0.2% MgSO_4 , 0.5% extrait de levure, 1% NZ amine, 1.5% agar, pH 7.5). Pour chaque groupe testé, 20 boîtes ont ainsi été réalisées afin de s'assurer que chaque protéine de la banque soit exprimée au moins une fois (ce qui représente en tout 1.0×10^6 pfu de la banque de départ). Les boîtes sont ensuite incubées à 42°C jusqu'à ce que les

plages de lyse, contenant chacune un clone de bactériophage de la banque, apparaissent (environ 4h). Des disques de nitrocellulose prétraités à l'IPTG 10 mM afin d'induire l'expression protéique sont appliqués sur chacune des boîtes, puis l'ensemble est incubé pendant 3h à 37°C afin que se fasse l'expression et le transfert des protéines sur la nitrocellulose. Les filtres de nitrocellulose sont ensuite récupérés, lavés dans le PBS – Tween 0.1% (PBST) afin d'éliminer toute trace d'agar et saturés pendant 1h à température ambiante dans le PBST - Lait 5%. Ils sont ensuite incubés sur la nuit à 4°C avec les échantillons d'IgG purifiées, à une concentration finale de 2 µg/mL dans le tampon de saturation. Après trois lavages dans le PBST, les disques de nitrocellulose sont incubés 1h à température ambiante avec un anticorps secondaire anti-IgG humaines couplé à la peroxidase (*Jackson ImmunoResearch*), et après trois nouveaux lavages, les protéines de la banque reconnues par des IgG sont révélées à l'ECL (*Amersham*). Les plages de lyse apparaissant positives ont été découpées sur les boîtes agar et récupérées dans 500 µL de tampon SM (0.6% NaCl, 0.2% MgSO₄, Tris-HCl 0.05M, 1% gélatine) contenant 20 µL de chloroforme, afin de relarguer les clones de bactériophage qu'elles contiennent.

Screening secondaire

Il est toujours nécessaire de procéder à un screening secondaire puisque la proximité des plages de lyse ne permet pas de récupérer des clones isolés, et puisque des « faux-positifs » sont souvent récupérés à cette étape. Pour cela, un protocole similaire à celui du screening primaire est utilisé, où la banque de départ est remplacée par la solution de bactériophage récupérée pour chaque plage positive, diluée au 1/300 dans le tampon SM.

Excision *in vivo* des phagemides sélectionnés

Une fois les clones positifs isolés, les phagemides pBluescript SK- qu'ils contiennent sont excisés à l'aide d'un phage helper ExAssist dans une lignée bactérienne E.coli SOLR. Pour ce faire, 200 µL de bactéries XL-1 Blue MRF' à une DO₆₀₀ de 1.0 sont mises en présence de 250 µL du bactériophage d'intérêt isolé et de 1 µL du phage helper ExAssist, et le tout est incubé dans 3 mL de milieu LB (1% NaCl, 1% tryptone, 0.5% extrait de levure, pH 7.0) supplémenté avec 0.01 M de MgSO₄ et 6 mM de maltose, pendant 3h à 37°C sous agitation. La culture récupérée est chauffée pendant 20 min à 70°C afin de lyser les bactéries et les

particules phagiques puis centrifugée 15 min à 1000 g pour éliminer les débris cellulaires. 100 µL du surnageant contenant les phagemides pBluescript excisés empaquetés en particules de phages filamenteux ExAssist, sont alors mélangés à 200 µL de bactéries SOLR (à une DO₆₀₀ de 1.0). 1 µL de ce mélange est ensuite étalé sur des pétris de LB agar contenant 0.1 mg/mL d'ampicilline et incubé sur la nuit à 37°C. Seules les bactéries qui ont intégré le phagemide peuvent former des colonies. Le phage helper ExAssist contient une mutation *Ambre* qui empêche la réplication de son génome dans la lignée non-suppressive SOLR. Les colonies formées contiennent donc uniquement le phagemide pBluescript SK- excisé.

Purification des phagemides et séquençage

Pour chaque clone sélectionné, une colonie de SOLR contenant le phagemide excisé est mise en culture dans 3 mL de LB supplémenté sur la nuit à 37°C. Le lendemain, les bactéries sont récupérées et le phagemide qu'elles contiennent est purifié à l'aide du kit Nucleospin® Plasmid (*Macherey-Nagel*) selon les instructions du fabricant.

Le séquençage de l'insert d'ADNc de chaque phagemide a ensuite été réalisé à la plateforme OUEST-genopole génotypage / séquençage de l'IFR26. 300 ng de chaque phagemide ont été séquencés à l'aide des amorces T7 PROM (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') et T3 (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3') qui se fixent respectivement sur les promoteurs T7 et T3 qui encadrent le site d'insertion de l'ADNc.

ELISA

Les puits d'une plaque 96 puits à fond plat sont coatés avec la protéine recombinante d'intérêt à 5 µg/mL, sur la nuit à 4°C : protéine GSTT1 humaine recombinante ou protéine IκB-ε humaine recombinante (*Tebu-Bio*). Une saturation est ensuite effectuée par 6 lavages avec 100 µL / puits de tampon de saturation (PBS – 0.5% gélatine – 0.05% tween). Chaque sérum testé est ensuite incubé (50 µL par puits) pendant 2h à température ambiante. Après trois lavages avec le tampon de saturation, l'anticorps secondaire anti-IgG humaines couplé à la peroxidase (*Jackson ImmunoResearch*) est déposé dans chaque puits, après dilution au 1/1000 dans le tampon de saturation. Les anticorps non-fixés sont ensuite lavés trois fois au

PBS froid et le signal est révélé grâce au substrat de la peroxidase ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)), suivi d'une lecture de la DO à 405 nm.

Génotypage pour GSTT1

L'ADN génomique a été isolé à partir du sang des patients selon le protocole suivant : 3 mL de sang ont été prélevés chez chaque patient et les PBL ont été lavés trois fois 10 min sur glace dans 50 mL de TE (Tris 10 mM pH 7.4, EDTA 1 mM pH 8.0). Après centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min à 4°C, les PBL ont été lysés pendant une nuit à 55°C dans 1 mL de solution de lyse (0.2 M NaCl, 0.1 M Tris (pH 8.3), 0.2% SDS, 5 mM EDTA, 100 µg/mL Protéinase K). Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation à 13 000 rpm pendant 5 min, et l'ADN génomique a été précipité à partir de 400 µL du surnageant à l'aide du même volume d'isopropanol. Après centrifugation pendant 5 min à 13 000 rpm, le culot d'ADN génomique a été lavé dans 300 µL d'éthanol 70%, puis séché à l'air libre. L'ADN ainsi obtenu a enfin été resuspendu dans 100 µL de TE.

Des réactions PCR multiplex ont été effectuées à partir de 100 ng d'ADN génomique pour chaque patient à l'aide du kit « Herculanse® II Fusion Enzyme With dNTPs Combo » (Stratagene) selon les recommandations du fournisseur. Les conditions de PCR utilisées étaient 95°C pendant 2 minutes, suivies de 30 cycles à 95°C pendant 20 secondes, 68°C pendant 20 secondes et 72°C pendant 30 secondes. Les primers utilisés étaient 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' et 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3' pour le gène GSTT1, ainsi que 5'-GCCCTCTGCTAACAAGTCCTA-3' et 5'-GCCCTAAAAAGAAAATCGCCAATC-3' pour le gène de l'albumine qui permet de contrôler que la PCR a correctement fonctionné. Les produits de PCR ont ensuite été analysés sur gel d'agarose 1.5% (**Figure 21.B**).

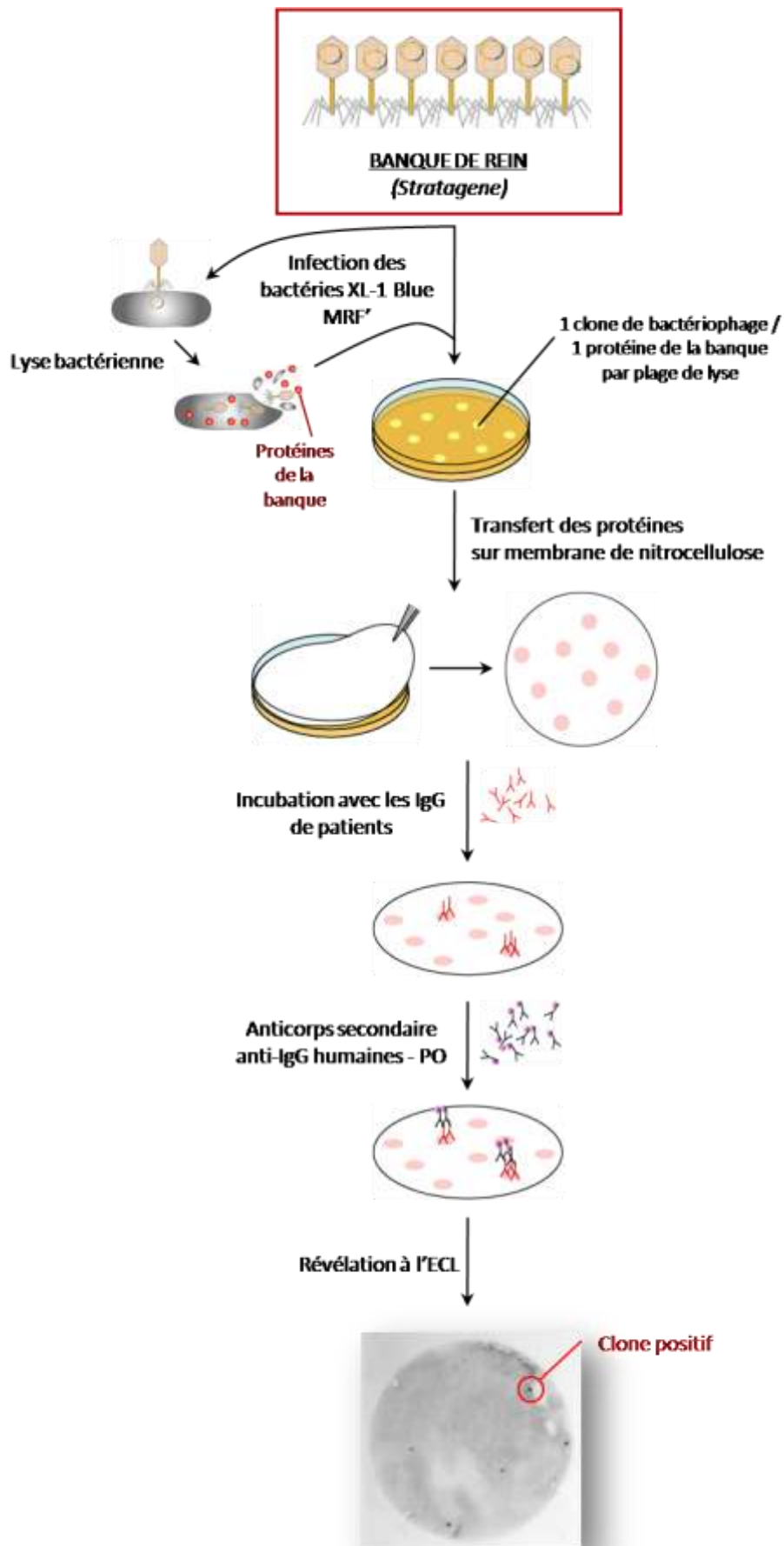


Figure 18 : Représentation schématique de la technique du SEREX.

III. Résultats obtenus

- *Analyse des antigènes rénaux reconnus par des IgG chez les patients présentant une récurrence de SNI après transplantation rénale.*

L'existence d'éventuelles immunoglobulines G ayant pour cible des protéines rénales chez les patients présentant une récurrence de SNI après transplantation a été étudiée grâce à la technique du SEREX. Après immunoscreening primaire de la banque, 114 clones positifs ont été sélectionnés (**Figure 19.A**). Cependant, l'immunoscreening secondaire de ces clones a conduit à l'élimination de 93 clones « faux-positifs » (**Figure 19.B**) et à la sélection de 21 clones réellement reconnus par des IgG (**Figure 19.C**).

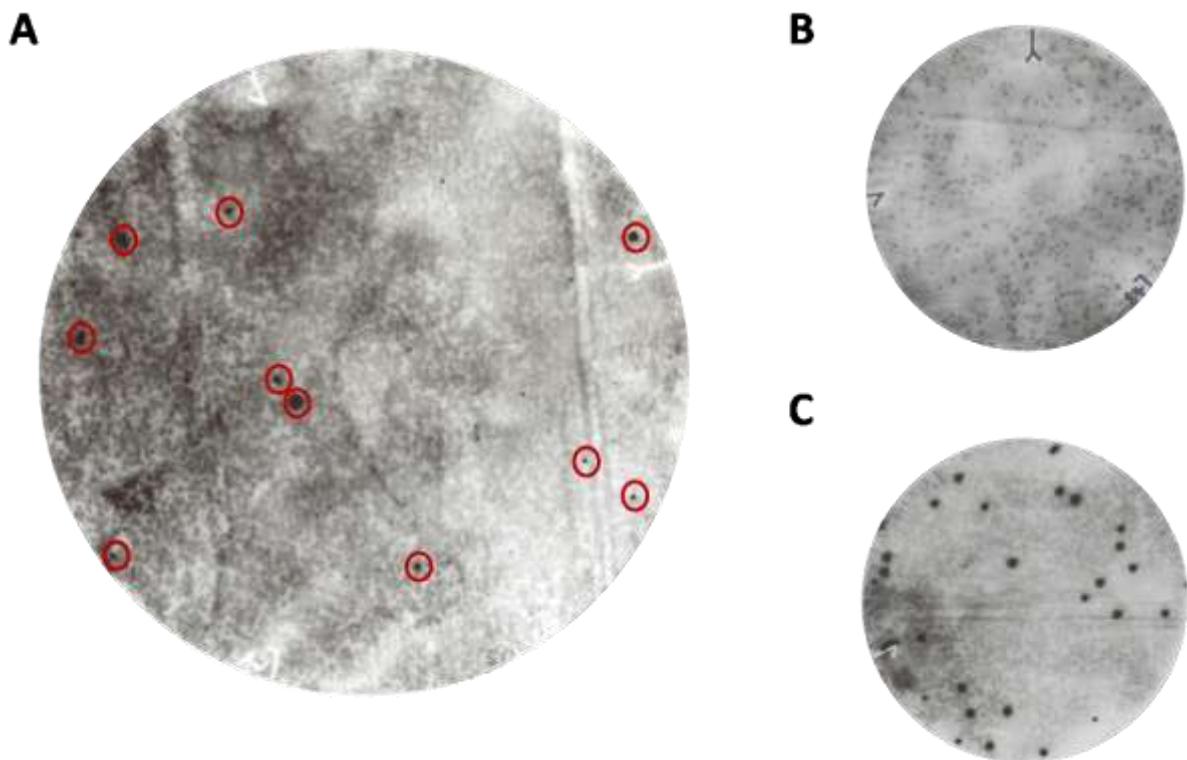


Figure 19 : Exemples obtenus par SEREX après immunoscreening primaire (A) et secondaire pour un clone « négatif » (B) ou « positif » (C). Les spots positifs sélectionnés après le screening primaire sont entourés en rouge.

Après purification et excision *in vivo* des phagemides sélectionnés, les inserts d'ADNc qu'ils contiennent ont été séquencés. La comparaison des séquences obtenues avec la base de données GenBank a révélé que ces 21 clones codaient en fait pour 6 protéines différentes, regroupées dans le **tableau 6**.

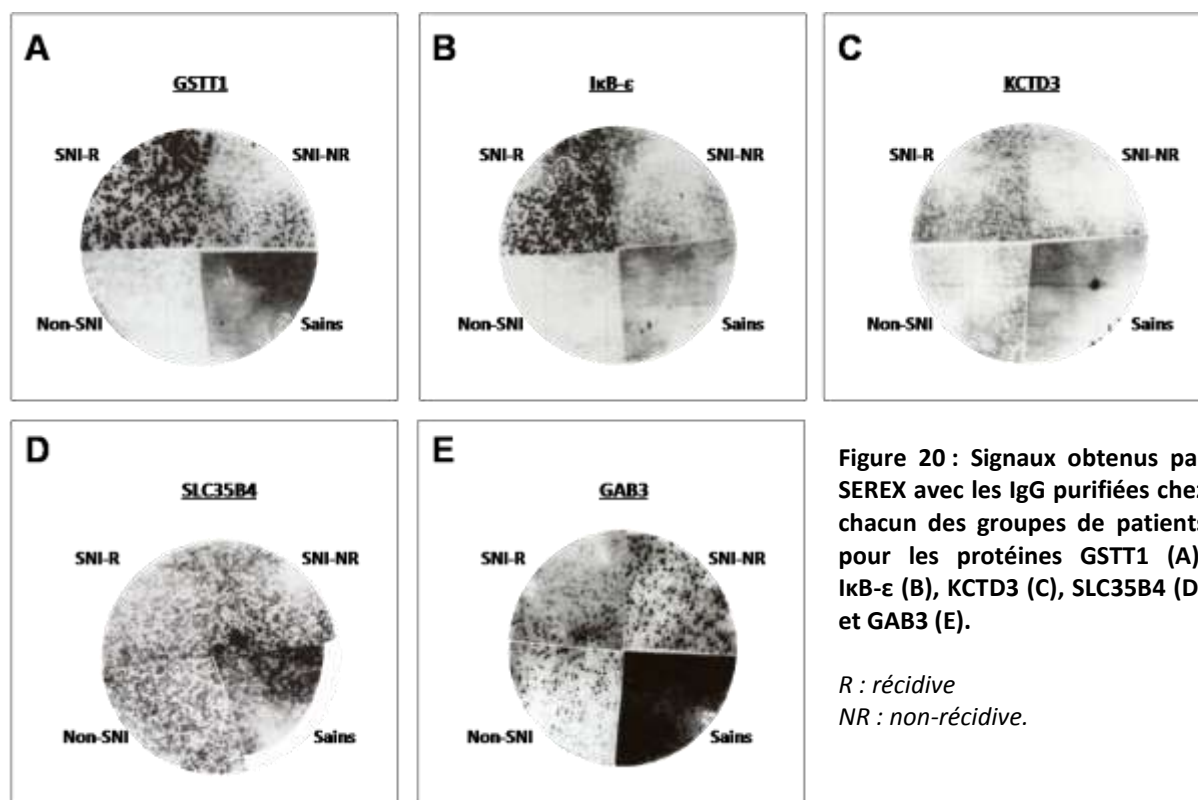
NOMBRE DE CLONES	PROTEINE CORRESPONDANTE	NOM COMPLET	GENE ID
11	IGHG3	<i>Immunoglobulin heavy constant gamma 3</i>	3502
4	SLC35B4	<i>Solute carrier family 35, member B4</i>	84912
2	GSTT1	<i>Glutathione-S-transferase, theta 1</i>	2952
1	KCTD3	<i>Potassium channel tetramerisation domain containing 3</i>	51133
1	GAB3	<i>GRB2-associated binding protein 3</i>	139716
2	IκB-ε	<i>NFκB inhibitor, type epsilon</i>	4794

Tableau 5 : Protéines identifiées par la technique du SEREX, grâce au screening d'une banque d'ADNc de reins humains sains par les IgG de patients présentant une récurrence de SNI après transplantation rénale.

Le clone le plus représenté code pour une chaîne d'immunoglobuline (IGHG3). Il s'agit donc d'un faux-positif reconnu directement par l'anticorps secondaire utilisé au cours du screening (anti-IgG humaines – Peroxydase).

Afin de vérifier si les autres protéines sélectionnées sont reconnues uniquement par des anticorps présents spécifiquement chez les patients présentant une récurrence de SNI, des bactéries ont été infectées avec les bactériophages correspondants. Après transfert des protéines, les membranes de nitrocellulose ont été découpées en 4 parts et chaque part a été incubée avec la même concentration d'IgG purifiées dans chaque groupe de patients (« SNI récurrence », « SNI non-récurrence », « non-SNI » et « sains »). Seulement 3 des clones analysés se sont révélés positifs uniquement avec les IgG purifiées chez les patients

récidivant, et ont donc été sélectionnés pour l'étape de validation : GSTT1, IκB-ε, et KCTD3 (Figure 20).



La présence d'anticorps dirigés contre les protéines sélectionnées a été analysée dans les sérums d'un nombre plus important de patients pour chacun des groupes étudiés. Pour cela, des tests ELISA ont été mis au point pour l'analyse des anticorps anti-GSTT1 et anti-IκB-ε présents dans le sérum post-transplantation des différents groupes. Malheureusement, il a été impossible de doser les anticorps dirigés contre KCTD3 du fait de l'absence de protéine KCTD3 recombinante et d'anticorps anti-KCTD3 spécifique. De plus, étant donné qu'il n'existe aucun anticorps humain commercial anti-GSTT1 ou anti-IκB-ε, il n'a pas été possible d'effectuer une gamme étalon et les valeurs obtenues ont été exprimées en unités arbitraires.

Le dosage des IgG ayant pour cible la protéine GSTT1 n'a pas permis de détecter de différence significative entre les quatre groupes de patients (Figure 21.A). La production d'anticorps dirigés contre la protéine GSTT1 est un phénomène qui a été observé soit chez

des patients présentant un génotype *GSTT1 null/null* (c'est-à-dire qui ne produisent pas la protéine GSTT1) lors d'une transfusion, d'une greffe de foie ou de rein à partir d'un donneur *GSTT1 positif*, soit chez des femmes *GSTT1 null/null* enceintes d'un enfant *GSTT1 positif*. Nous avons donc effectué le génotypage des différents patients analysés, et avons ainsi montré que les patients présentant des taux élevés d'IgG anti-GSTT1 avaient tous le génotype *GSTT1 null/null*. Seul l'un des patients de génotype *null/null* n'a pas développé ces anticorps (**Figure 21**).

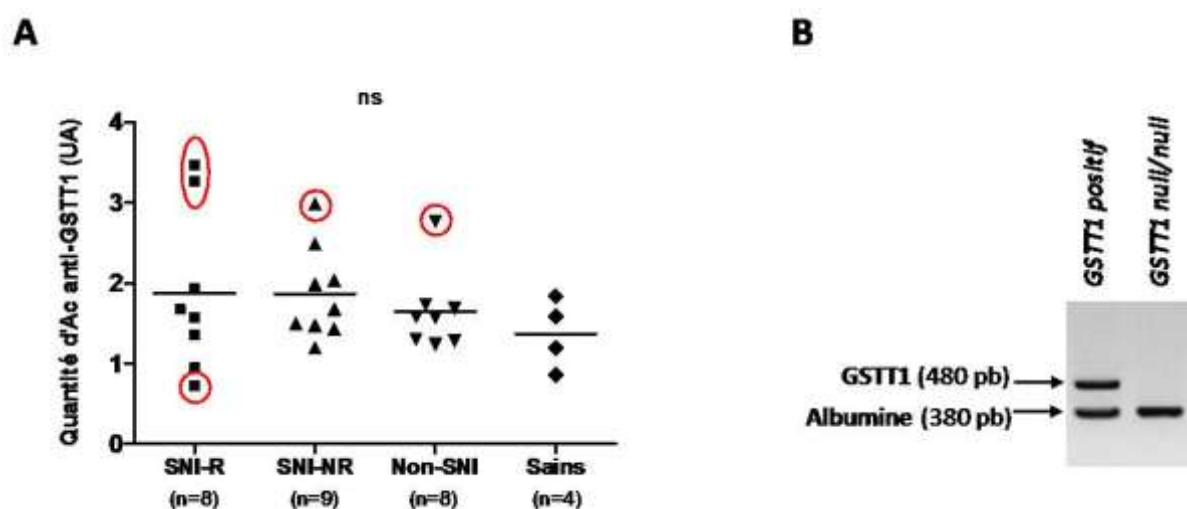


Figure 21 : (A) Dosage par ELISA des IgG ayant pour cible la protéine GSTT1 chez des patients présentant un SNI avec (SNI-R) ou sans (SNI-NR) récurrence après transplantation rénale, des patients protéinuriques transplantés pour une pathologie rénale autre qu'un SNI (Non-SNI) et des donneurs sains (Sains). Les quantités d'IgG sont indiquées en unités arbitraires. Les cercles rouges correspondent aux patients présentant un génotype *GSTT1 null/null*.

(B) Exemple de résultats obtenus pour le génotypage GSTT1 chez un patient présentant un génotype *GSTT1 positif* et un patient présentant un génotype *GSTT1 null/null*. Des fragments des gènes codant pour GSTT1 (480 pb) et pour l'albumine (380 pb) ont été amplifiés par PCR multiplex, et les produits de PCR ont été analysés sur gel d'agarose. Le fragment correspondant au gène de GSTT1 a été amplifié seulement chez le patient présentant un génotype *GSTT1 positif*.

De la même façon que pour GSTT1, aucune différence significative n'a été détectée entre les différents groupes en ce qui concerne la quantité d'IgG ayant pour cible la protéine IκB-ε (**Figure 22**).

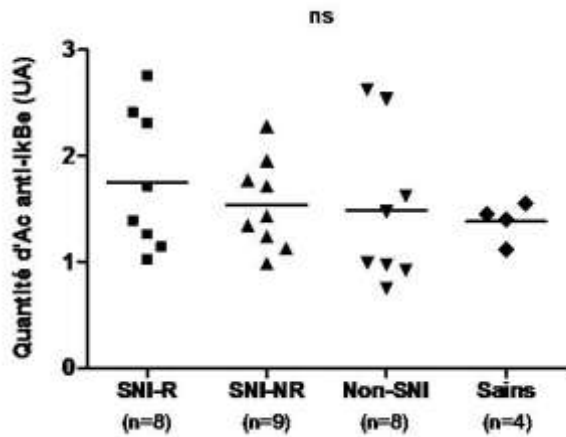


Figure 22 : Dosage des IgG ayant pour cible la protéine IkB- ϵ chez des patients présentant un SNI avec (SNI-R) ou sans récurrence (SNI-NR) après transplantation rénale, des patients protéinuriques transplantés pour une pathologie rénale autre qu'un SNI (Non-SNI) et des donneurs sains (Sains).

Les quantités d'IgG sont indiquées en unités arbitraires.

- Analyse des antigènes rénaux reconnus par des IgG chez les patients présentant un SNI sans récurrence après transplantation rénale.

De la même façon que pour le groupe de patients présentant une récurrence de SNI, la présence d'IgG chez les patients présentant un SNI sans récurrence après transplantation a été étudiée par SEREX. L'immunoscreening primaire a conduit à la sélection de 75 clones, dont 66 « faux-positifs » qui ont été éliminés après l'immunoscreening secondaire et 9 « vrais » positifs qui ont été retenus. Le séquençage des inserts d'ADNc correspondants et la comparaison des séquences obtenues dans la base de données GenBank a permis de déterminer que ces 9 clones codaient pour seulement deux protéines différentes : 5 clones pour IGHG3 (*Immunoglobulin heavy constant gamma 3*) et 4 clones pour SLC35B4 (*Solute carrier family 35, member B4*). Comme précédemment, la protéine IGHG3 est une chaîne d'immunoglobuline révélée de façon aspécifique par l'anticorps secondaire utilisé lors de l'immunoscreening. La protéine SLC35B4 a également été détectée par les IgG des patients des trois autres groupes, et n'a donc pas été retenue pour une analyse ultérieure.

IV. Discussion

Au cours de ce travail, nous avons cherché à savoir si les patients présentant une récurrence du SNI possèdent une ou plusieurs immunoglobulines G ayant pour cible des protéines rénales susceptibles de porter atteinte à la barrière de filtration glomérulaire. Pour cela, nous avons employé la technique du SEREX (Serological analysis of antigens by Recombinant Expression cloning), habituellement utilisée pour la recherche d'anticorps anti-tumoraux (Lee 2007).

L'immunoscreening de la banque d'expression des protéines rénales à l'aide des sérums pré-transplantation de trois patients récidivant a permis de mettre en évidence trois protéines cibles d'IgG présentes chez ces patients : la GSTT1 (*Glutathione-S-Transférase, thêta 1*), I κ B- ϵ (*NF κ B inhibitor, type epsilon*) et KCTD3 (*Potassium Channel Tetramerisation Domain Containing 3*).

La GSTT1 est une enzyme de la superfamille des Glutathione-S-Transferases, qui prend part à la détoxification de différents composés électrophiles (tels que les espèces réactives de l'oxygène) en les conjuguant au glutathione (Hayes 1995). Elle est essentiellement détectée dans le foie, les reins et les érythrocytes (Juronen 1996). Environ 20% de la population caucasienne présente une délétion du gène GSTT1 qui a pour conséquence une absence totale d'expression de cette protéine (génotype *GSTT1 null/null*) (Pemble 1994). Il a été montré que des individus présentant un tel génotype et polytransfusés à partir de donneurs au génotype *GSTT1 positif* produisaient des anticorps dirigés contre cette protéine (Wichmann 2006). De la même façon, des anticorps anti-GSTT1 ont été détectés chez les femmes *GSTT1 null/null* après gestation d'un enfant *GSTT1 positif*. De façon intéressante, la production d'IgG dirigées contre la protéine GSTT1 a également été rapportée chez des patients *GSTT1 null/null* suite à une transplantation hépatique ou rénale à partir de donneurs *GSTT1 positifs* (Aguilera 2001, Aguilera 2005a). Dans la greffe de foie, il a été suggéré que ces anticorps puissent prendre part à une réaction contre le greffon ayant pour conséquence le développement d'une hépatite *de novo* (Aguilera 2004). En ce qui concerne la greffe de rein, bien que les premières études aient suggéré que la production

d'anticorps anti-GSTT1 n'ait aucune conséquence sur le devenir du greffon (Aguilera 2005b), des travaux plus récents suggèrent qu'ils pourraient être impliqués dans certains cas de rejet humoral (Alvarez-Marquez 2009). Cependant, des anticorps anti-GSTT1 ont également été retrouvés chez des patients présentant une greffe parfaitement fonctionnelle. Bien qu'il soit possible que la sous-classe d'IgG impliquée puisse éventuellement expliquer la différence de réponse obtenue, ceci n'a encore jamais été vérifié et le rôle des anticorps anti-GSTT1 dans le rejet d'allogreffe de rein reste obscur.

L'implication d'immunoglobulines G dirigées contre la protéine GSTT1 dans le développement du SNI semble cependant peu probable. En effet, le dosage des anticorps anti-GSTT1 chez 8 autres patients présentant une récurrence de SNI, 9 patients présentant un SNI sans récurrence, 8 patients non-SNI ayant développé une glomérulopathie d'allogreffe après transplantation et chez 4 volontaires sains n'a pas permis de confirmer la production de ces anticorps spécifiquement dans la récurrence du SNI. De plus, il apparaît que les patients présentant des taux élevés d'anticorps anti-GSTT1 possèdent tous le génotype *GSTT1 null/null*, et la production de ces anticorps semble donc être la conséquence de la transplantation rénale ou d'une transfusion à partir de donneurs *GSTT1 positifs*. En outre, l'étude de la distribution tissulaire de la protéine GSTT1 chez la souris a montré que cette protéine n'était pas présente dans les podocytes, mais était localisée essentiellement, au niveau rénal, dans les cellules épithéliales des tubes collecteurs et dans les cellules mésangiales glomérulaires (Quondamatteo 1998), ce qui ne suggère pas un rôle des anticorps anti-GSTT1 dans le développement des lésions glomérulaires associées au SNI. La production de ces IgG est donc peut-être simplement la conséquence d'un mismatch GSTT1 au cours de la transplantation, sans effet délétère pour le rein.

Il est toutefois intéressant de noter que l'un des patients présentant un génotype *GSTT1 null/null* n'a pas produit d'anticorps anti-GSTT1, et a développé une récurrence de SNI relativement peu « agressive », puisqu'une rémission a pu être maintenue par la suite grâce aux traitements immunosuppresseurs. Il est possible que ce patient ait reçu un rein d'un donneur également *GSTT1 null/null* et n'ait jamais été transfusé à partir d'un individu *GSTT1 positif*. Cependant, il a aussi été rapporté que les individus *GSTT1 null/null* exposés à la protéine GSTT1 ne développaient pas systématiquement ces anticorps (Ardesjo 2008). Pour expliquer cela, il a été suggéré que certains individus pourraient avoir une prédisposition à

réagir contre cette structure allogénique. En particulier, il a été rapporté qu'un phénotype auto-immun pourrait être un facteur de risque pour le développement d'anticorps anti-GSTT1 (Ardesjo 2008). Dans le cas présent, cette observation pourrait être le reflet de l'hétérogénéité des patients présentant un SNI. En effet, bien que la sélection des patients sur la base de la récurrence après transplantation rénale permette à priori de sélectionner les « formes immunes » du SNI, il est probable que des mécanismes différents puissent conduire à une récurrence. Il est possible par exemple que d'éventuelles formes génétiques de syndrome néphrotique encore inconnues et capables de récidiver après transplantation soient incluses dans notre cohorte de patients récidivant, ce qui pourrait biaiser l'analyse. C'est pourquoi il apparaît aujourd'hui essentiel de restreindre au maximum les critères d'inclusion afin de s'assurer d'étudier une population de « formes immunes » aussi homogène que possible (développement d'une protéinurie immédiatement après chaque transplantation, réponse positive aux échanges plasmatiques, pas de rémission ultérieure). Bien que ces critères aient été utilisés lors de la sélection des patients inclus pour l'immunoscreening de la banque, les patients dont les sérums ont été utilisés pour l'étape de validation présentaient des caractéristiques cliniques plus hétérogènes du fait du manque de matériel disponible.

Dans la suite de ce travail, nous avons cherché à vérifier l'existence d'anticorps anti-I κ B- ϵ spécifiquement chez les patients présentant une récurrence de SNI. La protéine I κ B- ϵ est un membre de la famille des inhibiteurs du facteur de transcription NF κ B, dont le mécanisme d'action passe par son interaction avec les sous-unités de NF κ B p65 (RelA) et c-Rel (Whiteside 1997). I κ B- ϵ est une protéine moins ubiquitaire que les autres inhibiteurs de NF κ B, I κ B α et I κ B β , et est hautement exprimée dans la rate, les testicules, les poumons, et dans une moindre mesure dans les reins, le pancréas, le cœur, le placenta et le cerveau. Elle est également retrouvée au niveau du système immunitaire dans les lymphocytes B, les granulocytes et les macrophages. L'existence d'anticorps anti-I κ B- ϵ aurait pu expliquer l'activation de NF κ B anormale observée dans les PBMC des patients au cours des poussées de syndrome néphrotique (Sahali 2002). Cependant, le dosage de ces anticorps chez les patients des trois autres groupes n'a pas permis de confirmer leur production spécifiquement au cours du SNI ou de sa récurrence après transplantation. Il semble donc que

la production d'anticorps anti-IkB- ϵ varie d'un individu à l'autre, et résulte de mécanismes encore inconnus.

Ce travail a également permis de mettre en évidence des immunoglobulines G dirigées contre la protéine KCTD3 (également appelée NY-REN-45) chez les patients présentant une récurrence de SNI. Cette protéine a été identifiée initialement en 1998 grâce à la technique du SEREX, en tant qu'antigène rénal reconnu par des anticorps chez des patients présentant un carcinome rénal (Scanlan 1999). Depuis, elle a été très peu étudiée et il existe donc peu d'informations à son sujet. Le gène *KCTD3* code pour une protéine hautement similaire aux canaux potassiques voltage-dépendants, et il a donc été suggéré qu'elle participerait au transport des ions potassium. Elle est exprimée dans de nombreux tissus, en particulier dans le cerveau, les poumons et les reins. Sa localisation précise au niveau rénal est encore inconnue, mais il est important de noter que contrairement à GSTT1 et à IkB- ϵ , KCTD3 est une protéine membranaire et donc potentiellement une cible directement accessible pour des anticorps. Malheureusement, il existe très peu d'études concernant KCTD3 et pas de protéine KCTD3 recombinante. L'analyse des anticorps anti-KCTD3 par ELISA chez d'autres patients n'a donc pas pu être effectuée. Nous avons réussi à produire la protéine *in vitro* grâce au système d'expression bactérien du SEREX, mais il n'existe qu'un seul anticorps commercial dirigé contre cette protéine et sa spécificité est très médiocre. Il a donc été impossible jusqu'à maintenant de purifier KCTD3. Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour confirmer l'existence d'anticorps anti-KCTD3 spécifiques des patients présentant une récurrence de SNI. Si tel est le cas, des expériences devront être mises en œuvre pour déterminer l'effet pathogène de ces anticorps sur la barrière de filtration glomérulaire.

Globalement, le fait que seulement 5 protéines aient été identifiées après l'immunoscreening montre la sensibilité modérée de la technique du SEREX, en comparaison avec les techniques d'analyse sur puces à protéines. Il est possible que la forte réactivité contre la protéine GSTT1 ait pu masquer d'autres signaux moins intenses, comme cela a déjà été suggéré (Ardesjo 2008). En effet, une quantité fixe d'immunoglobulines est utilisée pour chaque groupe de patients lors du screening, et le fait qu'un ou plusieurs patients du groupe

« SNI-récidive » semblent posséder des taux élevés d'anticorps anti-GSTT1 diminue certainement notre capacité à détecter d'autres anticorps potentiels. Il serait donc intéressant de renouveler ce screening en utilisant uniquement les sérums des patients au génotype *GSTT1 positif*, ou pour lesquels l'absence d'anticorps anti-GSTT1 aura préalablement été vérifiée. Il est intéressant de noter que l'immunoscreening à partir des sérums des patients SNI ne récidivant pas (aucun ne possédait d'anticorps anti-GSTT1) n'a pas mis en évidence d'anticorps spécifiques dirigés contre une protéine rénale chez ces patients.

Cette étude pourrait être complétée par une analyse sur puces à protéines, moins exhaustive que le SEREX, mais probablement plus sensible.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Depuis l'article de Hoyer de 1972 posant pour la première fois l'hypothèse de l'existence de facteurs de perméabilité circulants à l'origine de la pathogenèse du SNI (Hoyer 1972), de nombreuses études se sont focalisées sur la recherche de tels facteurs. Une grande variété de candidats a ainsi été rapportée, aussi bien dans les formes corticosensibles que dans les formes corticorésistantes du SNI. Cependant, les résultats obtenus se sont révélés très disparates, voire contradictoires, et aucun de ces travaux n'a finalement pu aboutir à l'identification d'un facteur de perméabilité réellement impliqué dans le développement du SNI.

La difficulté principale de ces études repose sur l'hétérogénéité de cette population de patients. En effet, malgré des symptômes et des lésions histologiques similaires, il est possible que le SNI corticosensible et le SNI corticorésistant aient une étiologie différente. De la même façon, il est possible que le SNI récidivant après transplantation et le SNI ne récidivant pas aient des origines distinctes. Au cours de ce travail, nous avons donc choisi d'aborder la recherche de facteurs de perméabilité grâce à l'étude d'une population de patients la plus homogène possible, présentant un SNI résistant à tout traitement et développant une récurrence immédiate après transplantation rénale. Cette population « caricaturale » semble la plus susceptible de posséder un facteur de perméabilité préformé du fait de la rapidité de la récurrence, et présente une forme active de la maladie avant et après transplantation. Les patients corticorésistants qui ne développent pas de récurrence après transplantation semblent constituer un groupe contrôle approprié puisqu'ils présentent une forme de SNI similaire avant la greffe, mais une rémission après transplantation, ce qui pourrait suggérer qu'ils ne possèdent pas ou plus de facteur de perméabilité. Cependant, ces patients n'étant pas protéinuriques lors des prélèvements post-transplantation, nous avons choisi d'étudier en parallèle un deuxième groupe contrôle constitué de patients transplantés protéinuriques dont l'atteinte rénale n'est pas liée à un SNI.

La première partie de mon travail a consisté en l'étude d'un facteur de perméabilité potentiel, la protéine sST2. Cette étude a permis de montrer que cette protéine est significativement surexprimée dans le sérum des patients au cours de la récurrence du SNI, ce qui permet d'envisager le dosage de sST2 comme outil diagnostique. Nous souhaiterions effectuer ce dosage à plus large échelle afin de déterminer plus précisément la concentration seuil de sST2 permettant de discriminer les patients présentant une récurrence de SNI des autres patients protéinuriques après transplantation. Ceci pourrait en effet permettre d'envisager ce test comme une alternative à la biopsie rénale dans les situations cliniques ambiguës (récurrences tardives, ou avec un faible niveau de protéinurie).

Malgré cette augmentation des taux de sST2 circulants au cours de la récurrence, nous avons montré que cette protéine n'est pas directement impliquée dans la pathogenèse du SNI et de sa récurrence après transplantation. En effet, la surexpression de la protéine sST2 chez le rat n'a pas conduit au développement d'une protéinurie. De plus, l'incubation d'une lignée de podocytes avec la protéine sST2 purifiée à partir du sérum de patients récidivant n'a pas permis de reproduire les modifications morphologiques induites par les sérums de départ. Ce travail a néanmoins permis de mettre au point un test d'activité *in vitro* intéressant pour la recherche de facteurs de perméabilité. Les techniques utilisées par le passé pour tenter de caractériser ces facteurs étaient basées principalement sur l'injection de sérum ou de fractions sériques à l'animal et sur l'utilisation de glomérules de rats isolés, et posaient le problème de la barrière d'espèce. Le développement récent d'une lignée de podocytes humains immortalisés (Saleem 2002) pourrait permettre de s'affranchir de cette contrainte. Il serait intéressant d'utiliser cette lignée humaine pour tester l'activité des sérums des patients et des éluats de colonnes de Protéine A obtenus après immunoadsorption et tenter ainsi d'isoler le(s) facteur(s) de perméabilité.

Nous avons conclu que l'augmentation des taux sériques de sST2 au cours de la récurrence était probablement un reflet de l'activation Th2 atypique observée chez ces patients. Au vu des récentes publications concernant l'IL-33, ligand de la protéine ST2, nous avons posé l'hypothèse que les podocytes des patients SNI exprimaient peut-être de l'IL-33 intranucléaire, et que cette protéine était relarguée au cours des lésions podocytaires conduisant ainsi au recrutement et à l'activation de lymphocytes Th2. Ce phénomène pourrait expliquer l'activation Th2 anormale rapportée au cours du SNI. Pour vérifier cela,

nous souhaitons maintenant analyser l'expression de l'IL-33 au niveau des glomérules, en particulier chez les patients présentant un SNI.

La seconde partie de mon travail a consisté à mettre au point une technique de biologie moléculaire, le SEREX, afin de déterminer si des immunoglobulines G peuvent prendre part au développement du SNI et de sa récurrence après transplantation. Ce travail a permis d'identifier un candidat intéressant, cible potentielle d'IgG présentes chez les patients récidivant, la protéine KCTD3. Cependant, nous n'avons pas encore pu confirmer ces résultats et approfondir l'étude de KCTD3 du fait du manque d'outils disponibles pour cette protéine, encore très peu décrite. Nous souhaitons maintenant produire et purifier KCTD3 pour mettre au point un test ELISA qui permettra de déterminer si les patients présentant une récurrence de SNI possèdent spécifiquement des IgG dirigées contre cette protéine. Si tel est le cas, nous analyserons l'impact réel de ces anticorps sur le rein, *in vitro* grâce à l'incubation de la lignée podocytaire avec des anticorps anti-KCTD3, et *in vivo* par injection de ces anticorps au rat. L'étude de la distribution de cette protéine au niveau rénal sera également réalisée.

La technique du SEREX n'a permis d'obtenir qu'un faible nombre de candidats, ce qui peut sembler surprenant au vu des résultats obtenus avec cette technique en cancérologie pour la recherche d'anticorps dirigés contre des antigènes tumoraux. Il est possible qu'une réponse humorale majeure dirigée contre un antigène spécifique (tel que GSTT1 ici) dissimule des réactions « secondaires » étiologiquement importantes, comme cela a déjà été suggéré dans une autre étude par SEREX (Ardesjo 2008). De plus, les études basées sur cette technique ont généralement été réalisées à partir de cohortes comprenant une centaine de patients, ce qui permet certainement d'identifier un nombre plus important de protéines cibles. La population de patients présentant une récurrence de SNI étant restreinte, il nous est impossible d'obtenir une cohorte aussi importante. Nous souhaiterions cependant reproduire l'analyse SEREX avec un groupe d'une dizaine de patients, pour lesquels l'absence d'anticorps anti-GSTT1 aura été vérifiée préalablement. Ce travail sera également complété par une analyse de ces échantillons sur puces à protéines, une technique plus sensible quoique moins exhaustive que le SEREX.

L'un des arguments évoqués pour justifier l'implication des lymphocytes B et des immunoglobulines dans le développement du SNI est le fait que des rémissions ont déjà été obtenues après traitement au Rituximab, connu pour provoquer une forte déplétion B. Il faut cependant préciser que le mécanisme d'action de ce traitement n'est pas réellement clair. Une nouvelle hypothèse intéressante propose que l'effet du Rituximab puisse être médié par l'induction de cellules T régulatrices (**Annexe 1**). En effet, des études réalisées chez des patients atteints de néphropathie lupique ont rapporté l'induction de différents types de cellules T CD4+ régulatrices (Treg, Tr1 et Th3) au cours du traitement au Rituximab (Sfikakis 2007, Vigna-Perez 2006). De plus, les capacités suppressives des Tregs étaient significativement augmentées après traitement. Ces résultats ont été confirmés dans une autre étude chez des patients présentant un lupus érythémateux disséminé et traités avec succès au Rituximab (Vallerskog 2007). Cette capacité potentielle des cellules régulatrices à induire une rémission du SNI est également suggérée par notre travail récent sur le rat Buffalo/Mna, un modèle spontané de SNI récidivant après transplantation rénale (**Annexe 2**). Nous avons montré que le traitement par du LF15-0195 (un dérivé de la déoxyspergualine), pouvait induire une rémission complète de la protéinurie de cet animal, accompagnée d'une régression des lésions glomérulaires, et qu'au moins une partie de cet effet passait par l'induction de lymphocytes T CD4+ CD25+ FoxP3+ régulateurs. Il est possible que des lymphocytes T régulateurs puissent agir sur une sous-population immunitaire anormalement activée pour inhiber la sécrétion d'un facteur de perméabilité. Cette hypothèse fera l'objet d'un nouveau projet, dans lequel nous proposons d'analyser les sous-populations T régulatrices avant et après traitement chez les patients SNI traités avec succès au Rituximab. Les capacités suppressives de ces sous-populations seront analysées en parallèle. Nous allons également tester différents traitements capables d'induire des cellules T régulatrices chez le rat Buffalo/Mna. Cette nouvelle approche semble intéressante, puisqu'elle pourrait permettre à terme d'envisager de nouveaux traitements pour le SNI corticorésistant.

Globalement, l'inconvénient majeur auquel nous avons été confrontés au cours de ce travail est encore une fois l'hétérogénéité des patients sélectionnés, et le manque de matériel dû à la rareté de ces patients « caricaturaux ». Malgré le fait que nous nous soyons

limités à l'étude des patients présentant un SNI corticorésistant et récidivant immédiatement après transplantation, qui semblent tous présenter une « forme immune » de SNI, il est probable que différentes étiologies puissent malgré tout être distinguées au sein de ce groupe. Nous ne pouvons exclure par exemple, l'existence de formes génétiques de syndrome néphrotique encore inconnues capables de récidiver après transplantation. Il nous apparaît donc indispensable, malgré le faible nombre de patients concernés, de restreindre la sélection des patients récidivant à ceux qui sont les plus susceptibles de posséder un facteur de perméabilité préformé, c'est-à-dire les patients qui ne développeront pas de rémission ultérieure grâce aux traitements, et pour lesquels les échanges plasmatiques auront un effet bénéfique. De plus, les nombreux progrès réalisés ces dernières années concernant la structure moléculaire et les mécanismes de régulation des podocytes permettront certainement d'envisager prochainement de nouvelles approches pour l'étude de potentiels facteurs de perméabilité, de leurs cibles sur le podocyte, et de leurs mécanismes d'action.

BIBLIOGRAPHIE

- Adamson O., Trachtman H., Tejani A. (1986). "Urinary protein electrophoresis patterns in childhood idiopathic nephrotic syndrome" Int J Pediatr Nephrol **7**(4): 181-6.
- Adler S., Chen X. (1992). "Anti-Fx1A antibody recognizes a beta 1-integrin on glomerular epithelial cells and inhibits adhesion and growth" Am J Physiol **262**(5 Pt 2): F770-6.
- Adler S., Sharma R., Savin V.J., Abbi R., Eng B. (1996). "Alteration of glomerular permeability to macromolecules induced by cross-linking of beta 1 integrin receptors" Am J Pathol **149**(3): 987-96.
- Aguilera I., Wichmann I., Sousa J.M., Bernardos A., Franco E., Garcia-Lozano J.R., Nunez-Roldan A. (2001). "Antibodies against glutathione S-transferase T1 (GSTT1) in patients with de novo immune hepatitis following liver transplantation" Clin Exp Immunol **126**(3): 535-9.
- Aguilera I., Sousa J.M., Gavilan F., Bernardos A., Wichmann I., Nunez-Roldan A. (2004). "Glutathione S-transferase T1 mismatch constitutes a risk factor for de novo immune hepatitis after liver transplantation" Liver Transpl **10**(9): 1166-72.
- Aguilera I., Wichmann I., Gentil M.A., Gonzalez-Escribano F., Nunez-Roldan A. (2005a). "Alloimmune response against donor glutathione S-transferase T1 antigen in renal transplant recipients" Am J Kidney Dis **46**(2): 345-50.
- Aguilera I., Wichmann I., Gentil M.A., Gonzalez-Escribano F., Nunez-Roldan A. (2005b). "Antibodies against the donor antigen glutathione S-transferase T1 after renal transplantation" Transplant Proc **37**(3): 1457-8.
- Ahmad H., Tejani A. (2000). "Predictive value of repeat renal biopsies in children with nephrotic syndrome" Nephron **84**(4): 342-6.
- Ali A.A., Wilson E., Moorhead J.F., Amlot P., Abdulla A., Fernando O.N., Dorman A., Sweny P. (1994). "Minimal-change glomerular nephritis. Normal kidneys in an abnormal environment?" Transplantation **58**(7): 849-52.
- Alvarez-Marquez A., Aguilera I., Gentil M.A., Caro J.L., Bernal G., Fernandez Alonso J., Acevedo M.J., Cabello V., Wichmann I., Gonzalez-Escribano M.F., Nunez-Roldan A. (2009). "Donor-specific antibodies against HLA, MICA, and GSTT1 in patients with allograft rejection and C4d deposition in renal biopsies" Transplantation **87**(1): 94-9.
- Araya C.E., Wasserfall C.H., Brusko T.M., Mu W., Segal M.S., Johnson R.J., Garin E.H. (2006). "A case of unfulfilled expectations. Cytokines in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome" Pediatr Nephrol **21**(5): 603-10.
- Ardesjo B., Hansson C.M., Bruder C.E., Rorsman F., Betterle C., Dumanski J.P., Kampe O., Ekwall O. (2008). "Autoantibodies to glutathione S-transferase theta 1 in patients with primary sclerosing cholangitis and other autoimmune diseases" J Autoimmun **30**(4): 273-82.
- Aro M., Hardwicke J. (1984). "IgG subclass composition of monomeric and polymeric IgG in the serum of patients with nephrotic syndrome" Clin Nephrol **22**(5): 244-52.
- Artero M., Biava C., Amend W., Tomlanovich S., Vincenti F. (1992). "Recurrent focal glomerulosclerosis: natural history and response to therapy" Am J Med **92**(4): 375-83.

- Artero M.L., Sharma R., Savin V.J., Vincenti F. (1994). "Plasmapheresis reduces proteinuria and serum capacity to injure glomeruli in patients with recurrent focal glomerulosclerosis" Am J Kidney Dis **23**(4): 574-81.
- Asanuma K., Mundel P. (2003). "The role of podocytes in glomerular pathobiology" Clin Exp Nephrol **7**(4): 255-9.
- Asanuma K., Kim K., Oh J., Giardino L., Chabanis S., Faul C., Reiser J., Mundel P. (2005). "Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner" J Clin Invest **115**(5): 1188-98.
- Asanuma K., Yanagida-Asanuma E., Faul C., Tomino Y., Kim K., Mundel P. (2006). "Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling" Nat Cell Biol **8**(5): 485-91.
- Aten J., Roos A., Claessen N., Schilder-Tol E.J., Ten Berge I.J., Weening J.J. (2000). "Strong and selective glomerular localization of CD134 ligand and TNF receptor-1 in proliferative lupus nephritis" J Am Soc Nephrol **11**(8): 1426-38.
- Audard V., Lang P., Sahali D. (2008). "[Minimal change nephrotic syndrome : new insights into disease pathogenesis.]" Med Sci (Paris) **24**(10): 853-8.
- Auwaerter P.G., Kaneshima H., McCune J.M., Wiegand G., Griffin D.E. (1996). "Measles virus infection of thymic epithelium in the SCID-hu mouse leads to thymocyte apoptosis" J Virol **70**(6): 3734-40.
- Bagga A., Sharma A., Srivastava R.N. (1997). "Levamisole therapy in corticosteroid-dependent nephrotic syndrome" Pediatr Nephrol **11**(4): 415-7.
- Bagga A., Hari P. (2000). "Levamisole-induced vasculitis" Pediatr Nephrol **14**(10-11): 1057-8.
- Bagga A., Hari P., Moudgil A., Jordan S.C. (2003). "Mycophenolate mofetil and prednisolone therapy in children with steroid-dependent nephrotic syndrome" Am J Kidney Dis **42**(6): 1114-20.
- Bagga A., Sinha A., Moudgil A. (2007). "Rituximab in patients with the steroid-resistant nephrotic syndrome" N Engl J Med **356**(26): 2751-2.
- Bailey E., Bottomley M.J., Westwell S., Pringle J.H., Furness P.N., Feehally J., Brenchley P.E., Harper S.J. (1999). "Vascular endothelial growth factor mRNA expression in minimal change, membranous, and diabetic nephropathy demonstrated by non-isotopic in situ hybridisation" J Clin Pathol **52**(10): 735-8.
- Bakker W.W., Beukhof J.R., van Luijk W.H., van der Hem G.K. (1982a). "Vascular permeability increasing factor (VPF) in IgA nephropathy" Clin Nephrol **18**(4): 165-7.
- Bakker W.W., van der Laan S.M., Vos J.T., Hoedemaeker P.J. (1982b). "The glomerular polyanion (GPA) of the rat kidney. I. Concanavalin-A activated cells affect the glomerular polyanion in vitro" Nephron **31**(1): 68-74.
- Bakker W.W., van Luijk W.H., Hene R.J., Desmit E.M., van der Hem G.K., Vos J.T. (1986). "Loss of glomerular polyanion in vitro induced by mononuclear blood cells from patients with minimal-change nephrotic syndrome" Am J Nephrol **6**(2): 107-11.
- Bakker W.W., Baller J.F., van Luijk W.H. (1988). "A kallikrein-like molecule and plasma vasoactivity in minimal change disease. Increased turnover in relapse versus remission" Contrib Nephrol **67**(31-6).
- Bakker W.W., Borghuis T., Harmsen M.C., van den Berg A., Kema I.P., Niezen K.E., Kapojos J.J. (2005a). "Protease activity of plasma hemopexin" Kidney Int **68**(2): 603-10.

- Bakker W.W., van Dael C.M., Pierik L.J., van Wijk J.A., Nauta J., Borghuis T., Kapojos J.J. (2005b). "Altered activity of plasma hemopexin in patients with minimal change disease in relapse" Pediatr Nephrol **20**(10): 1410-5.
- Banfi G., Colturi C., Montagnino G., Ponticelli C. (1990). "The recurrence of focal segmental glomerulosclerosis in kidney transplant patients treated with cyclosporine" Transplantation **50**(4): 594-6.
- Banfi G., Moriggi M., Sabadini E., Fellin G., D'Amico G., Ponticelli C. (1991). "The impact of prolonged immunosuppression on the outcome of idiopathic focal-segmental glomerulosclerosis with nephrotic syndrome in adults. A collaborative retrospective study" Clin Nephrol **36**(2): 53-9.
- Bargman J.M. (1999). "Management of minimal lesion glomerulonephritis: evidence-based recommendations" Kidney Int Suppl **70**(S3): 16.
- Baum M.A. (2004). "Outcomes after renal transplantation for FSGS in children" Pediatr Transplant **8**(4): 329-33.
- Becker-Cohen R., Bruschi M., Rinat C., Feinstein S., Zennaro C., Ghiggeri G.M., Frishberg Y. (2007). "Recurrent nephrotic syndrome in homozygous truncating NPHS2 mutation is not due to anti-podocin antibodies" Am J Transplant **7**(1): 256-60.
- Belson A., Yorgin P.D., Al-Uzri A.Y., Salvatierra O., Higgins J., Alexander S.R. (2001). "Long-term plasmapheresis and protein A column treatment of recurrent FSGS" Pediatr Nephrol **16**(12): 985-9.
- Beltcheva O., Martin P., Lenkkeri U., Tryggvason K. (2001). "Mutation spectrum in the nephrin gene (NPHS1) in congenital nephrotic syndrome" Hum Mutat **17**(5): 368-73.
- Bernard D.B. (1988). "Extrarenal complications of the nephrotic syndrome" Kidney Int **33**(6): 1184-202.
- Bongers E.M., Gubler M.C., Knoers N.V. (2002). "Nail-patella syndrome. Overview on clinical and molecular findings" Pediatr Nephrol **17**(9): 703-12.
- Boulton Jones J.M., Tulloch I., Dore B., McLay A. (1983). "Changes in the glomerular capillary wall induced by lymphocyte products and serum of nephrotic patients" Clin Nephrol **20**(2): 72-7.
- Boute N., Gribouval O., Roselli S., Benessy F., Lee H., Fuchshuber A., Dahan K., Gubler M.C., Niaudet P., Antignac C. (2000). "NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome" Nat Genet **24**(4): 349-54.
- Brenner B.M., Hostetter T.H., Humes H.D. (1978). "Glomerular permselectivity: barrier function based on discrimination of molecular size and charge" Am J Physiol **234**(6): F455-60.
- Brown C.B., Cameron J.S., Turner D.R., Chantler C., Ogg C.S., Williams D.G., Bewick M. (1978). "Focal segmental glomerulosclerosis with rapid decline in renal function ("malignant FSGS")" Clin Nephrol **10**(2): 51-61.
- Brunner M., Krenn C., Roth G., Moser B., Dworschak M., Jensen-Jarolim E., Spittler A., Sautner T., Bonaros N., Wolner E., Boltz-Nitulescu G., Ankersmit H.J. (2004). "Increased levels of soluble ST2 protein and IgG1 production in patients with sepsis and trauma" Intensive Care Med **30**(7): 1468-73.
- Bulger R.E., Eknayan G., Purcell D.J., 2nd, Dobyan D.C. (1983). "Endothelial characteristics of glomerular capillaries in normal, mercuric chloride-induced, and gentamicin-induced acute renal failure in the rat" J Clin Invest **72**(1): 128-41.
- Burstein D.M., Rodby R.A. (1993). "Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection" J Am Soc Nephrol **4**(6): 1288-93.

- Cameron J.S., Turner D.R., Ogg C.S., Sharpstone P., Brown C.B. (1974). "The nephrotic syndrome in adults with 'minimal change' glomerular lesions" Q J Med **43**(171): 461-88.
- Cameron J.S., Turner D.R., Ogg C.S., Chantler C., Williams D.G. (1978). "The long-term prognosis of patients with focal segmental glomerulosclerosis" Clin Nephrol **10**(6): 213-8.
- Cameron J.S., Senguttuvan P., Hartley B., Rigden S.P., Chantler C., Koffman G., Williams D.G., Ogg C.S. (1989). "Focal segmental glomerulosclerosis in fifty-nine renal allografts from a single centre; analysis of risk factors for recurrence" Transplant Proc **21**(1 Pt 2): 2117-8.
- Cameron J.S. (1991). "Recurrent primary disease and de novo nephritis following renal transplantation" Pediatr Nephrol **5**(4): 412-21.
- Cameron J.S. (1996). "The enigma of focal segmental glomerulosclerosis" Kidney Int Suppl **57**(S119-31).
- Cantley L.C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway" Science **296**(5573): 1655-7.
- Caridi G., Bertelli R., Scolari F., Sanna-Cherchi S., Di Duca M., Ghiggeri G.M. (2003). "Podocin mutations in sporadic focal-segmental glomerulosclerosis occurring in adulthood" Kidney Int **64**(1): 365.
- Carraro M., Caridi G., Bruschi M., Artero M., Bertelli R., Zennaro C., Musante L., Candiano G., Perfumo F., Ghiggeri G.M. (2002). "Serum glomerular permeability activity in patients with podocin mutations (NPHS2) and steroid-resistant nephrotic syndrome" J Am Soc Nephrol **13**(7): 1946-52.
- Carraro M., Zennaro C., Candiano G., Musante L., Bruschi M., Ghiggeri G.M., Artero M., Faccini L. (2003). "Nephrotic urine prevents increased rat glomerular albumin permeability induced by serum from the same patient with idiopathic nephrotic syndrome" Nephrol Dial Transplant **18**(4): 689-93.
- Carriere V., Roussel L., Ortega N., Lacorre D.A., Americh L., Aguilar L., Bouche G., Girard J.P. (2007). "IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo" Proc Natl Acad Sci U S A **104**(1): 282-7.
- Cattran D.C., Appel G.B., Hebert L.A., Hunsicker L.G., Pohl M.A., Hoy W.E., Maxwell D.R., Kunis C.L. (1999). "A randomized trial of cyclosporine in patients with steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis. North America Nephrotic Syndrome Study Group" Kidney Int **56**(6): 2220-6.
- Cattran D.C., Wang M.M., Appel G., Matalon A., Briggs W. (2004). "Mycophenolate mofetil in the treatment of focal segmental glomerulosclerosis" Clin Nephrol **62**(6): 405-11.
- Cattran D.C., Alexopoulos E., Heering P., Hoyer P.F., Johnston A., Meyrier A., Ponticelli C., Saito T., Choukroun G., Nachman P., Praga M., Yoshikawa N. (2007). "Cyclosporin in idiopathic glomerular disease associated with the nephrotic syndrome : workshop recommendations" Kidney Int **72**(12): 1429-47.
- Caulfield J.P., Farquhar M.G. (1974). "The permeability of glomerular capillaries to graded dextrans. Identification of the basement membrane as the primary filtration barrier" J Cell Biol **63**(3): 883-903.
- Chan M.K., Chan K.W., Jones B. (1987). "Immunoglobulins (IgG, IgA, IgM, IgE) and complement components (C3, C4) in nephrotic syndrome due to minimal change and other forms of glomerulonephritis, a clue for steroid therapy?" Nephron **47**(2): 125-30.
- Chang Y.S., Munn L.L., Hillsley M.V., Dull R.O., Yuan J., Lakshminarayanan S., Gardner T.W., Jain R.K., Tarbell J.M. (2000). "Effect of vascular endothelial growth factor on cultured endothelial cell monolayer transport properties" Microvasc Res **59**(2): 265-77.

- Cheng I.K., Jones B.M., Chan P.C., Chan M.K. (1989). "The role of soluble immune response suppressor lymphokine in the prediction of steroid responsiveness in idiopathic nephrotic syndrome" Clin Nephrol **32**(4): 168-72.
- Cheung P.K., Stulp B., Immenschuh S., Borghuis T., Baller J.F., Bakker W.W. (1999). "Is 100KF an isoform of hemopexin? Immunochemical characterization of the vasoactive plasma factor 100KF" J Am Soc Nephrol **10**(8): 1700-8.
- Cheung P.K., Klok P.A., Baller J.F., Bakker W.W. (2000). "Induction of experimental proteinuria in vivo following infusion of human plasma hemopexin" Kidney Int **57**(4): 1512-20.
- Cheung W., Wei C.L., Seah C.C., Jordan S.C., Yap H.K. (2004). "Atopy, serum IgE, and interleukin-13 in steroid-responsive nephrotic syndrome" Pediatr Nephrol **19**(6): 627-32.
- Choi M.J., Eustace J.A., Gimenez L.F., Atta M.G., Scheel P.J., Sothinathan R., Briggs W.A. (2002). "Mycophenolate mofetil treatment for primary glomerular diseases" Kidney Int **61**(3): 1098-114.
- Chun M.J., Korbet S.M., Schwartz M.M., Lewis E.J. (2004). "Focal segmental glomerulosclerosis in nephrotic adults: presentation, prognosis, and response to therapy of the histologic variants" J Am Soc Nephrol **15**(8): 2169-77.
- Churg J., Habib R., White R.H. (1970). "Pathology of the nephrotic syndrome in children: a report for the International Study of Kidney Disease in Children" Lancet **760**(1): 1299-302.
- Cochat P., Kassir A., Colon S., Glastre C., Tourniaire B., Parchoux B., Martin X., David L. (1993). "Recurrent nephrotic syndrome after transplantation: early treatment with plasmapheresis and cyclophosphamide" Pediatr Nephrol **7**(1): 50-4.
- Cochat P., Schell M., Ranchin B., Boueva A., Said M.H. (1996). "Management of recurrent nephrotic syndrome after kidney transplantation in children" Clin Nephrol **46**(1): 17-20.
- Coleman M.A., Eisen J.A., Mohrenweiser H.W. (2000). "Cloning and characterization of HARP/SMARCA1: a prokaryotic HepA-related SNF2 helicase protein from human and mouse" Genomics **65**(3): 274-82.
- Couser W., Badger A., Cooperband S., Stilmand M., Jermanovich N., Aurora S., Doner D., Schmitt G. (1977). "Hodgkin's disease and lipoid nephrosis" Lancet **1**(8017): 912-3.
- Coward R.J., Foster R.R., Patton D., Ni L., Lennon R., Bates D.O., Harper S.J., Mathieson P.W., Saleem M.A. (2005). "Nephrotic plasma alters slit diaphragm-dependent signaling and translocates nephrin, Podocin, and CD2 associated protein in cultured human podocytes" J Am Soc Nephrol **16**(3): 629-37.
- Coyle A.J., Lloyd C., Tian J., Nguyen T., Eriksson C., Wang L., Ottoson P., Persson P., Delaney T., Lehar S., Lin S., Poisson L., Meisel C., Kamradt T., Bjerke T., Levinson D., Gutierrez-Ramos J.C. (1999). "Crucial role of the interleukin 1 receptor family member T1/ST2 in T helper cell type 2-mediated lung mucosal immune responses" J Exp Med **190**(7): 895-902.
- Cuoghi D., Venturi P., Cheli E. (1988). "Bee sting and relapse of nephrotic syndrome" Child Nephrol Urol **9**(1-2): 82-3.
- D'Agati V.D., Fogo A.B., Bruijn J.A., Jennette J.C. (2004). "Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal" Am J Kidney Dis **43**(2): 368-82.
- Dall'Amico R., Ghiggeri G., Carraro M., Artero M., Ghio L., Zamorani E., Zennaro C., Basile G., Montini G., Rivabella L., Cardillo M., Scalapogna M., Ginevri F. (1999). "Prediction and treatment of recurrent focal segmental glomerulosclerosis after renal transplantation in children" Am J Kidney Dis **34**(6): 1048-55.

- Daniel V., Trautmann Y., Konrad M., Nayir A., Scharer K. (1997). "T-lymphocyte populations, cytokines and other growth factors in serum and urine of children with idiopathic nephrotic syndrome" Clin Nephrol **47**(5): 289-97.
- Dantal J., Baatard R., Hourmant M., Cantarovich D., Buzelin F., Souillou J.P. (1991). "Recurrent nephrotic syndrome following renal transplantation in patients with focal glomerulosclerosis. A one-center study of plasma exchange effects" Transplantation **52**(5): 827-31.
- Dantal J., Bigot E., Bogers W., Testa A., Kriaa F., Jacques Y., Hurault de Ligny B., Niaudet P., Charpentier B., Souillou J.P. (1994). "Effect of plasma protein adsorption on protein excretion in kidney-transplant recipients with recurrent nephrotic syndrome" N Engl J Med **330**(1): 7-14.
- Dantal J., Giral M., Hoormant M., Souillou J.P. (1995). "Glomerulonephritis recurrences after kidney transplantation" Curr Opin Nephrol Hypertens **4**(2): 146-54.
- Dantal J., Godfrin Y., Koll R., Perretto S., Naulet J., Bouhours J.F., Souillou J.P. (1998). "Antihuman immunoglobulin affinity immunoabsorption strongly decreases proteinuria in patients with relapsing nephrotic syndrome" J Am Soc Nephrol **9**(9): 1709-15.
- Davin J.C., Merkus M.P. (2005). "Levamisole in steroid-sensitive nephrotic syndrome of childhood: the lost paradise?" Pediatr Nephrol **20**(1): 10-4.
- Day C.J., Cockwell P., Lipkin G.W., Savage C.O., Howie A.J., Adu D. (2002). "Mycophenolate mofetil in the treatment of resistant idiopathic nephrotic syndrome" Nephrol Dial Transplant **17**(11): 2011-3.
- Dedhar S., Jewell K., Rojiani M., Gray V. (1992). "The receptor for the basement membrane glycoprotein entactin is the integrin alpha 3/beta 1" J Biol Chem **267**(26): 18908-14.
- Deegens J.K., Andresdottir M.B., Croockewit S., Wetzels J.F. (2004). "Plasma exchange improves graft survival in patients with recurrent focal glomerulosclerosis after renal transplant" Transpl Int **17**(3): 151-7.
- Deen W.M., Bohrer M.P., Brenner B.M. (1979). "Macromolecule transport across glomerular capillaries: application of pore theory" Kidney Int **16**(3): 353-65.
- Deen W.M., Lazzara M.J., Myers B.D. (2001). "Structural determinants of glomerular permeability" Am J Physiol Renal Physiol **281**(4): F579-96.
- Denys P., Malvaux P., Van Den Berghe H., Tanghe W., Proesmans W. (1967). "[Association of an anato-pathological syndrome of male pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, parenchymatous nephropathy and XX/XY mosaicism]" Arch Fr Pediatr **24**(7): 729-39.
- Dileepan K.N., Sharma R., Stechschulte D.J., Savin V.J. (1993). "Effect of superoxide exposure on albumin permeability of isolated rat glomeruli" J Lab Clin Med **121**(6): 797-804.
- Dragovic D., Rosenstock J.L., Wahl S.J., Panagopoulos G., DeVita M.V., Michelis M.F. (2005). "Increasing incidence of focal segmental glomerulosclerosis and an examination of demographic patterns" Clin Nephrol **63**(1): 1-7.
- Drash A., Sherman F., Hartmann W.H., Blizzard R.M. (1970). "A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, hypertension, and degenerative renal disease" J Pediatr **76**(4): 585-93.
- Drenckhahn D., Franke R.P. (1988). "Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man" Lab Invest **59**(5): 673-82.
- Duncan N., Dhaygude A., Owen J., Cairns T.D., Griffith M., McLean A.G., Palmer A., Taube D. (2004). "Treatment of focal and segmental glomerulosclerosis in adults with tacrolimus monotherapy" Nephrol Dial Transplant **19**(12): 3062-7.

- Durkan A.M., Hodson E.M., Willis N.S., Craig J.C. (2001). "Immunosuppressive agents in childhood nephrotic syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials" Kidney Int **59**(5): 1919-27.
- Durvasula R.V., Shankland S.J. (2006). "Podocyte injury and targeting therapy: an update" Curr Opin Nephrol Hypertens **15**(1): 1-7.
- Eddy A.A., Symons J.M. (2003). "Nephrotic syndrome in childhood" Lancet **362**(9384): 629-39.
- Erb K.J., Ruger B., von Brevern M., Ryffel B., Schimpl A., Rivett K. (1997). "Constitutive expression of interleukin (IL)-4 in vivo causes autoimmune-type disorders in mice" J Exp Med **185**(2): 329-39.
- Esnault V.L., Besnier D., Testa A., Coville P., Simon P., Subra J.F., Audrain M.A. (1999). "Effect of protein A immunoadsorption in nephrotic syndrome of various etiologies" J Am Soc Nephrol **10**(9): 2014-7.
- Esser S., Wolburg K., Wolburg H., Breier G., Kurzchalia T., Risau W. (1998). "Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro" J Cell Biol **140**(4): 947-59.
- Ettenger R.B., Heuser E.T., Malekzadeh M.H., Pennisi A.J., Uittenbogaart C.H., Fine R.N. (1977). "Focal glomerulosclerosis in renal allografts: association with the nephrotic syndrome and chronic rejection" Am J Dis Child **131**(12): 1347-52.
- Faul C., Asanuma K., Yanagida-Asanuma E., Kim K., Mundel P. (2007). "Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton" Trends Cell Biol **17**(9): 428-37.
- Faul C., Donnelly M., Merscher-Gomez S., Chang Y.H., Franz S., Delfgaauw J., Chang J.M., Choi H.Y., Campbell K.N., Kim K., Reiser J., Mundel P. (2008). "The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A" Nat Med **14**(9): 931-8.
- First M.R. (1995). "Living-related donor transplants should be performed with caution in patients with focal segmental glomerulosclerosis" Pediatr Nephrol **9 Suppl**(S40-2).
- Florido J.F., Diaz Pena J.M., Belchi J., Estrada J.L., Garcia Ara M.C., Ojeda J.A. (1992). "Nephrotic syndrome and respiratory allergy in childhood" J Investig Allergol Clin Immunol **2**(3): 136-40.
- Fodor P., Saitua M.T., Rodriguez E., Gonzalez B., Schlesinger L. (1982). "T-cell dysfunction in minimal-change nephrotic syndrome of childhood" Am J Dis Child **136**(8): 713-7.
- Fogo A.B. (2003). "Animal models of FSGS: lessons for pathogenesis and treatment" Semin Nephrol **23**(2): 161-71.
- Franco A., Peres R., Anaya F., Niembro E., Valderrabano (1987). "Spontaneous remission of proteinuria in recurrent focal glomerulosclerosis. Reappraisal of plasma exchange treatment" Clin Nephrol **28**(3): 158.
- Francois H., Daugas E., Bensman A., Ronco P. (2007). "Unexpected efficacy of rituximab in multirelapsing minimal change nephrotic syndrome in the adult: first case report and pathophysiological considerations" Am J Kidney Dis **49**(1): 158-61.
- Frank C., Herrmann M., Fernandez S., Dirnecker D., Boswald M., Kolowos W., Ruder H., Haas J.P. (2000). "Dominant T cells in idiopathic nephrotic syndrome of childhood" Kidney Int **57**(2): 510-7.
- Frasier S.D., Bashore R.A., Mosier H.D. (1964). "Gonadoblastoma Associated with Pure Gonadal Dysgenesis in Monozygous Twins" J Pediatr **64**(740-5).
- Frishberg Y., Rinat C., Megged O., Shapira E., Feinstein S., Raas-Rothschild A. (2002). "Mutations in NPHS2 encoding podocin are a prevalent cause of steroid-resistant nephrotic syndrome among Israeli-Arab children" J Am Soc Nephrol **13**(2): 400-5.

- Fuchshuber A., Gribouval O., Ronner V., Kroiss S., Karle S., Brandis M., Hildebrandt F. (2001). "Clinical and genetic evaluation of familial steroid-responsive nephrotic syndrome in childhood" J Am Soc Nephrol **12**(2): 374-8.
- Fujimoto S., Yamamoto Y., Hisanaga S., Morita S., Eto T., Tanaka K. (1991). "Minimal change nephrotic syndrome in adults: response to corticosteroid therapy and frequency of relapse" Am J Kidney Dis **17**(6): 687-92.
- Fujinaga S., Ohtomo Y., Umino D., Takemoto M., Shimizu T., Yamashiro Y., Kaneko K. (2007). "A prospective study on the use of mycophenolate mofetil in children with cyclosporine-dependent nephrotic syndrome" Pediatr Nephrol **22**(1): 71-6.
- Furukawa T., Ohno S., Oguchi H., Hora K., Tokunaga S., Furuta S. (1991). "Morphometric study of glomerular slit diaphragms fixed by rapid-freezing and freeze-substitution" Kidney Int **40**(4): 621-4.
- Gajewska B.U., Swirski F.K., Alvarez D., Ritz S.A., Goncharova S., Cundall M., Snider D.P., Coyle A.J., Gutierrez-Ramos J.C., Stampfli M.R., Jordana M. (2001). "Temporal-spatial analysis of the immune response in a murine model of ovalbumin-induced airways inflammation" Am J Respir Cell Mol Biol **25**(3): 326-34.
- Genova R., Sanfilippo M., Rossi M.E., Vierucci A. (1987). "Food allergy in steroid-resistant nephrotic syndrome" Lancet **1**(8545): 1315-6.
- Gerke P., Huber T.B., Sellin L., Benzing T., Walz G. (2003). "Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1" J Am Soc Nephrol **14**(4): 918-26.
- Ghitescu L., Desjardins M., Bendayan M. (1992). "Immunocytochemical study of glomerular permeability to anionic, neutral and cationic albumins" Kidney Int **42**(1): 25-32.
- Giangiacomo J., Cleary T.G., Cole B.R., Hoffsten P., Robson A.M. (1975). "Serum immunoglobulins in the nephrotic syndrome. A possible cause of minimal-change nephrotic syndrome" N Engl J Med **293**(1): 8-12.
- Gilbert R.D., Hulse E., Rigden S. (2006). "Rituximab therapy for steroid-dependent minimal change nephrotic syndrome" Pediatr Nephrol **21**(11): 1698-700.
- Glassock R.J. (1993). "Therapy of idiopathic nephrotic syndrome in adults. A conservative or aggressive therapeutic approach?" Am J Nephrol **13**(5): 422-8.
- Godfrin Y., Dantal J., Bouhours J.F., Heslan J.M., Souillou J.P. (1996). "A new method of measuring albumin permeability in isolated glomeruli" Kidney Int **50**(4): 1352-7.
- Godfrin Y., Dantal J., Perretto S., Hristea D., Legendre C., Kreis H., Souillou J.P. (1997). "Study of the in vitro effect on glomerular albumin permselectivity of serum before and after renal transplantation in focal segmental glomerulosclerosis" Transplantation **64**(12): 1711-5.
- Gossmann J., Scheuermann E.H., Porubsky S., Kachel H.G., Geiger H., Hauser I.A. (2007). "Abrogation of nephrotic proteinuria by rituximab treatment in a renal transplant patient with relapsed focal segmental glomerulosclerosis" Transpl Int **20**(6): 558-62.
- Grishman E., Churg J. (1975). "Focal glomerular sclerosis in nephrotic patients: an electron microscopic study of glomerular podocytes" Kidney Int **7**(2): 111-22.
- Groffen A.J., Veerkamp J.H., Monnens L.A., van den Heuvel L.P. (1999). "Recent insights into the structure and functions of heparan sulfate proteoglycans in the human glomerular basement membrane" Nephrol Dial Transplant **14**(9): 2119-29.
- Guigonis V., Dallochio A., Baudouin V., Dehennault M., Hachon-Le Camus C., Afanetti M., Grothoff J., Llanas B., Niaudet P., Nivet H., Raynaud N., Taque S., Ronco P., Bouissou F. (2008).

- "Rituximab treatment for severe steroid- or cyclosporine-dependent nephrotic syndrome: a multicentric series of 22 cases" Pediatr Nephrol **23**(8): 1269-79.
- Guo J.K., Menke A.L., Gubler M.C., Clarke A.R., Harrison D., Hammes A., Hastie N.D., Schedl A. (2002). "WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis" Hum Mol Genet **11**(6): 651-9.
- Haas M., Spargo B.H., Coventry S. (1995). "Increasing incidence of focal-segmental glomerulosclerosis among adult nephropathies: a 20-year renal biopsy study" Am J Kidney Dis **26**(5): 740-50.
- Haas M., Meehan S.M., Karrison T.G., Spargo B.H. (1997). "Changing etiologies of unexplained adult nephrotic syndrome: a comparison of renal biopsy findings from 1976-1979 and 1995-1997" Am J Kidney Dis **30**(5): 621-31.
- Haber D.A., Buckler A.J., Glaser T., Call K.M., Pelletier J., Sohn R.L., Douglass E.C., Housman D.E. (1990). "An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor" Cell **61**(7): 1257-69.
- Habib R., Kleinknecht C. (1971). "The primary nephrotic syndrome of childhood. Classification and clinicopathologic study of 406 cases" Pathol Annu **6**(417-74).
- Habib R. (1973). "Editorial: Focal glomerular sclerosis" Kidney Int **4**(6): 355-61.
- Habib R., Antignac C., Hinglais N., Gagnadoux M.F., Broyer M. (1987). "Glomerular lesions in the transplanted kidney in children" Am J Kidney Dis **10**(3): 198-207.
- Hara M., Yanagihara T., Kihara I., Higashi K., Fujimoto K., Kajita T. (2005). "Apical cell membranes are shed into urine from injured podocytes: a novel phenomenon of podocyte injury" J Am Soc Nephrol **16**(2): 408-16.
- Hattori M., Akioka Y., Chikamoto H., Kobayashi N., Tsuchiya K., Shimizu M., Kagami S., Tsukaguchi H. (2008). "Increase of integrin-linked kinase activity in cultured podocytes upon stimulation with plasma from patients with recurrent FSGS" Am J Transplant **8**(7): 1550-6.
- Hayes J.D., Pulford D.J. (1995). "The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance" Crit Rev Biochem Mol Biol **30**(6): 445-600.
- Hayes J.M., Steinmuller D.R., Streem S.B., Novick A.C. (1991). "The development of proteinuria and focal-segmental glomerulosclerosis in recipients of pediatric donor kidneys" Transplantation **52**(5): 813-7.
- Herve C., Dantal J. (2006a). "Possible new perspectives for our understanding of nephrotic syndrome recurrence" Nephrol Dial Transplant **21**(1): 10-3.
- Herve C., Le Berre L., Miqueu P., Degauque N., Ruiz C., Brouard S., Guillet M., Souillou J.P., Dantal J. (2006b). "Blood T-cell repertoire in idiopathic nephrotic syndrome recurrence following kidney transplantation" Am J Transplant **6**(9): 2144-51.
- Heslan J.M., Lautie J.P., Intrator L., Blanc C., Lagrue G., Sobel A.T. (1982). "Impaired IgG synthesis in patients with the nephrotic syndrome" Clin Nephrol **18**(3): 144-7.
- Heslan J.M., Branellec A., Laurent J., Lagrue G. (1986). "The vascular permeability factor is a T lymphocyte product" Nephron **42**(2): 187-8.
- Hinkes B., Wiggins R.C., Gbadegesin R., Vlangos C.N., Seelow D., Nurnberg G., Garg P., Verma R., Chaib H., Hoskins B.E., Ashraf S., Becker C., Hennies H.C., Goyal M., Wharram B.L., Schachter A.D., Mudumana S., Drummond I., Kerjaschki D., Waldherr R., Dietrich A., Ozaltin F., Bakaloglu A., Cleper R., Basel-Vanagaite L., Pohl M., Griebel M., Tsygin A.N., Soylu A., Muller D., Sorli C.S., Bunney T.D., Katan M., Liu J., Attanasio M., O'Toole J F., Hasselbacher K., Mucha B., Otto E.A.,

- Airik R., Kispert A., Kelley G.G., Smrcka A.V., Gudermann T., Holzman L.B., Nurnberg P., Hildebrandt F. (2006). "Positional cloning uncovers mutations in *PLCE1* responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible" *Nat Genet* **38**(12): 1397-405.
- Hippenstiel S., Krull M., Ikemann A., Risau W., Clauss M., Suttorp N. (1998). "VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells" *Am J Physiol* **274**(5 Pt 1): L678-84.
- Ho I.C., Hodge M.R., Rooney J.W., Glimcher L.H. (1996). "The proto-oncogene *c-maf* is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4" *Cell* **85**(7): 973-83.
- Hofstra J.M., Deegens J.K., Wetzels J.F. (2007). "Rituximab: effective treatment for severe steroid-dependent minimal change nephrotic syndrome?" *Nephrol Dial Transplant* **22**(7): 2100-2.
- Hogg R.J., Fitzgibbons L., Bruick J., Bunke M., Ault B., Baqi N., Trachtman H., Swinford R. (2006). "Mycophenolate mofetil in children with frequently relapsing nephrotic syndrome: a report from the Southwest Pediatric Nephrology Study Group" *Clin J Am Soc Nephrol* **1**(6): 1173-8.
- Holmberg C., Antikainen M., Ronnholm K., Ala Houhala M., Jalanko H. (1995). "Management of congenital nephrotic syndrome of the Finnish type" *Pediatr Nephrol* **9**(1): 87-93.
- Holt R.C., Webb N.J., Ralph S., Davies J., Short C.D., Brenchley P.E. (2005). "Heparanase activity is dysregulated in children with steroid-sensitive nephrotic syndrome" *Kidney Int* **67**(1): 122-9.
- Hosenpud J., Piering W.F., Garancis J.C., Kauffman H.M. (1985). "Successful second kidney transplantation in a patient with focal glomerulosclerosis. A case report" *Am J Nephrol* **5**(4): 299-304.
- Hoyer J.R., Vernier R.L., Najarian J.S., Raij L., Simmons R.L., Michael A.F. (1972). "Recurrence of idiopathic nephrotic syndrome after renal transplantation" *Lancet* **2**(7773): 343-8.
- Hristea D., Hadaya K., Marangon N., Buhler L., Villard J., Morel P., Martin P.Y. (2007). "Successful treatment of recurrent focal segmental glomerulosclerosis after kidney transplantation by plasmapheresis and rituximab" *Transpl Int* **20**(1): 102-5.
- Huang T.W., Langlois J.C. (1985). "Podoendin. A new cell surface protein of the podocyte and endothelium" *J Exp Med* **162**(1): 245-67.
- Huber T.B., Kottgen M., Schilling B., Walz G., Benzing T. (2001). "Interaction with podocin facilitates nephrin signaling" *J Biol Chem* **276**(45): 41543-6.
- Huber T.B., Hartleben B., Kim J., Schmidts M., Schermer B., Keil A., Egger L., Lecha R.L., Borner C., Pavenstadt H., Shaw A.S., Walz G., Benzing T. (2003a). "Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling" *Mol Cell Biol* **23**(14): 4917-28.
- Huber T.B., Simons M., Hartleben B., Sernetz L., Schmidts M., Gundlach E., Saleem M.A., Walz G., Benzing T. (2003b). "Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the *NPHS2* gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains" *Hum Mol Genet* **12**(24): 3397-405.
- Hubsch H., Montane B., Abitbol C., Chandar J., Shariatmadar S., Ciancio G., Burke G., Miller J., Strauss J., Zilleruelo G. (2005). "Recurrent focal glomerulosclerosis in pediatric renal allografts: the Miami experience" *Pediatr Nephrol* **20**(2): 210-6.
- Hudson B.G., Reeders S.T., Tryggvason K. (1993). "Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis" *J Biol Chem* **268**(35): 26033-6.
- Huttunen N.P., Hallman N., Rapola J. (1976). "Glomerular basement membrane antigens in congenital and acquired nephrotic syndrome in childhood" *Nephron* **16**(6): 401-14.

- Hyman L.R., Burkholder P.M. (1973). "Focal sclerosing glomerulonephropathy with segmental hyalinosis. A clinicopathologic analysis" Lab Invest **28**(5): 533-44.
- Ingulli E., Tejani A., Butt K.M., Rajpoot D., Gonzalez R., Pomrantz A., Ettenger R. (1990). "High-dose cyclosporine therapy in recurrent nephrotic syndrome following renal transplantation" Transplantation **49**(1): 219-21.
- Inoue T., Yaoita E., Kurihara H., Shimizu F., Sakai T., Kobayashi T., Ohshiro K., Kawachi H., Okada H., Suzuki H., Kihara I., Yamamoto T. (2001). "FAT is a component of glomerular slit diaphragms" Kidney Int **59**(3): 1003-12.
- Iwahana H., Yanagisawa K., Ito-Kosaka A., Kuroiwa K., Tago K., Komatsu N., Katashima R., Itakura M., Tominaga S. (1999). "Different promoter usage and multiple transcription initiation sites of the interleukin-1 receptor-related human ST2 gene in UT-7 and TM12 cells" Eur J Biochem **264**(2): 397-406.
- Juronen E., Tasa G., Uuskula M., Pooga M., Mikelsaar A.V. (1996). "Purification, characterization and tissue distribution of human class theta glutathione S-transferase T1-1" Biochem Mol Biol Int **39**(1): 21-9.
- Kakkar R., Lee R.T. (2008). "The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker" Nat Rev Drug Discov **7**(10): 827-40.
- Kaplan J.M., Kim S.H., North K.N., Rennke H., Correia L.A., Tong H.Q., Mathis B.J., Rodriguez-Perez J.C., Allen P.G., Beggs A.H., Pollak M.R. (2000). "Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis" Nat Genet **24**(3): 251-6.
- Kapojos J.J., van den Berg A., van Goor H., te Loo M.W., Poelstra K., Borghuis T., Bakker W.W. (2003). "Production of hemopexin by TNF-alpha stimulated human mesangial cells" Kidney Int **63**(5): 1681-6.
- Karle S.M., Uetz B., Ronner V., Glaeser L., Hildebrandt F., Fuchshuber A. (2002). "Novel mutations in NPHS2 detected in both familial and sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome" J Am Soc Nephrol **13**(2): 388-93.
- Karnovsky M.J., Ainsworth S.K. (1972). "The structural basis of glomerular filtration" Adv Nephrol Necker Hosp **2**(35-60).
- Karras A., de Montpreville V., Fakhouri F., Grunfeld J.P., Lesavre P. (2005). "Renal and thymic pathology in thymoma-associated nephropathy: report of 21 cases and review of the literature" Nephrol Dial Transplant **20**(6): 1075-82.
- Kemeny E., Mihatsch M.J., Durmuller U., Gudat F. (1995). "Podocytes loose their adhesive phenotype in focal segmental glomerulosclerosis" Clin Nephrol **43**(2): 71-83.
- Kemper M.J., Altrogge H., Ludwig K., Timmermann K., Muller-Wiefel D.E. (2000). "Unfavorable response to cyclophosphamide in steroid-dependent nephrotic syndrome" Pediatr Nephrol **14**(8-9): 772-5.
- Kemper M.J., Wolf G., Muller-Wiefel D.E. (2001). "Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child" N Engl J Med **344**(5): 386-7.
- Kemper M.J., Altrogge H., Ganschow R., Muller-Wiefel D.E. (2002). "Serum levels of immunoglobulins and IgG subclasses in steroid sensitive nephrotic syndrome" Pediatr Nephrol **17**(6): 413-7.
- Kershaw D.B., Thomas P.E., Wharram B.L., Goyal M., Wiggins J.E., Whiteside C.I., Wiggins R.C. (1995). "Molecular cloning, expression, and characterization of podocalyxin-like protein 1 from rabbit as a transmembrane protein of glomerular podocytes and vascular endothelium" J Biol Chem **270**(49): 29439-46.

- Kestila M., Lenkkeri U., Mannikko M., Lamerdin J., McCready P., Putaala H., Ruotsalainen V., Morita T., Nissinen M., Herva R., Kashtan C.E., Peltonen L., Holmberg C., Olsen A., Tryggvason K. (1998). "Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome" Mol Cell **1**(4): 575-82.
- Khoshnoodi J., Sigmundsson K., Ofverstedt L.G., Skoglund U., Obrink B., Wartiovaara J., Tryggvason K. (2003). "Nephrin promotes cell-cell adhesion through homophilic interactions" Am J Pathol **163**(6): 2337-46.
- Kim E.M., Striegel J., Kim Y., Matas A.J., Najarian J.S., Mauer S.M. (1994). "Recurrence of steroid-resistant nephrotic syndrome in kidney transplants is associated with increased acute renal failure and acute rejection" Kidney Int **45**(5): 1440-5.
- Kim J.M., Wu H., Green G., Winkler C.A., Kopp J.B., Miner J.H., Unanue E.R., Shaw A.S. (2003). "CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility" Science **300**(5623): 1298-300.
- Klamt B., Koziell A., Poulat F., Wieacker P., Scambler P., Berta P., Gessler M. (1998). "Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms" Hum Mol Genet **7**(4): 709-14.
- Klinger M., Kramarz S., Wendycz D., Kopec W. (1997). "Different erythrocyte and platelet surface electric charge in various types of glomerulonephritis" Nephrol Dial Transplant **12**(4): 707-12.
- Kojima K., Davidovits A., Poczewski H., Langer B., Uchida S., Nagy-Bojarski K., Hovorka A., Sedivy R., Kerjaschki D. (2004). "Podocyte flattening and disorder of glomerular basement membrane are associated with splitting of dystroglycan-matrix interaction" J Am Soc Nephrol **15**(8): 2079-89.
- Korbet S.M. (1995). "Management of idiopathic nephrosis in adults, including steroid-resistant nephrosis" Curr Opin Nephrol Hypertens **4**(2): 169-76.
- Korbet S.M. (1998). "Primary focal segmental glomerulosclerosis" J Am Soc Nephrol **9**(7): 1333-40.
- Korbet S.M. (2002). "Treatment of primary focal segmental glomerulosclerosis" Kidney Int **62**(6): 2301-10.
- Korhonen M., Ylanne J., Laitinen L., Virtanen I. (1990). "The alpha 1-alpha 6 subunits of integrins are characteristically expressed in distinct segments of developing and adult human nephron" J Cell Biol **111**(3): 1245-54.
- Kos C.H., Le T.C., Sinha S., Henderson J.M., Kim S.H., Sugimoto H., Kalluri R., Gerszten R.E., Pollak M.R. (2003). "Mice deficient in alpha-actinin-4 have severe glomerular disease" J Clin Invest **111**(11): 1683-90.
- Koyama A., Fujisaki M., Kobayashi M., Igarashi M., Narita M. (1991). "A glomerular permeability factor produced by human T cell hybridomas" Kidney Int **40**(3): 453-60.
- Koziell A., Grech V., Hussain S., Lee G., Lenkkeri U., Tryggvason K., Scambler P. (2002). "Genotype/phenotype correlations of NPHS1 and NPHS2 mutations in nephrotic syndrome advocate a functional inter-relationship in glomerular filtration" Hum Mol Genet **11**(4): 379-88.
- Kreisberg J.I., Venkatachalam M., Troyer D. (1985). "Contractile properties of cultured glomerular mesangial cells" Am J Physiol **249**(4 Pt 2): F457-63.
- Kretzler M., Teixeira V.P., Unschuld P.G., Cohen C.D., Wanke R., Edenhofer I., Mundel P., Schlondorff D., Holthofer H. (2001). "Integrin-linked kinase as a candidate downstream effector in proteinuria" FASEB J **15**(10): 1843-5.
- Kriz W., Elger M., Lemley K., Sakai T. (1990). "Structure of the glomerular mesangium: a biomechanical interpretation" Kidney Int Suppl **30**(S2-9).

- Kriz W. (1996). "Progressive renal failure--inability of podocytes to replicate and the consequences for development of glomerulosclerosis" Nephrol Dial Transplant **11**(9): 1738-42.
- Kriz W., Lemley K.V. (1999). "The role of the podocyte in glomerulosclerosis" Curr Opin Nephrol Hypertens **8**(4): 489-97.
- Kuroiwa K., Arai T., Okazaki H., Minota S., Tominaga S. (2001). "Identification of human ST2 protein in the sera of patients with autoimmune diseases" Biochem Biophys Res Commun **284**(5): 1104-8.
- Kuwahara K., Wang Y., McAnally J., Richardson J.A., Bassel-Duby R., Hill J.A., Olson E.N. (2006). "TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling" J Clin Invest **116**(12): 3114-26.
- Kuzemko J.A. (1972). "Measles vaccination and the nephrotic syndrome" Br Med J **4**(5841): 665-6.
- Kwoh C., Shannon M.B., Miner J.H., Shaw A. (2006). "Pathogenesis of nonimmune glomerulopathies" Annu Rev Pathol **1**(349-74).
- Lagrue G., Branellec A., Blanc C., Xheneumont S., Beaudoux F., Sobel A., Weil B. (1975a). "A vascular permeability factor in lymphocyte culture supernants from patients with nephrotic syndrome. II. Pharmacological and physicochemical properties" Biomedicine **23**(2): 73-5.
- Lagrue G., Xheneumont S., Branellec A., Hirbec G., Weil B. (1975b). "A vascular permeability factor elaborated from lymphocytes. I. Demonstration in patients with nephrotic syndrome" Biomedicine **23**(1): 37-40.
- Lagrue G., Laurent J., Rostoker G. (1989). "Food allergy and idiopathic nephrotic syndrome" Kidney Int Suppl **27**(S147-51).
- Lagrue G., Branellec A., Niaudet P., Heslan J.M., Guillot F., Lang P. (1991). "[Transmission of nephrotic syndrome to two neonates. Spontaneous regression]" Presse Med **20**(6): 255-7.
- Lahdenpera J., Kilpelainen P., Liu X.L., Pikkarainen T., Reponen P., Ruotsalainen V., Tryggvason K. (2003). "Clustering-induced tyrosine phosphorylation of nephrin by Src family kinases" Kidney Int **64**(2): 404-13.
- Lai K.W., Wei C.L., Tan L.K., Tan P.H., Chiang G.S., Lee C.G., Jordan S.C., Yap H.K. (2007). "Overexpression of interleukin-13 induces minimal-change-like nephropathy in rats" J Am Soc Nephrol **18**(5): 1476-85.
- Lama G., Luongo I., Tirino G., Borriello A., Carangio C., Salsano M.E. (2002). "T-lymphocyte populations and cytokines in childhood nephrotic syndrome" Am J Kidney Dis **39**(5): 958-65.
- Langone J.J. (1982). "Protein A of Staphylococcus aureus and related immunoglobulin receptors produced by streptococci and pneumococci" Adv Immunol **32**(157-252).
- Latta K., von Schnakenburg C., Ehrich J.H. (2001). "A meta-analysis of cytotoxic treatment for frequently relapsing nephrotic syndrome in children" Pediatr Nephrol **16**(3): 271-82.
- Laufer J., Ettenger R.B., Ho W.G., Cohen A.H., Marik J.L., Fine R.N. (1988). "Plasma exchange for recurrent nephrotic syndrome following renal transplantation" Transplantation **46**(4): 540-2.
- Law-Chin-Yung L., Freed D.L. (1977). "Nephrotic syndrome due to milk allergy" Lancet **1**(8020): 1056.
- Le Berre L., Godfrin Y., Lafond-Puyet L., Perretto S., Le Carrer D., Bouhours J.F., Souillou J.P., Dantal J. (2000). "Effect of plasma fractions from patients with focal and segmental glomerulosclerosis on rat proteinuria" Kidney Int **58**(6): 2502-11.
- Lecart S., Lecoite N., Subramaniam A., Alkan S., Ni D., Chen R., Boulay V., Pene J., Kuroiwa K., Tominaga S., Yssel H. (2002). "Activated, but not resting human Th2 cells, in contrast to Th1

- and T regulatory cells, produce soluble ST2 and express low levels of ST2L at the cell surface" Eur J Immunol **32**(10): 2979-87.
- Lee S.Y., Jeoung D. (2007). "The reverse proteomics for identification of tumor antigens" J Microbiol Biotechnol **17**(6): 879-90.
- Lenarsky C., Jordan S.C., Ladisch S. (1982). "Plasma inhibition of lymphocyte proliferation in nephrotic syndrome: correlation with hyperlipidemia" J Clin Immunol **2**(4): 276-81.
- Lenkkeri U., Mannikko M., McCready P., Lamerdin J., Gribouval O., Niaudet P.M., Antignac C.K., Kashtan C.E., Homberg C., Olsen A., Kestila M., Tryggvason K. (1999). "Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the finnish type (NPHS1) and characterization of mutations" Am J Hum Genet **64**(1): 51-61.
- Lennon R., Singh A., Welsh G.I., Coward R.J., Satchell S., Ni L., Mathieson P.W., Bakker W.W., Saleem M.A. (2008). "Hemopexin induces nephrin-dependent reorganization of the actin cytoskeleton in podocytes" J Am Soc Nephrol **19**(11): 2140-9.
- Leunissen K.M., Bosman F.T., Kootstra G., van den Berg-Loonen P.M., van Hooff J.P. (1989). "Focal glomerulosclerosis in neonatal kidney grafts" Nephron **51**(1): 29-31.
- Levin M., Gascoine P., Turner M.W., Barratt T.M. (1989). "A highly cationic protein in plasma and urine of children with steroid-responsive nephrotic syndrome" Kidney Int **36**(5): 867-77.
- Lewis E.J. (1982). "Recurrent focal sclerosis after renal transplantation" Kidney Int **22**(3): 315-23.
- Li B., Yao J., Morioka T., Oite T. (2001a). "Nitric oxide increases albumin permeability of isolated rat glomeruli via a phosphorylation-dependent mechanism" J Am Soc Nephrol **12**(12): 2616-24.
- Li H., Lemay S., Aoudjit L., Kawachi H., Takano T. (2004). "SRC-family kinase Fyn phosphorylates the cytoplasmic domain of nephrin and modulates its interaction with podocin" J Am Soc Nephrol **15**(12): 3006-15.
- Li J.Z., Sharma R., Dileepan K.N., Savin V.J. (1994). "Polymorphonuclear leukocytes increase glomerular albumin permeability via hypohalous acid" Kidney Int **46**(4): 1025-30.
- Li P.K., Lai F.M., Leung C.B., Lui S.F., Wang A., Lai K.N. (1993). "Plasma exchange in the treatment of early recurrent focal glomerulosclerosis after renal transplantation. Report and review" Am J Nephrol **13**(4): 289-92.
- Li X., Talts U., Talts J.F., Arman E., Ekblom P., Lonai P. (2001b). "Akt/PKB regulates laminin and collagen IV isotypes of the basement membrane" Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14416-21.
- Lin C.Y., Lee B.H., Lin C.C., Chen W.P. (1990). "A study of the relationship between childhood nephrotic syndrome and allergic diseases" Chest **97**(6): 1408-11.
- Liu G., Kaw B., Kurfis J., Rahmanuddin S., Kanwar Y.S., Chugh S.S. (2003). "Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability" J Clin Invest **112**(2): 209-21.
- Loeffler K., Gowrishankar M., Yiu V. (2004). "Tacrolimus therapy in pediatric patients with treatment-resistant nephrotic syndrome" Pediatr Nephrol **19**(3): 281-7.
- Lohning M., Stroehmann A., Coyle A.J., Grogan J.L., Lin S., Gutierrez-Ramos J.C., Levinson D., Radbruch A., Kamradt T. (1998). "T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function" Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 6930-5.
- Lopez-Farre A., Gomez-Garre D., Bernabeu F., Montanes I., Millas I., Lopez-Novoa J.M. (1991). "Renal effects and mesangial cell contraction induced by endothelin are mediated by PAF" Kidney Int **39**(4): 624-30.

- Macario F., Freitas L., Correia J., Campos M., Marques A. (1995). "Nephrotic syndrome after recombinant hepatitis B vaccine" Clin Nephrol **43**(5): 349.
- Maizel S.E., Sibley R.K., Horstman J.P., Kjellstrand C.M., Simmons R.L. (1981). "Incidence and significance of recurrent focal segmental glomerulosclerosis in renal allograft recipients" Transplantation **32**(6): 512-6.
- Marks S.D., McGraw M. (2007). "Does rituximab treat recurrent focal segmental glomerulosclerosis post-renal transplantation?" Pediatr Nephrol **22**(1): 158-60.
- Maruyama K., Tomizawa S., Shimabukuro N., Fukuda T., Johshita T., Kuroume T. (1989). "Effect of supernatants derived from T lymphocyte culture in minimal change nephrotic syndrome on rat kidney capillaries" Nephron **51**(1): 73-6.
- Maruyama K., Tomizawa S., Seki Y., Arai H., Kuroume T. (1992). "Inhibition of vascular permeability factor production by ciclosporin in minimal change nephrotic syndrome" Nephron **62**(1): 27-30.
- Mathieson P.W. (2007). "Minimal change nephropathy and focal segmental glomerulosclerosis" Semin Immunopathol **29**(4): 415-26.
- Matsumoto H., Nakao T., Okada T., Nagaoka Y., Shino T., Yoshino M., Hidaka H. (2001). "Initial remission-inducing effect of very low-dose cyclosporin monotherapy for minimal-change nephrotic syndrome in Japanese adults" Clin Nephrol **55**(2): 143-8.
- Matsumoto K., Osakabe K., Katayama H., Okano K., Hatano M. (1984). "Defective cell-mediated immunity in lipid nephrosis" Int Arch Allergy Appl Immunol **73**(4): 370-2.
- Matsumoto K. (1997a). "Interleukin 10 inhibits vascular permeability factor release by peripheral blood mononuclear cells in patients with lipid nephrosis" Nephron **75**(2): 154-9.
- Matsumoto K., Ohi H., Kanmatsuse K. (1997b). "Interleukin 10 and interleukin 13 synergize to inhibit vascular permeability factor release by peripheral blood mononuclear cells from patients with lipid nephrosis" Nephron **77**(2): 212-8.
- Matsumoto K., Ohi H., Kanmatsuse K. (1998). "Interleukin 12 upregulates the release of vascular permeability factor by peripheral blood mononuclear cells from patients with lipid nephrosis" Nephron **78**(4): 403-9.
- Matsumoto K., Ohi H., Kanmatsuse K. (1999a). "Interleukin-4 cooperates with interleukin-10 to inhibit vascular permeability factor release by peripheral blood mononuclear cells from patients with minimal-change nephrotic syndrome" Am J Nephrol **19**(1): 21-7.
- Matsumoto K., Ohi H., Kanmatsuse K. (1999b). "Effects of interleukin-15 on vascular permeability factor release by peripheral blood mononuclear cells in normal subjects and in patients with minimal-change nephrotic syndrome" Nephron **82**(1): 32-8.
- Mauer S.M., Hellerstein S., Cohn R.A., Sibley R.K., Vernier R.L. (1979). "Recurrence of steroid-responsive nephrotic syndrome after renal transplantation" J Pediatr **95**(2): 261-4.
- Mawal-Dewan M., Lorenzini A., Frisoni L., Zhang H., Cristofalo V.J., Sell C. (2002). "Regulation of collagenase expression during replicative senescence in human fibroblasts by Akt-forkhead signaling" J Biol Chem **277**(10): 7857-64.
- McCarthy E.T., Sharma R., Sharma M., Li J.Z., Ge X.L., Dileepan K.N., Savin V.J. (1998). "TNF-alpha increases albumin permeability of isolated rat glomeruli through the generation of superoxide" J Am Soc Nephrol **9**(3): 433-8.

- McCauley J., Shapiro R., Jordan M., Scantlebury V., Vivas C., Jensen C., Starzl T.E. (1993). "FK 506 in the management of nephrotic syndrome after renal transplantation" Transplant Proc **25**(1 Pt 2): 1351-4.
- McDonald P., Kalra P.A., Coward R.A. (1992). "Thymoma and minimal-change glomerulonephritis" Nephrol Dial Transplant **7**(4): 357-9.
- McIntosh I., Dreyer S.D., Clough M.V., Dunston J.A., Eyaid W., Roig C.M., Montgomery T., Ala-Mello S., Kaitila I., Winterpacht A., Zabel B., Frydman M., Cole W.G., Francomano C.A., Lee B. (1998). "Mutation analysis of LMX1B gene in nail-patella syndrome patients" Am J Hum Genet **63**(6): 1651-8.
- Meadow S.R., Sarsfield J.K., Scott D.G., Rajah S.M. (1981). "Steroid-responsive nephrotic syndrome and allergy: immunological studies" Arch Dis Child **56**(7): 517-24.
- Meisel C., Bonhagen K., Lohning M., Coyle A.J., Gutierrez-Ramos J.C., Radbruch A., Kamradt T. (2001). "Regulation and function of T1/ST2 expression on CD4+ T cells: induction of type 2 cytokine production by T1/ST2 cross-linking" J Immunol **166**(5): 3143-50.
- Meyrier A., Simon P. (1988). "Treatment of corticoreistant idiopathic nephrotic syndrome in the adult: minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis" Adv Nephrol Necker Hosp **17**(127-50).
- Meyrier A., Condamin M.C., Broneer D. (1991). "Treatment of adult idiopathic nephrotic syndrome with cyclosporin A: minimal-change disease and focal-segmental glomerulosclerosis. Collaborative Group of the French Society of Nephrology" Clin Nephrol **35 Suppl 1**(S37-42).
- Meyrier A. (2004). "Nephrotic focal segmental glomerulosclerosis in 2004: an update" Nephrol Dial Transplant **19**(10): 2437-44.
- Michaud J.L., Lemieux L.I., Dube M., Vanderhyden B.C., Robertson S.J., Kennedy C.R. (2003). "Focal and segmental glomerulosclerosis in mice with podocyte-specific expression of mutant alpha-actinin-4" J Am Soc Nephrol **14**(5): 1200-11.
- Miner J.H., Morello R., Andrews K.L., Li C., Antignac C., Shaw A.S., Lee B. (2002). "Transcriptional induction of slit diaphragm genes by Lmx1b is required in podocyte differentiation" J Clin Invest **109**(8): 1065-72.
- Mishra O.P., Garg R., Usha, Ali Z., Das B.K. (1997). "Immunoglobulins and circulating immune complexes in nephrotic syndrome" J Trop Pediatr **43**(2): 93-7.
- Moller C.C., Wei C., Altintas M.M., Li J., Greka A., Ohse T., Pippin J.W., Rastaldi M.P., Wawersik S., Schiavi S., Henger A., Kretzler M., Shankland S.J., Reiser J. (2007). "Induction of TRPC6 channel in acquired forms of proteinuric kidney disease" J Am Soc Nephrol **18**(1): 29-36.
- Mosmann T.R., Coffman R.L. (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties" Annu Rev Immunol **7**(145-73).
- Moulin B., Ronco P.M., Mougenot B., Francois A., Fillastre J.P., Mignon F. (1992). "Glomerulonephritis in chronic lymphocytic leukemia and related B-cell lymphomas" Kidney Int **42**(1): 127-35.
- Mousson C., Ortega N., Girard J.P. (2008). "The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'?" PLoS ONE **3**(10): e3331.
- Mundel P., Reiser J. (1997a). "New aspects of podocyte cell biology" Kidney Blood Press Res **20**(3): 173-6.
- Mundel P., Reiser J., Zuniga Mejia Borja A., Pavenstadt H., Davidson G.R., Kriz W., Zeller R. (1997b). "Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during

- differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines" Exp Cell Res **236**(1): 248-58.
- Murugasu B., Yap H.K., Tay A.H. (1990). "The red cell charge in steroid--responsive nephrotic syndrome" J Singapore Paediatr Soc **32**(3-4): 129-31.
- Musante L., Candiano G., Bruschi M., Zennaro C., Carraro M., Artero M., Giuffrida M.G., Conti A., Santucci A., Ghiggeri G.M. (2002). "Characterization of plasma factors that alter the permeability to albumin within isolated glomeruli" Proteomics **2**(2): 197-205.
- Nagata M., Kriz W. (1992). "Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. II. Mechanical stress on podocytes as a pathway to sclerosis" Kidney Int **42**(1): 148-60.
- Nakayama M., Katafuchi R., Yanase T., Ikeda K., Tanaka H., Fujimi S. (2002). "Steroid responsiveness and frequency of relapse in adult-onset minimal change nephrotic syndrome" Am J Kidney Dis **39**(3): 503-12.
- Nakayama M., Kamei K., Nozu K., Matsuoka K., Nakagawa A., Sako M., Iijima K. (2008). "Rituximab for refractory focal segmental glomerulosclerosis" Pediatr Nephrol **23**(3): 481-5.
- Nathanson S., Cochat P., Andre J.L., Guyot C., Loirat C., Nivet H., Deschenes G. (2005). "Recurrence of nephrotic syndrome after renal transplantation: influence of increased immunosuppression" Pediatr Nephrol **20**(12): 1801-4.
- Neuhaus T.J., Shah V., Callard R.E., Barratt T.M. (1995). "T-lymphocyte activation in steroid-sensitive nephrotic syndrome in childhood" Nephrol Dial Transplant **10**(8): 1348-52.
- Newstead C.G. (2003). "Recurrent disease in renal transplants" Nephrol Dial Transplant **18 Suppl 6**(vi68-74).
- Niaudet P., Drachman R., Gagnadoux M.F., Broyer M. (1984). "Treatment of idiopathic nephrotic syndrome with levamisole" Acta Paediatr Scand **73**(5): 637-41.
- Niaudet P., Habib R. (1994). "Cyclosporine in the treatment of idiopathic nephrosis" J Am Soc Nephrol **5**(4): 1049-56.
- Niranjan T., Bielez B., Gruenwald A., Ponda M.P., Kopp J.B., Thomas D.B., Susztak K. (2008). "The Notch pathway in podocytes plays a role in the development of glomerular disease" Nat Med **14**(3): 290-8.
- Nishibori Y., Liu L., Hosoyamada M., Endou H., Kudo A., Takenaka H., Higashihara E., Bessho F., Takahashi S., Kershaw D., Ruotsalainen V., Tryggvason K., Khoshnoodi J., Yan K. (2004). "Disease-causing missense mutations in NPHS2 gene alter normal nephrin trafficking to the plasma membrane" Kidney Int **66**(5): 1755-65.
- Nolasco F., Cameron J.S., Heywood E.F., Hicks J., Ogg C., Williams D.G. (1986). "Adult-onset minimal change nephrotic syndrome: a long-term follow-up" Kidney Int **29**(6): 1215-23.
- Nozu K., Iijima K., Fujisawa M., Nakagawa A., Yoshikawa N., Matsuo M. (2005). "Rituximab treatment for posttransplant lymphoproliferative disorder (PTLD) induces complete remission of recurrent nephrotic syndrome" Pediatr Nephrol **20**(11): 1660-3.
- Oliver J.D., 3rd, Anderson S., Troy J.L., Brenner B.M., Deen W.H. (1992). "Determination of glomerular size-selectivity in the normal rat with Ficoll" J Am Soc Nephrol **3**(2): 214-28.
- Oshikawa K., Kuroiwa K., Tago K., Iwahana H., Yanagisawa K., Ohno S., Tominaga S.I., Sugiyama Y. (2001). "Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation" Am J Respir Crit Care Med **164**(2): 277-81.
- Parry R.G., Gillespie K.M., Mathieson P.W. (2001). "Effects of type 2 cytokines on glomerular epithelial cells" Exp Nephrol **9**(4): 275-83.

- Patek C.E., Fleming S., Miles C.G., Bellamy C.O., Lodomery M., Spraggon L., Mullins J., Hastie N.D., Hooper M.L. (2003). "Murine Denys-Drash syndrome: evidence of podocyte de-differentiation and systemic mediation of glomerulosclerosis" Hum Mol Genet **12**(18): 2379-94.
- Patrakka J., Ruotsalainen V., Reponen P., Qvist E., Laine J., Holmberg C., Tryggvason K., Jalanko H. (2002). "Recurrence of nephrotic syndrome in kidney grafts of patients with congenital nephrotic syndrome of the Finnish type: role of nephrin" Transplantation **73**(3): 394-403.
- Peces R., Sanchez L., Gorostidi M., Alvarez J. (1991). "Minimal change nephrotic syndrome associated with Hodgkin's lymphoma" Nephrol Dial Transplant **6**(3): 155-8.
- Pei Y., Cattran D., Delmore T., Katz A., Lang A., Rance P. (1987). "Evidence suggesting under-treatment in adults with idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. Regional Glomerulonephritis Registry Study" Am J Med **82**(5): 938-44.
- Pemble S., Schroeder K.R., Spencer S.R., Meyer D.J., Hallier E., Bolt H.M., Ketterer B., Taylor J.B. (1994). "Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism" Biochem J **300** (Pt 1)(271-6.
- Pescovitz M.D., Book B.K., Sidner R.A. (2006). "Resolution of recurrent focal segmental glomerulosclerosis proteinuria after rituximab treatment" N Engl J Med **354**(18): 1961-3.
- Peters H.P., van de Kar N.C., Wetzels J.F. (2008). "Rituximab in minimal change nephropathy and focal segmental glomerulosclerosis: report of four cases and review of the literature" Neth J Med **66**(10): 408-15.
- Pick E., Krejci J., Cech K., Turk J.L. (1969). "Interaction between 'sensitized lymphocytes' and antigen in vitro. I. The release of a skin reactive factor" Immunology **17**(5): 741-67.
- Pierson M., Cordier J., Hervouet F., Rauber G. (1963). "[an Unusual Congenital and Familial Congenital Malformative Combination Involving the Eye and Kidney.]" J Genet Hum **12**(184-213.
- Pilia P.A., Swain R.P., Williams A.V., Loadholt C.B., Ainsworth S.K. (1985). "Glomerular anionic site distribution in nonproteinuric rats. A computer-assisted morphometric analysis" Am J Pathol **121**(3): 474-85.
- Pinto J., Lacerda G., Cameron J.S., Turner D.R., Bewick M., Ogg C.S. (1981). "Recurrence of focal segmental glomerulosclerosis in renal allografts" Transplantation **32**(2): 83-9.
- Ponticelli C., Edefonti A., Ghio L., Rizzoni G., Rinaldi S., Gusmano R., Lama G., Zacchello G., Confalonieri R., Altieri P., et al. (1993). "Cyclosporin versus cyclophosphamide for patients with steroid-dependent and frequently relapsing idiopathic nephrotic syndrome: a multicentre randomized controlled trial" Nephrol Dial Transplant **8**(12): 1326-32.
- Ponticelli C., Villa M., Banfi G., Cesana B., Pozzi C., Pani A., Passerini P., Farina M., Grassi C., Baroli A. (1999). "Can prolonged treatment improve the prognosis in adults with focal segmental glomerulosclerosis?" Am J Kidney Dis **34**(4): 618-25.
- Quondamatteo F., Schulz T.G., Bunzel N., Hallier E., Herken R. (1998). "Immunohistochemical localization of glutathione S-transferase-T1 in murine kidney, liver, and lung" Histochem Cell Biol **110**(4): 417-23.
- Raafat R.H., Kalia A., Travis L.B., Diven S.C. (2004). "High-dose oral cyclosporin therapy for recurrent focal segmental glomerulosclerosis in children" Am J Kidney Dis **44**(1): 50-6.
- Ramjee G., Coovadia H.M., Adhikari M. (1996). "Direct and indirect tests of pore size and charge selectivity in nephrotic syndrome" J Lab Clin Med **127**(2): 195-9.

- Ramos E.L., Tisher C.C. (1994). "Recurrent diseases in the kidney transplant" Am J Kidney Dis **24**(1): 142-54.
- Rea R., Smith C., Sandhu K., Kwan J., Tomson C. (2001). "Successful transplant of a kidney with focal segmental glomerulosclerosis" Nephrol Dial Transplant **16**(2): 416-7.
- Reeves W.G., Cameron J.S., Johansson S.G., Ogg C.S., Peters D.K., Weller R.O. (1975). "Seasonal nephrotic syndrome. Description and immunological findings" Clin Allergy **5**(2): 121-37.
- Regele H.M., Fillipovic E., Langer B., Poczewski H., Kraxberger I., Bittner R.E., Kerjaschki D. (2000). "Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis" J Am Soc Nephrol **11**(3): 403-12.
- Reiser J., Kriz W., Kretzler M., Mundel P. (2000). "The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction" J Am Soc Nephrol **11**(1): 1-8.
- Reiser J., Oh J., Shirato I., Asanuma K., Hug A., Mundel T.M., Honey K., Ishidoh K., Kominami E., Kreidberg J.A., Tomino Y., Mundel P. (2004a). "Podocyte migration during nephrotic syndrome requires a coordinated interplay between cathepsin L and alpha3 integrin" J Biol Chem **279**(33): 34827-32.
- Reiser J., von Gersdorff G., Loos M., Oh J., Asanuma K., Giardino L., Rastaldi M.P., Calvaresi N., Watanabe H., Schwarz K., Faul C., Kretzler M., Davidson A., Sugimoto H., Kalluri R., Sharpe A.H., Kreidberg J.A., Mundel P. (2004b). "Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome" J Clin Invest **113**(10): 1390-7.
- Reiser J., Polu K.R., Moller C.C., Kenlan P., Altintas M.M., Wei C., Faul C., Herbert S., Villegas I., Avila-Casado C., McGee M., Sugimoto H., Brown D., Kalluri R., Mundel P., Smith P.L., Clapham D.E., Pollak M.R. (2005). "TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function" Nat Genet **37**(7): 739-44.
- Rich A.R. (1957). "A hitherto undescribed vulnerability of the juxtamedullary glomeruli in lipoid nephrosis" Bull Johns Hopkins Hosp **100**(4): 173-86.
- Rizzoni G., Ehrich J.H., Brunner F.P., Geerlings W., Fassbinder W., Landais P., Mallick N., Margreiter R., Raine A.E., Selwood N.H., et al. (1991). "Combined report on regular dialysis and transplantation of children in Europe, 1990" Nephrol Dial Transplant **6 Suppl 4**(31-42).
- Roberts W.G., Palade G.E. (1995). "Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor" J Cell Sci **108 (Pt 6)**(2369-79).
- Roberts W.G., Palade G.E. (1997). "Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated" Cancer Res **57**(4): 765-72.
- Rodewald R., Karnovsky M.J. (1974). "Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse" J Cell Biol **60**(2): 423-33.
- Rohr C., Prestel J., Heidet L., Hosser H., Kriz W., Johnson R.L., Antignac C., Witzgall R. (2002). "The LIM-homeodomain transcription factor Lmx1b plays a crucial role in podocytes" J Clin Invest **109**(8): 1073-82.
- Rostgaard J., Qvortrup K. (2002). "Sieve plugs in fenestrae of glomerular capillaries--site of the filtration barrier?" Cells Tissues Organs **170**(2-3): 132-8.
- Ruf R.G., Lichtenberger A., Karle S.M., Haas J.P., Anacleto F.E., Schultheiss M., Zalewski I., Imm A., Ruf E.M., Mucha B., Bagga A., Neuhaus T., Fuchshuber A., Bakaloglu A., Hildebrandt F. (2004). "Patients with mutations in NPHS2 (podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome" J Am Soc Nephrol **15**(3): 722-32.

- Ruger B.M., Erb K.J., He Y., Lane J.M., Davis P.F., Hasan Q. (2000). "Interleukin-4 transgenic mice develop glomerulosclerosis independent of immunoglobulin deposition" Eur J Immunol **30**(9): 2698-703.
- Ruotsalainen V., Ljungberg P., Wartiovaara J., Lenkkeri U., Kestila M., Jalanko H., Holmberg C., Tryggvason K. (1999). "Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes" Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 7962-7.
- Ryan G.B., Karnovsky M.J. (1976). "Distribution of endogenous albumin in the rat glomerulus: role of hemodynamic factors in glomerular barrier function" Kidney Int **9**(1): 36-45.
- Rydel J.J., Korbet S.M., Borok R.Z., Schwartz M.M. (1995). "Focal segmental glomerular sclerosis in adults: presentation, course, and response to treatment" Am J Kidney Dis **25**(4): 534-42.
- Sahali D., Pawlak A., Le Gouvello S., Lang P., Valanciute A., Remy P., Loirat C., Niaudet P., Bensman A., Guellaen G. (2001). "Transcriptional and post-transcriptional alterations of IkappaBalpha in active minimal-change nephrotic syndrome" J Am Soc Nephrol **12**(8): 1648-58.
- Sahali D., Pawlak A., Valanciute A., Grimbert P., Lang P., Remy P., Bensman A., Guellaen G. (2002). "A novel approach to investigation of the pathogenesis of active minimal-change nephrotic syndrome using subtracted cDNA library screening" J Am Soc Nephrol **13**(5): 1238-47.
- Sahiner S., Ayli M.D., Yuksel C., Onec K., Abayli E. (2004). "Membranous nephropathy associated with acute myeloid leukemia" Transplant Proc **36**(9): 2618-9.
- Saleem M.A., O'Hare M.J., Reiser J., Coward R.J., Inward C.D., Farren T., Xing C.Y., Ni L., Mathieson P.W., Mundel P. (2002). "A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression" J Am Soc Nephrol **13**(3): 630-8.
- Salomon R., Gagnadoux M.F., Niaudet P. (2003). "Intravenous cyclosporine therapy in recurrent nephrotic syndrome after renal transplantation in children" Transplantation **75**(6): 810-4.
- Sanada S., Hakuno D., Higgins L.J., Schreiter E.R., McKenzie A.N., Lee R.T. (2007). "IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system" J Clin Invest **117**(6): 1538-49.
- Sandberg D.H., Bernstein C.W., McIntosh R.M., Carr R., Strauss J. (1977). "Severe steroid-responsive nephrosis associated with hypersensitivity" Lancet **1**(8008): 388-91.
- Savin V.J., Sharma R., Lovell H.B., Welling D.J. (1992). "Measurement of albumin reflection coefficient with isolated rat glomeruli" J Am Soc Nephrol **3**(6): 1260-9.
- Savin V.J., Johnson R.J., Couser W.G. (1994). "C5b-9 increases albumin permeability of isolated glomeruli in vitro" Kidney Int **46**(2): 382-7.
- Savin V.J., Sharma R., Sharma M., McCarthy E.T., Swan S.K., Ellis E., Lovell H., Warady B., Gunwar S., Chonko A.M., Artero M., Vincenti F. (1996). "Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis" N Engl J Med **334**(14): 878-83.
- Sawada H., Stukenbrok H., Kerjaschki D., Farquhar M.G. (1986). "Epithelial polyanion (podocalyxin) is found on the sides but not the soles of the foot processes of the glomerular epithelium" Am J Pathol **125**(2): 309-18.
- Scanlan M.J., Gordan J.D., Williamson B., Stockert E., Bander N.H., Jongeneel V., Gure A.O., Jager D., Jager E., Knuth A., Chen Y.T., Old L.J. (1999). "Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma" Int J Cancer **83**(4): 456-64.
- Schena F.P., Cameron J.S. (1988). "Treatment of proteinuric idiopathic glomerulonephritides in adults: a retrospective survey" Am J Med **85**(3): 315-26.

- Schlondorff D. (1987). "The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte" FASEB J **1**(4): 272-81.
- Schlondorff J.S., Pollak M.R. (2006). "TRPC6 in glomerular health and disease: what we know and what we believe" Semin Cell Dev Biol **17**(6): 667-74.
- Schmieder S., Nagai M., Orlando R.A., Takeda T., Farquhar M.G. (2004). "Podocalyxin activates RhoA and induces actin reorganization through NHERF1 and Ezrin in MDCK cells" J Am Soc Nephrol **15**(9): 2289-98.
- Schmitz J., Owyang A., Oldham E., Song Y., Murphy E., McClanahan T.K., Zurawski G., Moshrefi M., Qin J., Li X., Gorman D.M., Bazan J.F., Kastelein R.A. (2005). "IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines" Immunity **23**(5): 479-90.
- Schnaper H.W., Aune T.M. (1985). "Identification of the lymphokine soluble immune response suppressor in urine of nephrotic children" J Clin Invest **76**(1): 341-9.
- Schnaper H.W. (1990). "A regulatory system for soluble immune response suppressor production in steroid-responsive nephrotic syndrome" Kidney Int **38**(1): 151-9.
- Schulte-Wissermann H., Gortz W., Straub E. (1979). "IgE in patients with glomerulonephritis and minimal-change nephrotic syndrome" Eur J Pediatr **131**(2): 105-11.
- Schwarz A., Krause P.H., Offermann G., Keller F. (1991). "Recurrent and de novo renal disease after kidney transplantation with or without cyclosporine A" Am J Kidney Dis **17**(5): 524-31.
- Schwarz K., Simons M., Reiser J., Saleem M.A., Faul C., Kriz W., Shaw A.S., Holzman L.B., Mundel P. (2001). "Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin" J Clin Invest **108**(11): 1621-9.
- Segarra A., Vila J., Pou L., Majo J., Arbos A., Quiles T., Piera L.L. (2002). "Combined therapy of tacrolimus and corticosteroids in cyclosporin-resistant or -dependent idiopathic focal glomerulosclerosis: a preliminary uncontrolled study with prospective follow-up" Nephrol Dial Transplant **17**(4): 655-62.
- Sellin L., Huber T.B., Gerke P., Quack I., Pavenstadt H., Walz G. (2003). "NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins" FASEB J **17**(1): 115-7.
- Senggutuvan P., Cameron J.S., Hartley R.B., Rigden S., Chantler C., Haycock G., Williams D.G., Ogg C., Koffman G. (1990). "Recurrence of focal segmental glomerulosclerosis in transplanted kidneys: analysis of incidence and risk factors in 59 allografts" Pediatr Nephrol **4**(1): 21-8.
- Sewell R.F., Brenchley P.E., Mallick N.P. (1989). "Human mononuclear cells contain an endoglycosidase specific for heparan sulphate glycosaminoglycan demonstrable with the use of a specific solid-phase metabolically radiolabelled substrate" Biochem J **264**(3): 777-83.
- Sfikakis P.P., Souliotis V.L., Fragiadaki K.G., Moutsopoulos H.M., Boletis J.N., Theofilopoulos A.N. (2007). "Increased expression of the FoxP3 functional marker of regulatory T cells following B cell depletion with rituximab in patients with lupus nephritis" Clin Immunol **123**(1): 66-73.
- Shalhoub R.J. (1974). "Pathogenesis of lipid nephrosis: a disorder of T-cell function" Lancet **2**(7880): 556-60.
- Sharma M., Sharma R., McCarthy E.T., Savin V.J. (1999). ""The FSGS factor:" enrichment and in vivo effect of activity from focal segmental glomerulosclerosis plasma" J Am Soc Nephrol **10**(3): 552-61.
- Sharma M., Sharma R., Reddy S.R., McCarthy E.T., Savin V.J. (2002). "Proteinuria after injection of human focal segmental glomerulosclerosis factor" Transplantation **73**(3): 366-72.

- Sharma R., Khanna A., Sharma M., Savin V.J. (2000a). "Transforming growth factor-beta1 increases albumin permeability of isolated rat glomeruli via hydroxyl radicals" Kidney Int **58**(1): 131-6.
- Sharma R., Sharma M., McCarthy E.T., Ge X.L., Savin V.J. (2000b). "Components of normal serum block the focal segmental glomerulosclerosis factor activity in vitro" Kidney Int **58**(5): 1973-9.
- Shih N.Y., Li J., Karpitskii V., Nguyen A., Dustin M.L., Kanagawa O., Miner J.H., Shaw A.S. (1999). "Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein" Science **286**(5438): 312-5.
- Shimpo M., Morrow D.A., Weinberg E.O., Sabatine M.S., Murphy S.A., Antman E.M., Lee R.T. (2004). "Serum levels of the interleukin-1 receptor family member ST2 predict mortality and clinical outcome in acute myocardial infarction" Circulation **109**(18): 2186-90.
- Siegel N.J., Goldberg B., Krassner L.S., Hayslett J.P. (1972). "Long-term follow-up of children with steroid-responsive nephrotic syndrome" J Pediatr **81**(2): 251-8.
- Smith G.C. (2007). "Is there a role for rituximab in the treatment of idiopathic childhood nephrotic syndrome?" Pediatr Nephrol **22**(6): 893-8.
- Smoyer W.E., Mundel P. (1998). "Regulation of podocyte structure during the development of nephrotic syndrome" J Mol Med **76**(3-4): 172-83.
- Stephan J.L., Deschenes G., Perel Y., Bader-Meunier B., Brunat-Mentigny M., Lejars O., Lamagneres J.P. (1997). "Nephrotic syndrome and Hodgkin disease in children: a report of five cases" Eur J Pediatr **156**(3): 239-42.
- Stephanian E., Matas A.J., Mauer S.M., Chavers B., Nevins T., Kashtan C., Sutherland D.E., Gores P., Najarian J.S. (1992). "Recurrence of disease in patients retransplanted for focal segmental glomerulosclerosis" Transplantation **53**(4): 755-7.
- Sterzel R.B., Schulze-Lohoff E., Weber M., Goodman S.L. (1992). "Interactions between glomerular mesangial cells, cytokines, and extracellular matrix" J Am Soc Nephrol **2**(10 Suppl): S126-31.
- Stirling C.M., Mathieson P., Boulton-Jones J.M., Feehally J., Jayne D., Murray H.M., Adu D. (2005). "Treatment and outcome of adult patients with primary focal segmental glomerulosclerosis in five UK renal units" QJM **98**(6): 443-9.
- Striegel J.E., Sibley R.K., Fryd D.S., Mauer S.M. (1986). "Recurrence of focal segmental sclerosis in children following renal transplantation" Kidney Int Suppl **19**(S44-50).
- Sun X., Burns J.B., Howell J.M., Fujinami R.S. (1998). "Suppression of antigen-specific T cell proliferation by measles virus infection: role of a soluble factor in suppression" Virology **246**(1): 24-33.
- Suri M., Tran K., Sharma A.P., Filler G., Grimmer J. (2008). "Remission of steroid-resistant nephrotic syndrome due to focal and segmental glomerulosclerosis using rituximab" Int Urol Nephrol **40**(3): 807-10.
- Tajima S., Oshikawa K., Tominaga S., Sugiyama Y. (2003). "The increase in serum soluble ST2 protein upon acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis" Chest **124**(4): 1206-14.
- Takami H., Naramoto A., Shigematsu H., Ohno S. (1991). "Ultrastructure of glomerular basement membrane by quick-freeze and deep-etch methods" Kidney Int **39**(4): 659-64.
- Takeda T., McQuistan T., Orlando R.A., Farquhar M.G. (2001). "Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton" J Clin Invest **108**(2): 289-301.
- Tanaka R., Yoshikawa N., Nakamura H., Ito H. (1992). "Infusion of peripheral blood mononuclear cell products from nephrotic children increases albuminuria in rats" Nephron **60**(1): 35-41.

- Tanawattanacharoen S., Falk R.J., Jennette J.C., Kopp J.B. (2000). "Parvovirus B19 DNA in kidney tissue of patients with focal segmental glomerulosclerosis" Am J Kidney Dis **35**(6): 1166-74.
- Tareyeva I.E., Nikolaev A.J., Janushkevitch T.N. (1982). "Nephrotic syndrome induced by insect sting" Lancet **2**(8302): 825.
- Teixeira Vde P., Blattner S.M., Li M., Anders H.J., Cohen C.D., Edenhofer I., Calvaresi N., Merkle M., Rastaldi M.P., Kretzler M. (2005). "Functional consequences of integrin-linked kinase activation in podocyte damage" Kidney Int **67**(2): 514-23.
- Thomas S., Vanuystel J., Gruden G., Rodriguez V., Burt D., Gnudi L., Hartley B., Viberti G. (2000). "Vascular endothelial growth factor receptors in human mesangium in vitro and in glomerular disease" J Am Soc Nephrol **11**(7): 1236-43.
- Tominaga S. (1989). "A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor" FEBS Lett **258**(2): 301-4.
- Tomizawa S., Nagasawa N., Maruyama K., Shimabukuro N., Arai H., Kuroume T. (1990). "Release of the vascular permeability factor in minimal change nephrotic syndrome is related to CD4+ lymphocytes" Nephron **56**(3): 341-2.
- Tomlanovich S., Vincenti F., Amend W., Biava C., Melzer J., Feduska N., Salvatierra O. (1988). "Is cyclosporine effective in preventing recurrence of immune-mediated glomerular disease after renal transplantation?" Transplant Proc **20**(3 Suppl 4): 285-8.
- Topaloglu R., Saatci U., Arikan M., Canpinar H., Bakkaloglu A., Kansu E. (1994). "T-cell subsets, interleukin-2 receptor expression and production of interleukin-2 in minimal change nephrotic syndrome" Pediatr Nephrol **8**(6): 649-52.
- Torretta L., Perotti C., Costamagna L., Tarantino A., Salvaneschi L. (1995). "Usefulness of plasma exchange in recurrent nephrotic syndrome following renal transplant" Artif Organs **19**(1): 96-8.
- Trajkovic V., Sweet M.J., Xu D. (2004). "T1/ST2--an IL-1 receptor-like modulator of immune responses" Cytokine Growth Factor Rev **15**(2-3): 87-95.
- Tryggvason K. (1999). "Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm" J Am Soc Nephrol **10**(11): 2440-5.
- Tsukaguchi H., Sudhakar A., Le T.C., Nguyen T., Yao J., Schwimmer J.A., Schachter A.D., Poch E., Abreu P.F., Appel G.B., Pereira A.B., Kalluri R., Pollak M.R. (2002). "NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele" J Clin Invest **110**(11): 1659-66.
- Tune B.M., Mendoza S.A. (1997). "Treatment of the idiopathic nephrotic syndrome: regimens and outcomes in children and adults" J Am Soc Nephrol **8**(5): 824-32.
- Valanciute A., le Gouvello S., Solhonne B., Pawlak A., Grimbert P., Lyonnet L., Hue S., Lang P., Remy P., Salomon R., Bensman A., Guellaen G., Sahali D. (2004). "NF-kappa B p65 antagonizes IL-4 induction by c-maf in minimal change nephrotic syndrome" J Immunol **172**(1): 688-98.
- Valdivia P., Gonzalez Roncero F., Gentil M.A., Jimenez F., Algarra G., Pereira P., Rivera M., Suner M., Cabello V., Toro J., Mateos J. (2005). "Plasmapheresis for the prophylaxis and treatment of recurrent focal segmental glomerulosclerosis following renal transplant" Transplant Proc **37**(3): 1473-4.
- Vallerskog T., Gunnarsson I., Widhe M., Risselada A., Klareskog L., van Vollenhoven R., Malmstrom V., Trollmo C. (2007). "Treatment with rituximab affects both the cellular and the humoral arm of the immune system in patients with SLE" Clin Immunol **122**(1): 62-74.

- Van Den Berg J.G., Aten J., Chand M.A., Claessen N., Dijkink L., Wijdenes J., Lakkis F.G., Weening J.J. (2000). "Interleukin-4 and interleukin-13 act on glomerular visceral epithelial cells" J Am Soc Nephrol **11**(3): 413-22.
- Van Den Berg J.G., Aten J., Annink C., Ravesloot J.H., Weber E., Weening J.J. (2002). "Interleukin-4 and -13 promote basolateral secretion of H(+) and cathepsin L by glomerular epithelial cells" Am J Physiol Renal Physiol **282**(1): F26-33.
- van den Berg J.G., Weening J.J. (2004). "Role of the immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome" Clin Sci (Lond) **107**(2): 125-36.
- Vasmant D., Maurice M., Feldmann G. (1984). "Cytoskeleton ultrastructure of podocytes and glomerular endothelial cells in man and in the rat" Anat Rec **210**(1): 17-24.
- Velosa J.A., Holley K.E., Torres V.E., Offord K.P. (1983). "Significance of proteinuria on the outcome of renal function in patients with focal segmental glomerulosclerosis" Mayo Clin Proc **58**(9): 568-77.
- Verani R.R., Hawkins E.P. (1986). "Recurrent focal segmental glomerulosclerosis. A pathological study of the early lesion" Am J Nephrol **6**(4): 263-70.
- Verma R., Wharram B., Kovari I., Kunkel R., Nihalani D., Wary K.K., Wiggins R.C., Killen P., Holzman L.B. (2003). "Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephlin" J Biol Chem **278**(23): 20716-23.
- Vigna-Perez M., Hernandez-Castro B., Paredes-Saharopulos O., Portales-Perez D., Baranda L., Abud-Mendoza C., Gonzalez-Amaro R. (2006). "Clinical and immunological effects of Rituximab in patients with lupus nephritis refractory to conventional therapy: a pilot study" Arthritis Res Ther **8**(3): R83.
- Vollrath D., Jaramillo-Babb V.L., Clough M.V., McIntosh I., Scott K.M., Lichter P.R., Richards J.E. (1998). "Loss-of-function mutations in the LIM-homeodomain gene, LMX1B, in nail-patella syndrome" Hum Mol Genet **7**(7): 1091-8.
- Waage A., Slupphaug G., Shalaby R. (1990). "Glucocorticoids inhibit the production of IL6 from monocytes, endothelial cells and fibroblasts" Eur J Immunol **20**(11): 2439-43.
- Waldman M., Crew R.J., Valeri A., Busch J., Stokes B., Markowitz G., D'Agati V., Appel G. (2007). "Adult minimal-change disease: clinical characteristics, treatment, and outcomes" Clin J Am Soc Nephrol **2**(3): 445-53.
- Walton H.A., Byrne J., Robinson G.B. (1992). "Studies of the permeation properties of glomerular basement membrane: cross-linking renders glomerular basement membrane permeable to protein" Biochim Biophys Acta **1138**(3): 173-83.
- Warshaw B.L., Check I.J. (1989). "IgG subclasses in children with nephrotic syndrome" Am J Clin Pathol **92**(1): 68-72.
- Wartiovaara J., Ofverstedt L.G., Khoshnoodi J., Zhang J., Makela E., Sandin S., Ruotsalainen V., Cheng R.H., Jalanko H., Skoglund U., Tryggvason K. (2004). "Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography" J Clin Invest **114**(10): 1475-83.
- Webb N.J., Watson C.J., Roberts I.S., Bottomley M.J., Jones C.A., Lewis M.A., Postlethwaite R.J., Brenchley P.E. (1999). "Circulating vascular endothelial growth factor is not increased during relapses of steroid-sensitive nephrotic syndrome" Kidney Int **55**(3): 1063-71.
- Weber S., Gribouval O., Esquivel E.L., Moriniere V., Tete M.J., Legendre C., Niaudet P., Antignac C. (2004). "NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence" Kidney Int **66**(2): 571-9.

- Weinberg E.O., Shimp M., Hurwitz S., Tominaga S., Rouleau J.L., Lee R.T. (2003). "Identification of serum soluble ST2 receptor as a novel heart failure biomarker" Circulation **107**(5): 721-6.
- White R.H., Glasgow E.F., Mills R.J. (1970). "Clinicopathological study of nephrotic syndrome in childhood" Lancet **1**(7661): 1353-9.
- Whiteside S.T., Epinat J.C., Rice N.R., Israel A. (1997). "I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity" EMBO J **16**(6): 1413-26.
- Wichmann I., Aguilera I., Sousa J.M., Bernardos A., Garcia Nunez E.J., Vigil E., Magarino R., Magarino I., Torres A., Nunez-Roldan A. (2006). "Antibodies against glutathione S-transferase T1 in non-solid organ transplanted patients" Transfusion **46**(9): 1505-9.
- Wijnhoven T.J., Geelen J.M., Bakker M., Lensen J.F., Rops A.L., Kramer A.B., Navis G., van den Hoven M.J., van der Vlag J., Berden J.H., Wetzels J.F., van den Heuvel L.P., Monnens L.A., van Kuppevelt T.H. (2007). "Adult and paediatric patients with minimal change nephrotic syndrome show no major alterations in glomerular expression of sulphated heparan sulphate domains" Nephrol Dial Transplant **22**(10): 2886-93.
- Williamson D.A. (1970). "Nephrotic syndrome associated with inhaled allergens" Lancet **1**(7650): 778.
- Winn M.P., Conlon P.J., Lynn K.L., Farrington M.K., Creazzo T., Hawkins A.F., Daskalakis N., Kwan S.Y., Ebersviller S., Burchette J.L., Pericak-Vance M.A., Howell D.N., Vance J.M., Rosenberg P.B. (2005). "A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis" Science **308**(5729): 1801-4.
- Wittig H.J., Goldman A.S. (1970). "Nephrotic syndrome associated with inhaled allergens" Lancet **1**(7646): 542-3.
- Xu D., Chan W.L., Leung B.P., Huang F., Wheeler R., Piedrafita D., Robinson J.H., Liew F.Y. (1998). "Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells" J Exp Med **187**(5): 787-94.
- Yabu J.M., Ho B., Scandling J.D., Vincenti F. (2008). "Rituximab failed to improve nephrotic syndrome in renal transplant patients with recurrent focal segmental glomerulosclerosis" Am J Transplant **8**(1): 222-7.
- Yahata N., Kawanishi Y., Okabe S., Kimura Y., Okada T., Otani M., Shimizu T., Nakao T., Ohyashiki K. (2000). "Membranous glomerulonephritis with nephrotic syndrome associated with chronic lymphocytic leukemia" Am J Nephrol **20**(5): 402-7.
- Yan K., Nakahara K., Awa S., Nishibori Y., Nakajima N., Kataoka S., Maeda M., Watanabe T., Matsushima S., Watanabe N. (1998). "The increase of memory T cell subsets in children with idiopathic nephrotic syndrome" Nephron **79**(3): 274-8.
- Yan K., Kudo A., Hirano H., Watanabe T., Tasaka T., Kataoka S., Nakajima N., Nishibori Y., Shibata T., Kohsaka T., Higashihara E., Tanaka H., Watanabe H., Nagasawa T., Awa S. (1999). "Subcellular localization of glucocorticoid receptor protein in the human kidney glomerulus" Kidney Int **56**(1): 65-73.
- Yanagisawa K., Naito Y., Kuroiwa K., Arai T., Furukawa Y., Tomizuka H., Miura Y., Kasahara T., Tetsuka T., Tominaga S. (1997). "The expression of ST2 gene in helper T cells and the binding of ST2 protein to myeloma-derived RPMI8226 cells" J Biochem **121**(1): 95-103.
- Yang T., Nast C.C., Vo A., Jordan S.C. (2008). "Rapid remission of steroid and mycophenolate mofetil (mmf)-resistant minimal change nephrotic syndrome after rituximab therapy" Nephrol Dial Transplant **23**(1): 377-80.

- Yao J., Le T.C., Kos C.H., Henderson J.M., Allen P.G., Denker B.M., Pollak M.R. (2004). "Alpha-actinin-4-mediated FSGS: an inherited kidney disease caused by an aggregated and rapidly degraded cytoskeletal protein" PLoS Biol **2**(6): e167.
- Yap H.K., Yip W.C., Lee B.W., Ho T.F., Teo J., Aw S.E., Tay J.S. (1983). "The incidence of atopy in steroid-responsive nephrotic syndrome: clinical and immunological parameters" Ann Allergy **51**(6): 590-4.
- Yokoyama H., Kida H., Tani Y., Abe T., Tomosugi N., Koshino Y., Hattori N. (1985). "Immunodynamics of minimal change nephrotic syndrome in adults T and B lymphocyte subsets and serum immunoglobulin levels" Clin Exp Immunol **61**(3): 601-7.
- Yokoyama H., Kida H., Abe T., Koshino Y., Yoshimura M., Hattori N. (1987). "Impaired immunoglobulin G production in minimal change nephrotic syndrome in adults" Clin Exp Immunol **70**(1): 110-5.
- Yoshizawa N., Kusumi Y., Matsumoto K., Oshima S., Takeuchi A., Kawamura O., Kubota T., Kondo S., Niwa H. (1989). "Studies of a glomerular permeability factor in patients with minimal-change nephrotic syndrome" Nephron **51**(3): 370-6.
- Zenker M., Aigner T., Wendler O., Tralau T., Muntefering H., Fenski R., Pitz S., Schumacher V., Royer-Pokora B., Wuhl E., Cochat P., Bouvier R., Kraus C., Mark K., Madlon H., Dotsch J., Rascher W., Maruniak-Chudek I., Lennert T., Neumann L.M., Reis A. (2004a). "Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities" Hum Mol Genet **13**(21): 2625-32.
- Zenker M., Tralau T., Lennert T., Pitz S., Mark K., Madlon H., Dotsch J., Reis A., Muntefering H., Neumann L.M. (2004b). "Congenital nephrosis, mesangial sclerosis, and distinct eye abnormalities with microcoria: an autosomal recessive syndrome" Am J Med Genet A **130A**(2): 138-45.
- Zimmerman S.W. (1984). "Increased urinary protein excretion in the rat produced by serum from a patient with recurrent focal glomerular sclerosis after renal transplantation" Clin Nephrol **22**(1): 32-8.

ANNEXES

Annexe 1 : Revue Bruneau *et al.*

New insights into the pathophysiology of idiopathic nephrotic syndrome.

Sarah Bruneau and Jacques Dantal

INSERM, U643, Nantes, F44093 France; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITERT) Nantes, F44000 France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France.

Correspondance to Pr. Jacques Dantal, ITERT/INSERM U643, CHU Hôtel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes cedex 01, France, jacques.dantal@chu-nantes.fr

Tel: +33 (0)2-40-08-74-41

Fax: +33 (0)2-40-08-74-11

Acceptée pour publication dans *Clinical Immunology*.

Abstract:

Corticoreistant idiopathic nephrotic syndrome (INS) is a glomerulopathy of unknown etiology whose original aspect is its recurrence after kidney transplantation in 30 to 50% of patients with end-stage renal disease. This suggests the involvement of circulating factors that would alter the glomerular filtration barrier, but whose nature remains elusive. Although a T cell immune origin has been suggested, the actual role of these cells in INS recurrence is still unclear. Here we present an 8-year-old patient with corticoreistant INS who developed a recurrence of her initial disease after kidney transplantation. Rituximab therapy was proposed 11 months after transplantation; although no immediate effect was induced, a slow but persistent decrease in proteinuria began a few months after Rituximab infusions despite cessation of plasma exchanges and steroid therapy. The pathophysiology of INS and the putative mechanisms of action of Rituximab are discussed.

Case presentation:

An 8-year-old girl received a renal transplant for end-stage renal disease due to an idiopathic nephrotic syndrome diagnosed at 6 years of age. This nephrotic syndrome remained unaffected after 2 months of steroid treatment; a kidney biopsy showed minimal change disease. This patient was resistant to steroid pulse therapy and Cyclosporin A and moved rapidly toward end-stage renal failure. There was no evidence of podocin or WT1 mutations, and dialysis was started 17 months after the onset of the nephrotic syndrome.

A cadaveric kidney transplantation was performed after 8 months of hemodialysis. The donor was a 5-year-old boy who presented 2 HLA compatibilities (A02/02, B44/55, DR04/14) with the recipient (A02/32, B57/14, DR04/07). The cause of the death was related to a trauma, and transplantation was done after a cold ischemia time of 720 min. Initial immunosuppressive therapy consisted of Simulect® (*Basiliximab*, Novartis) (20 mg at days 1 and 4), Cyclosporine A (CsA) (10 mg/kg/day per os), Mycophenolate Mofetil (MMF) (600 mg/m²/day) and steroids (1 mg/kg/day). The recovery of renal function was immediate, with a massive proteinuria occurring at Day 1. At Day 7, a kidney graft biopsy showed a normal pattern with only podocytes foot processes fusion observed at electronic microscopy, leading to the diagnosis of recurrence of idiopathic nephrotic syndrome due to minimal change nephropathy. Treatment was then modified with 1) administration of Cyclosporin A by IV (600 mg/day) to maintain a high CsA blood level (objective: 400 ng/mL) and 2) introduction of plasma exchanges (1.5 plasmatic volumes were exchanged each time, 3 sessions weekly) (**Figure 1, Part 1**). With this strategy, we observed a decrease in proteinuria from 8.0 to 1.5 g/d at Day 35; reduction of plasma exchanges by 2 sessions per week was associated with an increase of proteinuria up to 6.6 g/d at Day 48. We then maintained treatment with Cyclosporin A by IV and plasma exchanges (3 sessions per week) but converted the patient from Mycophenolate Mofetil to Cyclophosphamide (50 mg/day per os) (**Figure 1, Part 2**).

Three weeks after this conversion, proteinuria decreased to below 2 g/day. Cyclosporin A by IV was interrupted and replaced by administration per os, with monitoring to obtain trough levels between 180 and 250 ng/mL; plasma exchanges were reduced to 2 sessions per week and then to 1 session per week. Cyclophosphamide treatment was interrupted after 2 months as scheduled. The patient was then treated with low doses of corticosteroids (CS), CsA, MMF and 1 plasma exchange session weekly. At 5 months post-transplantation, the patient did not present any infection or show signs of acute rejection. Serum creatinine was 80 μ mol/L with stable proteinuria levels between 1.5 and 2.0 g/day and normal serum albumin levels (36 to 40 g/L).

Nevertheless, proteinuria increased and peaked at 7-8 months within nephrotic ranges (**Figure 1, Part 3**). We started a second course of cyclophosphamide in association with Captopril and re-intensified plasma exchange therapy to 3 sessions per week, but proteinuria remained unchanged at 5 to 7 g/day. Cyclophosphamide and plasma exchanges were interrupted after 1 and 2 months, respectively (**Figure 1, Part 4**). Eleven months post-transplantation, Rituximab (375 mg weekly for one month) in association with CsA-MMF-low doses CS (**Figure 1, Part 5**) and reintroduction of intensive treatment with plasma exchange (3 sessions weekly) was proposed. No immediate effect was observed, and at one year post-transplantation, proteinuria remained between 5 and 8 g/day, and serum creatinine remained stable at 90 μ mol/L. Plasma exchanges were stopped 15 months post-transplantation, and CS therapy was withdrawn (**Figure 1, Part 6**). We observed thereafter a slow decrease in proteinuria to 3.6 g/d at 6 months and 2.35 g/d at 12 months after Rituximab infusions; peripheral CD19+ cells were absent (**Figure 1, Part 7**). Long-term follow-up (6 years after transplantation) confirmed reduction of proteinuria below 1 g/d, while CD19+ cells had returned to their pre-treatment levels. The patient was not in complete remission but

exhibited stable renal function (serum creatinine: 110 $\mu\text{mol/L}$), while immunosuppressive therapy was CsA-MMF in association with 50 mg of Captopril.

Discussion:

Primary idiopathic nephrotic syndrome (INS) is a glomerulopathy of unknown etiology characterized by a massive albuminuria, which can be associated with two main types of glomerular lesions, Minimal Change Nephrotic Syndrome (MCNS) and Focal and Segmental Glomerular Sclerosis (FSGS). During INS, the first injury occurs at the level of glomerular podocytes. These cells are highly differentiated visceral epithelial cells whose intercellular space is defined by the slit diaphragm, composed of a molecular complex essential for the maintenance of glomerular permselectivity. The recent discovery of genetic abnormalities involved in INS, particularly mutation of genes that encode for several slit diaphragm proteins (for a review, see [1]), has aided researchers in understanding the molecular mechanisms involved in the development of the nephrotic syndrome. However, most of the 20% of patients with INS/FSGS who do not respond to the classical treatment involving corticosteroids, Cyclosporine A and cyclophosphamide do not exhibit such genetic alterations. These patients usually evolve toward end-stage renal failure, requiring hemodialysis and/or kidney transplantation. However, the initial disease recurs quickly in 30 to 50% of transplanted patients [2], thus leading to loss of the graft within months or years after transplantation.

In 1972, Hoyer was the first author to put forth the hypothesis that a circulating permeability factor could alter the glomerular filtration barrier and would therefore be responsible for the recurrence of INS after transplantation [3]. This assumption, which is particularly based on the fact that INS can recur immediately after kidney transplantation (sometimes within just a few hours), is now accepted by many authors. On the contrary, kidney transplantation from a donor with INS to a recipient with another renal pathology leads to the disappearance of proteinuria, which seems to exclude the possibility of a single intra-renal abnormality [4, 5]. Another interesting point is the beneficial effect of plasma exchanges, which are able to induce a transient remission of proteinuria, probably through their capacity to remove the glomerular permeability factor from circulation [6, 7]. In the patient whom we discuss here, this hypothesis is strongly supported by the fact that plasma exchanges decreased proteinuria levels, and these levels increased immediately when plasmapheresis sessions were reduced or stopped; this suggests constant production of the permeability factor(s) despite the immunosuppressive regimen. Interestingly, plasma immunoadsorption onto Protein A or Ig-Therasorb columns also leads to a transitory decrease in proteinuria levels in patients with INS recurrence [8, 9], which could suggest the intervention of an immunoglobulin or a factor carried on immunoglobulins. Finally, the glomerular permeability factor hypothesis is supported by some cases of proteinuria transmission from a mother with INS to her fetus [10, 11], suggesting that the permeability factor was able to cross the placental barrier in these cases.

The glomerular permeability factors involved in INS recurrence have been explored in many studies. However, none of this research was able to identify a concrete mechanism. The beneficial effects of corticosteroids and immunosuppressive treatments in the initial disease and the disease's association with hematologic malignancies (Hodgkin's disease, chronic lymphoid leukemia, thymomas), as well as the discovery of T lymphocyte anomalies in

corticossensitive INS, suggest a T cell immune origin, but this still needs to be determined, particularly with regard to corticoresistant INS.

Putative glomerular permeability factors:

Several approaches have been used to identify and characterize the glomerular permeability factor(s) involved in INS recurrence after transplantation. The first attempts consisted of injecting patients' plasma or plasma fractions into rats. In 1984, Zimmerman became the first to transfer the serum proteinuric activity of a patient with recurrent INS into a rat, using intra-aortic injection [12]. Injection of proteins retained on Protein A columns during the treatment of patients with recurrent INS also led to the transfer of the activity of the putative permeability factor(s) [8]. However, it has been difficult to reproduce these initial encouraging results, and a lack of specificity, which may have been due to a low final concentration of the factor, species-specificity or the possible presence of protective factors in the serum of healthy rats, was demonstrated afterward [13].

The second approach consisted of using isolated rats' glomeruli incubated with patients' sera *in vitro* in order to estimate indirectly the presence of a glomerular permeability factor [14]. This technique also enabled researchers to confirm the presence of proteinuric activity in the serum of INS patients [15]; this activity level seemed to have a predictive value for recurrence, although this finding was not consistent [16]. This bioassay was used by several authors in an attempt to purify and characterize the glomerular permeability factor. Partial purification was achieved by ammonium sulfate precipitation of plasmatic proteins and was thus found to be in the 70% ammonium sulfate fraction, with an estimated molecular weight between 30 and 50 kD [17]. More recently, this technique led to the identification of cardiotrophin like cytokine 1 (CLC1), a protein of the IL6 family found in the plasma of a

patient with recurrent INS (Savin V. *et al.*, ASN Renal Week 2008). This protein has been proposed as a permeability factor, as it is capable of inducing an increase in albumin permeability in isolated rats' glomeruli *in vitro* and its injection into rats leads to an increase in protein excretion levels. Interestingly, the three known receptors for CLC1 (gp130, CNTFR and LIFR) are expressed on podocytes. Moreover, mRNA encoding for CLC1 was shown to be overexpressed in the PBMCs of 15 patients with recurrent INS in comparison to patients transplanted due to another end-stage renal disease. However, these initial results and the potential mechanism of cellular action for this protein need to be confirmed in more patients.

Recently, the development of immortalized mouse and human podocyte cell lines [18, 19] enabled researchers to consider new strategies for the study of permeability factors and, in particular, the molecular mechanisms induced by these factors in podocytes during INS. A recent study showed that incubation of the mouse podocyte cell line with plasma from patients with recurrent INS could induce the detachment of podocytes from their matrix, thus reproducing the podocyte detachment phenomenon that is observed during the development of glomerular injuries associated with INS in humans ([20] and personal observations). Moreover, Saleem's team showed that incubation of the human podocyte cell line with plasma from nephrotic INS patients induces a cytoplasmic delocalization of the fundamental slit diaphragm complex proteins nephrin, podocin and CD2AP, while podocytes incubated with plasma from "non-nephrotic" patients display a normal membranous distribution of these three proteins [21]. These results are interesting, as they reproduce the nephrin and podocin delocalization that occurs during INS in humans [22]. These authors also demonstrated that incubation with normal plasma could reverse this delocalization, thus underlying the possible existence of podocyte protective factors. The presence of these protective factors was also suggested in a study on isolated glomeruli in which it was reported that plasma from healthy subjects was able to prevent the glomerular permeability induced by plasma from patients

with recurrent INS [23]. The hypothesized protective factors could explain the difficulty found in transferring proteinuric activity into animals or obtaining reproducible results *in vitro*. However, the beneficial effect of plasma exchanges on proteinuria levels seems to support the excess of a permeability factor.

The difficulties encountered in researching the permeability factor demonstrate the complexity of the mechanisms leading to INS and support the probable involvement of several players, with a balance between permeability factor(s) and protective factor(s) deregulated in INS. The primary difficulty stems from the heterogeneous nature of corticoresistant INS. Indeed, the interpretation of the different results described above needs to be revisited in light of the recent discovery of genetic abnormalities leading to INS. A growing number of proteins mutated in INS have now been described, including nephrin, podocin, and CD2AP, which are some crucial slit diaphragm proteins [1]. The term “podocytopathies” is used in such cases, and one could expect the absence of recurrence after transplantation. However, this is not always the case, and some cases of recurrence have been reported in patients with nephrin [24] or podocin [25] mutations. In patients with mutations of the gene encoding for nephrin, immunization against the neoantigen introduced by the graft has clearly been demonstrated as the cause of recurrence [26]. In contrast, although a permeability factor activity has been detected in the serum of recurrent patients with a podocin mutation both before and after transplantation [27], no anti-podocin antibodies were found in these patients. Nevertheless, these observations suggest that antibodies against podocyte proteins can trigger cellular injuries that lead to recurrence of INS and that other targets on podocytes cannot yet be excluded.

An immune origin?

The role of the immune system in INS is strongly suggested, although evidence supporting this hypothesis has thus far been indirect. Indeed, examination of patients' glomeruli does not evidence any inflammation, T lymphocytes or other immune cells infiltrate and immunoglobulins or complement deposit. These observations support the hypothesis of a soluble mediator secreted by an immune cell, which is able to damage the glomerular filtration barrier. The glomerular permeability factor-producing cell is still unknown, but several clinical arguments suggest T lymphocyte involvement. Indeed, while a nephrotic syndrome can arise during an activation of the immune system triggered by a viral infection [28, 29], definitive extinction of INS can occur following a measles infection in conjunction with a profound T immunosuppression [30, 31]. Moreover, INS can be associated with chronic lymphoid hemopathies [32-34] or allergic reactions [35-37]. The role of T lymphocytes is also supported by a decrease in IgG levels and a strong increase in IgM levels during INS relapse [38]. This pattern would indeed correspond to an anomaly in the immunoglobulins' isotypic switch, which is strongly T lymphocyte-dependent. Finally, T lymphocyte involvement is suggested by immunosuppressive treatments' capacity to induce a remission [39], although direct action of these drugs on podocytes is also suspected. Indeed, podocytes and glomerular endothelial cells express glucocorticoid receptors through which corticosteroids could affect the filtration barrier [40]. This is the case for Cyclosporin A, which is able to act directly on podocytes to stabilize their actin cytoskeleton, thus preventing the podocyte detachment that occurs in INS [41].

Several studies have tried to identify anomalies of the immune system, especially in T lymphocytes, in corticosteroid-sensitive INS. It seems that INS patients express a Th2 lymphocyte profile. This is suggested clinically by the fact that INS is often associated with atopy and allergy [42], which are typically linked to a Th2 immune response, and by the beneficial

effects of levamisole treatment [43], which is associated with an increase in Th1 responses and down-regulation of excessive Th2 responses. Many works have described the cytokine profile of corticosenesitive INS patients using different techniques (dosage of cytokines in patients' sera or in the supernatant of PBMCs, both stimulated with mitogens and not; analysis of cytokines' mRNA expression levels in PBMCs; or intracellular staining of cytokines in T lymphocytes) [44], but final analysis of these results is difficult because of the variety of techniques used, the heterogeneity of the populations analyzed, and the fact that many patients are under immunosuppressive treatment at the time of harvesting, which affects cytokine levels. Moreover, INS is often associated with hyperlipidemia, which could modulate immune system activity. Although the results obtained fluctuate dramatically and often conflict, overall, they show an overexpression of some Th2 cytokines, particularly IL-13 and IL-10, while production of IL-4, IL-2 and IFN γ seems to be unchanged. Repression of IL-12 receptor β 2 expression was also shown during INS relapse, suggesting an early activation of T CD4 $^{+}$ lymphocytes toward the Th2 phenotype [45].

More recently, T lymphocyte anomalies were clearly emphasized in corticosenesitive INS by the use of a differential subtractive cloning technique in a patient in INS relapse versus remission [45]. This work revealed activation of the NF κ B pathway in T CD4 $^{+}$ lymphocytes during relapse, which abnormally persisted as long as the disease was active, suggesting a disruption of the regulatory feedback loop [46]. This study also showed an activation of the transcription factor c-maf in T CD4 $^{+}$ lymphocytes during relapse, while its basal expression is typically very weak or undetectable in the T lymphocytes of normal subjects [47].

From a purely phenotypic standpoint, the most frequently produced result in the study of INS is an imbalance of the T CD4 $^{+}$ / T CD8 $^{+}$ distribution in favor of T CD8 $^{+}$ lymphocytes in comparison to healthy individuals in INS relapse as well as remission [48, 49]. Other

studies also reported expansion of the T CD4⁺ lymphocytes that express the CD25 marker [50] and of the T CD4⁺ and T CD8⁺ memory lymphocytes that express the CD45RO marker [51] during INS relapse, but these observations are rare, and the involvement of these lymphocytes populations in INS still needs to be established.

Taken together, these results strongly suggest an anomaly of T lymphocytes in INS. However, it is still difficult to determine whether T activation is a cause or consequence of INS. The T lymphocyte pattern was recently analyzed more specifically in patients with corticoresistant and recurrent INS in research based on the study of Vbeta mRNA alterations of the T cell receptor (TCR) (TcLandscape[®]). This study showed that the process responsible for INS recurrence does not involve TCR activation or specific clonal expansion of T cells, but it did not exclude the involvement of T cells in the production of a permeability factor [52].

Lymphocyte impairments in INS do not seem to be limited to the T cell compartment, since a B lymphocyte expansion was also reported during relapse, although this has not been well studied thus far. The frequently observed hypogammaglobulinemia and IgG2 deficits evoke problems with T/B cooperation during INS [53, 54]. This could explain the potential beneficial effects of Rituximab, a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (*MabThera/Rituxan[®]*, Roche), in INS treatment. Indeed, several cases of remission after Rituximab therapy have been reported in patients with corticodependent [55-60] or corticoresistant INS [61-63], as well as in patients with a recurrence of INS after transplantation [64-72] (Table 1). However, the mechanism of Rituximab in the treatment of INS is not clear; one interesting hypothesis is that its effect could be due to the induction of regulatory T cells. A study in 22 patients with lupus nephritis refractory to conventional therapy who were successfully treated with Rituximab showed that, despite B cell depletion, the effect of Rituximab on complement and autoantibody levels was not clear-cut. However,

an induction of different types of T CD4⁺ regulatory cells (Treg, Th3 and Tr1) was detected at 1 month post-treatment, with the Treg and Th3 increases remaining up to 3 months post-treatment. More importantly, the Tregs' suppressive capacities were increased significantly after treatment, and T cell apoptosis was elevated at 1 month post-treatment [73]. These results were supported in a study of 11 patients with refractory SLE, which found that Rituximab treatment induced an increase in Treg frequency and number for up to 30 months post-treatment [74]. Finally, real-time PCR analysis of mRNA levels for molecules associated with regulatory cell sub-populations CD25, GITR, CTLA-4 and FoxP3 in 7 Rituximab-treated patients with lupus nephritis showed highly significant increases in all of these molecules [75]. Interestingly, the increases in FoxP3 mRNA persisted while the patients were in remission, while a decrease was detected in relapse. These results raise questions about the interest of regulatory T cells in the treatment of corticoreistant INS. In the case presented here, Rituximab treatment had no immediate effect, but a progressive and long-lasting decrease in proteinuria was observed a few months after Rituximab infusions. If this partial remission was due to the Rituximab therapy, the delayed decrease in proteinuria may suggest that the antiproteinuric effect of Rituximab is due not to the depletion of peripheral B cells, but rather to a more complex mechanism possibly involving the recruitment of regulatory cells. However, interpretation of this case is complex as the decrease in proteinuria could also be explained by a slow spontaneous remission, a phenomenon that has been reported in rare cases [76, 77]. There have been only a few reported cases of successful Rituximab treatment in INS patients so far, and 6 patients with recurrent INS who failed to respond to Rituximab therapy have also been reported [78, 79]. Further studies are needed to settle the optimal dosage and target population and to determine whether regulatory cells are induced in successfully treated patients.

We recently demonstrated the interest of regulatory T cells in a study using an animal model of recurrent INS, the Buffalo/Mna rat, and achieved complete remission of proteinuria and a regression of renal lesions through treatment with a derivative of deoxyspergualin called LF15-0195 [80]. We showed that treated animals exhibited a significant increase in splenic and peripheral T CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ lymphocytes. Interestingly, the transfer of purified LF15-0195-induced CD4⁺ CD25⁺ T cells to irradiated Buffalo/Mna rats significantly reduced their protein excretion levels. It is possible that the induction of such a regulatory population could act on an abnormal immune sub-population (whose nature still needs to be determined), thus inhibiting the secretion of permeability factors. Further study is needed to determine whether regulatory cells are actually able to interfere with the development of INS. This approach could be useful when considering new treatments for corticoresistant INS.

Conclusions:

Research on the pathophysiology of idiopathic nephrotic syndrome has seen many advances over the past few years. We are now better able to distinguish between genetic forms of INS (although other genetic mutations probably remain unknown) and “immune” forms of INS whose origin is still obscure. In these immune forms, the intervention of an extra-renal factor toxic for podocytes is strongly suggested. In the clinical presentation discussed here, this hypothesis is supported by the fact that the patient is highly dependent on plasma exchanges, which can decrease proteinuria levels, with relapses occurring when plasmapheresis sessions are reduced or stopped. Despite much research, no previous study was able to identify a permeability factor involved in INS and its recurrence after transplantation until a recent report on cardiotrophin like Cytokine 1, a candidate whose

actual role in INS recurrence still needs to be confirmed. Over the past few years, research on INS has also illuminated the role of T lymphocytes, which paradoxically seems to be reinforced by the use of Rituximab, an anti-B lymphocyte treatment. As shown in the case presented here, Rituximab treatment seems to be able to decrease proteinuria levels in patients with corticoid-dependent or corticoid-resistant and recurrent INS, although cases of failure have also been reported. The mechanism through which Rituximab works is thus far unclear; one possibility is that its effect is due, at least in part, to the induction of regulatory T cells rather than to simple B cell depletion. Further study of the mechanism of Rituximab in successfully treated patients could encourage new perspectives in the treatment of INS recurrence after transplantation.

Acknowledgements:

We would like to thank Dr. Gwenaëlle Roussey-Kesler and Dr. Emma Allain-Launay for the help provided in the acquisition of patient's observations. We thank the Agence Nationale pour la Recherche, the Fédération Nationale d'Aide aux Insuffisants Rénaux, the Fondation Progreffe and the Société de Néphrologie for supporting this research.

References:

- [1] Pollak MR, Focal segmental glomerulosclerosis: recent advances, *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 17 (2008) 138-42.
- [2] Dantal J, Giral M, Hoormant M, Soulillou JP, Glomerulonephritis recurrences after kidney transplantation, *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 4 (1995) 146-54.
- [3] Hoyer JR, Vernier RL, Najarian JS, Raij L, Simmons RL, Michael AF, Recurrence of idiopathic nephrotic syndrome after renal transplantation, *Lancet.* 2 (1972) 343-8.
- [4] Ali AA, Wilson E, Moorhead JF, Amlot P, Abdulla A, Fernando ON, Dorman A, Sweny P, Minimal-change glomerular nephritis. Normal kidneys in an abnormal environment?, *Transplantation.* 58 (1994) 849-52.
- [5] Rea R, Smith C, Sandhu K, Kwan J, Tomson C, Successful transplant of a kidney with focal segmental glomerulosclerosis, *Nephrol Dial Transplant.* 16 (2001) 416-7.
- [6] Dantal J, Baatard R, Hourmant M, Cantarovich D, Buzelin F, Soulillou JP, Recurrent nephrotic syndrome following renal transplantation in patients with focal glomerulosclerosis. A one-center study of plasma exchange effects, *Transplantation.* 52 (1991) 827-31.
- [7] Artero ML, Sharma R, Savin VJ, Vincenti F, Plasmapheresis reduces proteinuria and serum capacity to injure glomeruli in patients with recurrent focal glomerulosclerosis, *Am J Kidney Dis.* 23 (1994) 574-81.
- [8] Dantal J, Bigot E, Bogers W, Testa A, Kriaa F, Jacques Y, Hurault de Ligny B, Niaudet P, Charpentier B, Soulillou JP, Effect of plasma protein adsorption on protein excretion in kidney-transplant recipients with recurrent nephrotic syndrome, *N Engl J Med.* 330 (1994) 7-14.
- [9] Dantal J, Godfrin Y, Koll R, Perretto S, Naulet J, Bouhours JF, Soulillou JP, Antihuman immunoglobulin affinity immunoadsorption strongly decreases proteinuria in patients with relapsing nephrotic syndrome, *J Am Soc Nephrol.* 9 (1998) 1709-15.
- [10] Lagrue G, Branellec A, Niaudet P, Heslan JM, Guillot F, Lang P, [Transmission of nephrotic syndrome to two neonates. Spontaneous regression], *Presse Med.* 20 (1991) 255-7.
- [11] Kemper MJ, Wolf G, Muller-Wiefel DE, Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child, *N Engl J Med.* 344 (2001) 386-7.
- [12] Zimmerman SW, Increased urinary protein excretion in the rat produced by serum from a patient with recurrent focal glomerular sclerosis after renal transplantation, *Clin Nephrol.* 22 (1984) 32-8.
- [13] Le Berre L, Godfrin Y, Lafond-Puyet L, Perretto S, Le Carrer D, Bouhours JF, Soulillou JP, Dantal J, Effect of plasma fractions from patients with focal and segmental glomerulosclerosis on rat proteinuria, *Kidney Int.* 58 (2000) 2502-11.
- [14] Savin VJ, Sharma R, Lovell HB, Welling DJ, Measurement of albumin reflection coefficient with isolated rat glomeruli, *J Am Soc Nephrol.* 3 (1992) 1260-9.
- [15] Savin VJ, Sharma R, Sharma M, McCarthy ET, Swan SK, Ellis E, Lovell H, Warady B, Gunwar S, Chonko AM, Artero M, Vincenti F, Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis, *N Engl J Med.* 334 (1996) 878-83.

- [16] Godfrin Y, Dantal J, Perretto S, Hristea D, Legendre C, Kreis H, Soulillou JP, Study of the in vitro effect on glomerular albumin permselectivity of serum before and after renal transplantation in focal segmental glomerulosclerosis, *Transplantation*. 64 (1997) 1711-5.
- [17] Sharma M, Sharma R, McCarthy ET, Savin VJ, "The FSGS factor:" enrichment and in vivo effect of activity from focal segmental glomerulosclerosis plasma, *J Am Soc Nephrol*. 10 (1999) 552-61.
- [18] Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, Coward RJ, Inward CD, Farren T, Xing CY, Ni L, Mathieson PW, Mundel P, A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression, *J Am Soc Nephrol*. 13 (2002) 630-8.
- [19] Mundel P, Reiser J, Zuniga Mejia Borja A, Pavenstadt H, Davidson GR, Kriz W, Zeller R, Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines, *Exp Cell Res*. 236 (1997) 248-58.
- [20] Hattori M, Akioka Y, Chikamoto H, Kobayashi N, Tsuchiya K, Shimizu M, Kagami S, Tsukaguchi H, Increase of integrin-linked kinase activity in cultured podocytes upon stimulation with plasma from patients with recurrent FSGS, *Am J Transplant*. 8 (2008) 1550-6.
- [21] Coward RJ, Foster RR, Patton D, Ni L, Lennon R, Bates DO, Harper SJ, Mathieson PW, Saleem MA, Nephrotic plasma alters slit diaphragm-dependent signaling and translocates nephrin, Podocin, and CD2 associated protein in cultured human podocytes, *J Am Soc Nephrol*. 16 (2005) 629-37.
- [22] Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, Lupia E, Biancone L, Conaldi PG, Reponen P, Tryggvason K, Camussi G, Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome, *Am J Pathol*. 158 (2001) 1723-31.
- [23] Sharma R, Sharma M, McCarthy ET, Ge XL, Savin VJ, Components of normal serum block the focal segmental glomerulosclerosis factor activity in vitro, *Kidney Int*. 58 (2000) 1973-9.
- [24] Laine J, Jalanko H, Holthofer H, Krogerus L, Rapola J, von Willebrand E, Lautenschlager I, Salmela K, Holmberg C, Post-transplantation nephrosis in congenital nephrotic syndrome of the Finnish type, *Kidney Int*. 44 (1993) 867-74.
- [25] Ruf RG, Lichtenberger A, Karle SM, Haas JP, Anacleto FE, Schultheiss M, Zalewski I, Imm A, Ruf EM, Mucha B, Bagga A, Neuhaus T, Fuchshuber A, Bakkaloglu A, Hildebrandt F, Patients with mutations in NPHS2 (podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome, *J Am Soc Nephrol*. 15 (2004) 722-32.
- [26] Wang SX, Ahola H, Palmen T, Solin ML, Luimula P, Holthofer H, Recurrence of nephrotic syndrome after transplantation in CNF is due to autoantibodies to nephrin, *Exp Nephrol*. 9 (2001) 327-31.
- [27] Carraro M, Caridi G, Bruschi M, Artero M, Bertelli R, Zennaro C, Musante L, Candiano G, Perfumo F, Ghiggeri GM, Serum glomerular permeability activity in patients with podocin mutations (NPHS2) and steroid-resistant nephrotic syndrome, *J Am Soc Nephrol*. 13 (2002) 1946-52.
- [28] Burstein DM, Rodby RA, Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection, *J Am Soc Nephrol*. 4 (1993) 1288-93.

- [29] Tanawattanacharoen S, Falk RJ, Jennette JC, Kopp JB, Parvovirus B19 DNA in kidney tissue of patients with focal segmental glomerulosclerosis, *Am J Kidney Dis.* 35 (2000) 1166-74.
- [30] Sun X, Burns JB, Howell JM, Fujinami RS, Suppression of antigen-specific T cell proliferation by measles virus infection: role of a soluble factor in suppression, *Virology.* 246 (1998) 24-33.
- [31] Auwaerter PG, Kaneshima H, McCune JM, Wiegand G, Griffin DE, Measles virus infection of thymic epithelium in the SCID-hu mouse leads to thymocyte apoptosis, *J Virol.* 70 (1996) 3734-40.
- [32] Sahiner S, Ayli MD, Yuksel C, Onec K, Abayli E, Membranous nephropathy associated with acute myeloid leukemia, *Transplant Proc.* 36 (2004) 2618-9.
- [33] Peces R, Sanchez L, Gorostidi M, Alvarez J, Minimal change nephrotic syndrome associated with Hodgkin's lymphoma, *Nephrol Dial Transplant.* 6 (1991) 155-8.
- [34] Karras A, de Montpreville V, Fakhouri F, Grunfeld JP, Lesavre P, Renal and thymic pathology in thymoma-associated nephropathy: report of 21 cases and review of the literature, *Nephrol Dial Transplant.* 20 (2005) 1075-82.
- [35] Florido JF, Diaz Pena JM, Belchi J, Estrada JL, Garcia Ara MC, Ojeda JA, Nephrotic syndrome and respiratory allergy in childhood, *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2 (1992) 136-40.
- [36] Lagrue G, Laurent J, Rostoker G, Food allergy and idiopathic nephrotic syndrome, *Kidney Int Suppl.* 27 (1989) S147-51.
- [37] Cuoghi D, Venturi P, Cheli E, Bee sting and relapse of nephrotic syndrome, *Child Nephrol Urol.* 9 (1988) 82-3.
- [38] Giangiacomo J, Cleary TG, Cole BR, Hoffsten P, Robson AM, Serum immunoglobulins in the nephrotic syndrome. A possible cause of minimal-change nephrotic syndrome, *N Engl J Med.* 293 (1975) 8-12.
- [39] Ehrich JH, Brodehl J, Long versus standard prednisone therapy for initial treatment of idiopathic nephrotic syndrome in children. Arbeitsgemeinschaft fur Padiatrische Nephrologie, *Eur J Pediatr.* 152 (1993) 357-61.
- [40] Yan K, Kudo A, Hirano H, Watanabe T, Tasaka T, Kataoka S, Nakajima N, Nishibori Y, Shibata T, Kohsaka T, Higashihara E, Tanaka H, Watanabe H, Nagasawa T, Awa S, Subcellular localization of glucocorticoid receptor protein in the human kidney glomerulus, *Kidney Int.* 56 (1999) 65-73.
- [41] Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Franz S, Delfgaauw J, Chang JM, Choi HY, Campbell KN, Kim K, Reiser J, Mundel P, The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A, *Nat Med.* 14 (2008) 931-8.
- [42] Reeves WG, Cameron JS, Johansson SG, Ogg CS, Peters DK, Weller RO, Seasonal nephrotic syndrome. Description and immunological findings, *Clin Allergy.* 5 (1975) 121-37.
- [43] Davin JC, Merkus MP, Levamisole in steroid-sensitive nephrotic syndrome of childhood: the lost paradise?, *Pediatr Nephrol.* 20 (2005) 10-4.
- [44] Araya CE, Wasserfall CH, Brusko TM, Mu W, Segal MS, Johnson RJ, Garin EH, A case of unfulfilled expectations. Cytokines in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome, *Pediatr Nephrol.* 21 (2006) 603-10.

- [45] Sahali D, Pawlak A, Valanciute A, Grimbert P, Lang P, Remy P, Bensman A, Guellaen G, A novel approach to investigation of the pathogenesis of active minimal-change nephrotic syndrome using subtracted cDNA library screening, *J Am Soc Nephrol.* 13 (2002) 1238-47.
- [46] Sahali D, Pawlak A, Le Gouvello S, Lang P, Valanciute A, Remy P, Loirat C, Niaudet P, Bensman A, Guellaen G, Transcriptional and post-transcriptional alterations of IkappaBalpha in active minimal-change nephrotic syndrome, *J Am Soc Nephrol.* 12 (2001) 1648-58.
- [47] Valanciute A, le Gouvello S, Solhonne B, Pawlak A, Grimbert P, Lyonnet L, Hue S, Lang P, Remy P, Salomon R, Bensman A, Guellaen G, Sahali D, NF-kappa B p65 antagonizes IL-4 induction by c-maf in minimal change nephrotic syndrome, *J Immunol.* 172 (2004) 688-98.
- [48] Lama G, Luongo I, Tirino G, Borriello A, Carangio C, Salsano ME, T-lymphocyte populations and cytokines in childhood nephrotic syndrome, *Am J Kidney Dis.* 39 (2002) 958-65.
- [49] Frank C, Herrmann M, Fernandez S, Dirnecker D, Boswald M, Kolowos W, Ruder H, Haas JP, Dominant T cells in idiopathic nephrotic syndrome of childhood, *Kidney Int.* 57 (2000) 510-7.
- [50] Neuhaus TJ, Shah V, Callard RE, Barratt TM, T-lymphocyte activation in steroid-sensitive nephrotic syndrome in childhood, *Nephrol Dial Transplant.* 10 (1995) 1348-52.
- [51] Yan K, Nakahara K, Awa S, Nishibori Y, Nakajima N, Kataoka S, Maeda M, Watanabe T, Matsushima S, Watanabe N, The increase of memory T cell subsets in children with idiopathic nephrotic syndrome, *Nephron.* 79 (1998) 274-8.
- [52] Herve C, Le Berre L, Miqueu P, Degauque N, Ruiz C, Brouard S, Guillet M, Souillou JP, Dantal J, Blood T-cell repertoire in idiopathic nephrotic syndrome recurrence following kidney transplantation, *Am J Transplant.* 6 (2006) 2144-51.
- [53] Cheung W, Wei CL, Seah CC, Jordan SC, Yap HK, Atopy, serum IgE, and interleukin-13 in steroid-responsive nephrotic syndrome, *Pediatr Nephrol.* 19 (2004) 627-32.
- [54] Kemper MJ, Altrogge H, Ganschow R, Muller-Wiefel DE, Serum levels of immunoglobulins and IgG subclasses in steroid sensitive nephrotic syndrome, *Pediatr Nephrol.* 17 (2002) 413-7.
- [55] Gilbert RD, Hulse E, Rigden S, Rituximab therapy for steroid-dependent minimal change nephrotic syndrome, *Pediatr Nephrol.* 21 (2006) 1698-700.
- [56] Francois H, Daugas E, Bensman A, Ronco P, Unexpected efficacy of rituximab in multirelapsing minimal change nephrotic syndrome in the adult: first case report and pathophysiological considerations, *Am J Kidney Dis.* 49 (2007) 158-61.
- [57] Smith GC, Is there a role for rituximab in the treatment of idiopathic childhood nephrotic syndrome?, *Pediatr Nephrol.* 22 (2007) 893-8.
- [58] Hofstra JM, Deegens JK, Wetzels JF, Rituximab: effective treatment for severe steroid-dependent minimal change nephrotic syndrome?, *Nephrol Dial Transplant.* 22 (2007) 2100-2.
- [59] Guignon V, Dallochio A, Baudouin V, Dehennault M, Hachon-Le Camus C, Afanetti M, Groothoff J, Llanas B, Niaudet P, Nivet H, Raynaud N, Taque S, Ronco P, Bouissou F, Rituximab treatment for severe steroid- or cyclosporine-dependent nephrotic syndrome: a multicentric series of 22 cases, *Pediatr Nephrol.* 23 (2008) 1269-79.

- [60] Yang T, Nast CC, Vo A, Jordan SC, Rapid remission of steroid and mycophenolate mofetil (mmf)-resistant minimal change nephrotic syndrome after rituximab therapy, *Nephrol Dial Transplant*. 23 (2008) 377-80.
- [61] Bagga A, Sinha A, Moudgil A, Rituximab in patients with the steroid-resistant nephrotic syndrome, *N Engl J Med*. 356 (2007) 2751-2.
- [62] Nakayama M, Kamei K, Nozu K, Matsuoka K, Nakagawa A, Sako M, Iijima K, Rituximab for refractory focal segmental glomerulosclerosis, *Pediatr Nephrol*. 23 (2008) 481-5.
- [63] Suri M, Tran K, Sharma AP, Filler G, Grimmer J, Remission of steroid-resistant nephrotic syndrome due to focal and segmental glomerulosclerosis using rituximab, *Int Urol Nephrol*. 40 (2008) 807-10.
- [64] Hristea D, Hadaya K, Marangon N, Buhler L, Villard J, Morel P, Martin PY, Successful treatment of recurrent focal segmental glomerulosclerosis after kidney transplantation by plasmapheresis and rituximab, *Transpl Int*. 20 (2007) 102-5.
- [65] Gossmann J, Scheuermann EH, Porubsky S, Kachel HG, Geiger H, Hauser IA, Abrogation of nephrotic proteinuria by rituximab treatment in a renal transplant patient with relapsed focal segmental glomerulosclerosis, *Transpl Int*. 20 (2007) 558-62.
- [66] Pescovitz MD, Book BK, Sidner RA, Resolution of recurrent focal segmental glomerulosclerosis proteinuria after rituximab treatment, *N Engl J Med*. 354 (2006) 1961-3.
- [67] Nozu K, Iijima K, Fujisawa M, Nakagawa A, Yoshikawa N, Matsuo M, Rituximab treatment for posttransplant lymphoproliferative disorder (PTLD) induces complete remission of recurrent nephrotic syndrome, *Pediatr Nephrol*. 20 (2005) 1660-3.
- [68] Peters HP, van de Kar NC, Wetzels JF, Rituximab in minimal change nephropathy and focal segmental glomerulosclerosis: report of four cases and review of the literature, *Neth J Med*. 66 (2008) 408-15.
- [69] El-Firjani A, Hoar S, Karpinski J, Bell R, Deschenes MJ, Knoll GA, Post-transplant focal segmental glomerulosclerosis refractory to plasmapheresis and rituximab therapy, *Nephrol Dial Transplant*. 23 (2008) 425.
- [70] Kamar N, Faguer S, Esposito L, Guitard J, Nogier MB, Durand D, Rostaing L, Treatment of focal segmental glomerular sclerosis with rituximab: 2 case reports, *Clin Nephrol*. 67 (2007) 250-4.
- [71] Meyer TN, Thaïss F, Stahl RA, Immunoabsorption and rituximab therapy in a second living-related kidney transplant patient with recurrent focal segmental glomerulosclerosis, *Transpl Int*. 20 (2007) 1066-71.
- [72] Bayrakci US, Baskin E, Sakalli H, Karakayali H, Haberal M, Rituximab for post-transplant recurrences of FSGS, *Pediatr Transplant*. 13 (2009) 240-3.
- [73] Vigna-Perez M, Hernandez-Castro B, Paredes-Saharopulos O, Portales-Perez D, Baranda L, Abud-Mendoza C, Gonzalez-Amaro R, Clinical and immunological effects of Rituximab in patients with lupus nephritis refractory to conventional therapy: a pilot study, *Arthritis Res Ther*. 8 (2006) R83.
- [74] Vallerkog T, Gunnarsson I, Widhe M, Risselada A, Klareskog L, van Vollenhoven R, Malmstrom V, Trollmo C, Treatment with rituximab affects both the cellular and the humoral arm of the immune system in patients with SLE, *Clin Immunol*. 122 (2007) 62-74.

- [75] Sfrikakis PP, Souliotis VL, Fragiadaki KG, Moutsopoulos HM, Boletis JN, Theofilopoulos AN, Increased expression of the FoxP3 functional marker of regulatory T cells following B cell depletion with rituximab in patients with lupus nephritis, *Clin Immunol.* 123 (2007) 66-73.
- [76] Stephanian E, Matas AJ, Mauer SM, Chavers B, Nevins T, Kashtan C, Sutherland DE, Gores P, Najarian JS, Recurrence of disease in patients retransplanted for focal segmental glomerulosclerosis, *Transplantation.* 53 (1992) 755-7.
- [77] Franco A, Peres R, Anaya F, Niembro E, Valderrabano, Spontaneous remission of proteinuria in recurrent focal glomerulosclerosis. Reappraisal of plasma exchange treatment, *Clin Nephrol.* 28 (1987) 158.
- [78] Marks SD, McGraw M, Does rituximab treat recurrent focal segmental glomerulosclerosis post-renal transplantation?, *Pediatr Nephrol.* 22 (2007) 158-60.
- [79] Yabu JM, Ho B, Scandling JD, Vincenti F, Rituximab failed to improve nephrotic syndrome in renal transplant patients with recurrent focal segmental glomerulosclerosis, *Am J Transplant.* 8 (2008) 222-7.
- [80] Le Berre L, Bruneau S, Naulet J, Renaudin K, Buzelin F, Usal C, Smit H, Condamine T, Souillou JP, Dantal J, Induction of T Regulatory Cells Attenuates Idiopathic Nephrotic Syndrome, *J Am Soc Nephrol.* (2008)

Table 1. Rituximab therapy in patients with INS recurrence after transplantation

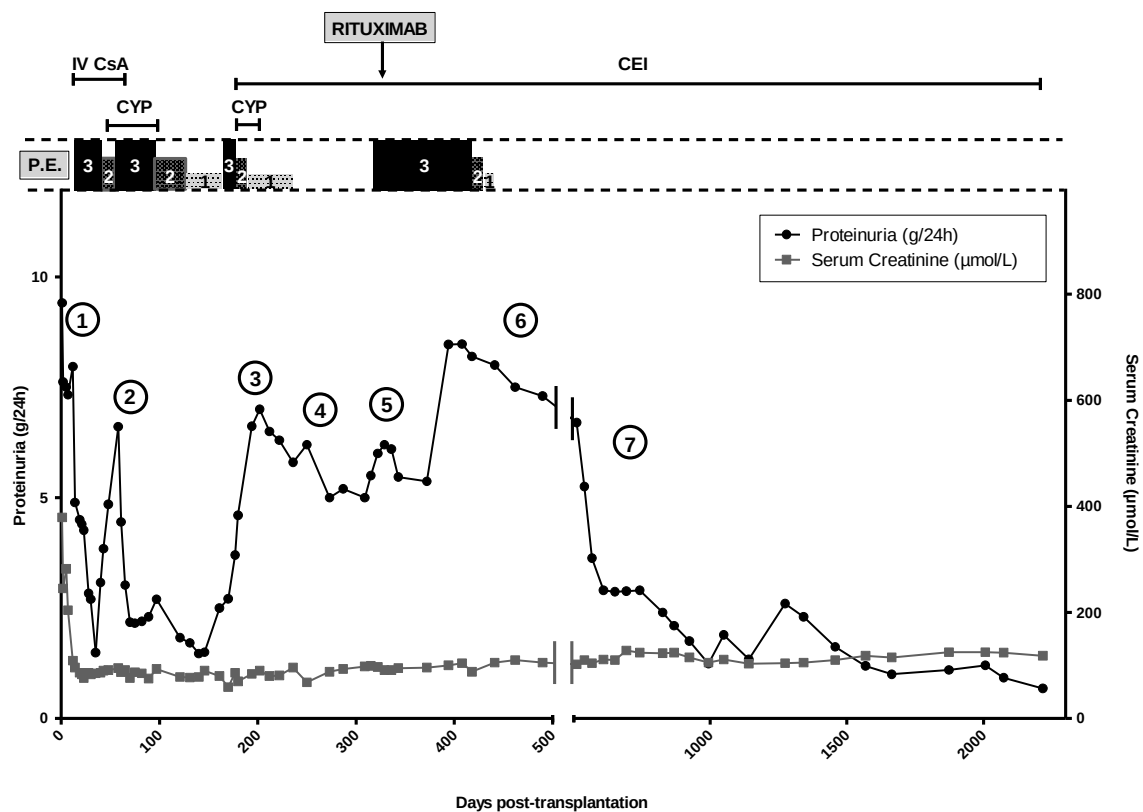
Author	Sex	Age at start RTX (years)	Time between Tx and RTX	RTX dose	Concomitant therapy	Duration of follow-up	Outcomes
Hristea <i>et al.</i>	M	22	1 week	375 mg/m ² once weekly, 2 doses	Prednisone, Tacrolimus, MMF, Basiliximab, PE	24 months	Complete remission after 3 months
Gossmann <i>et al.</i>	F	48	3 months	375 mg/m ² once weekly, 2 doses	Prednisone, Tacrolimus, MMF, ATG	12 months	Complete remission within 1.5 months
Pescovitz <i>et al.</i>	M	7	8 months	375 mg/m ² once weekly, 6 doses	Tacrolimus, MMF, (Daclizumab)	16 months	Partial remission within 2 months
Nozu <i>et al.</i>	M	12	6 months	375 mg/m ² once weekly, 4 doses	CsA	36 months	Complete remission within 7 months.
Marks <i>et al.</i>	M	6	2 months	375 mg/m ² once weekly, 4 doses	Prednisone, Tacrolimus	5 months	No response and no complete B cell depletion
	M	10	9.5 months	375 mg/m ² once weekly, 2 doses	Prednisone, Tacrolimus, MMF	14 months	No response and no complete B cell depletion
Yabu <i>et al.</i>	M	41	7 months	1 g every other week, 2 doses	Prednisone, Tacrolimus, MMF	12 months	Partial remission within 4 months, with PE 2 months after RTX.
	F	43	5 months	375 mg/m ² once weekly, 4 doses	Prednisone, Tacrolimus, MMF, ATG	10 months	No response.
	F	41	11 months	375 mg/m ² once weekly, 4 doses	Prednisone, MMF, CsA, ATG, total lymphoid irradiation	7 months	No response.
	F	47	8 months	375 mg/m ² once weekly, 4 doses	JAK3 inhibitor, MMF, Prednisone	8 months	No response.
Peters <i>et al.</i>	F	24	> 2 years	375 mg/m ² once weekly, 4 doses	Prednisone, Tacrolimus, Azathioprine	24 months	Partial remission within 7 months but relapse after 16 months. Second course of RTX: Partial remission within 2 months.
El Firjani <i>et al.</i>	F	48	3 months	375 mg/m ² , 6 doses in 8 weeks	Prednisone, Tacrolimus, MMF, ATG	NA	No response.
Kamar <i>et al.</i>	M	25	< 1 month	375 mg/m ² once weekly, 2 doses	Prednisone, CsA, MMF, Basiliximab, PE	10 months	Relapse within 1 month.
	M	46	13 months	375 mg/m ² once weekly, 4 doses	Prednisone, CsA, MMF	4 months	No proteinuria at the time of RTX treatment.
Meyer <i>et al.</i>	F	31	1 year	375 mg/m ² once weekly, 3 doses	Prednisone	14 months	Decrease of proteinuria 5 months after RTX.
Bayrakci <i>et al.</i>	M	14	4 days	375 mg/m ² once weekly, 4 doses	Steroids, CsA, MMF, Daclizumab, PE	6 months	Complete remission within 6 weeks
Present case	F	9	11 months	375 mg/m ² once weekly, 4 doses	Prednisone, CsA, MMF, PE	5 years	Decrease of proteinuria 6 months after RTX

RTX = rituximab; Tx = transplantation; MMF = mycophenolate Mofetil; PE = plasma exchanges; CsA = cyclosporine A; M = male; F = female

Figure Legend:

Figure 1: Urinary protein excretion and serum creatinine relative to days post-transplantation are shown. Therapy of recurrent INS after transplantation is indicated by boxes for plasma exchanges (3, 2 and 1 session(s) weekly) and lines for IV administration of Cyclosporin A (IV CsA), Cyclophosphamide (CYP) and Converting Enzyme Inhibitors (CEI). Rituximab treatment is indicated by the arrow (1 injection weekly for 4 weeks). Circled numbers refer to periods of time in the text.

Figure 1:



BASIC RESEARCH

www.jasn.org

Induction of T Regulatory Cells Attenuates Idiopathic Nephrotic Syndrome

Ludmilla Le Berre,* Sarah Bruneau,* Jeanne Naulet,* Karine Renaudin,[†] Françoise Buzelin,[†] Claire Usal,* Helga Smit,* Thomas Condamine,* Jean-Paul Soulillou,* and Jacques Dantal*

*INSERM U643, and CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, and Université de Nantes, Faculté de Médecine, and [†]Service d'Anatomopathologie, CHU Hôtel Dieu, Nantes, France

Induction of T Regulatory Cells Attenuates Idiopathic Nephrotic Syndrome

Ludmilla Le Berre,* Sarah Bruneau,* Jeanne Naulet,* Karine Renaudin,[†] Françoise Buzelin,[†] Claire Usal,* Helga Smit,* Thomas Condamine,* Jean-Paul Soulillou,* and Jacques Dantal*

*INSERM U643, and CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, and Université de Nantes, Faculté de Médecine, and [†]Service d'Anatomopathologie, CHU Hôtel Dieu, Nantes, France

ABSTRACT

Buffalo/Mna rats spontaneously develop FSGS and nephrotic syndrome as a result of an immune disorder. Similar to some humans with FSGS, the disease recurs after renal transplantation, suggesting the involvement of a circulating factor. Here, we tested the effect of several immunosuppressive treatments on these rats. Although corticosteroids, cyclosporin A, and anti-T cell receptor treatment reduced proteinuria, only the deoxyspergualin derivative LF15-0195 led to a rapid and complete normalization of proteinuria. Furthermore, this compound led to the regression of renal lesions during both the initial disease and posttransplantation recurrence. The frequency of splenic and peripheral CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T lymphocytes significantly increased with remission. Moreover, the transfer of purified LF15-0195-induced CD4⁺CD25⁺ T cells to irradiated Buff/Mna rats significantly reduced their proteinuria compared with the transfer of untreated control cells, suggesting that LF15-0195 induces regulatory T cells that are able to induce regression of rat nephropathy. These data suggest that idiopathic nephrotic syndrome/FSGS disease can be regulated by cellular transfer, but how this regulation leads to the reorganization of the podocyte cytoskeleton remains to be determined.

J Am Soc Nephrol 20: 57–67, 2009. doi: 10.1681/ASN.2007111244

Idiopathic nephrotic syndrome (INS) with primary FSGS lesions is a disease of unknown cause that is defined by selective proteinuria, hypoalbuminemia, and nonspecific lesions with a glomerular sclerosis. Although treatments such as corticosteroids, cyclosporin A (CsA), and cyclophosphamide remain useful, at least 20% of affected patients ultimately require hemodialysis and/or kidney transplantation for end-stage renal failure. Moreover, despite treatment, the initial disease immediately relapses in 30 to 50% of transplant patients¹ and leads to the loss of the graft. This immediate (and iterative) recurrence, together with the beneficial effect of plasmatic exchanges² or immunoadsorption,^{3,4} strongly supports the presence of a circulating factor.

The majority of animal models of FSGS present secondary forms^{5–7} and do not supply a causal model with a permeability factor.⁸ The Buffalo/Mna rat strain develops a spontaneous glomerulo-

nephritis (with albuminuria, edema, and lipidic disorders) at 3 mo of age, and FSGS lesions appear at 4 to 6 mo of age.^{9,10} In addition to a genetic background predisposing to proteinuria¹¹ (a growing concept also noted in humans), we recently highlighted the involvement of an extrarenal circulating factor. We demonstrated both the recurrence of the initial disease after transplantation of normal rat kidneys into Buff/Mna recipients and remission when nephrotic Buff/Mna kidneys were transplanted into normal rats.¹² We also highlighted the

Received November 26, 2007. Accepted August 5, 2008.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Prof. Jacques Dantal, INSERM U643, CHU Hôtel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France. Phone: 33-2-40-08-74-41; Fax: 33-2-40-08-74-11; E-mail: jacques.dantal@chu-nantes.fr

Copyright © 2009 by the American Society of Nephrology

involvement of activated macrophages and Th2 lymphocytes in this disease,¹³ as reported in the human disease. All of these findings suggest that this rat model may be relevant for studying the challenge of INS recurrence after transplantation in the clinic.

In this study, we used the Buff/Mna strain to test the anti-proteinuric effect of various immunoregulatory compounds. Only a deoxyspergualin (DSG) derivative, LF15-0195,¹⁴ specifically induced a rapid and complete remission of the initial kidney disease as well as its posttransplantation recurrence. This effect was manifested as a resolution of both proteinuria and histologic lesions. These findings may provide novel insights into the development of innovative, clinically applicable therapeutics for the treatment of INS.

RESULTS

Effect of Drugs Frequently Used in the Clinic for the Treatment of Patients with INS/FSGS and Anti-T Cell Receptor MAb

Corticosteroid treatment significantly reduced urinary protein excretion (lowest proteinuria at day 10 51% reduction), but treatment did not lower levels to those within the normal range of proteinuria for healthy rats (<0.2 g/mmol). In the same way, CsA treatment and the combination of corticosteroids and CsA resulted in a significant decrease in proteinuria (lowest at day 30 64% reduction; lowest at day 63 68% reduction, respectively) but again did not normalize it (see Supplemental Figures a through c).

The administration of R7.3 antibodies for 9 d rapidly decreased proteinuria (50% reduction), but this decrease was transient and did not reach normalization. The combination of R7.3 and CsA significantly decreased proteinuria (65%) but did not normalize levels (Supplemental Figure d).

LF15-0195 Consistently Induces a Complete Remission of the Buff/Mna Native Disease as Well as Its Recurrence after Kidney Transplantation

Effect of LF15-0195 on the Initial Nephrotic Syndrome

First, we showed that LF15-0195 treatment prevented the development of nephrotic-range proteinuria in 2-mo-old Buff/Mna rats when administered at the onset of proteinuria (0.2 g/mmol; Figure 1A). The prevention of proteinuria occurrence in these animals was still efficient 1 mo after treatment withdrawal, at which point proteinuria reverted progressively to reach the values observed in vehicle-treated, aged-matched Buff/Mna rats. At a later stage of the disease in which the animals had developed a persistent proteinuria (mean 0.5 g/mmol; day 100), the re-introduction of LF15-0195 promptly reduced proteinuria to the normal range (<0.1 g/mmol at day 120; Figure 1A). Normalization of proteinuria was also achieved 20 to 30 d after LF15-0195 treatment of proteinuric Buff/Mna rats ($P < 0.05$; Figure 1B) and was efficient 1 mo after treatment withdrawal. In addition, LF15-0195 adminis-

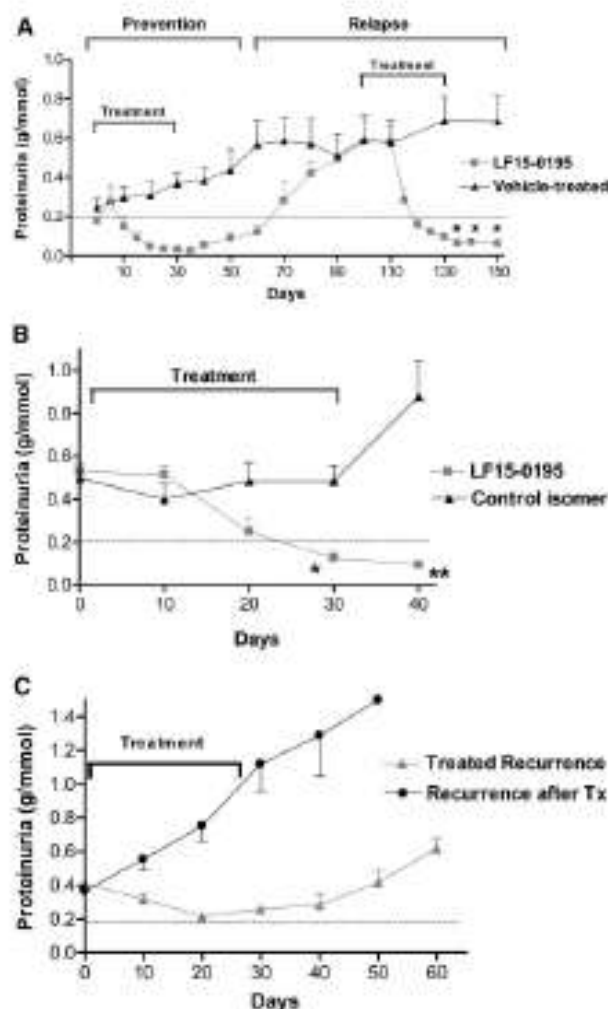


Figure 1. (A) Beneficial effect of a derivative of DSG, LF15-0195, on both the onset of proteinuria and established proteinuria in young Buff/Mna rats. Each treatment was administered for 30 d at a dosage of 1 mg/kg per d ($n = 5$). The control group consisted of vehicle-treated Buff/Mna rats. (B) Effect of LF15-0195 compared with LF15-0296, an isomer without any immunosuppressive effect, on the proteinuria of 6-mo-old Buff/Mna rats. The two treatments were administered for 30 d ($n = 5$). (C) LF15-0195 reduced the proteinuria of Buff/Mna rats experiencing recurrence of their initial disease after kidney transplantation. The treatment was administered for 30 d ($n = 5$). The control group consisted of untreated Buff/Mna rats experiencing recurrence of proteinuria after kidney transplantation ($n = 5$). Proteinuria is expressed as the ratio of the urinary proteins (g/L) to urinary creatinine concentration (mmol/L). Data are means $\pm$ SEM (scale bar). *Significant decrease in proteinuria (versus day 0; $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

tration had no effect on serum creatinine levels ($28 \pm 5.2 \mu\text{mol}$ at day 0 versus $21 \pm 1.6 \mu\text{mol}$ at day 30 and day 130 [remission phase]; NS).

Regardless of the initial levels of proteinuria (ranging from

0.35 to 5.10 g/mmol; 59 supplementary rats; Supplemental Figure e), the normalization of proteinuria was observed in every Buff/Mna rat treated with LF15-0195.

Effect of LF15-0195 on Renal Lesions

Light microscopy examination of LF15-0195-treated rat kidneys obtained during proteinuria remission showed a subnormal renal histology ($n = 6$; Figure 2, B through D). In comparison with lesions usually seen in age-matched Buff/Mna animals ($n = 4$; Figure 2, A through C), treated rats had no tubular dilation (0.83 ± 1.1 versus $19.5 \pm 13.1\%$; $P < 0.01$) and only a few glomerular FSGS lesions (defined by segmental lesions of flocculus, sclerotic area, flocculocapsular synechia, or atrophic glomeruli; 3.3 ± 1.8 versus $10.9 \pm 1.5\%$; $P < 0.001$). These findings demonstrate the effect of LF15-0195 at the histologic level. We detected no renal fibrosis in either group and

only a minor and diffuse interstitial infiltrate in the untreated group, but we sometimes noted a trend toward a periglomerular reinforcement (see also¹³).

Electron microscopic examination of treated Buff/Mna rat kidneys revealed an absence of foot process fusion and cytoplasmic vacuolization (Figure 2F). In contrast, the untreated age-matched Buff/Mna kidneys showed focal and moderate podocyte lesions with foot process flattening and fusion (Figure 2E).

Effect of LF15-0195 on the Recurrence of the Nephrotic Syndrome after Renal Transplantation

LF15-0195 was then administered as a treatment for Buff/Mna disease recurrence. Normal histocompatible kidneys (from healthy Lew.1W) were grafted into proteinuric Buff/Mna recipients. When the Buff/Mna rats that underwent transplantation became again proteinuric (>0.4 g/mmol), the administration of LF15-0195 reduced proteinuria to normal levels (0.41 ± 0.01 at day 0 versus 0.2 ± 0.02 at day 20; NS; Figure 1C). Nevertheless, although the occurrence of the disease on the kidney graft was clearly curtailed by LF15-0195, this effect was less profound and more transient than that of the native disease.

Effect of LF15-0195 Depends on Its Immunosuppressive Activity and not Its Physical Properties

The control isomer (LF15-0296) that has very few immunomodulatory effects (as tested by Fournier Laboratories in various experimental models) had no effect on proteinuria (Figure 1B). That this isomer has the same charges suggests that LF15-0195 did not reduce the proteinuria through an electrostatic effect and also did not influence the ultrafiltration properties of the glomerular barrier.

To eliminate further a nonimmune effect of LF15-0195 treatment, we treated proteinuric animals from other models (5/6 nephrectomy and puromycin aminonucleoside) with LF15-0195 or LF15-0296. No improvement of proteinuria was detected in the 5/6 model, and a persistent increase in proteinuria was observed with both drugs (0.55 ± 0.03 versus 0.54 ± 0.08 , respectively, at day 0; 0.64 ± 0.07 versus 0.65 ± 0.07 at day 10; 0.67 ± 0.16 versus 0.98 ± 0.27 g/mmol at the end of the treatment). Along the same lines, LF15-0195 had no effect on the heavy peak of proteinuria associated with the puromycin model (acute phase); proteinuria reached a maxi-

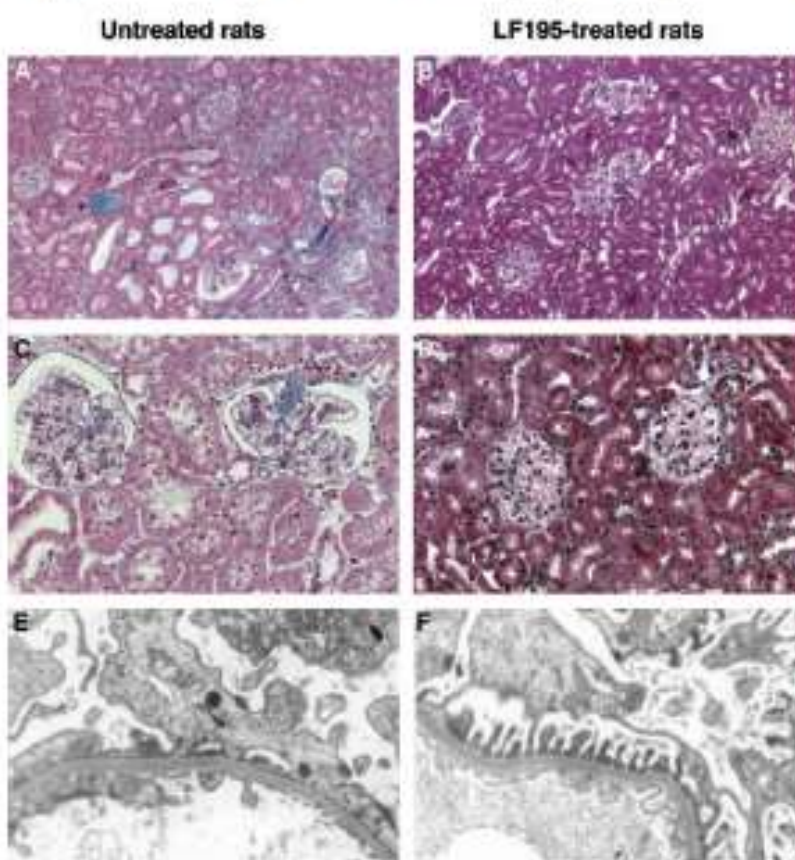


Figure 2. (A through D) Light microscopic examination of native kidneys from untreated age-matched Buff/Mna rats showing major tubular alterations (A) and FSGS lesions (C; $n = 4$) and LF15-0195-treated Buff/Mna kidneys showing a subnormal renal interstitium (B) without glomerulosclerosis (D; $n = 6$; periodic acid-Schiff staining). (E and F) Electron microscopic examination of age-matched kidneys of native Buff/Mna rats showing some flattening and foot process fusion (E), compared with LF15-0195-treated Buff/Mna kidneys showing a normal ultrastructure with well differentiated and organized foot processes (F). Magnifications: $\times 100$ in A and B; $\times 200$ in C and D; $\times 15,000$ in F.

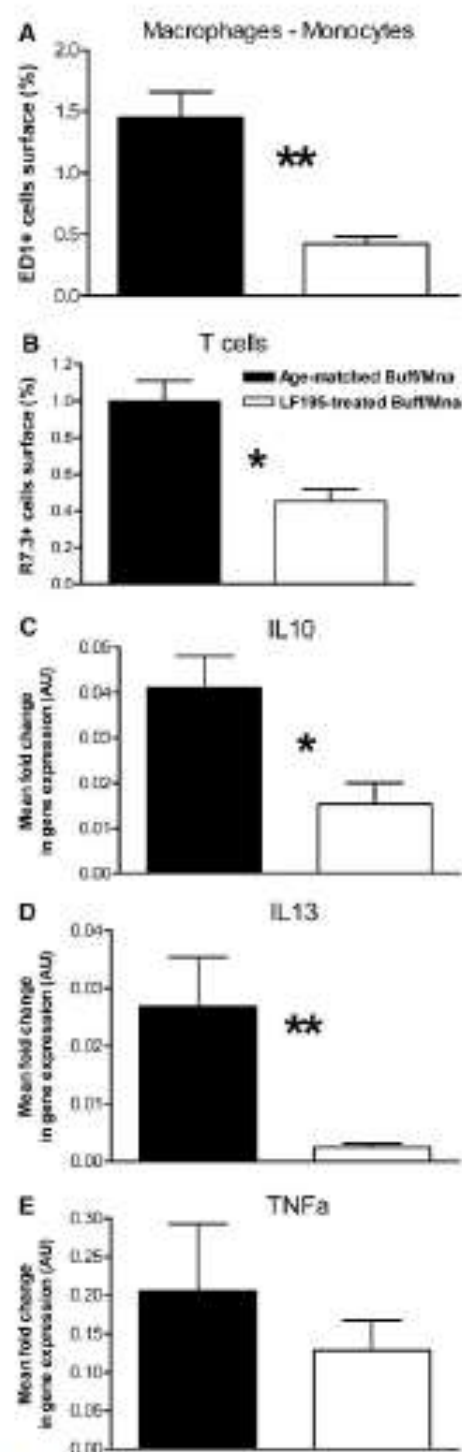


Figure 3. Decrease in renal infiltration of monocytes, T lymphocytes, and associated cytokines upon LF15-0195 treatment. (A and B) Results are expressed as the percentage (means $\pm$ SEM) of the surface area occupied by positive cells. Each group consisted of five or six rats. The control groups consisted of age-matched Bufl/Mna rats. (A) Monocyte-macrophage (ED1 Ab) populations.

imum of 6.55 ± 1.50 g/mmol in the LF15-0195-treated group and 6.44 ± 1.00 g/mmol in the control isomer group (day 7; data not shown). No effect of LF15-0195 was observed on the acute or late phases of the puromycin model. Of note, LF15-0195 normalizes proteinuria in Bufl/Mna rats with the same range of proteinuria that PAN induces (see Supplemental Figure e).

Potential Mechanisms Implicated in the Beneficial Effect of LF15-0195

Effect of LF15-0195 on Renal Cell Infiltration and Associated Cytokines

By quantitative morphometric histology, a significant decrease in the quantity of renal monocytes (71%) and T cells (54%) was noted in treated animals ($P < 0.05$; Figure 3, A and B). The transcript levels of three cytokines (IL-10, IL-13, and TNF- α) that are significantly increased in Bufl/Mna kidneys in comparison with healthy rat kidneys (see reference¹²) were significantly reduced by LF15-0195 treatment for IL-10 and IL-13 ($P < 0.05$; Figure 3, C and D) but not statistically for TNF- α (Figure 3E).

Action on the NF- κ B Pathway

Because LF15-0195 is known to inhibit the NF- κ B pathway,¹⁵ we investigated its effect on this pathway in the context of Bufl/Mna nephropathy. All experiments were performed on isolated glomeruli so as to eliminate any potential activation of NF- κ B in tubular cells as a result of proteinuria.¹⁶ We analyzed the expression of NF- κ B/p65, I κ B factor, cPLA₂ (whose expression is dependent on NF- κ B activation), and the nuclear active form of NF- κ B/p65 in glomeruli isolated from untreated and LF15-0195-treated Bufl/Mna rats (quantitative reverse transcription-PCR [RT-PCR], Western blot, immunohistochemistry, TransAM ELISA). We observed no difference in NF- κ B activity (data not shown). The basal level of activation of NF- κ B in Bufl/Mna rats was lower than that in healthy rats. We compared *in vivo* the effect of LF15-0195 with pyrrolidinedithio-carbamate ammonium [PDTC; 100 mg/kg per d], an inhibitor of I κ B release from the NF- κ B complex. We observed no improvement of proteinuria, even though this drug has proved effective in another model of glomerulonephritis¹⁷ (Supplemental Figure f). Altogether, these experiments do not indicate a role for the NF- κ B pathway in the LF15-0195 effect.

Predominant Effect of LF15-0195 Is the Induction of Regulatory Cells

Increase of CD4⁺CD25⁺ T Cell Frequency

As previously reported,¹⁸ LF15-0195 treatment decreased the PBMC count (from $12.5 \pm 0.7 \times 10^3$ cells/L [$n = 20$] to $7.7 \pm 1.0 \times 10^3$ at day 15 and $5.3 \pm 0.2 \times 10^3$ cells/L at day 30 [$n =$

(B) T lymphocytes (R7.3 Ab). (C through E) IL-10 (C), IL-13 (D), and TNF- α (E) mRNA expression was analyzed by quantitative RT-PCR in the kidneys of LF15-0195-treated or untreated age-matched Bufl/Mna rats. Data are means $\pm$ SEM of arbitrary units (AU) relative to HPRT ($n = 6$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

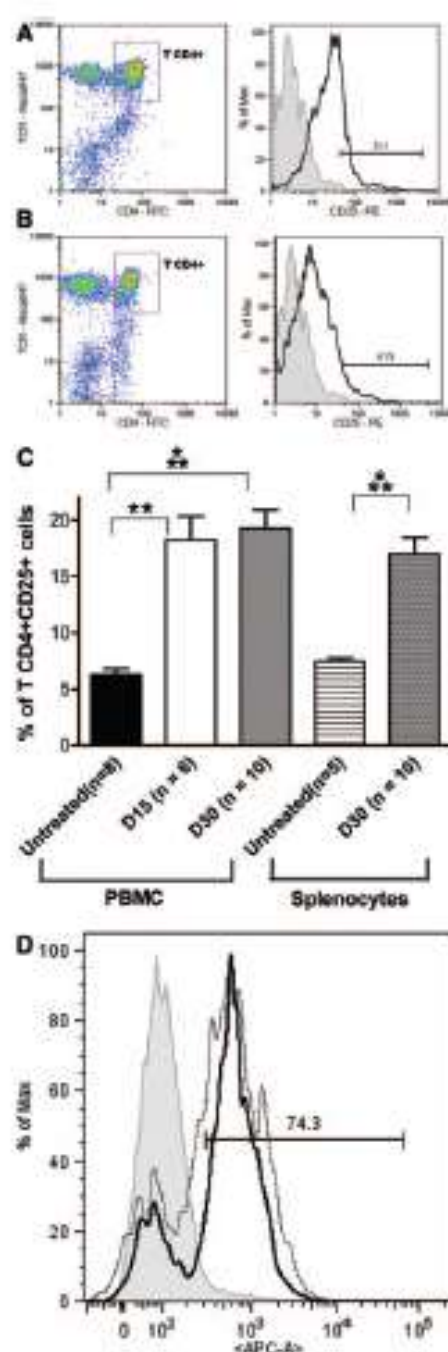


Figure 4. Significant increase in blood CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes after LF15-0195 treatment of Buff/Mna rats. (A and B) Representative FACS staining of PBMC of LF15-0195-treated Buff/Mna (A) versus untreated age-matched Buff/Mna rats (B) shows a significant increase in the frequency of CD4⁺CD25⁺ T cells (similar dot plots and histograms not shown for splenocytes). (C) Results are expressed as the percentage of CD4⁺CD25⁺ T cells in PBMC or splenocytes of untreated or treated Buff/Mna rats at either day 15 or the end (day 30) of the treatment. (A through C)

10³; fold reductions of 1.6 and 2.3, respectively). Consequently, the T cells count (from 9.1×10^3 at day 15 and 3.7×10^3 at day 30; fold decreases of 1.7 and 2.4, respectively) were also reduced.

More interesting, FACS analysis of blood and spleen cells from LF15-0195-treated Buff/Mna rats ($n = 5$ to 10; Figure 4C) showed a significant increase in the frequency of CD4⁺CD25⁺ T cells ($P < 0.01$) but no change in the frequency of T, B, or NK cells or monocytes (Supplemental Table 1). This effect was constant and reproducible; in all LF15-0195-treated groups, the increase in frequency of peripheral blood CD4⁺CD25⁺ T cells (approximately three-fold) was parallel to a decrease in proteinuria below the normal range (approximately 14 d).

No increase in the frequency of the CD4⁺CD25⁺ T cell population was detected in Buff/Mna rats treated with the control isomer LF15-0296 (data not shown). Moreover, the administration of LF15-0195 to healthy rats (Sprague-Dawley) did not trigger a change in the frequency of this population in the periphery ($9.6 \pm 0.6\%$ in LF15-0195-treated healthy rats and $8.7 \pm 0.15\%$ in untreated healthy rats; $n = 5$; NS). These results were also reported by Cuturi's group in Lewis rats¹⁹ (unpublished data). In addition, intracellular staining revealed that $65.4 \pm 2.4\%$ of spleen CD4⁺CD25⁺ T cells and $82.3 \pm 4.2\%$ of blood CD4⁺CD25⁺ T cells were FoxP3 positive, thereby indicating these cells to be regulatory T cells (Figure 4D). In contrast, CD28, CD45RC, and CD62L markers were unmodified.

Finally, we measured the expression of the transcripts of molecules associated and/or involved in the regulation process of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. CD25, glucocorticoid-induced TNF receptor (GITR), cytotoxic T lymphocyte associated protein 4 (CTLA4), indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO), and inducible nitric oxide synthase (iNOS) transcripts were significantly increased in the spleen of LF15-0195-treated rats ($P < 0.05$; Figure 5). No significant increase was observed for FoxP3, whose expression level was low in these samples and therefore probably incorrectly estimated by the Sybr Green technology.

Cell Transfers

To demonstrate that the effect of LF15-0195 is mainly due to the induction of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells, we performed transfer experiments. The transfer of purified CD4⁺CD25⁺ T cells from LF15-0195-treated rats showed a clear but NS trend toward a decrease in proteinuria (0.54 ± 0.03 at day 0 versus 0.31 ± 0.02 g/mmol at day 14; NS; Figure

Cells labeled with control isotype antibodies were used as a negative control and are represented in gray on the histogram. (D) Representative histogram of the percentage of FoxP3-positive cells (FoxP3-PE) contained in the CD4⁺CD25⁺ T cells as described previously for LF15-0195-treated rats. The dotted line in the histogram represents the percentage of FoxP3⁺ cells in CD4⁺CD25⁺ T cells from untreated rats. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

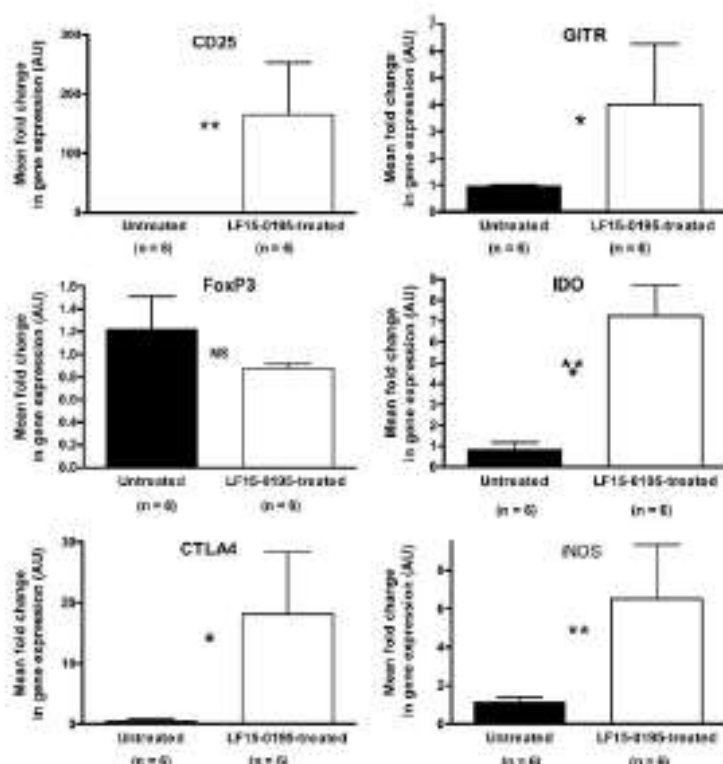


Figure 5. Accumulation of transcripts for the regulatory markers CD25, CTLA4, GITR, IDO, and iNOS in LF15-0195-treated in comparison with untreated age-matched splenocytes. mRNA expression was analyzed by quantitative RT-PCR. Data are means $\pm$ SEM of AU relative to HPRT ($n = 6$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

6B). Interestingly, this was not observed after transfer of the same number of CD4⁺CD25⁺ T cells isolated in the same conditions according to the same procedure from untreated Buff/Mna rats (0.54 ± 0.02 at day 0 versus 0.77 ± 0.17 g/mmol at day 14; NS). This finding suggests that the properties of these cells were modified by the LF15-0195 treatment and indicates the acquisition of a specificity for a pathologic element. More important, the proteinuria levels in both groups were statistically different at day 14 ($P < 0.01$) and day 21 ($P = 0.05$).

DISCUSSION

The Buff/Mna rat is an original model of spontaneously occurring INS that recurs after kidney transplantation. This model is useful for the testing of novel therapeutics for INS.

First, we tested the effect of drugs used by clinicians for INS treatment. Corticosteroids and CsA and their combination had only a moderate effect on proteinuria and did not achieve normalization. Just like the human disease, for which no drugs currently in use can efficiently control the corticoreistant

form of INS or its recurrence after transplantation, the Buff/Mna disease is resistant to classical INS treatments.

We tested several other immunosuppressive drugs (anti-TCR antibody, mitoxantrone, and anti-TNF- α antibody), but none demonstrated convincing efficacy. Only the anti-TCR antibody (R7.3) significantly but transiently decreased Buff/Mna proteinuria, but normalization was still not reached. Moreover, its use is very limited in time because the induction of immunization precludes us from drawing any firm conclusions concerning either the involvement of T lymphocytes or the efficiency of anti-T therapy for INS.

The most promising observation reported here is the demonstration of complete proteinuria remission after treatment with LF15-0195, a derivative of 15-deoxyspergualin. Importantly, this complete remission was associated with a near-complete resolution of ultrastructural glomerular abnormalities, suggesting an impact on podocytes. Because this beneficial effect was not observed in two other models of proteinuria, we can eliminate the possibility of a nonspecific effect on the renal filtration barrier. In addition, the treatment of Buff/Mna rats with a similarly charged isomer of LF15-0195 with very weak immunosuppressive properties had no ef-

fect on proteinuria. This finding further demonstrated that the effect of LF15-0195 is not due to the restoration of glomerular permeability through an electrostatic effect.

We noted that the effect on posttransplantation recurrence was less profound than that on the initial disease. This is most likely due to the creation of additional lesions by the transplantation procedure.²⁰

DSG is a potent immunosuppressive drug known to block T and B lymphocyte differentiation¹⁸ as well as macrophage function and activation.^{21,22} DSG has been shown to bind a member of the heat-shock protein 70 family,²³ interfere with Ag processing²⁴ and with the nuclear translocation of NF- κ B,²⁵ and block the cellular cycle.²⁶ DSG has proved its efficiency in extending the survival of skin, heart, kidney, bone marrow, pancreatic islets, and liver transplantation in animals and humans and reverting rejection in human renal allotransplantation.²⁷ More recently, LF15-0195, a stabilized DSG derivative, was shown to produce a beneficial effect in graft-versus-host disease,¹⁴ allotransplantation,^{17,28} xenotransplantation, experimental autoimmune encephalomyelitis, myasthenia, arthritis, and anti-glomerular basement membrane glomerulonephri-

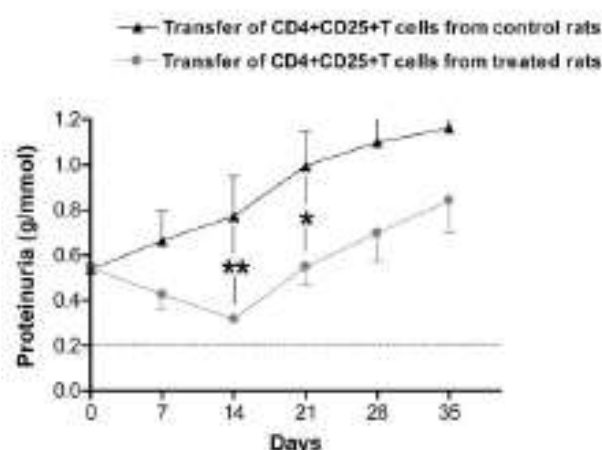


Figure 6. Transient regulation of nephropathy after transfer of CD4⁺CD25⁺ T cells from Bufr/Mna rats in remission into Bufr/Mna rats. Purified CD4⁺CD25⁺ T cells from LF15-0195-treated Bufr/Mna rats were injected into 4 Gy-irradiated proteinuric Bufr/Mna rats ($n = 5$). The number of injected cells was equivalent in the two groups: $2.57 \pm 0.8 \times 10^6$ cells in the untreated group and $2.97 \pm 0.8 \times 10^6$ cells in the LF15-0195 treated group (NS). Data are means $\pm$ SEM (scale bar) and are compared with a control group injected with purified cells from untreated rats ($n = 5$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ between the two experimental groups.

tis²⁹ in rodents. LF15-0195 can induce tolerance by increasing CD4⁺CD25⁺ T cells¹⁹ expressing the transcription factor FoxP3,³⁰ presenting regulatory properties, and transferring tolerance to allotransplants in naive recipients.¹⁹ From a molecular standpoint, LF15-0195 binds to heat-shock protein 70³¹ and can inhibit the activation of I κ B kinase; this results in the inhibition of the NF- κ B pathway.¹⁵ This action triggers the inhibition of dendritic cell maturation,³² which then favors a tolerogenic phenotype and the generation of regulatory T cells.^{15,28} LF15-0195 can also sensitize cells to activation-induced cell death by a Fas-dependent mechanism that triggers the activation of caspases.³³

One of our initial hypotheses concerning this model was that LF15-0195 acts via the inhibition of NF- κ B activation in glomerular epithelial cells to modify the pathway of a putative nephrotoxic factor. This hypothesis was supported by the observation of an increase in NF- κ B expression in kidney biopsies of patients with INS recurrence.³⁴ Nevertheless, our results do not corroborate this hypothesis. Indeed, we observed only a weak basal activation of the NF- κ B pathway in the glomeruli of native Bufr/Mna rats not treated with LF15-0195. These data are additionally supported by the absence of improvement after inhibition of NF- κ B by another drug (PDTC). On the contrary, inhibition of the NF- κ B pathway may have a dramatic effect on proteinuria by blocking the tubular NF- κ B activation involved in tubular compensatory reabsorption of albumin. Through this mechanism, it could aggravate Bufr/Mna proteinuria.¹⁶

Another hypothesis centers on the idea that LF15-0195 decreases graft infiltration, thereby reducing its impact on the

organ. In our model, LF15-0195 decreased the quantity of intrarenal monocytes and T lymphocytes (Figure 3, A and B). This finding supports the hypothesis of a pathologic role for these cells in the Bufr/Mna disease³⁵ but could be only an indirect effect of treatment. How LF15-0195 modifies kidney infiltration is still unknown, but we hypothesize that regulatory cells play a critical role in this phenomenon.

The third hypothesis involves the idea that LF15-0195 contributes to the control of an unknown immune process leading to albuminuria in Bufr/Mna. This control could be mediated by the induction of the FoxP3⁺CD4⁺CD25⁺ T cell subset observed in Bufr/Mna rats.¹⁹ The control isomer of LF15-0195, which was unable to normalize proteinuria, did not increase CD4⁺CD25⁺ T cell frequency. In addition, administration of LF15-0195 to healthy rats did not trigger an increase of this subpopulation. These findings highlight a phenomenon specific to Bufr/Mna nephropathy. Moreover, the increase of transcripts for molecules, such as CTLA4, GITR, IDO, and iNOS, that have been associated with CD4⁺CD25⁺ T cells confirms the induction of cells with a regulatory phenotype. Indeed, IDO has been described to have regulatory properties.³⁶ GITR is similarly involved in the control of regulation,³⁶ and CTLA4 negatively regulates the function of T cells.^{37,38} Finally, iNOS was also found to be expressed at high levels in CD4⁺CD25⁺ T cells, which present regulatory properties dependent on iNOS activity.³⁹

The transfer of LF15-0195-induced CD4⁺CD25⁺ T cells to proteinuric recipients led to a decrease in proteinuria that was significantly different from that in controls (CD4⁺CD25⁺ T cells from untreated Bufr/Mna). This difference suggests that regulatory T cells influence the disease process. LF15-0195 treatment led to a modification in the regulatory properties of CD4⁺CD25⁺ T cells, with a more efficient regulatory function and/or a specificity against a pathologic element. This modification explains the inefficiency of natural regulatory T cells. The relatively short therapeutic effect observed after administration of purified CD4⁺CD25⁺ T cells may be the result of the short half-life of these cells; previous work showed that these cells rapidly lose their expression of CD25 and regulatory capacities.⁴⁰ It is also possible that not enough cells were injected to counterbalance the long-term pathologic mechanisms in our model. Further studies focusing on timing, concentration, irradiation dosage, improved purification, or repeated injection of efficient cells could help to improve this effect. Although regulatory T cells indisputably play a role, it is obvious that the drug's effect is exerted through the aforementioned as well as other mechanisms.

How regulatory T cells act precisely on Bufr/Mna pathology is unknown. We hypothesize that regulatory T cells could act by either decreasing the renal infiltrate or inhibiting an immune cell population responsible for a deleterious effect on glomerular cells. For example, IDO triggers tryptophan starvation,⁴¹ which can be fatal for cell survival. Alternatively, LF15-0195 could sensitize cells to activation-induced cell death, thereby providing a model to understand how LF15-0195 can eliminate renal infiltrating cells or other pathologic populations.³³

A recent study showed that the injection of CD34⁺ stem cells from patients with INS into immunocompromised mice triggered an albuminuria associated with the effacement of podocyte process in these animals.⁴² We performed the inverse process of transferring cells with the capacity to block and control such pathogenic cells. Both of these studies demonstrated the importance of an appropriate balance of effector and regulatory cells in INS.

In summary, we have shown that LF15-0195 has a unique beneficial effect in an experimental model of INS. This drug has the capacity to induce regulatory T cells, which themselves regulate an unknown pathologic mechanism. The idea of using regulatory T cells to treat glomerulonephritis should now be considered,⁴³ especially for the treatment of patients with steroid-resistant nephrotic syndrome or patients with posttransplantation recurring nephrotic syndrome.

CONCISE METHODS

Animals and Measurement of Proteinuria

The Buffalo/Mna rat strain maintained in our laboratory was provided by Dr. Saito (Central Experimental Institute, Yokohama, Kanagawa, Japan). The animal care was in accordance with our institutional guidelines. The rats were placed in metabolic cages for 24 h. We measured the total urinary protein concentration (g/L) by a colorimetric method using a Hitachi autoanalyzer (Boehringer, Reims, France) and urinary creatinine (mmol/L) by the Jaffe method. Proteinuria was expressed according to the formula: proteinuria (g/mmol) = urinary proteins (g/L)/urinary creatinine (mmol/L), and it was considered to be abnormal at values >0.2 g/mmol.

Treatments

Six-month-old male proteinuric Buffalo/Mna rats (with a mean proteinuria of 0.5 g/mmol) were allocated into groups of five. The treatments used were methylprednisolone (Solumedrol; Merck, Fontenay-sous-Bois, France), CsA (Sandimmun Novartis), mitoxantrone (Novantrone Wyeth-Lederle, Paris, France), PDTC (Sigma-Aldrich, Lyon, France), and LF15-0195 (and its control isomer, the LF15-0296; Fournier, Dals, France). The duration and dosage of each treatment are presented in Table 1. Animals from groups 4 and 5 were killed during the remission period (proteinuria <0.2 g/mmol) for histologic examination. For each treatment, control vehicles (olive oil or NaCl) or isotypic control antibodies were administered daily to five rats. Only an initial slight and NS decrease in proteinuria was observed in each control group (maximal decrease 14.9%; data not shown).

Renal Transplantation

Healthy rat kidneys (LEW.1W) were transplanted into proteinuric Buffalo/Mna recipients.⁴⁴ Rats were anesthetized for 90 min by isoflurane/oxygen inhalation. The surgical technique has been described elsewhere.⁴⁴ The first nephrectomy was performed during the transplantation procedure, and the second occurred 7 d later.

Five-Sixths Nephrectomy in Wistar Rats

The five-sixths nephrectomy was performed by uninephrectomy of the left kidney followed by a ligation of two of the three branches of

the renal artery of the right kidney ($n = 10$). When proteinuria reached roughly 0.5 g/mmol, rats were treated with LF15-0195 or the control isomer LF15-0296.

Puromycin Administration to Wistar Rats

Puromycin aminonucleoside was injected intraperitoneally at a single dose of 100 mg/kg into 10 healthy rats. Proteinuria peaked at approximately 7 d and reached a mean of 6.5 ± 1.2 g/mmol. Treatment with LF15-0195 or the control isomer ($n = 5$) was given from the day of puromycin injection until day 30.

Light and Electronic Microscopic Examination

Light microscopic preparation has been described previously.⁴⁵ Slides were examined by a pathologist in a blinded manner. Lesions were estimated and counted on five fields at a $\times 100$ magnification. For electron microscopic examination, kidney biopsies were fixed in 2.5% glutaraldehyde, postfixed in a mixture of 2% osmium tetroxide in 200 mM cacodylate buffer (pH 7.2), and embedded in Epon 815. Thin sections were stained with lead citrate and uranyl acetate and examined using a Hitachi electron microscope at 2000 KeV.

Flow Cytometry

Cells were prepared from 2- to 8-ml blood samples or from an entire spleen. Dilutions and washes were performed in PBS with 0.2% BSA and 0.1% NaN₃. After mechanical separation of splenocytes and/or lysis of erythrocytes with hypotonic solution (NH₄Cl-KHCO₃-Na₂EDTA [pH 7.2]), cells were saturated with rat serum, incubated with a saturating concentration of an anti-rat mAb (Ox1+Ox30: anti-CD45; Ox19: anti-CD3; B7.3: anti-TCR- β ; Ox8: anti-CD8; Ox35: anti-CD4; Ox33: anti-CD45RA; ED3: anti-macrophagic sialoadhesin; 3.2.3: NKRP-1), stained with FITC-labeled donkey anti-mouse IgG (Jackson Laboratories, Newmarket, Suffolk, UK; Immunotech, Marseille, France), washed, and analyzed. For triple or quadruple staining, cells were simultaneously incubated with a saturating combination of FITC-, PE-, APC-, Alexa 647-, and Alexa 488-labeled or biotinylated mAb (Ox1+Ox30; Ox8; Ox35; Ox33; Ox22: anti-CD45RC; Ox26: anti-transferrin receptor; Ox39: anti-CD25; Ox85: anti-CD62L) and then incubated with streptavidin-PE, -PE-Cy7, or -PE-Cy5.5 (Jackson, Immunotech; BD Biosciences, Erembodegem, Belgium; Caltag Laboratories, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). For intracellular staining, cells were fixed with paraformaldehyde (4%) and permeabilized by PBS-BSA-NaN₃-0.5% Saponin. Antibodies (FoxP3-PE or -APC; eBiosciences, San Diego, CA; Clnisciences, Montrouge, France) were diluted in PBS-BSA-NaN₃-0.1% Saponin. Cytofluorometric analysis was performed on a LSR II flow cytometer using FACSDiva Software (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA).

Real-Time Quantitative RT-PCR

Total RNA was prepared from the renal cortex by Trizol extraction (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Messenger RNA was reverse transcribed as described previously.⁴⁶ Real-time quantitative PCR was performed in an Applied Biosystems GenAmp 7700 Sequence Detection System using SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers for rat FoxP3, GITR, CTLA4, CD25, IDO, iNOS, NF- κ B p65, IKK, cPLA2, IL-10, IL-13, and TNF- α ⁴⁷ are presented in Supplemental Table 2. Targeted transcripts were ampli-

Table 1. Summary of the treatments used in the Buff/Mna rats

Group	Treatment	Dosage	Route	Length	
1	Corticosteroids	1 mg/kg per d	Intraperitoneal	60 d	
2	CsA	10 mg/kg per d	Oral	60 d	
3	Corticosteroid + CsA	1 mg/kg per d + 10 mg/kg per d	Intraperitoneal + oral	60 d	
4	Anti-TCR antibody	50 µg/d	Intraperitoneal	9 d	
5	Anti-TCR antibody + CsA	50 µg/d + 10 mg/kg per d	Intraperitoneal + oral	20 d	
6	Mitoxantrone	0.5 mg/kg per d	Intraperitoneal	14 d + 14 d to 0.5	
7	Anti-TNF-α antibody "curative"	8 + 15 mg/kg 2x/wk	Intraperitoneal	30 + 30 d	
8	Anti-TNF-α antibody "Preventive"	15 mg/kg 2x/wk	Intraperitoneal	6 wk	
9	LF15-0195 Prevention LF15-0195	1 mg/kg per d	Intraperitoneal	30 d	
10	Cure and relapse treatment				
11	PDTC	100 mg/kg per d	Intraperitoneal	30 d	
Group	No. of Rats	Initial Proteinuria (g/mmol)	Control Group	Reference	Effect of Treatment on Proteinuria
1	5	0.56	0.9% NaCl (n = 5)	9	Decrease
2	5	0.55	Olive oil (n = 5)	48	Decrease
3	5	0.49	Olive oil and NaCl (n = 5)		Decrease
4	5	1.90	3GB (IgG1)	49	Decrease
5	7	0.76	3GB (IgG1) and olive oil (n = 7)	49	Decrease
6	5	0.51	0.9% NaCl (n = 5)	50	No effect
7	5	0.59		Centocor, Inc	No effect
8	6	0.10		Centocor, Inc	No effect
9	5	0.18	LF15-0296 10 mg/kg per d (n = 5)	Fournier Laboratories	Normalization
10	69	From 0.35 to 5.10		19	Normalization
11	5	0.60		17	No effect

Bed in 25 µl of PCR mix containing 10 µl of diluted cDNA; 300 nM of each primer; 200 µM dATP, dGTP, and dCTP; 400 µM dUTP; 3 mM MgCl₂; 0.25 U of uracil-N-glycosylase; 0.625 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase; and 2.5 µl of the 10× SYBR Green buffer. The cycling conditions were as follows: 2 min at 55°C to allow the uracil-N-glycosylase to eliminate putative PCR contaminants; 10 min at 95°C to activate the AmpliTaq Gold DNA polymerase; and 40 cycles each consisting of 15 s at 95°C, 1 min at 60°C, and 15 s at a temperature 3°C below the melting temperature of the primer to exclude interfering fluorescence measurement as a result of primer dimer formation. Amplification was followed by a melting curve program: 60 to 95°C for 20 min with a continuous fluorescence acquisition. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) was used as an endogenous control gene to normalize for varying starting amounts. Relative expression between a given sample and a reference sample was calculated with the formula $2^{-\Delta\Delta C_T}$, where $\Delta\Delta C_T = (C_{T_{\text{gene}}} - C_{T_{\text{HPRT}}})_{\text{sample}} / (C_{T_{\text{gene}}} - C_{T_{\text{HPRT}}})_{\text{reference}}$. The mean value for the calibrator (reference, same tissue) integrated in each experiment was equal to 1.⁴³

Quantitative Analysis of Cellular Infiltrates

Immunohistology on the kidney slides of untreated and LF15-0195-treated rats was performed as described previously,¹² and the cell-infiltrated area was determined by quantitative morphometric analysis.⁴⁶ Briefly, positively stained cells in each section were counted by morphometric analysis using a point-counting method with a 121-intersection square grid in the eyepiece of the microscope. Results were expressed as the percentage of the area of each renal section occupied by cells of a particular antigenic specificity ($\pm$ SD). The percentage of area infiltrate was calculated as follows: [(number of positive cells under grid intersections)/(total number of grid intersections = 121)] $\times$ 100. The sections were examined at a magnification of $\times$ 400. The accuracy of the technique is proportional to the number of points counted; therefore, 15 fields were counted for each labeled section of high density and 40 fields for sections with low density ($<10\%$). We chose a random start point on a border of a section and moved to field in field. Each counted field was adjacent to the previous and next fields.⁴⁷ Counting was scored in a blinded manner by two observers.

Immunoblotting

Glomeruli were isolated from the superficial renal cortex of rats by sieving.⁴⁷ Glomerular pellets were lysed (in 2% TritonX-100, 250 mM NaCl, 20 mM Tris, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 4 mM Na₂VO₄, 10 mM Na₂P₂O₇, 50 mM NaF, 40 μ M leucostatin, 0.4 mM PMSF, and 40 μ M pepstatin), and their concentrations were measured using the BCA protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA). A total of 20 μ g of each lysate was used for Western blot experiments according to the Bio-Rad instructions (SDS-PAGE 10%; rabbit anti-I κ B α or rabbit anti-phosphorylated I κ B α [1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA] or mouse anti-active NF- κ B p65 [10 μ g/ml; Chemicon Europe, Hampshire, UK] antibodies; peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG and donkey anti-mouse IgG [1:1000 and 1:3000, respectively; Jackson ImmunoResearch]). We performed blot quantification using a Kodak Digital Science Image Station 440 CF (Kodak, Paris, France).

Cell Transfers into Proteinuric Buff/Mna

Buff/Mna rats were irradiated at 4 Gy and received an injection of purified CD4⁺CD25⁺ T cells from LF15-0195-treated Buff/Mna rats. Briefly, splenocytes were prepared mechanically by flushing spleens with PBS, mincing them, and filtering the resulting cell suspension. CD4⁺ T cells were purified by negative selection (staining of the unwanted populations with a cocktail of mouse anti-rat antibodies [Ox42 (anti-CD11b), Ox8, His 24 (anti-CD45R), 3.2.3, and Ox6 (anti-MHC II)]). Unwanted cells were removed with magnetic Dynal beads bound with goat anti-mouse IgG according to the manufacturer's instructions. CD4⁺ T cells were then labeled with an anti-CD25-FITC (Ox39-FITC) antibody, and CD4⁺CD25⁺ T cells were removed by Macs anti-FITC microbeads (Miltenybiotec, Bergisch Gladbach, Germany; positive selection). Cell purity was assessed by FACS and was >85%. The number of injected cells was equivalent in two groups: $2.57 \pm 0.8 \times 10^6$ cells for the untreated group and $2.97 \pm 0.8 \times 10^6$ cells for the LF15-0195-treated group (NS).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (GraphPad, San Diego, CA). We used the Friedman test followed by a Dunn multiple comparison test to compare the proteinuria level before and at various points throughout the treatments. We used the Mann-Whitney test to compare histologic data, cell populations in the FACS analysis (Figure 4), and transcript levels in Figures 3 and 5.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Fondation Progreffe, the Fédération Nationale d'aide aux insuffisants rénaux, and the Agence nationale pour la recherche.

We thank Dr. Cristina Cuturi for discussion and advice, Dr. Patrick Dutarte of Fournier Laboratories for supplying LF15-0195 and LF15-0296, and Joanna Ashton-Chess for editing the manuscript.

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

- Dantal J, Giral M, Houmanti M, Souillou JP: Glomerulonephritis recurrences after kidney transplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 4: 146–154, 1995
- Artero ML, Sharma R, Savin VJ, Vincenti F: Plasmapheresis reduces proteinuria and serum capacity to injure glomeruli in patients with recurrent focal glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 23: 574–581, 1994
- Dantal J, Bigot E, Bogers W, Testa A, Knaa F, Jacques Y, Hurault de Ligny B, Naudet P, Charpentier B, Souillou JP: Effect of plasma protein adsorption on protein excretion in kidney-transplant recipients with recurrent nephrotic syndrome. *N Engl J Med* 330: 7–14, 1994
- Dantal J, Godfrin Y, Koll R, Perrotto S, Naudet J, Bouhours JF, Souillou JP: Antihuman immunoglobulin affinity immunoadsorption strongly decreases proteinuria in patients with relapsing nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 9: 1709–1715, 1998
- Oliver JD 3rd, Simons JL, Troy JL, Provoost AP, Brenner BM, Dean WM: Proteinuria and impaired glomerular permselectivity in uninephrectomized fawn-hooded rats. *Am J Physiol* 267: F917–F925, 1994
- Bertani T, Poggi A, Pozzani R, Delaini F, Sacchi G, Thosa Y, Mecca G, Remuzzi G, Donati MB: Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: Sequences of pathologic events. *Lab Invest* 66: 16–23, 1992
- Kulpers MH, Provoost AP, de Jong W: Development of hypertension and proteinuria with age in fawn-hooded rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 13: 201–209, 1986
- Savin VJ, Sharma R, Sharma M, McCarthy ET, Swan SK, Ellis E, Lovell H, Warady B, Gunwar S, Chonko AM, Artero M, Vincenti F: Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med* 334: 878–883, 1996
- Kato F, Watanabe M, Matsuyama M: Nephrotic syndrome in spontaneous thymoma rats, Buffalo/Mna. *Biomed Res* 4: 105–110, 1983
- Nakamura T, Oito T, Shimizu F, Matsuyama M, Kazama T, Koda Y, Arakawa M: Sclerotic lesions in the glomeruli of Buffalo/Mna rats. *Nephron* 43: 50, 1986
- Polak MR: The genetic basis of FSGS and steroid-resistant nephrosis. *Semin Nephrol* 23: 141–146, 2003
- Le Bero L, Godfrin Y, Gunther E, Buzsaki F, Perrotto S, Smif H, Korjaschki D, Usal C, Cuturi C, Souillou JP, Dantal J: Extrarenal effects on the pathogenesis and relapse of idiopathic nephrotic syndrome in Buffalo/Mna rats. *J Clin Invest* 109: 491–498, 2002
- Le Bero L, Hervé C, Buzsaki F, Usal C, Souillou JP, Dantal J: Renal macrophage activation and Th2 polarization precedes the development of nephrotic syndrome in Buffalo/Mna rats. *Kidney Int* 68: 2079–2090, 2005
- Labreton L, Jost E, Carboni B, Annat J, Vautier M, Dutarte P, Renaud P: Structure-immunosuppressive activity relationships of new analogues of 15-deoxyspergualin. 2. Structural modifications of the spermidine moiety. *J Med Chem* 42: 4749–4763, 1999
- Yang J, Bessler SM, Ichim TE, Li M, Xia X, Zhou D, Huang X, Strijun GH, White DJ, Zhong R, Min WP: LF15-0195 generates tolerogenic dendritic cells by suppression of NF- κ B signaling through inhibition of IKK activity. *J Leukoc Biol* 74: 438–447, 2003
- Zoja C, Benigni A, Remuzzi G: Cellular responses to protein overload: Key event in renal disease progression. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 13: 31–37, 2004
- Mudge SJ, Palis K, Auerdt RB, Thomas RJ, Power DA: Activation of nuclear factor- κ B by podocytes in the autologous phase of passive Heymann nephritis. *Kidney Int* 59: 923–931, 2001
- Kerr PG, Atkins RC: The effects of deoxyspergualin on lymphocytes and monocytes in vivo and in vitro. *Transplantation* 48: 1048–1052, 1989

19. Chiffoleau E, Beriou G, Dutarte P, Usal C, Souillou JP, Cuturi MC: Role for thymic and splenic regulatory CD4⁺ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J Immunol* 168: 5058–5069, 2002
20. Tullius S, Heemant U, Hancock W, Azuma H, Tilney N: Long-term kidney isografts develop functional and morphologic changes that mimic those of chronic allograft rejection. *Ann Surg* 220: 425–432, 1994
21. Didkotte G, Schorlemmer HU, Sedlacek HH: Decrease of mononuclear phagocyte cell functions and prolongation of graft survival in experimental transplantation by (+/-)-15-deoxyspergualin. *Int J Immunopharmacol* 9: 559–565, 1987
22. Waaga AM, Krymowski M, Urdits K, Treutner J, Oke A, Muller-Ruchholtz W: In vitro analysis of the mode of action of the immunosuppressive drug 15-deoxyspergualin. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 44: 155–163, 1996
23. Nadler SG, Tepper MA, Schardor B, Mazzucco CE: Interaction of the immunosuppressant deoxyspergualin with a member of the Hsp70 family of heat shock proteins. *Science* 258: 484–486, 1992
24. Hoeger PH, Tepper MA, Faith A, Higgins JA, Lamb JR, Geha RS: Immunosuppressant deoxyspergualin inhibits antigen processing in monocytes. *J Immunol* 153: 3908, 1994
25. Tepper MA, Nadler SG, Esselstyn JM, Starbuck KG: Deoxyspergualin inhibits kappa light chain expression in 702/3 pre-B cells by blocking lipopolysaccharide-induced NF-kappa B activation. *J Immunol* 155: 2427–2436, 1995
26. Amemiya H: 15-Deoxyspergualin: A newly developed immunosuppressive agent and its mechanism of action and clinical effect—A review. *Japan Collaborative Transplant Study Group for NKT-01. Artif Organs* 20: 832–835, 1996
27. Amemiya H, Suzuki S, Ota K, Takahashi K, Sonoda T, Ishibashi M, Omoto R, Koyama F, Orita K, Takagi H, et al: Multicentre clinical trial of antirejection pulse therapy with deoxyspergualin in kidney transplant patients. *Int J Clin Pharmacol Res* 11: 175–182, 1991
28. Min WP, Zhou D, Ichim TE, Strejan GH, Xia X, Yang J, Huang X, Garcia B, White D, Dutarte P, Jovinikar AM, Zhong R: Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in transplant tolerance. *J Immunol* 170: 1304–1312, 2003
29. Tesch GH, Hill PA, Wei M, Nikolic-Paterson DJ, Dutarte P, Atkins RC: LF15-0195 prevents the induction and inhibits the progression of rat anti-GBM disease. *Kidney Int* 60: 1354–1365, 2001
30. Heslan JM, Beriou G, Le Ludec JB, Guillemain C, Anegón I, Souillou JP, Cuturi MC, Chiffoleau E: Accumulation of T cells with potent regulatory properties and restricted Vbeta7-TCR rearrangements in tolerated allografts. *Transplantation* 80: 1476–1484, 2005
31. Komesli S, Dumas C, Dutarte P: Analysis of in vivo immunosuppressive and in vitro interaction with constitutive heat shock protein 70 activity of LF08-0299 (Tresperimus) and analogues. *Int J Immunopharmacol* 21: 349–358, 1999
32. Thomas JM, Contreras JL, Jiang XL, Edhoff DE, Wang PX, Hubbard WJ, Lobachevsky AL, Wang W, Asledu C, Stavrou S, Cook WJ, Robbin ML, Thomas FT, Neville DM Jr: Posttransplant tolerance induction in macaques: Early events reflecting the unique synergy between immunotoxin and deoxyspergualin. *Transplantation* 68: 1660–1673, 1999
33. Ducoroy P, Micheau O, Perruche S, Dubrez-Daloz L, de Forni D, Dutarte P, Saas P, Solary E: LF 15-0195 immunosuppressive agent enhances activation-induced T-cell death by facilitating caspase-8 and caspase-10 activation at the DISC level. *Blood* 101: 194–201, 2003
34. Schachler AD, Strehlau J, Zurskiowski D, Vasconcelos L, Kim YS, Zhang XX, Gunshin Y, Overstreet SL, Benfield MR, Tojani A, Harmon WE, Harn J, Strom TB: Increased nuclear factor-kappaB and angiotensinogen gene expression in posttransplant recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *Transplantation* 70: 1107–1110, 2000
35. Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaveri KG, Johnson TS, Kaskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R, Slingluff CL Jr, Mellor AL: Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 297: 1867–1870, 2002
36. Stephens GL, McHugh RS, Whittles MJ, Young DA, Luxenberg D, Camero BM, Collins M, Shevach EM: Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4⁺CD25⁺ T cells. *J Immunol* 173: 5008–5020, 2004
37. Faust S, Lu L, McCarty N, Cantor H: Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10398–10403, 2004
38. Read S, Malmstrom V, Powrie F: Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺CD4⁺ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192: 295–302, 2000
39. Aloisi S, Casati P, Casati L, Tomasini S, Benigni A, Pozzetti A, Cavinato RA, Cugliani D, Azzolini N, Moser M, Longarini L, Thomson AW, Remuzzi G, Noris M: DNKK2-transfected dendritic cells induce a novel population of inducible nitric oxide synthase-expressing CD4⁺CD25⁺ cells with tolerogenic properties. *Transplantation* 83: 474–484, 2007
40. Gavin MA, Clarke SR, Negrou E, Gallegos A, Rudensky A: Homeostasis and anergy of CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 3: 33–41, 2002
41. Grohmann U, Orabona C, Falzato F, Vacca C, Calzavara F, Faloni A, Candore P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, Picotini P: CTLA-4 Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 3: 1097–1101, 2002
42. Seller-Leduc AL, Duval A, Riveron S, Macher MA, Deschenes G, Lalat C, Vulpont MC, Pouchaud M, Ronco P, Monteiro RC, Haddad E: A humanized mouse model of idiopathic nephrotic syndrome suggests a pathogenic role for immature cells. *J Am Soc Nephrol* 18: 2732–2739, 2007
43. Wolf D, Hochegger K, Wolf AM, Rumpold HF, Gastl G, Tilg H, Mayer G, Gurellus E, Rosenkrantz AR: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells inhibit experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice. *J Am Soc Nephrol* 16: 1360–1370, 2005
44. Engelbrecht G, Kahn D, Dunmire F, Hickman R: New rapid technique for renal transplantation in the rat. *Microsurgery* 13: 340–344, 1992
45. Livak K, Schmittgen T: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 25: 402–408, 2001
46. McWhinnie D, Thompson J, Taylor H, Chapman J, Bolton E, Carter N, Wood R, Morris P: Morphometric analysis of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labeling in sequential human renal allograft biopsies. *Transplantation* 42: 352–358, 1986
47. Goddard Y, Dantal J, Bouchours JF, Heslan JM, Souillou JP: A new method of measuring albumin permeability in isolated glomeruli. *Kidney Int* 50: 1352–1357, 1996
48. Bouchot O, Anegón I, Romanik A, Jacques Y, Painsau J, Souillou JP: Interleukin 2 receptor in rat heart allograft rejection. *Transplantation* 48(6): 918–922, 1989
49. Tsuchida M, Hirahara H, Matsumoto Y, Abo T, Eguchi S: Induction of specific unresponsiveness to cardiac allografts by short-term administration of anti-T cell receptor alpha beta antibody. *Transplantation* 57(2): 256–262, 1994
50. Fidler IJ, DeJoy SQ, Gibbons JJ: Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. I. Suppression of B lymphocyte function. *J Immunol* 137(2): 727–732, 1986

ETUDE DES MECANISMES DE LA RECIDIVE DU SYNDROME NEPHROTIQUE IDIOPATHIQUE APRES TRANSPLANTATION RENALE

Le syndrome néphrotique idiopathique (SNI) est une glomérulopathie d'origine inconnue qui évolue dans 10 à 20% des cas vers l'insuffisance rénale terminale, nécessitant alors l'hémodialyse à long terme et/ou la transplantation rénale. Cependant, 30 à 50% des patients transplantés développeront une récurrence immédiate de leur maladie initiale, ce qui suggère l'existence d'un ou plusieurs facteur(s) circulant(s) capable(s) de porter atteinte à la barrière de filtration glomérulaire.

Au cours de ce travail, nous avons cherché à identifier des facteurs de perméabilité circulants pouvant prendre part au développement du SNI et de sa récurrence. Nous avons montré que la protéine sST2, facteur de perméabilité potentiel, est surexprimée dans le sérum des patients présentant une récurrence de SNI après transplantation. Cependant, cette protéine ne semble pas être impliquée dans la pathogenèse du SNI récidivant. L'existence d'éventuelles immunoglobulines ayant pour cible des antigènes rénaux a également été analysée par la technique du SEREX. Ce travail a permis d'identifier trois protéines rénales potentiellement cibles d'immunoglobulines chez les patients récidivant, ces résultats devant encore être confirmés à plus large échelle.

Mots clés : Syndrome néphrotique idiopathique, récurrence, transplantation, facteur de perméabilité.

STUDY OF THE MECHANISMS OF IDIOPATHIC NEPHROTIC SYNDROME RECURRENCE AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION

Idiopathic Nephrotic Syndrome (INS) is a glomerulopathy of unknown origin that evolves in 10 to 20% of cases toward end-stage renal failure, thus requiring long-term hemodialysis and/or kidney transplantation. However, 30 to 50% of transplant patients will develop an immediate recurrence of their initial disease, suggesting the involvement of one or several circulating factor(s) capable of injuring the glomerular filtration barrier.

During this work, we tried to identify circulating permeability factors that could take part to the development of INS and its recurrence. We have shown that the sST2 protein, a potential permeability factor, is overexpressed in the serum of patients with INS recurrence after transplantation. However, this protein does not seem to be involved in the pathogenesis of recurrent INS. The potential presence of immunoglobulins which could target renal antigens has also been analyzed by the SEREX technique. This work led to the identification of three renal proteins potentially targeted by immunoglobulins in patients with INS recurrence, although these results have to be confirmed in more patients.

Key words: Idiopathic nephrotic syndrome, recurrence, transplantation, permeability factor.

BRUNEAU Sarah
INSERM U643
30 bd Jean Monnet
44093 Nantes Cedex