

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

**ETUDE DES DESORDRES IMMUNITAIRES DANS LE
SYNDROME NEPHROTIQUE IDIOPATHIQUE ET SA
RECIDIVE APRES TRANSPLANTATION RENALE**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale CHIMIE BIOLOGIE
Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Immunologie

présentée
et soutenue publiquement par :

Caroline HERVE

Le 29 Mars 2006, devant le jury ci-dessous :

Président du jury : Yannick Jacques, Directeur de Recherche, Nantes

Rapporteurs : Christophe Legendre, Professeur, Paris
Georges Guellaen, Directeur de Recherche, Créteil

Examineurs : Yannick Jacques, Directeur de Recherche, Nantes
Renato Monteiro, Directeur de Recherche, Paris

Directeur de Thèse : Jacques Dantal, Professeur, Nantes

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	ERREUR ! SIGNET NON DÉFINI.
TABLE DES MATIERES	2
TABLES ET FIGURES	5
LISTE DES ABREVIATIONS	7
I-INTRODUCTION	8
A-RAPPELS SUR LA PHYSIOLOGIE RÉNALE	8
<i>A.1-Principales fonctions du rein</i>	8
A.1.1 Fonction endocrine	8
A.1.2 Fonction exocrine	8
<i>A.2-Structure du rein</i>	9
A.2.1 Le néphron.....	9
A.2.2 Le glomérule.....	10
A.2.2.1 Les cellules endothéliales.....	10
A.2.2.2 Les cellules mésangiales	10
A.2.2.3 Les cellules épithéliales viscérales ou podocytes.....	11
A.3-La filtration glomérulaire	14
B-PRÉSENTATION DU SYNDROME NÉPHROTIQUE IDIOPATHIQUE	16
<i>B.1-Définition</i>	16
<i>B.2-Les Lésions Glomérulaires minimales.....</i>	16
B.2.1 Incidence.....	16
B.2.2 Histologie.....	17
B.2.2.1 Microscopie optique	17
B.2.2.2 Microscopie électronique	18
<i>B.3-La Hyalinose Segmentaire et Focale.....</i>	19
B.3.1 Incidence.....	19
B.3.2 Aspects cliniques et progression.....	19
B.3.3 Histologie.....	20
B.3.3.1 Microscopie optique	20
B.3.3.2 Microscopie électronique	22
B.3.3.3 Variants histologiques	22
<i>B.4-Liens entre les lésions de LGM et de HSF</i>	23
C-TRAITEMENT DU SYNDROME NÉPHROTIQUE IDIOPATHIQUE	23
<i>C.1-Traitements de première intention.....</i>	23
<i>C.2-Syndrome Néphrotique Idiopathique corticosensible</i>	24
<i>C.3-Syndrome Néphrotique Idiopathique corticorésistant</i>	25
D-LA RÉCIDIVE DU SYNDROME NÉPHROTIQUE IDIOPATHIQUE APRÈS TRANSPLANTATION	
RÉNALE.....	27
<i>D.1-Définition.....</i>	27
<i>D.2-Incidence et évolution</i>	27
<i>D.3-Facteurs de risques de la récurrence.....</i>	28
<i>D.4-Les traitements de la récurrence.....</i>	29
D.4.1 La ciclosporine A	29

D.4.2 Les autres drogues	30
D.4.3 Les traitements du plasma	30
D.4.3.1 Les échanges plasmatiques.....	30
D.4.3.2 Les colonnes d'immunoabsorption	31
E-HYPOTHÈSES ÉTIOLOGIQUES DU SYNDROME NÉPHROTIQUE IDIOPATHIQUE	31
<i>E.1-Anomalies génétiques dans le syndrome néphrotique idiopathique</i>	32
E.1.1 Anomalies impliquant des gènes de structure.....	32
E.1.1.1 La néphrine	32
E.1.1.2 La podocine.....	33
E.1.1.3 La CD2AP.....	34
E.1.1.4 L'α-actinine 4	35
E.1.1.5 Transient Receptor Potential 6 (TRCP6).....	36
E.1.1.6 Autres.....	36
E.1.2 Anomalies impliquant des facteurs de transcription.....	36
E.1.2.1 Le gène WT1	36
E.1.2.2 Le gène SMARCAL1	37
E.1.2.3 Le gène LMX1B	38
E.1.2.4 Autres.....	39
<i>E.2-Implication d'un ou plusieurs facteur(s) circulant(s).....</i>	39
E.2.1 Observations cliniques.....	40
E.2.2 Facteurs dans le SNI corticosensible	40
E.2.3 Facteurs dans le SNI corticorésistant.....	44
E.2.4 Existence de contre-facteurs	46
<i>E.3-Anomalies du système immunitaire dans le SNI</i>	47
E.3.1 Observations cliniques.....	47
E.3.2 Anomalies des Immunoglobulines.....	48
E.3.3 Perturbations des fonctions lymphocytaires	49
E.3.3.1 Anomalies du phénotype	49
E.3.3.2 Anomalies de distribution des cytokines	50
E.3.3.3 Anomalies des voies de régulation et d'activation	53
F-MODÈLES D'ÉTUDE DU SYNDROME NÉPHROTIQUE IDIOPATHIQUE.....	57
<i>F-1 Modèles in vitro</i>	57
F.1.1 Culture de podocytes immortalisés	57
F.1.2 Apport des cultures podocytaires	58
F.1.2.1 Modifications structurales.....	58
F.1.2.2 Apoptose	59
<i>F-2 Modèles animaux</i>	60
F.2.1 Les modèles mécaniques.....	60
F.2.2 Modèles inductibles	61
F.2.2.1 Modèles chimio-induits.....	61
F.2.2.2 Modèles immuno-induits	63
F.2.3 Modèles spontanés de néphropathies secondaires	64
F.2.4 Le Rat Buffalo/Mna	65
F.2.4.1 La myasthénie	65
F.2.4.2 Le thymome	65
F.2.4.3 La néphropathie.....	67
II-METHODOLOGIE	69

A-BUT DE L'ÉTUDE	69
B-MATÉRIELS ET MÉTHODES	72
<i>B-1 Patients.....</i>	<i>72</i>
<i>B-2 L'analyse du Vβtranscriptome.....</i>	<i>72</i>
B-1.2 Rappels sur l'origine de la diversité lymphocytaire T	72
B-1.3 Principe du TcLandscape	74
III RESULTATS	77
A-ARTICLE 1 : MISE EN ÉVIDENCE D'ANOMALIES IMMUNOLOGIQUES PRÉCÉDENT	
L'APPARITION DU SYNDROME NÉPHROTIQUE CHEZ LE RAT BUFFALO/MNA	
<i>A-1 Résumé de l'article 1</i>	<i>77</i>
ARTICLE 1.....	78
<i>A-2 Résultats complémentaires et discussion de l'article 1.....</i>	<i>90</i>
B-ARTICLE 2 ET 3 : LA RÉCIDIVE DU SYNDROME NÉPHROTIQUE APRÈS TRANSPLANTATION	
EST ASSOCIÉE À UN PHÉNOTYPE LYMPHOCYTAIRE NAÏF CHEZ L'HOMME.	
<i>B-1 Résumé de l'article 2</i>	<i>94</i>
ARTICLE 2.....	95
<i>B-2 Résumé de l'article 3</i>	<i>116</i>
ARTICLE 3.....	117
<i>B-3 Résultats complémentaires et discussion des articles 2 et 3.....</i>	<i>141</i>
C-ARTICLE 4 : MISE EN ÉVIDENCE D'UN FACTEUR DE PERMÉABILITÉ POTENTIEL CHEZ LES	
PATIENTS PRÉSENTANT UNE RÉCIDIVE DE SNI APRÈS TRANSPLANTATION	
<i>C-1 Résumé de l'article 4.....</i>	<i>147</i>
ARTICLE 4.....	148
<i>C-2 Résultats complémentaires et discussion de l'article 4.....</i>	<i>176</i>
IV CONCLUSION GENERALE/PERSPECTIVES.....	182
V-BIBLIOGRAPHIE.....	191
VI ANNEXES	217
A-ANNEXE 1	217
B-ANNEXE 2	221
C-ANNEXE 3.....	247

TABLES ET FIGURES

FIGURES

INTRODUCTION

<i>Figure 1 : Représentation schématique d'un néphron.....</i>	<i>9</i>
<i>Figure 2 : Représentation schématique d'un glomérule en coupe.....</i>	<i>12</i>
<i>Figure 3 : Histologie d'un glomérule normal en microscopie optique.....</i>	<i>12</i>
<i>Figure 4 : Représentation en microscopie électronique à balayage des corps cellulaires (CC) des podocytes, à l'aspect de pieuvres dont les tentacules (FP) encerclent totalement les capillaires. D'après Pavenstadt H, Physiol Rev, 2003</i>	<i>12</i>
<i>Figure 5 : Représentation schématique de l'équipement moléculaire des pieds des podocytes. D'après Kerjashki, J Clin Invest, 2001</i>	<i>13</i>
<i>Figure 6 : Représentation en microscopie électronique à transmission de la barrière de filtration glomérulaire, constituée de l'endothélium fenestré (GenC), de la membrane basale glomérulaire (GBM) et des podocytes (Pod). D'après Mathieson PW, Clin Exp Immunol, 2003.</i>	<i>15</i>
<i>Figure 7 : Histologie en microscopie optique de glomérules présentant des lésions glomérulaires minimales (A) ou des lésions de hyalinose segmentaire et focale (B). D'après Eddy AA, Lancet, 2003.</i>	<i>21</i>
<i>Figure 8 : Représentation en microscopie électronique à transmission de la barrière de filtration glomérulaire d'un patient avec des lésions de LGM. Les pieds de podocytes sont fusionnés et la fente de filtration est désorganisée. D'après Eddy AA, Lancet, 2003.</i>	<i>21</i>
<i>Figure 9 : Principaux composants podocytaires associés à un syndrome néphrotique chez l'homme. SD : diaphragme de fente, GBM : Membrane basale glomérulaire</i>	<i>34</i>
<i>Figure 10 : Dichotomie des lymphocytes T CD4+ vers un profil Th1 ou Th2</i>	<i>51</i>
<i>Figure 11 : Schéma récapitulatif des principales anomalies lymphocytaires T observées lors des poussées de SNI/LGM.</i>	<i>56</i>
<i>Figure 12 : Aspect de culture de podocytes non-différenciés et différenciés en microscopie optique.....</i>	<i>58</i>
<i>Figure 13 : Comparaison macroscopique du thymus d'un rat normal de 5 mois (à gauche) avec le thymus d'un rat Buffalo/Mna du même âge (d'après saito, 1997).....</i>	<i>66</i>

METHODOLOGIE

<i>Figure 14 : Schéma récapitulatif de l'hypothèse de départ utilisée chez l'homme ainsi que les articles s'y rapportant.....</i>	<i>71</i>
<i>Figure 15 : Les mécanismes de réarrangements génomiques et d'addition de nucléotides au niveau des jonctions, ajoutés aux nombreuses associations α/β sont source d'une grande diversité des TCR.</i>	<i>73</i>
<i>Figure 16 : Analyse par Immunoscope®.....</i>	<i>75</i>
<i>Figure 17 : Le logiciel Immunoscope® donne le profil de la distribution des longueurs en nucléotides du CDR3 pour une famille Vβ.....</i>	<i>76</i>

RESULTATS (Hors articles)

<i>Figure 18 : Effet du traitement préventif par l'anticorps anti-TNFα sur la protéinurie du rat Buffalo/Mna. L'anticorps a été administré à une dose de 15mg/Kg/j, 2 fois par semaine pendant 6 semaines chez 5 rats Buffalo âgés de 2 semaines et non protéinuriques.....</i>	<i>91</i>
---	-----------

<i>Figure 19 : Phénotypage par cytométrie en flux des différentes populations périphériques exprimées chez les rats Buffalo/Mna à différents degrés de protéinurie et chez les rats contrôles LEW 1W.....</i>	<i>92</i>
<i>Figure 20 : Expression quantitative de différents transcrits de cytokines dans les PBMC de patients SNI récidivant (R) ou non (NR), avant (pré) et après transplantation (post).</i>	<i>142</i>
<i>Figure 21 : Concentration sérique de CD28 soluble détectée par ELISA chez les patients récidivant (n=14) et ne récidivant pas leur SNI (n=20) après transplantation.</i>	<i>143</i>
<i>Figure 22 : Expression de la quantité de transcrits de MAPK9, obtenue par PCR quantitative, dans les PBMC de patients récidivant (R) et ne récidivant pas (NR), avant transplantation et à 1 mois après transplantation.....</i>	<i>144</i>
<i>Figure 23 : Détermination par PCR semi-quantitative de l'expression de l'ARNm de ST2L dans les PBMC (A) et les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ purifiés (B) de patients présentant ou non une récurrence de SNI après transplantation rénale.</i>	<i>177</i>
<i>Figure 24 : Détermination de la concentration seuil de sST2 entraînant un décollement podocytaire supérieur à 20%.</i>	<i>178</i>
<i>Figure 25 : Récapitulatif de la moyenne des taux de ST2 soluble mesurés dans le sérum de patients récidivant et non récidivant, avant transplantation (Tx), au cours de la dialyse et après transplantation.</i>	<i>179</i>

DISCUSSION GENERALE

<i>Figure 26 : Hypothèse reprenant les résultats obtenus dans les différents articles ainsi que les principales observations de la littérature concernant les anomalies immunitaires dans la récurrence SNI après transplantation.</i>	<i>184</i>
---	------------

TABLES

<i>Tableau 1 : Principaux facteurs associés à la progression du syndrome néphrotique</i>	<i>17</i>
<i>Tableau 2 : Résumé des essais cliniques sur les patients atteints de syndrome néphrotique corticorésistant. CP : Cyclophosphamide, CsA : Ciclosporine A, MP : méthylprednisone, iv : intraveineux, N : nombre de patients.</i>	<i>26</i>
<i>Tableau 3 : Principaux gènes associés au syndrome néphrotique idiopathique chez l'Homme ..</i>	<i>38</i>
<i>Tableau 4 : Synthèse des données de la littérature concernant le niveau d'expression des cytokines dans le SNI (d'après D.Sahali, Actualités Néphrologiques 2003-Nécker)</i>	<i>52</i>
<i>Tableau 5 : Principales phospho-tyrosine kinases reconnues par l'anticorps 4G10.....</i>	<i>146</i>
<i>Tableau 6 : Récapitulatif des tyrosines kinases avec un poids moléculaire avoisinant les 56 kDa et leur localisation.....</i>	<i>146</i>

LISTE DES ABREVIATIONS

AAV : Associated Adeno Virus
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
CD: Cluster of Differentiation
CD2AP: CD2 Associated Protein
ConA: Concanavaline A
CPA: Cellule Présentatrice d'Antigènes
CsA : cyclosporine A
DST: Transfusion Spécifique du Donneur
GPF: Glomerular Permeability Factor
GVV: Glomerular Volume Variation
HSF : Hyalinose Segmentaire et Focale
i.v.: intra-veineux
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
ILK: Integrin Linked Kinase
IRT : Insuffisance Rénale Terminale
kDa : Kilodalton
LEF-1: Lymphoide Enhancer Factor 1
LGM : Lésions Glomérulaires Minimales
LPS: Lipopolysaccharide
MBG : Membrane basale glomérulaire
MMF: Mycophénolate Mofetil
MN : Néphropathie membraneuse
NFκB: Nuclear Factor κB
NO: Monoxyde d'azote
P_{alb}: Perméabilité à l'albumine
PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor 1
PAN: Aminonucléoside de Puromycine
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells
PI3: Phosphatidyl Inositol 3
SNI : Syndrome Néphrotique Idiopathique
SV40: Simian Virus 40
Tc-mip: Truncated c-maf protein
TCR: T Cell receptor
TNF: Tumor Necrosis Factor
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VPF: Vascular Permeability Factor

I-INTRODUCTION

A-Rappels sur la physiologie rénale

Le système urinaire se compose de différentes parties : les reins qui assurent les fonctions de filtration, sécrétion et réabsorption, les uretères et l'urètre qui permettent l'acheminement des fluides et la vessie qui assure la fonction de réservoir. L'urine contient principalement de l'eau, de l'urée, de l'acide urique, de l'ammoniaque, des électrolytes ainsi que des toxiques exogènes. Les protéines, les glucides et les lipides sont normalement indétectables. La présence de ces substances dans l'urine est un indice de pathologie.

A.1-Principales fonctions du rein

A.1.1 Fonction endocrine

Le rein représente un véritable organe endocrine capable de synthèse et de sécrétion d'un grand nombre d'hormones et de médiateurs d'action locale. Il assure un rôle important dans la régulation endocrine du volume extracellulaire et de la pression artérielle. La rénine est une hormone exclusivement synthétisée dans le rein. Elle est responsable de l'étape limitante de l'activation du système rénine-angiotensines-aldostérone aboutissant à la production d'un vasoconstricteur puissant, l'angiotensine II. Les prostaglandines rénales jouent un rôle important dans l'adaptation de la microcirculation rénale en cas d'hypovolémie et dans l'excrétion rénale du sodium. Le rein assure également la synthèse et la libération de l'érythropoïétine, principale hormone stimulant la production médullaire des érythrocytes et régulant la masse globulaire.

A.1.2 Fonction exocrine

Le rein assure le maintien des volumes des fluides de l'organisme, mais également le maintien du bilan et de la composition ionique d'un grand nombre d'ions monovalents et divalents tels que Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , H^+ , HCO_3^- , PO_4^{3-} . Cette fonction, dite homéostasique, est assurée par filtration glomérulaire et modifications tubulaires, celles-ci étant régulées. Les modifications importantes de débit des urines et de leur composition traduisent les capacités du rein à s'adapter à une situation physiologique ou pathologique. Le rein est la voie principale d'excrétion des déchets métaboliques non volatils, certains d'entre eux étant potentiellement toxiques. C'est le cas notamment pour l'urée, l'acide oxalique et la créatinine. Le rein élimine un

grand nombre de produits chimiques exogènes (médicaments, toxines) et leurs métabolites, selon un mécanisme propre à la molécule considérée. Il assure également la dégradation et le catabolisme des hormones peptidiques telles que l'insuline, le glucagon, le parathormone, la calcitonine et de façon générale le catabolisme des protéines de petit poids moléculaire.

A.2-Structure du rein

A.2.1 Le néphron

Le néphron est l'unité structurale et fonctionnelle du rein. On en dénombre environ un million par rein chez l'homme. Le néphron est constitué de plusieurs parties (figure 1) :

- Les corpuscules rénaux (figure 2), décrits pour la première fois par Malpighi en 1687, sont constitués de la capsule de Bowman et du glomérule et sont situés dans le cortex rénal. La structure du glomérule ainsi que ses rôles seront détaillés dans une autre partie.
- Le tube proximal, formé du tube contourné proximal, du tube proximal droit et du tube proximal médullaire réabsorbe 60 à 70% du filtrat glomérulaire.
- L'anse de Henlé, débutant par la partie terminale du tube proximal, se poursuit par une succession de branches grêles et de segments larges. Un amas de cellules spécialisées, appelé *macula densa*, se trouve dans le prolongement de l'anse.
- Le tube distal rejoint les tubes collecteurs qui vont confluer dans le bassinnet au niveau de la papille rénale.
- Le tractus urinaire se prolonge enfin par deux conduits, les uretères, par lesquels l'urine parvient dans la vessie.

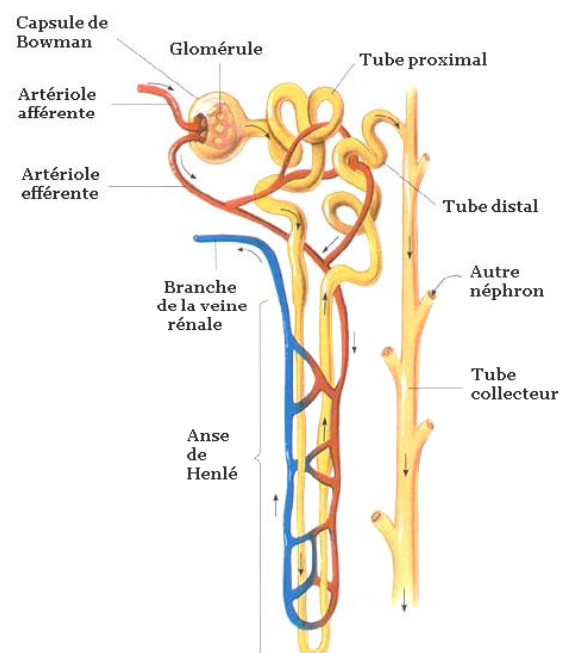


Figure 1: Représentation schématique d'un néphron

A.2.2 Le glomérule

Le glomérule est une structure complexe comprenant au moins 3 types cellulaires différents : Les cellules endothéliales, les cellules mésangiales et les cellules viscérales épithéliales ou podocytes (figure 3).

A.2.2.1 *Les cellules endothéliales*

Les cellules endothéliales sont un composant important de la paroi capillaire glomérulaire. Comme les autres cellules endothéliales, elles se trouvent à l'interface entre les compartiments sanguins et tissulaires (Savage 1994) et ont pour fonction de réguler le tonus vasomoteur (King et al. 1991), l'hémostase (Gross et al. 2000), et le trafic des leucocytes (Takano et al. 1995). L'endothélium forme une couche cellulaire extrêmement fine ($<0,15 \mu\text{m}$) et fortement fenestrée, qui entoure la circonférence de la lumière des anses capillaires glomérulaires. Alors que la membrane basale glomérulaire (MBG) soutient la plupart de l'endothélium de la périphérie de l'anse capillaire, la cellule endothéliale du hile glomérulaire est en contact étroit avec les cellules mésangiales et la matrice mésangiale, sans MBG intermédiaire. Les fenestrations sont des pores circulaires de 70 à 100 nm dans la membrane plasmique, qui perforent l'endothélium glomérulaire aplati. Bien que les fenestrations glomérulaires aient été longtemps considérées comme étant dépourvues de diaphragme, des travaux assez récents ont montré que, comme dans le cas des autres endothéliums fenestrés, les fenestrations glomérulaires sont enjambées par un diaphragme (Rostgaard et al. 1997). Les microfilaments d'actine qui entourent les fenestrations régulent la forme et le diamètre de celles-ci (Vasmant et al. 1984).

A.2.2.2 *Les cellules mésangiales*

Le mésangium glomérulaire occupe une place centrale dans le lobule glomérulaire auquel sont fixés les capillaires (Kriz et al. 1990). L'ensemble mésangium-capillaires glomérulaires forme un peloton sur lequel repose la membrane basale glomérulaire (MBG). Les cellules mésangiales sont des cellules ayant les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des cellules musculaires lisses et des macrophages. Elles possèdent différentes fonctions, telles que le maintien de l'architecture des capillaires glomérulaires (Sakai et al. 1987; Lemley et al. 1992), la phagocytose des macromolécules et des complexes immuns (Schlondorff et al. 1990; Cortes-

Hernandez et al. 2002) ainsi que la production de substances bioactives (Diaz-Cazorla et al. 1999) (Busiek et al. 1995; Rovin et al. 2001). Elles peuvent également communiquer directement avec les cellules endothéliales par différents médiateurs : facteurs de croissance, cytokines, médiateurs lipidiques (Saeki et al. 1991; Kitahara et al. 2005). Les cellules mésangiales en se contractant peuvent diminuer le diamètre des capillaires glomérulaires et la surface de filtration. Au niveau des prolongements cellulaires, les amas de microfilaments d'actine se lient à la membrane basale glomérulaire grâce à une protéine transmembranaire, l'intégrine (Rupprecht et al. 1996). Il a d'ailleurs été rapporté que l' $\alpha 8$ intégrine était spécifique des cellules mésangiales (Hartner et al. 1999). Au niveau de ces sites d'adhésion, plusieurs protéines associées à l'actine telles que l' α -actinine, la taline ou la vinculine ont été identifiées. Par ailleurs, certaines de ces protéines du site d'adhésion jouent un rôle dans la transduction des signaux.

A.2.2.3 Les cellules épithéliales viscérales ou podocytes

Les podocytes sont des cellules hautement spécialisées, avec une organisation cellulaire et une cytoarchitecture complexes (Mundel et al. 1995). Ainsi, les podocytes sont divisés en trois segments, au plan structural et fonctionnel : le corps cellulaire, les expansions principales et les pieds des podocytes (figure 4). Les corps cellulaires et les expansions principales ne sont généralement pas directement attachés à la MBG mais sont plutôt des structures qui flottent librement dans la lumière de l'espace de Bowman, créant un sous-espace entre le corps cellulaire et les pédicelles. Au contraire, les pieds des podocytes recouvrent le versant externe de la MBG et sont entrelacés avec les cellules voisines, formant des fentes de filtration entre les cellules adjacentes. Les corps cellulaires possèdent un noyau proéminent, un système golgien et un réticulum endoplasmique bien développés alors que les pieds des podocytes contiennent peu d'organelles. La présence d'une forte densité d'organelles dans les corps podocytaires témoigne d'une grande activité catabolique et anabolique, nécessaire au maintien de l'intégrité de la cellule et à la synthèse des principaux composants de la MBG.

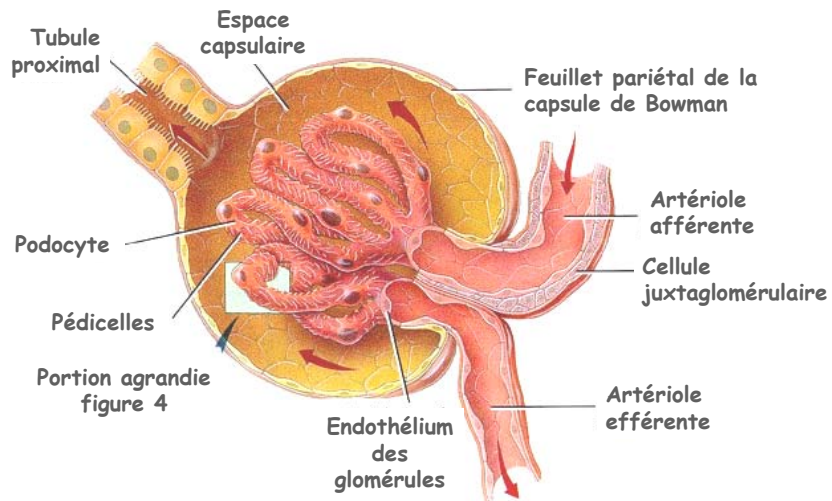


Figure 2 : Représentation schématique d'un corpuscule rénal

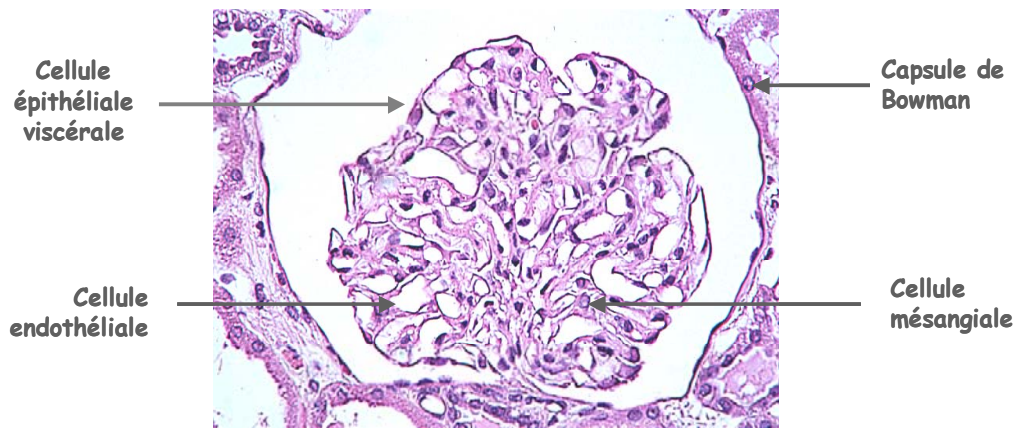


Figure 3 : Histologie d'un glomérule normal en microscopie optique

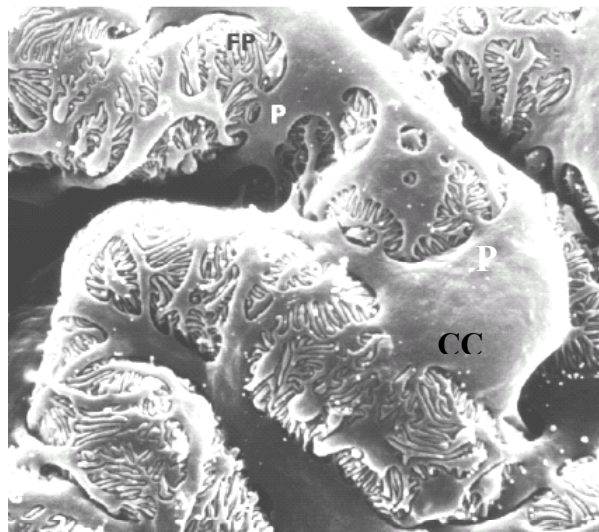


Figure 4 : Représentation en microscopie électronique à balayage des corps cellulaires (CC) des podocytes (P), à l'aspect de pieuvres dont les tentacules (FP) encerclent totalement les capillaires. D'après Pavenstadt H, *Physiol Rev*, 2003

Les podocytes sont organisés d'une façon polarisée avec un domaine membranaire luminal et un domaine abluminal, qui sont séparés l'un de l'autre au niveau du diaphragme de fente.

A leur surface luminaire, les podocytes sont recouverts d'un glycocalyx bien développé, composé de plusieurs sialoglycoprotéines dont la podocalyxine (Kerjaschki et al. 1984; Kershaw et al. 1995).

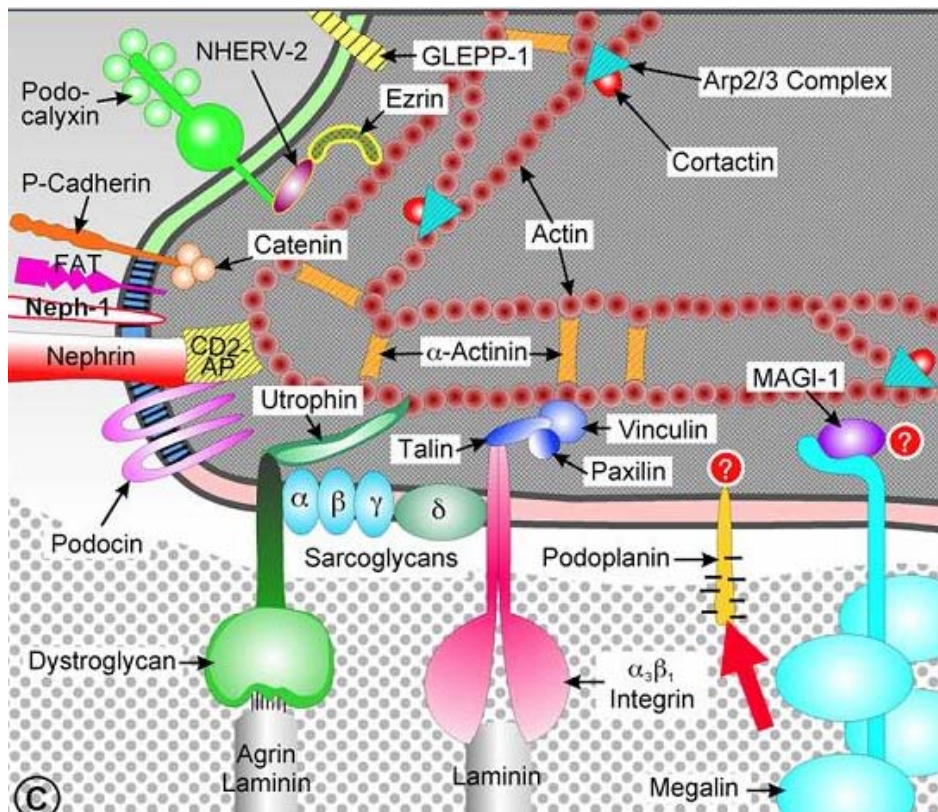


Figure 5 : Représentation schématique de l'équipement moléculaire de la portion baso-latérale d'un podocyte. D'après Kerjaschki, *J Clin Invest*, 2001

La semelle podocytaire est composée de protéines d'adhésion qui lient le podocyte à la matrice extracellulaire, telles que l'intégrine $\alpha_3\beta_1$, la taline, la paxiline, le complexe des dystroglycans et MAGI-1. La membrane apicale est quant à elle constituée principalement de podocalyxine, de GLEPP-1 et de NHERV-2. La néphrine, la podocine, Nep-1, FAT sont les composants majeurs du diaphragme de fente. Des protéines telles que la vinculine, l'utrophine, CD2AP ou l'eitrine relient les différentes parties du podocyte au cytosquelette d'actine. Les points d'interrogation indiquent des protéines encore non caractérisées.

Le revêtement de surface contribue à la charge négative de la barrière de filtration mais est aussi critique dans la formation et la préservation de l'architecture dynamique des expansions podocytaires. D'autres protéines sont présentes dans la membrane du podocyte (Somlo et al. 2000) : la protéine des jonctions serrées ZO-1 (Kurihara et al. 1992), la tyrosine phosphatase GLEPP-1 (Thomas et al. 1994), la podoplanine (Breiteneder-Geleff et al. 1997), la néphrine (Ruotsalainen et al. 1999) et la podocine (Boute et al. 2000).

Les pieds des podocytes ne sont pas statiques et contiennent un système contractile similaire à celui observé dans les péricytes (figure 5). Cet appareil contractile est composé d'actine, de myosine-2 et d' α -actinine- 4, de taline et de vinculine. Les faisceaux de filaments d'actine forment des arches entre les pédicelles adjacents du même podocyte (Drenckhahn et al. 1988).

Deux complexes majeurs d'adhésion ont été identifiés au niveau de l'interface podocyte-MBG (figure 5) :

-Les complexes de dystroglycanes, situés au niveau des pieds des podocytes, permettent de faire le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine (Regele et al. 2000) et sont essentiels à l'intégrité de la MBG (Kojima et al. 2004). Les principales protéines associées aux dystroglycanes dans la MBG sont la laminine, l'agrine, le perlecan et l'utrophine (Raats et al. 2000).

-Les filaments d'actine sont également connectés à la membrane basale glomérulaire sous-jacente, en des points de contact focaux, par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ (Adler 1992). Ainsi, l'inactivation de l'intégrine α_3 chez la souris entraîne un défaut de formation des pieds des podocytes (Kreidberg et al. 1996). Les intégrines sont également des récepteurs impliqués dans la transduction des signaux liés à l'adhésion (Hynes 2002).

A.3-La filtration glomérulaire

La filtration glomérulaire s'effectue à travers la barrière de filtration glomérulaire. Celle-ci comprend les trois couches cellulaires de la paroi capillaire : la plus interne, l'endothélium fenestré, la membrane basale glomérulaire et la couche de cellules podocytaires faisant face à l'espace urinaire (Deen et al. 2001)(figure 6).

La taille des fenestrations de l'endothélium est d'environ 70-100 nm de diamètre ce qui permet un contact direct entre le sang et la MBG. Ainsi l'endothélium ne semble pas représenter une barrière directe au passage des macromolécules. La MBG est une matrice extracellulaire acellulaire composée de grandes protéines telles que le collagène de type IV, les laminines, le nidogène et les protéoglycanes (Hudson et al. 1993). Les interactions complexes inter- et intramoléculaires de ces molécules font de la MBG un échafaudage perméable unique procurant à la paroi capillaire une certaine force et une certaine flexibilité. De plus, ce réseau protéique fonctionne comme un filtre des macromolécules dépendant à la fois de la charge et de la taille (Brenner et al. 1978; Caulfield et al. 1978; Kanwar et al. 1991). La charge négative a été attribuée aux protéoglycanes riches en héparane sulfate (Kanwar et al. 1979). Les podocytes ont leurs pieds qui couvrent la surface externe de la MBG de façon tout à fait caractéristique. Entre

les pieds des podocytes se trouve une fente étroite d'une largeur assez constante de 40 nm. Cette fente contient une membrane ultra-mince, le diaphragme de fente, dont on pense qu'il sert de filtre ultime pour les macromolécules plasmatiques (Karnovsky et al. 1972; Kanwar et al. 1991).

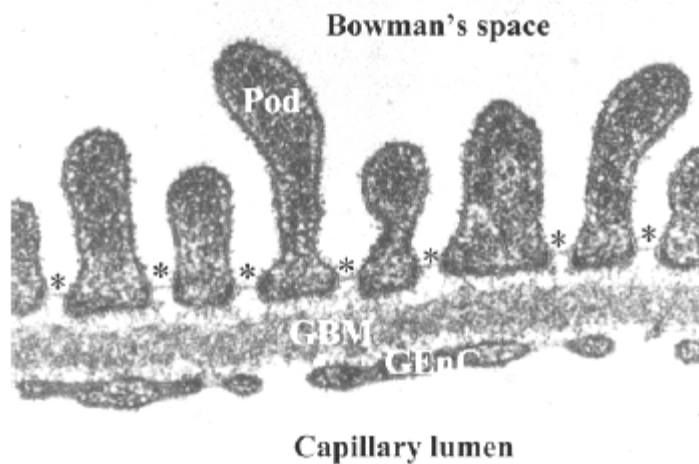


Figure 6 : Représentation en microscopie électronique à transmission de la barrière de filtration glomérulaire, constituée de l'endothélium fenestré (GenC), de la membrane basale glomérulaire (GBM) et des podocytes (Pod). D'après Mathieson PW, *Clin Exp Immunol*, 2003.

A partir d'études de traceurs, il a été proposé que le glomérule contienne deux filtres en série : la MBG qui est le filtre grossier restreignant le passage des larges molécules et le diaphragme de fente qui est un filtre plus fin et qui a une sélectivité dépendante de la taille, perméable uniquement aux molécules plus petites que l'albumine. Rodewald et Karnovsky ont proposé un modèle de diaphragme de fente basé sur des études en microscopie électronique de reins de souris et de rats (Rodewald et al. 1974). Dans ce modèle, le diaphragme de fente est un réseau protéique tridimensionnel qui a une structure extrêmement ordonnée et périodique à type de ponts formant un motif en fermeture éclair. Il a été suggéré que le diaphragme de fente contenait des pores de 4 à 14 nm situés des deux cotés d'un filament central de la fermeture-éclair. Ces pores seraient assez petits pour entraver le passage des protéines de la taille de l'albumine dans l'urine. Cette architecture a été validée par la découverte de la néphrine.

B-Présentation du syndrome néphrotique idiopathique

B.1-Définition

Initialement décrite avec d'autres pathologies sous le terme de néphrose lipoïdique, cette maladie émerge en tant qu'entité à la suite des travaux de Rich en 1957. Classiquement, le syndrome néphrotique (SN) est défini par l'association d'une protéinurie abondante supérieure à 3 g/24 h (supérieure à 50 mg/kg/jour chez l'enfant), d'une hypoalbuminémie inférieure à 30 g/l et d'une hypoprotidémie inférieure à 60 g/l. Les oedèmes et l'hyperlipidémie sont fréquemment associés au syndrome néphrotique mais ne font pas partie de la définition classique. La définition du syndrome néphrotique est en fait quelque peu arbitraire et il faut savoir que le pronostic d'une atteinte glomérulaire avec une protéinurie abondante persistante de plus de 3-4 g/24 h (on parle alors de protéinurie néphrotique), même sans hypoalbuminémie, n'est pas fondamentalement différent de celui d'un syndrome néphrotique. Le terme idiopathique est principalement utilisé pour décrire un groupe de glomérulopathies qui se manifeste principalement chez l'enfant et dont l'étiologie est inconnue. Lorsque le syndrome est associé à une autre maladie, on dit alors qu'il est secondaire. Les principales causes de SN secondaire sont indiquées dans le tableau 1.

En se basant sur des études histologiques, le syndrome néphrotique idiopathique peut se diviser en trois sous types : Les Lésions Glomérulaires Minimales (LGM), la Hyalinose Segmentaire et Focale (HSF) et la Néphropathie Membraneuse (MN). Dans la suite de l'exposé, je ne m'intéresserai qu'aux formes de LGM et de HSF.

B.2-Les Lésions Glomérulaires minimales

B.2.1 Incidence

Chez l'enfant, les Lésions Glomérulaires Minimales représentent la forme la plus commune de syndrome néphrotique, soit 35 à 80% des cas recensés selon la provenance ethnique (Churg et al. 1970; White et al. 1970; Webb et al. 1996; Bonilla-Felix et al. 1999). Chez l'adulte, elle représente entre 15 et 25% des cas et constitue ainsi la troisième cause de syndrome néphrotique, juste derrière la forme avec dépôts extra-membraneux et celle avec lésions de hyalinose segmentaire et focale (Haas et al. 1997). Les lésions de LGM sont plus fréquentes dans les populations hispaniques, asiatiques, arabes et caucasiennes que dans les populations afro-américaines (Sharples et al. 1985; Pontier et al. 1994; Korbet et al. 1996; Baqi et al. 1998; Bonilla-Felix et al. 1999). Selon la provenance ethnique, l'incidence de la LGM peut varier, chez

l'enfant de moins de 16 ans, de 2 à 16 cas pour 100 000 (Arneil 1961; Schlesinger et al. 1968; Feehally et al. 1985; Sharples et al. 1985). Les études plus anciennes ont rapporté des incidences de LGM plus élevées chez l'enfant que les études plus récentes. Cette observation peut s'expliquer par le fait que l'incidence des lésions de HSF a augmenté au cours de ces dernières années tandis que celle de LGM semble avoir diminué (D'Agati 1994; Haas et al. 1997; Bonilla-Felix et al. 1999; Filler et al. 2003).

Tableau 1 : Principales causes secondaires de syndrome néphrotique

Causes secondaires de Syndrome Néphrotique	
Infections	Hépatite B et C, HIV 1 Malaria, Syphilis Toxoplasmose EBV
Médicaments, drogues	Pénicillamine, Pamidronate Médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens Interféron Or, mercure Héroïne, lithium
Manifestations allergiques	Piqûre d'abeille, allergènes alimentaires Pollen, poussière Dermatite de contact Venins ou poisons végétaux
Désordres immunitaires	Maladie de Castleman, maladie de Kimura Lymphomes, sarcomes, carcinomes Leucémie Maladie de Hodgkin
Autres maladies rénales	Lupus érythémateux systémique Reflux vésico-urétéral, uropathie malformative
Autres causes	Diabète, obésité, hypertension Prééclampsie Réduction de masse rénale

B.2.2 Histologie

B.2.2.1 Microscopie optique

Le glomérule apparaît complètement normal en microscopie optique, avec une membrane basale glomérulaire et une disposition cellulaire normales. Des changements glomérulaires minimes, tels que un gonflement et une vacuolisation des cellules épithéliales accompagnés d'une légère prolifération de la matrice extracellulaire, sont habituellement observés (figure 7A).

Cependant, une légère hypercellularité mésangiale peut être retrouvée (Churg et al. 1970; Habib et al. 1971; Cameron et al. 1974). La présence de vacuoles lipidiques, à l'origine de l'appellation de la néphrose lipoïdique, et de changements dégénératifs au niveau des tubules proximaux sont classiques. Des anomalies tubulaires focales et occasionnellement un glomérule sclérotique sont également compatibles avec ce diagnostic. Ces dernières se définissent par une obstruction, par de larges dépôts hyalins, une dilatation ainsi qu'un amincissement des cellules épithéliales, une atrophie accompagnée d'un épaississement des membranes basales tubulaires, la présence de cellules voilées dans l'interstitium et de dépôts calciques. Les modifications vasculaires sont absentes chez l'enfant (White et al. 1970; Habib et al. 1971) alors qu'elles sont age dépendantes chez l'adulte (Jao et al. 1973).

B.2.2.2 Microscopie électronique

Contrairement au peu d'anomalies observées en microscopie optique, des changements ultrastructuraux sont présents, tout particulièrement au niveau des podocytes et du mésangium (figure 8). La fusion des pieds des podocytes, décrite pour la première fois par Farquhar et al. en 1957 (Farquhar et al. 1957), est nettement visible et son intensité semble corrélée avec le degré de protéinurie (Jao et al. 1973; Powell 1976). Cependant, une étude récente montre qu'il n'existe pas de corrélation entre ces deux phénomènes (van den Berg et al. 2004). Comme le montre une étude en microscopie électronique sur des rats néphrotiques traités à l'aminonucléoside (Arakawa 1970; Carroll et al. 1973), il n'y a pas vraiment fusion mais œdème et rétractation podocytaire, conduisant à l'effacement des pieds. Les autres modifications épithéliales consistent en la formation de microvillosités, la présence de nombreuses gouttelettes de réabsorption protéique et moins fréquemment en l'augmentation du nombre d'organelles et de lysosomes. Les membranes basales glomérulaires ont un aspect quasi-normal et sont dépourvues de dépôts pariétaux. Les cellules endothéliales sont souvent gonflées (Kawano et al. 1971). La formation de fibrine intra capillaire ainsi qu'une agrégation des plaquettes peuvent également être observées (Jao et al. 1973). Les altérations du mésangium se traduisent par une hyperplasie des cellules mésangiales (Kawano et al. 1971) qui augmentent leur production de matrice et des dépôts osmiophiles localisés au niveau de la face interne de la membrane basale. Ces altérations de structure sont non spécifiques et sont probablement la conséquence d'une protéinurie massive.

B.3-La Hyalinose Segmentaire et Focale

B.3.1 Incidence

La hyalinose segmentaire et focale est un ensemble hétérogène d'affections ayant en commun une lésion histologique glomérulaire peu spécifique mais individualisée en raison de sa localisation initiale particulière. La forme primitive de hyalinose segmentaire et focale représente 7 à 20% des lésions glomérulaires de l'adulte et de l'enfant néphrotiques (Habib et al. 1971; Cameron 1996; Korbet et al. 1996). Son incidence a progressivement augmenté et constitue à présent la lésion la plus fréquemment trouvée dans le rein adulte natif, représentant entre 30 et 50% des cas de syndrome néphrotique adulte (Haas et al. 1997). Chez l'enfant, les lésions de HSF représentent la seconde cause de syndrome néphrotique idiopathique, soit environ 20 à 30% des cas (Ingulli et al. 1991). Il a été mis en évidence dans la littérature que la maladie avait une plus grande incidence dans les populations noires et hispaniques que dans les populations caucasiennes (Bakir et al. 1989; Ingulli et al. 1991).

B.3.2 Aspects cliniques et progression

Les lésions de hyalinose segmentaire et focale ont été décrites pour la première fois par Rich en 1957 dans un groupe d'enfants néphrotiques (Rich 1957). A la définition habituelle du syndrome néphrotique peuvent s'ajouter une hématurie microscopique, de l'hypertension et une insuffisance rénale. Le syndrome est alors qualifié « d'impur ».

Le degré de protéinurie au moment du diagnostic est un facteur prédictif de l'évolution des lésions de HSF. La présence d'une protéinurie conséquente (3-3.5g/24h) est souvent associée à une mauvaise évolution du syndrome néphrotique primitif : en effet, 50% des patients protéinuriques atteindront le stade d'insuffisance rénale terminale (IRT) en 6 à 8 ans (Cameron et al. 1978; Velosa et al. 1983; Korbet et al. 1994; Rydel et al. 1995). Les patients présentant une protéinurie massive (>10g/24h) évolueront vers l'IRT en seulement 3 ans pour la majorité d'entre eux (Brown et al. 1978; Rydel et al. 1995). Inversement, les patients avec une protéinurie non néphrotique ont une évolution plus favorable, puisque plus de 80% d'entre eux présentent une bonne fonction rénale 10 ans après le diagnostic (Korbet et al. 1986; Rydel et al. 1995). Un autre facteur indicatif de l'évolution des lésions est la présence et le degré de créatinémie (Velosa et al. 1983; Wehrmann et al. 1990; Ingulli et al. 1991; Rydel et al. 1995). Une créatinémie supérieure à 1,3 mg/dL est associée à une mauvaise survie rénale en comparaison avec une créatinémie inférieure à 1,3 mg/dL. Par ailleurs, aucune corrélation n'a pu être établie

entre la progression des lésions de HSF et l'âge, le sexe ou la présence d'hématurie et d'hypertension chez le patient (Pei et al. 1987; Banfi et al. 1991; Rydel et al. 1995).

B.3.3 Histologie

Les lésions de hyalinose segmentaire et focale comportent trois types d'altérations caractéristiques : podocytaires, scléreuses et hyalines. Cette lésion est dite segmentaire, c'est-à-dire qu'elle ne touche qu'une partie du glomérule et focale, parce qu'elle ne touche que certains glomérules.

B.3.3.1 Microscopie optique

En microscopie optique et au stade précoce, la hyalinose segmentaire et focale comporte une atteinte focale souvent localisée dans les glomérules juxtamédullaires (Rich 1957) avec un épaissement du matériel mésangial, une adhésion du flocculus à la capsule de Bowman (synéchie flocculocapsulaire) et une condensation de matériel hyalin amorphe (figure 7B). Une hypercellularité mésangiale modérée ainsi qu'une occlusion partielle de la lumière capillaire par des dépôts hyalins sont fréquemment observés: ces lésions semblent être proportionnelles à l'atteinte glomérulaire (Habib et al. 1971; Hyman et al. 1973). L'occlusion par des dépôts hyalins représente l'insudation de protéines plasmatiques dans une paroi capillaire glomérulaire anormalement perméable. Cette lésion évolue secondairement vers une glomérulosclérose segmentaire puis enfin diffuse de l'ensemble du glomérule. Dans de rares cas, des lésions tubulaires peuvent prédominer (Hayslett et al. 1969).

L'étude en microscopie à fluorescence peut se révéler soit négative soit présenter des dépôts segmentaires d'IgM ou de complément (C3) au niveau des lésions. Plus rarement, du C1q (variant aussi appelé néphropathie à C1q, (Jennette et al. 1985; Markowitz et al. 2003), du C4 et des β -lipoprotéines peuvent être mis en évidence.

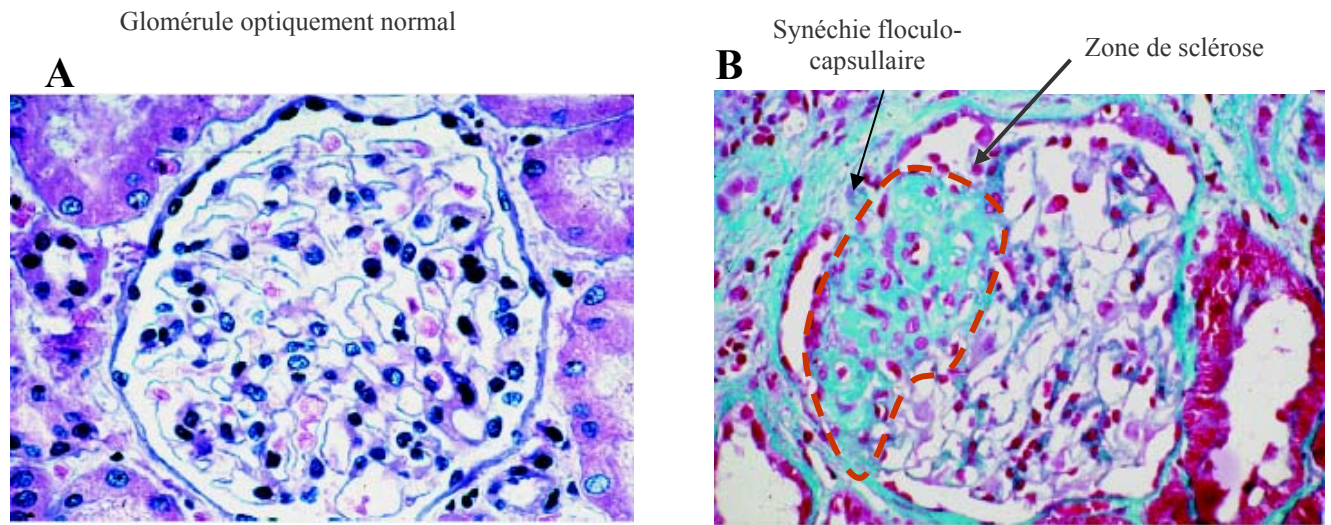


Figure 7 : Histologie en microscopie optique de glomérules présentant des lésions glomérulaires minimales (A) ou des lésions de hyalinose segmentaire et focale (B). D'après Eddy AA, Lancet, 2003.

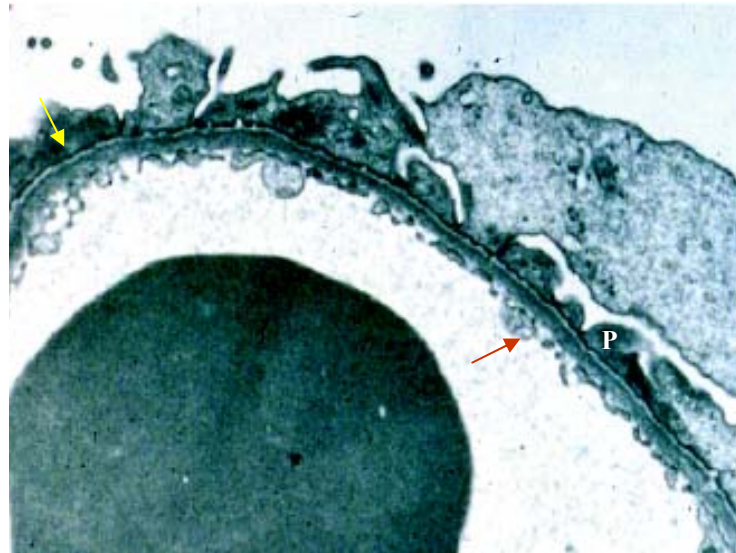


Figure 8: Représentation en microscopie électronique à transmission de la barrière de filtration glomérulaire d'un patient avec des lésions de LGM. Les pieds de podocytes (P) sont fusionnés (flèche jaune) et la fente de filtration est désorganisée (flèche rouge). D'après Eddy AA, Lancet, 2003.

B.3.3.2 Microscopie électronique

En microscopie électronique, la lésion initiale est un effacement diffus des pédicelles, analogue à celui observé au cours des lésions glomérulaires minimales. On peut observer ensuite un collapsus segmentaire d'anse capillaire avec repli de la membrane basale glomérulaire et inclusion de tissu amorphe et de gouttelettes électrodenses hyalines et lipidiques finement granulaires (Nagi et al. 1971; Hyman et al. 1973; Velosa et al. 1975). Des cellules spumeuses occupent volontiers la lumière des capillaires collabés. Dans ces cas, on observe une dégénérescence des podocytes, souvent avec détachement de la membrane basale sous-jacente ou une nécrose cellulaire (Churg et al. 1975). Des vacuoles lipidiques peuvent être observées, aussi bien au sein des dépôts anormaux que dans le cytoplasme des cellules endothéliales et mésangiales.

B.3.3.3 Variants histologiques

En plus des lésions segmentaires glomérulaires « classiques », d'autres observations histologiques ou variants ont pu être inclus dans le diagnostic de HSF primitive (Schwartz et al. 1993; Schwartz et al. 1995).

Certains patients avec un syndrome néphrotique et une HSF présentent une lésion segmentaire faisant face au pôle tubulaire, appelée « tip » lésion. Cette lésion pourrait identifier un sous-groupe de patients avec des caractéristiques cliniques, notamment une meilleure réponse aux stéroïdes (Stokes et al. 2004). Cette notion est cependant fortement controversée, car la 'tip' lésion s'observe dans d'autres atteintes glomérulaires avec lésions podocytaires (glomérulonéphrite extramembraneuse par exemple). Une autre variante histologique, décrite sous le nom de "collapsing focal glomerulosclerosis", avec sclérose et collapsus marqué de toutes les anses capillaires d'un même glomérule, souvent associée à des lésions tubulaires, serait fréquente au cours de la néphropathie due à l'infection par le VIH, ou encore dans les HSF idiopathiques cortico-résistantes (Weiss et al. 1986; Detwiler et al. 1994; Laurinavicius et al. 1999). La présence de lésions de « collapsing » évoque souvent un mauvais pronostic avec une progression rapide vers l'insuffisance rénale terminale (Grcevska et al. 1999).

B.4-Liens entre les lésions de LGM et de HSF

Le fait que des lésions de LGM puissent évoluer vers des lésions de HSF a fait l'objet d'un long débat. Ahmad et Tejani ont reporté, dans une étude effectuée sur 49 patients présentant des lésions initiales de LGM, que plus de 50% d'entre eux évoluaient vers des lésions de HSF dans une période d'étude de 10 ans (Ahmad et al. 2000). Cependant, la présence de lésions initiales de LGM ou de HSF est difficile à déterminer puisque peu d'enfants sont biopsiés avant le début de leur traitement par corticostéroïdes (Mallick 1991). Il a été suggéré que la présence continue d'une protéinurie pouvait contribuer à la transformation des lésions de LGM en HSF (Tanaka et al. 2000). Des études sur les syndromes néphrotiques congénitaux supportent l'hypothèse que ces deux lésions seraient les évolutions d'une même maladie, puisque les patients atteints d'une même anomalie génétique peuvent présenter aussi bien une LGM qu'une HSF (Karle et al. 2002). De même, les premières lésions observées suite à une récurrence après transplantation sont de type LGM et évoluent ensuite vers des lésions de HSF. Malgré cela, il n'a toujours pas été clairement démontré si les lésions de LGM et de HSF étaient étiologiquement liées.

C-Traitement du Syndrome Néphrotique Idiopathique

Les lésions glomérulaires minimales isolées sont caractérisées par une réponse favorable à la corticothérapie dans plus de 90% des cas, et un bon pronostic à long terme. A l'inverse, les patients chez lesquels la biopsie rénale objective des lésions de hyalinose segmentaire et focale sont fréquemment résistants à la corticothérapie.

C.1-Traitements de première intention

La corticothérapie ne doit pas débiter trop précocement dans la mesure où des rémissions spontanées peuvent survenir dans 5% des cas. La corticothérapie est débutée lorsque le diagnostic de néphrose idiopathique est très vraisemblable ou après que la biopsie rénale ait été effectuée. La prednisone est donnée à la dose initiale de 60 mg/m²/j pendant 30 jours. Généralement, la protéinurie disparaît entre le 8^{ème} et le 14^{ème} jour. Le traitement est poursuivi à la même dose en alternance un jour sur deux pendant un mois, puis la dose est diminuée de 15 mg/m² tous les 15 jours. La durée totale du traitement lors de la première poussée est ainsi de quatre mois et demi. Lorsque la durée du traitement de cette première poussée est plus courte, le

pourcentage de patients qui présentent une rechute est plus élevé (Brodehl 1991). Si la protéinurie persiste à la fin du premier mois de traitement, la corticothérapie doit être augmentée. Une persistance de la protéinurie à l'issue de ce traitement définit le syndrome néphrotique corticorésistant.

C.2-Syndrome Néphrotique Idiopathique corticosensible

Dans environ 90% des cas chez l'enfant, la néphrose idiopathique est corticosensible. Environ 30% des enfants présentent uniquement une poussée et sont ensuite définitivement guéris à la suite de la corticothérapie. Dix à 20% des enfants rechutent plusieurs mois après l'arrêt du traitement, mais la guérison survient en général après deux ou trois épisodes qui répondent à une cure standard de corticothérapie. Dans 40 à 50% des cas, les enfants présentent des rechutes fréquentes, dès que la corticothérapie est diminuée ou arrêtée. Si la cortico dépendance persiste, d'autres traitements doivent être envisagés. La Société Française de Néphrologie Pédiatrique recommande d'utiliser successivement :

☞ **Lévamisole** : le lévamisole est un immunostimulant qui utilisé à la dose de 2.5 mg/Kg un jour sur deux permet de diminuer les doses de corticoïdes et augmente le taux de rémission (Niaudet et al. 1984; Bagga et al. 1997; Davin et al. 2005). Malheureusement, les récurrences sont fréquentes trois mois après l'arrêt du traitement (1991). Le traitement est généralement bien toléré : les rares effets secondaires incluent une leucopénie, des éruptions cutanées et une toxicité hépatique (Bagga et al. 2000).

☞ **Les agents alkylants** : Le cyclophosphamide (Endoxan®) administré per os à la dose de 2 mg/kg/j pendant 12 semaines entraîne 66% de rémission à deux ans chez les sujets qui récidivent fréquemment, et 33% de rémission chez les sujets corticorésistants (Latta et al. 2001). Le chlorambucil donne des résultats similaires à la dose 0.2 mg/kg/j pendant 2 mois. Leur utilisation est limitée par leurs effets secondaires : toxicité médullaire, infections, rarement alopecie ou cystite hémorragique. Le risque gonadique est évité si la dose totale ne dépasse pas 200 mg/kg pour le cyclophosphamide et 10 mg/kg pour le chlorambucil. Le mechlorethamine (moutarde azotée) a pu être efficace dans certains cas (Broyer et al. 1985).

☞ **Les inhibiteurs de calcineurine** : La ciclosporine A (CsA) et le tacrolimus (FK506) agissent en inhibant la voie d'activation calcium-dépendante impliquée dans la transcription du gène de

l'IL-2. La ciclosporine A est apparue comme un médicament important pour traiter les rechutes fréquentes et les patients corticodépendants. Environ 80% d'entre eux répondent à la CsA (Niaudet et al. 1994; Eddy et al. 2003). Cependant, de nombreux patients nécessitent une faible dose de stéroïdes en plus de la CsA pour rester en rémission (Hulton et al. 1994). Les expériences avec le tacrolimus sur des patients présentant des rechutes fréquentes sont limitées. Les avantages potentiels du tacrolimus incluent peu d'effets secondaires d'ordre esthétique pour le patient ainsi qu'une réduction modeste de la néphrotoxicité, de l'hypertension et de l'hyperlipidémie.

Myophénolate Mofétil (MMF) : Ce médicament inhibe spécifiquement la prolifération des lymphocytes T et B en bloquant la synthèse de purines «de novo». L'action du MMF a été testée sur des patients présentant une grande corticodépendance et n'ayant pas répondu au lévamisole et aux agents alkylants. Le traitement avec le MMF à une dose de 25-30 mg/kg/j a montré une réduction significative du taux de rechutes (Day et al. 2002). Les effets secondaires sont faibles, mais l'arrêt du traitement entraîne la récurrence des rechutes (Bagga et al. 2003).

La liste ci-dessus n'est pas exhaustive mais reprend les principales drogues utilisées et leurs effets .

C.3-Syndrome Néphrotique Idiopathique corticorésistant

Il n'existe pas de consensus sur le traitement de la néphrose corticorésistante. Ces patients présentent de forts risques de complications ainsi qu'une évolution progressive vers l'insuffisance rénale terminale. De nombreux protocoles ont été essayés : les plus importants ainsi que leurs résultats sont répertoriés dans le tableau 2. Les corticoïdes à fortes doses, en particulier sous forme de bolus de méthylprednisone, associés ou non aux alkylants, ont pu donner plus de 50% de rémissions complètes et ont significativement diminué l'évolution vers l'insuffisance rénale chronique. Il semble également que ces formes corticorésistantes soient une bonne indication de la ciclosporine : administrée pendant un mois et associée à des doses modérées de corticoïdes prescrits pendant 5 mois supplémentaires, près de 50% des patients évoluent vers une rémission complète. D'autres études ont dénoté par ailleurs une rémission après traitement avec le tacrolimus chez des patients ne répondant pas à la ciclosporine (Loeffler et al. 2004; Tsugawa et al. 2004).

Tableau 2 : Résumé des essais cliniques sur les patients atteints de syndrome néphrotique corticorésistant.
 CP : Cyclophosphamide, CsA : Ciclosporine A, MP : méthylprednisone, iv : intraveineux, N : nombre de patients.

Etude	N	Traitement	Rémission
Abramovicz et al (1970)	31	Azathioprine et prednisolone vs. Prednisolone et placebo pendant 3 mois	Pas de rémission
Auteur inconnu (1974)	31	CP (<i>per os</i>) et prednisolone vs. prednisolone pendant 3 mois	Pas de rémission
Tarshish et al (1996)	60	CP (<i>per os</i>) et prednisolone vs. prednisolone pendant 12 mois	25% dans chaque groupe
Elhence et al (1994)	13	CP (<i>iv</i>) et prednisolone (gr.I) vs. CP (<i>per os</i>) et prednisolone (gr.II)	100% dans gr.I ; 25% gr.II
Ponticelli et al (1993)	20	CsA (gr.I) vs. traitement symptomatique (gr.II) pendant 6 mois	40% dans gr.I, 0% dans gr.II
Lieberman et al (1996)	31	CsA vs. placebo pendant 6 mois	33.3% dans le groupe CsA
Mantan et al (2004)	49	CP (<i>iv</i>) et prédnisolone (gr.I) vs. dexamethasone (<i>iv</i>) (gr.II)	53.8% dans le gr.I, 47.8% dans le gr.II
Niaudet et al (1994)	65	CsA et prednisolone pendant 6 mois	41.5%
Rennert et al (1999)	10	CP (<i>iv</i>) et prednisolone pendant 6 mois	70%
Tune et al (1995)	32	MP (<i>iv</i>), CP (<i>per os</i>) et prednisolone	60%
Adhikari et al (1997)	12	MP (<i>iv</i>), CP (<i>per os</i>) et prednisolone (gr.I) vs. CP (<i>iv</i>), MP (<i>iv</i>) et prednisolone (gr.II)	85.7% dans gr.I et 40% dans gr.II
Hari et al (2001)	65	MP ou dexamethasone (<i>iv</i>), CP (<i>per os</i>) et prednisolone pendant 52 semaines	65%
Hari et al (2004)	81	Dexamethasone (<i>iv</i>) vs. MP (<i>iv</i>) [CP (<i>per os</i>) et prednisolone dans les 2 groupes]	35.1% dans le gr.I et 33.1% dans le gr.II
Gulati et Kher (2000)	20	CP (<i>iv</i>) et prednisolone pendant 6 mois	65%
Bajpai et al (2003)	24	CP (<i>iv</i>) et prednisolone pendant 6 mois	29%

D-La Récidive du Syndrome Néphrotique Idiopathique après transplantation rénale

D.1-Définition

Cette définition doit être clairement établie car il est rétrospectivement observé de grandes variations dans les critères pris en compte pour le diagnostic de récurrence. La récurrence est suspectée en présence d'une protéinurie importante ($\geq 1\text{g}/24\text{h}$ chez l'adulte (Dantal et al. 1991; Kim et al. 1994) ou $\geq 50\text{ mg/kg/j}$ chez l'enfant (Cochat et al. 1993), en général d'apparition rapide après la transplantation, accompagnée ou non d'un syndrome néphrotique. La récurrence est ensuite confirmée sur des bases histologiques avec la mise en évidence sur le greffon rénal de lésions glomérulaires compatibles avec un syndrome néphrotique idiopathique. Cependant, la démonstration pour affirmer la récurrence de HSF n'est pas obligatoire (Verani et al. 1986; Korbet et al. 1988; Morales et al. 1988). En effet, la ou les biopsies précoces ne retrouvent pas les lésions de HSF qui apparaissent après un délai variable (de quelques semaines à quelques années). Le détachement des cellules épithéliales qui peut être observé précocement a aussi été proposé comme une des toutes premières lésions caractéristiques de HSF (Verani et al. 1986).

Une classification de la récurrence en fonction de son délai d'apparition a également été proposée (Cameron et al. 1989):

- ⊗ **Récurrence immédiate** dans les 48h suivant la transplantation et/ou la reprise de la diurèse
- ⊗ **Récurrence précoce** dans les 3 premiers mois
- ⊗ **Récurrence tardive** après 3 mois.

La récurrence « classique » est dans 90% des cas immédiate ou précoce.

D.2-Incidence et évolution

La récurrence de syndrome néphrotique après transplantation a été décrite pour la première fois par Hoyer en 1972 (Hoyer et al. 1972). Le taux de récurrence varie en fonction des différentes séries et se situe en général autour de 20-30% pour une première transplantation, avec des extrêmes allant de 5.6% à 75% (Hoyer et al. 1972; Dantal et al. 1996; Hariharan et al. 1998; Wuhl et al. 1998; Choi et al. 2001; Yakupoglu et al. 2004). Une récurrence sur le premier greffon se reproduit généralement sur la deuxième greffe (75 à 80%) (Cameron 1991; Stephanian et al. 1992; Ramos et al. 1994). Cependant, certains succès de retransplantation ont été obtenus après un long délai d'attente en hémodialyse (Hosenpud et al. 1985; Cameron et al. 1989).

L'évolution après récurrence est très variable mais malgré les quelques rares cas de rémission spontanée (Striegel et al. 1986; Franco et al. 1987; Stephanian et al. 1992), 50 % environ des récurrences vont entraîner l'échec de la transplantation (Habib et al. 1987; Cameron 1991; Dantal et al. 1991). La reprise de fonction du greffon est généralement retardée et ce quelle que soit l'origine du greffon (donneur cadavérique ou vivant) (Kim et al. 1994). Une étude rapporte également que les patients récidivant présenteraient plus de rejets aigus (Kim et al. 1994), observation qui n'est pas systématiquement retrouvée (Dantal et al. 1996).

D.3-Facteurs de risques de la récurrence

Il n'existe pas de tests prédictifs de la récurrence à ce jour mais plusieurs observations cliniques permettent de distinguer des populations à plus haut risque.

L'âge de début de la maladie est un facteur important en pédiatrie, bien que plusieurs différences soient retrouvées en fonction des études. Globalement, le risque de récurrence est plus élevé chez les enfants dont la maladie initiale s'est déclarée entre l'âge de 6 et 15 ans et oscille entre 40 et 53% (Cheigh et al. 1983; Habib et al. 1987; Senggutuvan et al. 1990; Cameron 1991; Ingulli et al. 1991; Cameron 1993). Chez l'adulte, la récurrence est possible quel que soit l'âge d'installation de la maladie initiale (Dantal et al. 1991; Artero et al. 1992).

L'intervalle de temps séparant le début du syndrome néphrotique et la transplantation n'est pas différent entre les groupes avec et sans récurrence (Artero et al. 1992). En revanche, la rapidité d'évolution de la maladie initiale, de son début apparent jusqu'à l'insuffisance rénale terminale nécessitant la dialyse, est plus courte en cas de récurrence (Leumann et al. 1980; Lewis 1982; Habib et al. 1987; Dantal et al. 1991; Artero et al. 1992; Cheong et al. 2000). Le seuil de trois années est fréquemment cité mais cette notion ne fait pas l'unanimité (Maizel et al. 1981; Cameron 1991).

Toutes les formes histologiques regroupées sous le nom de syndrome néphrotique idiopathique sont susceptibles de récidiver sur les greffons. Cependant, la présence d'une prolifération diffuse sur les biopsies des reins propres est reconnue comme l'un des éléments prédictifs le plus important (Maizel et al. 1981; Lewis 1982; Habib et al. 1987; Cameron et al. 1989; Conlon et al. 1999). Chez l'enfant, le taux de récurrence varie de 20% en l'absence de prolifération à 80% en présence d'une prolifération mésangiale diffuse (Striegel et al. 1986). D'autres paramètres tels que l'âge du donneur, le sexe, la provenance ethnique, le temps d'ischémie froide, la présence de diabète ou les incompatibilités HLA, le délai d'attente en

hémodialyse n'interviennent pas dans l'incidence de la récurrence (Dantal et al. 1991; Cosio et al. 1999).

En résumé, une maladie initiale déclarée avant 15 ans, une progression rapide vers l'insuffisance rénale terminale (< 3 ans) et la présence d'une prolifération mésangiale diffuse sur la biopsie native sont considérés comme des facteurs prédictifs de la récurrence.

D.4-Les traitements de la récurrence

En règle générale, les récurrences observées après transplantation sont résistantes aux corticoïdes et au cyclophosphamide (Pinto et al. 1981), bien que quelques cas de rémission aient été décrits après l'utilisation de bolus de méthylprédnisone chez l'enfant (Mauer et al. 1979). J'évoquerai dans ce paragraphe les principaux outils thérapeutiques utilisés pour traiter ou contenir la progression de la récurrence.

D.4.1 La ciclosporine A

L'introduction de la ciclosporine A n'a pas modifié le taux de récurrence en comparaison avec le traitement conventionnel associant corticostéroïdes et azathioprine (Pirson et al. 1986; Voets et al. 1986; Tomlanovich et al. 1988; Vincenti et al. 1989; Banfi et al. 1990; Schwarz et al. 1991). Néanmoins, il n'est pas exclu qu'elle puisse moduler la sévérité de celle-ci comme le suggèrent les quelques cas de rémissions rapportés après traitement à la ciclosporine A (Habib et al. 1987; Morales et al. 1989; Green et al. 1990; Cattran et al. 1999). Plusieurs auteurs ont rapporté un contrôle de la protéinurie chez des enfants transplantés avec une récurrence de HSF présumée grâce à la prise per os de ciclosporine (Ingulli et al. 1991; Srivastava et al. 1994; Raafat et al. 2004). Dans ces études, le nombre de patients était limité, les doses de ciclosporine très fluctuantes (allant de 15 à 35 mg/kg/j) et la période de suivi assez courte. Une administration précoce en i.v de la ciclosporine après récurrence sur le transplant a également été proposée en pédiatrie: les résultats sont encourageants puisqu'une baisse importante de la protéinurie a été observée chez 82% des enfants traités (Salomon et al. 2003). Cependant, l'utilisation de cette stratégie ne s'est pas avérée totalement satisfaisante chez l'adulte (Ranchin et al. 1996).

D.4.2 Les autres drogues

Tacrolimus : Le remplacement de la ciclosporine par le tacrolimus chez des patients présentant une récurrence immédiate de syndrome néphrotique n'a pas abouti à des résultats très concluants (McCauley et al. 1993). Il a même été rapporté dans une étude chez un adulte présentant une récurrence tardive que la ciclosporine A était plus efficace que le tacrolimus (Kessler et al. 1999). Néanmoins, cette observation ne fait pas l'unanimité puisqu'une étude récente effectuée chez l'enfant démontre l'effet inverse (Tsugawa et al. 2004).

Anti-inflammatoires non stéroïdiens : Plusieurs études anciennes ont démontré que l'indométhacine (Kooijmans-Coutinho et al. 1993) et le méclofénamate (Torres et al. 1984) entraînaient une chute importante et durable de la protéinurie, sans altération de la fonction rénale. Malheureusement, ces observations n'ont pu être reproduites par d'autres équipes (Cameron 1991).

Inhibiteurs de l'enzyme de conversion : Les résultats concernant l'effet des inhibiteurs de l'enzyme de conversion sur la récurrence du SNI après transplantation se sont avérés assez décevants. En effet, sur neuf patients traités, seulement un a présenté une baisse significative de sa protéinurie (Artero et al. 1992). Cependant, l'utilisation de l'inhibiteur de l'enzyme de conversion constitue un traitement de base.

D.4.3 Les traitements du plasma

Etant donné la rapidité de la récurrence de HSF après transplantation rénale, la présence de facteur(s) plasmatique(s) capables d'altérer le greffon a été suggérée. Ainsi, plusieurs traitements visant à diluer ou ôter ce facteur du sérum des patients récidivants ont été testés.

D.4.3.1 Les échanges plasmatiques

L'échange plasmatique consiste en l'élimination d'une quantité importante de plasma remplacée de façon concomitante par des solutions de substitution de nature colloïdale. L'extraction du plasma fait appel à deux principes différents, l'un basé sur une centrifugation du sang qui peut être continue ou discontinue, l'autre sur une filtration à travers une membrane microporeuse. Le plasma extrait est remplacé par des fluides de substitution et le plasma du patient est éliminé.

Des séries d'échanges plasmatiques ont été réalisées précocement après le diagnostic de récurrence et ont entraîné une diminution importante de la protéinurie, voire une rémission

(Dantal et al. 1991; Artero et al. 1994; Torretta et al. 1995). Les facteurs d'échec des échanges plasmatiques sont la présence de lésions de HSF sur le transplant et une prise en charge tardive. L'administration simultanée de doses importantes de cyclosporine A (Mowry et al. 1993), de bolus de corticoïdes et/ou de cyclophosphamide (Cheong et al. 2000), d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion (Rodicio et al. 1990) ou d'indométacine (Kooijmans-Coutinho et al. 1993) améliorerait l'efficacité des échanges plasmatiques en prolongeant l'effet sur la protéinurie (Cochat et al. 1993; Cochat et al. 1996). Toutefois, ces effets restent transitoires, la protéinurie revenant à son niveau pré-traitement dans des délais variables (Laufer et al. 1988; Cochat et al. 1993).

D.4.3.2 Les colonnes d'immunoabsorption

L'immunoabsorption sur colonne de protéine A permet l'élimination sélective des immunoglobulines G de sous classes 1, 2, et 4 et dans une moindre mesure les IgG3, IgM et IgA (Langone 1982). Plusieurs études ayant décrit des anomalies de répartition des immunoglobulines dans les phases actives de SNI (détaillées dans le chapitre E.3.2), un protocole d'immunoabsorption sur protéine A a été mis en place en vue de traiter précocement la récurrence de HSF (Dantal et al. 1994; Belson et al. 2001). Les résultats se sont avérés très encourageants puisque pour la première étude, sur dix patients, huit ont vu leur protéinurie chuter de 80%, un est entré en rémission complète et le dernier a récidivé immédiatement. Malheureusement, cet effet bénéfique est transitoire puisque la protéinurie retrouve son niveau initial 28 jours après l'arrêt du traitement.

Devant ces résultats positifs, d'autres supports ont été utilisés tels que les colonnes d'affinité anti Ig humaines (thérasorb) (Dantal et al. 1998), ou plus récemment les colonnes d'affinité au tryptophane (Bussemaker et al. 2001), cette dernière ayant entraîné une baisse importante de la protéinurie chez le patient traité. Cependant, l'effet spécifique de la colonne de protéine A sur la récurrence de HSF est remis en cause puisque cette approche est également capable de réduire la protéinurie dans les SN d'origines différentes (Esnault et al. 1999).

E-Hypothèses étiologiques du syndrome néphrotique idiopathique

La recherche des mécanismes à l'origine du syndrome néphrotique idiopathique ont fait l'objet d'un travail de longue haleine. Toute la difficulté de l'étude repose sur la grande hétérogénéité de ce syndrome. En effet, comme nous l'avons vu lors de la présentation du SNI,

des patients présentant les mêmes symptômes ne réagiront pas de la même façon aux traitements et à la transplantation. Bien qu'à ce jour, aucun facteur ni aucun mécanisme n'aient pu véritablement être validés, l'implication d'un ou plusieurs facteurs circulants ainsi que celui du système immunitaire semble indéniable. De plus, le rôle cible du podocyte a également été mis en évidence grâce à la description de mutations de protéines podocytaires dans les formes génétiques. Au cours de ce chapitre, je détaillerai les différents acteurs potentiels impliqués, de près ou de loin, dans l'apparition et/ou la progression du SNI.

E.1-Anomalies génétiques dans le syndrome néphrotique idiopathique

L'approche génétique des formes familiales de HSF a permis une avancée décisive dans la compréhension de certains mécanismes moléculaires qui régissent le fonctionnement de la barrière de filtration glomérulaire. Bien que les SNI ne soient habituellement pas considérés comme des maladies héréditaires, les composantes génétiques impliquées dans leur pathogénie sont indiscutables : des formes familiales, bien que rares, ont été rapportées à la fois dans les formes corticorésistantes et plus rarement dans les formes corticosensibles (Fuchshuber et al. 2001). Des études génétiques récentes chez l'homme ont permis d'identifier différents gènes impliqués dans les formes héréditaires de syndromes néphrotiques corticorésistants et codant pour des protéines podocytaires (tableau 3).

E.1.1 Anomalies impliquant des gènes de structure

E.1.1.1 La néphrine

Le gène NPHS1 est localisé sur le chromosome 19q13 et constitue le premier gène décrit associé au syndrome néphrotique humain (Kestila et al. 1998). Ce gène code pour la néphrine, protéine transmembranaire de 136 kDa de la super-famille des immunoglobulines, exprimée spécifiquement dans le podocyte. Cette protéine est par ailleurs un composant majeur du diaphragme de fente (figure 8) qui permet de relier les pieds des podocytes le long de la membrane basale glomérulaire (Ruotsalainen et al. 1999). En effet, il est proposé que les molécules de néphrine adjacentes sont capables d'interagir les unes avec les autres grâce à une dimérisation homophile et de former une structure en « fermeture éclair », visible en microscopie électronique (Kestila et al. 1998). Les molécules de néphrine peuvent également interagir avec d'autres molécules du diaphragme de fente, telles que la podocine. Récemment,

trois protéines homologues à la néphrine, Neph1, Neph2 et Neph3, ont été identifiées chez le rongeur (Donoviel et al. 2001; Sellin et al. 2003).

Des mutations de la néphrine ont été décrites chez les patients atteints de syndrome congénital finlandais (Kestila et al. 1998). Cette forme de syndrome néphrotique se caractérise par une apparition très rapide des premiers symptômes, généralement chez le nouveau-né, ainsi qu'une progression rapide vers l'insuffisance rénale. Les recherches de mutations dans le gène *NPHS1* ont montré qu'à côté de deux mutations habituellement rencontrées en Finlande (*Fin_{major}* et *Fin_{minor}*), de nombreuses autres mutations réparties sur l'ensemble du gène peuvent aussi provoquer un SN congénital. Il a également été montré que certaines mutations peuvent être à l'origine de formes moins sévères de la maladie (Koziell et al. 2002). Ces différences de phénotype peuvent être partiellement expliquées par des variations d'adressage de la protéine mutée, comme l'a montré l'équipe de K. Tryggvason dans un modèle cellulaire (Liu et al. 2001; Nishibori et al. 2004). Un traitement par le 4-phénylbutyrate a permis de réorienter certaines de ces protéines mutées vers la membrane plasmique, fournissant une base rationnelle pour la recherche de nouveaux traitements (Liu et al. 2004). De rares cas de récurrence après transplantation rénale ont été rapportés, et ces récurrences ont pu être expliquées par la présence d'anticorps anti-néphrine dans le sérum du receveur (Wang et al. 2001; Patrakka et al. 2002).

E.1.1.2 La podocine

L'équipe de C. Antignac a localisé puis identifié par clonage positionnel le gène *NPHS2* sur le chromosome 1q25-q31, impliqué dans une entité particulière de syndrome néphrotique corticorésistant de transmission autosomique récessive (Fuchshuber et al. 1995). Ce gène code pour une protéine de 42 kDa, nommée podocine, exclusivement exprimée dans les podocytes (Boute et al. 2000), au niveau du diaphragme de fente (Roselli et al. 2002; Ruf et al. 2004). Cette protéine fait partie de la famille des stomatines et possède une structure originale en épingle à cheveux : son domaine central est ancré dans la membrane plasmique alors que ses extrémités amino et carboxy terminales sont situées dans le cytoplasme (Roselli et al. 2002).

La podocine est un composant de la membrane basale glomérulaire associé au raft lipidique et localisé au niveau du diaphragme de fente (Huber et al. 2003)(figure 9). Elle joue un rôle essentiel dans le transport de la néphrine à la membrane ainsi que dans la signalisation intracellulaire du podocyte. Les souris *knock-out* pour la podocine développent des lésions podocytaires et une protéinurie avant la naissance puis meurent d'urémie après quelque jours de vie (Roselli et al. 2004).

Depuis son identification, de nombreuses études ont montré que des mutations dans ce gène pouvaient être retrouvées dans 10 à 20% des formes sporadiques de l'enfant (Karle et al. 2002; Maruyama et al. 2003; Yu et al. 2005). Des mutations du gène *NPHS2* ont également été décrites chez l'adulte mais, dans la plupart des cas, les patients sont hétérozygotes composites pour une mutation sévère et pour un polymorphisme (R229Q) retrouvé à l'état hétérozygote dans 4% de la population générale (Tsukaguchi et al. 2002). Comme pour la néphrine, il a été montré que des formes mutées de la podocine ne sont pas adressées à la membrane plasmique et restent bloquées dans le réticulum endoplasmique (Nishibori et al. 2004). Les patients présentant une mutation du gène *NPHS2* déclarent la maladie très tôt dans l'enfance, et évoluent rapidement vers l'insuffisance rénale. La maladie ne récidive après transplantation que dans très peu de cas (Weber et al. 2004).

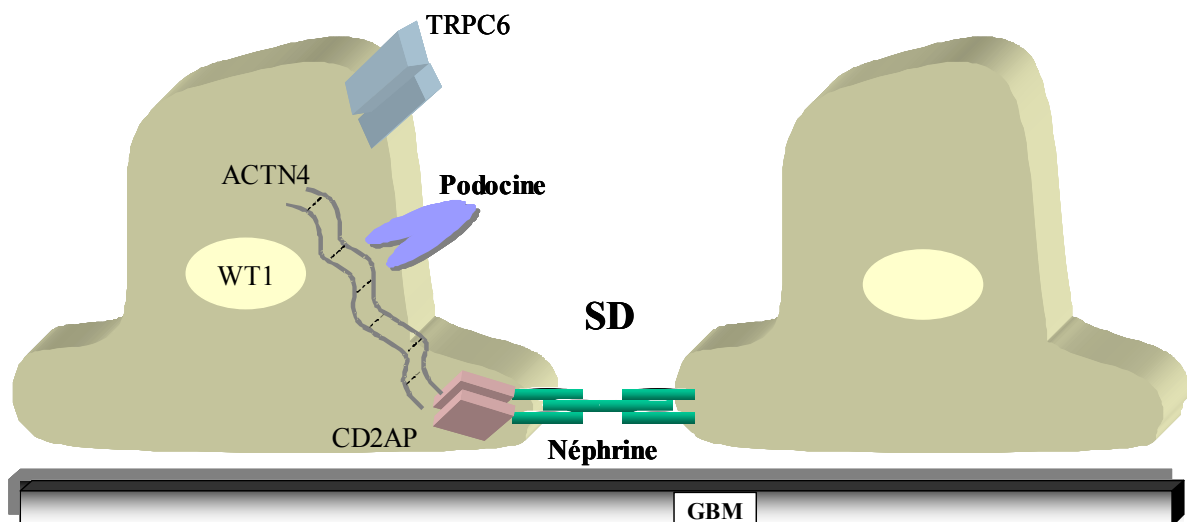


Figure 9 : Principaux composants podocytaires associés à un syndrome néphrotique chez l'homme.
SD : diaphragme de fente, GBM : Membrane basale glomérulaire

E.1.1.3 La CD2AP

La CD2 associated protein (CD2AP) a été tout d'abord décrite comme une protéine capable de s'associer au domaine cytoplasmique du récepteur CD2 et de faciliter ainsi la liaison des cellules T aux cellules présentatrices d'antigène (Dustin et al. 1998). Cette protéine de 80 kDa est également exprimée dans les podocytes, les cellules du tube collecteur et dans les cellules des tubules proximaux (Li et al. 2000). C'est donc logiquement que les souris knock-out pour le gène *CD2AP* développent un syndrome néphrotique précoce, évoluent rapidement vers

l'insuffisance rénale terminale et décèdent vers l'âge de 6-7 mois (Shih et al. 1999). Cette léthalité précoce peut être palliée si l'expression de CD2AP est restaurée dans les podocytes à l'aide d'un transgène (Grunkemeyer et al. 2005). Une co-immunoprécipitation de CD2AP avec une protéine de fusion codant pour la néphrine a permis de mettre en évidence une association de ces deux protéines au sein du diaphragme de fente (Shih et al. 1999). Plus récemment, les mêmes auteurs ont montré que les souris haplo-insuffisantes pour CD2AP développaient des lésions glomérulaires minimales à partir de 9 mois et présentaient une susceptibilité accrue au stress glomérulaire (Kim et al. 2003). En parallèle, ils ont montré que deux patients présentant une hyalinose segmentaire et focale idiopathique avaient une mutation dans un site consensus d'épissage du gène *CD2AP* à l'état hétérozygote. Cependant, ces résultats doivent être confirmés chez l'homme puisqu'à ce jour, aucun autre cas n'a été décrit dans la littérature.

E.1.1.4 L' α -actinine 4

Deux gènes ont pu être localisés dans le cadre de formes autosomiques dominantes de « hyalinose segmentaire et focale primitive » : l'un en 19q13 et l'autre en 11q21-22 (Smoyer et al. 1997; Kaplan et al. 2000). L' α -actinine 4, qui joue un rôle important dans la fonction du cytosquelette non musculaire, a été décrite comme augmentée précocément dans certains modèles animaux de syndrome néphrotique (Kos et al. 2003). L'identification de mutations de l' α -actinine 4 chez des patients ayant une forme autosomale dominante de HSF a permis de mettre en évidence l'importance du cytosquelette dans les fonctions glomérulaires (Kaplan et al. 2000). D'autres mutations sur le même gène ont depuis été décrites chez l'homme, en particulier des mutations non sens. Ces mutations sont responsables d'une plus grande avidité de l' α -actinine 4 avec l'actine F, suggérant que les caractéristiques mécaniques des podocytes sont altérées dans ce cas (Smoyer et al. 1997).

La protéine « normale » est exprimée largement chez l'homme de façon ubiquitaire et en particulier dans le podocyte glomérulaire mais le fait que la maladie se déclare uniquement dans le glomérule reste obscure. Cette observation est retrouvée chez l'animal, et ce aussi bien pour des souris *knock-out* (Kos et al. 2003) que pour des souris surexprimant une forme mutée de l' α -actinine 4 (Michaud et al. 2003), suggérant un polymorphisme important de cette protéine lié aux lésions de hyalinose segmentaire et focale. Cependant à ce jour, tout comme CD2AP, peu de formes familiales se sont avérées liées à une mutation de cette protéine (Aucella et al. 2005; Sako et al. 2005).

E.1.1.5 Transient Receptor Potential 6 (TRCP6)

Le gène TRCP6 est localisé sur le chromosome 11q24 et a récemment été associé avec le syndrome néphrotique chez l'homme (Reiser et al. 2005). Ce canal ionique est exprimé dans les podocytes et est constitutif du diaphragme de fente (Freichel et al. 2004). TRCP6 est un membre de la superfamille des canaux ioniques cation sélectif. La sous famille des TRCP (TRCP1-7) est un groupe de canaux cationiques perméables au calcium, indispensables pour l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium après l'engagement des récepteurs couplés à la protéine G ainsi que des récepteurs tyrosine kinases. Récemment, des mutations de ce gène ont été rapportées dans une famille atteinte d'une forme autosomale dominante de SNI/HSF en Nouvelle Zélande (Reiser et al. 2005). Les différents variants décrits semblent tous associés à une augmentation importante de la voie calcique in vitro (Freichel et al. 2004). Ainsi, une régulation cellulaire complexe de l'homéostasie calcique par TRCP6 semble indispensable pour le bon fonctionnement du podocyte, et les mutations de ce gène pourraient entraîner des modifications de l'état protéinurique.

E.1.1.6 Autres

L'invalidation chez la souris des gènes codant pour la protéine NEPH1 (Donoviel et al. 2001), protéine ayant des homologies de séquence avec la néphrine et exprimée dans le podocyte, et pour FAT1 (Ciani et al. 2003), protocadhérine géante localisée au niveau du diaphragme de fente, provoque aussi la survenue d'un syndrome néphrotique chez la souris. De même, les souris déficientes pour la podocalyxine (Doyonnas et al. 2001) ou pour la tyrosine phosphatase GLEPP-1 (Wharram et al. 2000) présentent de sévères anomalies de leur structure podocytaire. Cependant aucune mutation d'homologues humains de ces gènes n'a été décrite chez l'homme.

E.1.2 Anomalies impliquant des facteurs de transcription

E.1.2.1 Le gène WT1

Le gène de la tumeur de Wilms (WT1) est localisé sur le chromosome 11p13 et a été découvert et identifié à l'origine comme un gène suppresseur de tumeur inactivé dans un type de tumeur de Wilms (Orloff et al. 2005). WT1 possède plusieurs isoformes, dont quatre principaux, produits grâce à l'utilisation de deux sites d'épissage alternatif. De plus, les modifications post-

transcriptionnelles peuvent amener le nombre d'isoformes protéiques de WT1 à au moins 24 (Pelletier et al. 1991). WT1 est exprimé dans les podocytes et est nécessaire à leur bon fonctionnement puisqu'il intervient dans la régulation de la synthèse de la néphrine (Wagner et al. 2004). Les mutations de WT1 sont principalement observées dans les cas sporadiques de tumeurs de Wilms et sont fréquemment associées aux syndromes de Frasier et de Denys-Drash (Barboux et al. 1997; Guo et al. 2002; Patek et al. 2003). Ces deux syndromes sont caractérisés par un dysfonctionnement gonadique et une néphropathie progressive avec lésions de HSF ou une sclérose mésangiale diffuse apparaissant très tôt chez l'enfant.

Le gène PAX2 code pour un facteur de transcription exprimé précocément durant le développement et est un gène cible de WT1. L'expression de PAX2 est diminuée quand celle de WT1 est augmentée dans les glomérules matures. Les souris déficientes pour PAX2 mais aussi pour WT1 ne développent pas de reins, attestant de l'importance de ces facteurs de transcription dans le développement métanéphrique. Par ailleurs, la surexpression de PAX2 génère de nombreuses anomalies rénales (Dressler et al. 1993).

E.1.2.2 Le gène SMARCAL1

Le gène SMARCAL1 est localisé sur le chromosome 2q34-36 et les transcrits de ce gène sont exprimés de façon ubiquitaire dans tous les tissus chez l'homme (Coleman et al. 2000). Des mutations du gène SMARCAL1 sont responsables du syndrome de Schimke qui associe au syndrome néphrotique une dysplasie spondylo-épiphysaire, un déficit immunitaire et des accidents vasculaires cérébraux (Boerkoel et al. 2002). Le gène SMARCAL1 code pour une protéine de la famille SNF2, impliquée dans le remaniement de la chromatine survenant lors de la réplication de l'ADN et la régulation de l'expression des gènes (Coleman et al. 2000). Une hypothèse séduisante pour expliquer l'atteinte rénale dans le syndrome de Schimke est donc l'implication de SMARCAL1 dans la régulation de l'expression de protéines podocytaires.

Tableau 3 : Principaux gènes associés au syndrome néphrotique idiopathique chez l'Homme

Gène	Symbole	Chromosome	Transmission	Pathologie	Fonctions
Néphrine	NPHS1	19q13	Autosomale récessive	SN congénital finlandais, HSF	-Localisée au niveau du SD -interagit avec CD2AP et podocine -rôle dans la signalisation intracellulaire
Podocine	NPHS2	1q25		SN précoce, HSF	-Co-localise avec la néphrine -interagit avec CD2AP et la néphrine -rôle dans la signalisation intracellulaire
SMARCAL1		2q34-36		Syndrome de Schimke associé à un SN/ HSF	-protéine nucléaire (SNF2) -rôle dans le remaniement de la chromatine
α-actinine IV	ACTN4	19q13	Autosomale dominante	SN précoce	-se lie au cytosquelette d'actine -rôle dans la mobilité cellulaire
TRPC6	TRPC6	11q21		SN avec lésions de HSF	-canal ionique constitutif du SD -rôle dans les variations de la concentration calcique dans les podocytes
WT1	WT1	11p13		Syndromes de Denys Drash et Frasier	-Facteur de transcription
CD2AP	CD2AP	6p12	???	SN avec lésions HSF	-interagit avec la néphrine et la podocine -se lie au cytosquelette d'actine

E.1.2.3 Le gène LMX1B

Des mutations dans l'homéodomaine riche en cystéine LIM du facteur de transcription LMX1B provoque le syndrome de nail-patella, une maladie autosomale dominante, qui se traduit par des anomalies squelettiques, une hypoplasie des ongles et une néphropathie (Morello et al. 2002). Les podocytes de souris LMX1B^{-/-} ont un nombre réduit de prolongements, sont dysplastiques, et présentent un diaphragme de fente atypique, indiquant une anomalie de développement. Cependant, ces podocytes expriment des niveaux normaux de néphrine, synaptopodine, ZO-1, α -intégrine et laminines au niveau de la membrane basale glomérulaire

(Hamano et al. 2002; Miner et al. 2002; Rohr et al. 2002). Plusieurs sites d'accrochage de LMX1B sur les régions régulatrices supposées de CD2AP et de la podocine ont été identifiés. De plus, des expériences *in vitro* de cotransfection ont démontré que LMX1B s'accrochent à ces régions et peut activer la transcription des protéines du diaphragme de fente. Ainsi, LMX1B régule l'expression de plusieurs gènes podocytaires essentiels pour la différenciation et la fonction des podocytes. Ces résultats indiquent que la baisse d'expression de plusieurs protéines podocytaires spécifiques pourraient contribuer au syndrome de nail-patella associant une néphropathie.

E.1.2.4 Autres

Pod1 est un facteur de transcription « hélice-boucle-hélice » qui est fortement exprimé dans le mésenchyme des tissus en développement tels que le cœur, les poumons, les intestins et les podocytes (Quaggin 2002). Les souris déficientes en Pod1 ne parviennent pas à développer des glomérules matures, et le développement podocytaire semble arrêter à l'étape du corps en S (Quaggin et al. 1999). Récemment, 3896 gènes exprimés différemment chez des souris *knock out* pour Pod1 par rapport à des souris sauvages ont été identifiés, dont l' $\alpha 8$ intégrine (Cui et al. 2005).

Il a été montré que le gène murin de segmentation *kreisler* était nécessaire dans la différenciation podocytaire (Sadl et al. 2002). Contrairement à LMXB1 et à Pod1, *kreisler* semble être impliqué dans les phases terminales de la différenciation des podocytes, incluant l'élaboration de l'architecture des prolongements cytoplasmiques (Sadl et al. 2002). Suite à ces observations, il serait intéressant de déterminer si une baisse de l'expression de *kreisler* est responsable de l'effacement des pieds podocytaires.

E.2-Implication d'un ou plusieurs facteur(s) circulant(s)

Parallèlement aux formes génétiques se situent les formes corticosensibles et celles récidivant après transplantation, suggérant d'une part un rôle des lymphocytes T et d'autre part celui d'un ou plusieurs facteur(s) circulant(s) dans l'initiation et/ou la progression de la maladie. Au cours de ce chapitre, je décrirais les observations cliniques, les expériences *in vivo* et *in vitro* qui ont permis d'étayer cette hypothèse et d'en faire le principal axe de recherche et enfin les tentatives de caractérisation biochimique des facteurs circulants dans le SNI/LGM et HSF.

Les difficultés à caractériser ce facteur démontrent la complexité d'un tel processus et l'implication plus que probable de plusieurs acteurs.

E.2.1 Observations cliniques

Hoyer et al. fut le premier à évoquer la présence d'un facteur circulant après avoir observé qu'une protéinurie pouvait récidiver immédiatement après transplantation d'un rein normal chez un receveur ayant présenté des lésions de HSF (Hoyer et al. 1972). A l'inverse, la transplantation de reins issus d'un donneur présentant un SNI avec lésions de LGM ou de HSF chez un patient dont l'atteinte rénale n'était pas due à un syndrome néphrotique entraîne la disparition de la protéinurie (Ali et al. 1994; Rea et al. 2001). Ces dernières observations démontrent bien la présence d'un ou plusieurs facteur(s) de perméabilité sérique(s) spécifiquement chez les patients atteints de SNI, et excluent l'hypothèse d'un facteur intra-rénal. D'autres travaux, bien qu'anecdotiques, ont également rapporté la transmission de la protéinurie d'une mère atteinte de SNI/HSF à son fœtus durant la gestation (Lagrue et al. 1991; Kemper et al. 2001). La protéinurie de l'enfant disparaît quelques semaines après la naissance, suggérant que l'atteinte rénale observée chez celui-ci est due à un facteur présent dans la circulation de la mère, et qui plus est, capable de traverser la barrière placentaire.

Enfin, comme je l'ai évoqué dans la partie se rapportant aux traitements de la récurrence, les traitements du plasma ont un effet bénéfique mais transitoire sur la protéinurie des patients (Artero et al. 1994; Dantal et al. 1998; Andresdottir et al. 1999; Bussemaker et al. 2001). Cette chute de la protéinurie est probablement due à l'épuration du facteur de perméabilité du plasma des patients et/ou à sa dilution. La réapparition rapide de la protéinurie après l'arrêt des échanges suggère la synthèse du facteur en continu, malgré les traitements immunosuppresseurs.

E.2.2 Facteurs dans le SNI corticosensible

En 1985, Levin et al. ont proposé que les patients ayant un SN corticosensible présentaient une désorganisation générale des charges négatives de la membrane due à une protéine circulante cationique (Levin et al. 1985). En effet, les charges négatives seraient neutralisées par le facteur cationique au niveau de la membrane basale glomérulaire, entraînant alors une fuite de protéines plasmatiques dans l'urine. Cette hypothèse est en accord avec d'autres travaux qui ont décrit une baisse des charges négatives au niveau de la MBG dans le SNI/LGM (Guasch et al. 1993). Expérimentalement, l'équipe de Levin a montré que le bleu

Alcian (colorant cationique) se fixait en moindre quantité à la surface des globules rouges de patients présentant une rechute de leur SNI/LGM en comparaison des mêmes patients en rémission et de patients atteints d'une autre maladie rénale non associée au SNI. Une protéine cationique a même pu être isolée à partir des sérums et des urines de patients SNI/LGM en poussée (Levin et al. 1989). Cependant, ces travaux sont restés sans suite puisque aucun transfert chez l'animal ni aucune caractérisation biochimique n'ont été effectués. D'autres équipes ont tenté de reproduire ces expériences et ont obtenu des résultats assez disparates (Murugasu et al. 1990). Il a même été démontré que les résultats obtenus étaient dus à un effet non spécifique inhérent au syndrome néphrotique (Ramjee et al. 1996; Klingler et al. 1997).

Une autre hypothèse émise par Lagrue et al. (Lagrue et al. 1975; Lagrue et al. 1975), se basant sur des travaux antérieurs de Pick (Pick et al. 1969), consiste en l'existence d'un facteur circulant appelé VPF (Vascular Permeability Factor) qui pourrait moduler non seulement la perméabilité glomérulaire mais également la perméabilité vasculaire. Ce VPF est produit *in vitro* après stimulation de PBMC de patients SNI/LGM par la concanavaline A (con A) et est mis en évidence par un test consistant à mesurer le degré d'extravasation du colorant bleu Evans quand la solution est injectée en sous-cutané chez le cochon d'inde (Pick et al. 1969). Le VPF est une molécule thermosensible, détruite par la digestion à la pepsine mais résistante à la Dnase (Lagrue et al. 1975). Sa masse moléculaire a été estimée à 12 kDa et son pI à 6.4 (Sobel et al. 1977). Le groupe de Lagrue a identifié le VPF comme étant une lymphokine différente de l'IL-2 (Heslan et al. 1991) produite par les lymphocytes T CD4+ (Heslan et al. 1986; Tomizawa et al. 1990). D'autres travaux ont confirmé que le VPF était bien d'origine lymphocytaire (Tomizawa et al. 1985) et que sa production était inhibée par la ciclosporine A (Maruyama et al. 1992) et les stéroïdes (Matsumoto 1997). Plus récemment, il a été reporté une augmentation de la production de VPF après stimulation par l'IL-12 (Matsumoto et al. 1998), l'IL-2 et l'IL-15 (Matsumoto et al. 1999) et une inhibition de sa synthèse après stimulation par l'IL-4 (Matsumoto et al. 1999), l'IL-10 et l'IL-13 (Matsumoto et al. 1997), ce qui en fait une cytokine plutôt de type Th1. Cependant, le VPF s'est révélé incapable d'induire une protéinurie ou une modification des charges de barrière capillaire glomérulaire *in vivo*. De plus, ce facteur ne semble pas spécifique du SNI/LGM puisqu'il a été également décrit dans d'autres glomérulopathies (Lagrue et al. 1975; Bakker et al. 1982).

D'autres facteurs de perméabilité issus de la stimulation de lymphocytes T de patients SNI/LGM par la con A ont été rapportés : Bakker a décrit un facteur, le GPA (Glomerular

Polyanion), capable d'affecter les charges de la barrière de perméabilité glomérulaire suite à une incubation *in vitro* sur des sections de reins (Bakker et al. 1982; Bakker et al. 1986).

D'autres ont montré que l'injection de surnageant de culture de PBMC de patients stimulés à la con A étaient capables d'induire une protéinurie chez le rat, après infusion soit dans l'artère rénale (Boulton Jones et al. 1983; Maruyama et al. 1989; Tanaka et al. 1992), soit dans la veine caudale (Yoshizawa et al. 1989). Yoshizawa a nommé ce facteur GPF, pour Glomerular Permeability Factor. La même stratégie d'investigation a été utilisée à partir de la production d'hybridomes T humains provenant de cellules de patients SNI/LGM. L'injection de ces surnageants en intraveineuse a pu induire une protéinurie chez des rats Wistar ainsi qu'une réduction du nombre de sites anioniques glomérulaires (Koyama et al. 1991). Bien que des similitudes soient observées entre GPF et VPF, il a été montré que ces deux facteurs étaient différents (Kondo et al. 1999), indiquant que plusieurs facteurs sont probablement impliqués dans l'induction de la protéinurie.

Un suppresseur soluble de la prolifération cellulaire a été mis en évidence dans le sérum et l'urine de patients SNI/LGM. Ce facteur, appelé SIRS (Soluble immune response suppressor) est détecté grâce à sa capacité à inhiber la formation de plages cellulaires de lymphocytes T stimulés (Schnaper et al. 1985; Cheng et al. 1989). Le SIRS a un poids moléculaire de 100 à 150 kD et est inhibé par la catalase, le lévamisole, le 2-mercaptoéthanol, par acidification, par traitement protéasique (Schnaper et al. 1985) et par les corticostéroïdes (Cheng et al. 1989). Sa présence n'est ni spécifique du SNI/LGM, ni un facteur prédictif de la réponse aux traitements des patients. Sa production est induite par l'histamine et par une substance sérique retrouvée dans les surnageants de cellules CD4⁺ de patients. Cette substance, d'un poids moléculaire compris entre 13 et 18 kD, peut stimuler la sécrétion du SIRS par les lymphocytes T CD8⁺ (Schnaper 1990). Par ailleurs, elle peut être dégradée par la protéase K et par l'ébullition mais résiste à l'acidification et à une température de 56°C.

Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est un facteur potentiel de modulation de la perméabilité (Dvorak et al. 1999) produit *in vitro* par les cellules immunes activées (Bottomley et al. 1999). *In vivo*, les podocytes non lésés sont une source majeure de VEGF et les récepteurs au VEGF sont présents sur l'endothélium glomérulaire et les cellules mésangiales (Thomas et al. 2000). Plusieurs travaux suggèrent que les fenestrations de l'endothélium glomérulaire seraient dépendantes de VEGF étant donné que celles de l'endothélium continu sont induites par ce facteur (Roberts et al. 1995; Roberts et al. 1997). *In vitro*, VEGF est capable

d'altérer la perméabilité des monocouches endothéliales (Esser et al. 1998; Hippenstiel et al. 1998; Chang et al. 2000), ce qui pourrait faire de lui un facteur de perméabilité glomérulaire. Afin de vérifier cette hypothèse, l'équipe de Brenchley a comparé l'expression de l'ARNm de VEGF chez des patients SNI/LGM en rémission et en poussée, mais n'a relevé aucune différence, ni dans le plasma, ni dans les urines (Webb et al. 1999). De plus, dans cette même étude, ils n'ont pas réussi à induire une protéinurie chez le rat après une injection de VEGF en systémique, échec qui avait été reporté par une autre équipe dans un modèle de rein de rat perfusé (Klanke et al. 1998). Néanmoins, une augmentation de l'ARNm de VEGF a été mise en évidence dans un modèle animal de néphrose (Horita et al. 1998) et dans des biopsies de patients SNI/LGM par hybridation in situ (Bailey et al. 1999), suggérant que l'expression de VEGF serait secondaire à la protéinurie. Les résultats actuels ne permettent cependant pas de considérer VEGF comme un facteur de perméabilité glomérulaire mais plutôt comme un facteur protecteur.

L'héparanase, une enzyme capable de digérer les héparanes sulfates et produite par les cellules immunitaires, est un facteur de perméabilité séduisant puisqu'elle pourrait dégrader les sites anioniques de la barrière capillaire qui sont essentiels dans le maintien de la sélectivité de charge et de la filtration protéique (Sewell et al. 1989). Le clonage du gène de l'héparanase humaine ainsi que la mise en évidence d'une forte expression constitutive de l'ARNm de l'héparanase dans les PBMC (Hulett et al. 1999; Vlodavsky et al. 1999) suggèrent un rôle physiologique important de cette enzyme dans la biologie des cellules immunitaires. Une étude récente a montré une expression dérégulée de l'héparanase chez des enfants atteints de SNI/LGM en poussée, comparé aux mêmes patients en rémission et à des sujets sains (Holt et al. 2005), renforçant l'hypothèse d'une implication de cette protéine dans l'étiologie du syndrome néphrotique corticosensible. Des études complémentaires sont néanmoins nécessaires afin de mieux caractériser le rôle de l'héparanase.

Bakker et al. ont caractérisé un facteur plasmatique de 100 kDa chez les patients atteints de SNI/LGM, capable de réduire le nombre de sialoglycoprotéines glomérulaires in vivo et d'induire une protéinurie chez le rat (Bakker et al. 1988; Cheung et al. 1996). Ce facteur vasoactif, qui possède une activité similaire aux kallikréines, est présent dans le plasma humain et murin. Sa concentration est diminuée chez les patients SNI/LGM en rechute mais son activité est augmentée (Bakker et al. 1988). *In vitro*, ce facteur nommé 100 KF est capable de moduler la perméabilité de cellules endothéliales humaines et réduit l'expression cellulaire des sites anioniques de l'ectoATPase (Cheung et al. 1996). Grâce à des expériences de perfusion

dans un rein de rat, il a été montré que ce facteur réduit le nombre de sites anioniques de la lamina rara interne, suggérant que les cibles *in vivo* sont l'endothélium glomérulaire et la membrane basale subendothéliale (Cheung et al. 1996). Ce facteur 100 KF a été identifié comme étant l'hémopexine (Cheung et al. 1999; Cheung et al. 2000). L'hémopexine est produite par les cellules mésangiales stimulées par le TNF α (Kapojos et al. 2003) et possède une activité protéase capable de réduire le nombre d'ectoapyrases et de sialoglycoprotéines glomérulaires (Bakker et al. 2005). Par ailleurs, l'activité protéasique de l'hémopexine est augmentée spécifiquement chez les patients SNI/LGM en rechute, comparée à celle des mêmes patients en rémission, à des patients SNI/HSF ou présentant d'autres formes de glomérulopathies primitives (Bakker et al. 2005). Les patients SNI/LGM pourrait donc posséder une isoforme active de l'hémopexine capable d'altérer la membrane basale glomérulaire. Cette protéine est à ce jour le facteur plasmatique le mieux caractérisé dans le syndrome néphrotique corticosensible.

E.2.3 Facteurs dans le SNI corticorésistant

Zimmerman et al. ont montré que l'injection intra-aortique chez un rat de sérum provenant d'un patient ayant récidivé son SNI/HSF provoque l'apparition immédiate d'une protéinurie et d'une albuminurie (Zimmerman 1984). Par contre, aucune protéinurie n'est apparue après l'infusion de sérums de patients SNI n'ayant pas présenté de récurrence après transplantation ou de sérums de patients présentant une autre forme de syndrome néphrotique. La transmission d'un facteur circulant dans cette expérience semble très spécifique des patients présentant une récurrence après transplantation.

D'autres travaux effectués par l'équipe de Savin ont également décrit la présence d'un facteur sérique chez des patients SNI/HSF récidivant leur maladie initiale après transplantation (Savin et al. 1996). Pour cela, un test *in vitro* a été mis au point sur des glomérules isolés de rat immergés dans un milieu hypotonique afin d'estimer indirectement la présence d'un facteur de perméabilité (Savin et al. 1992). Le principe biophysique de ce test assimile le glomérule isolé à un système clos, séparé du milieu extérieur par une membrane semi-perméable, la barrière de filtration. Quand cette barrière est intacte et donc imperméable aux protéines, le glomérule soumis à un choc hypotonique augmente de volume par transfert d'eau. Si la membrane est lésée, elle devient perméable à l'albumine et le glomérule n'augmente pas de volume puisque le transfert peut se faire librement. Cette variation de volume est estimée grâce à un système vidéo d'analyse d'images et est exprimée en tant que variable de perméabilité à l'albumine, Palb.

Les sérums de patients SNI/HSF présentant ou non une récurrence ont été testés et comparés à ceux d'individus sains et de patients protéinurique non HSF. Le test a révélé que les patients ayant récidivé possédaient un Palb significativement plus élevé, et ce même avant transplantation, en faisant alors le premier test prédictif de récurrence (Savin et al. 1996; Dall'Amico et al. 1999). En revanche, la valeur de Palb ne permet pas de prévoir la corticosensibilité ou la corticorésistance d'un patient, ni son évolution (Trachtman et al. 2004). De plus, toujours dans la maladie initiale, le traitement par la ciclosporine n'a pas d'effet sur le Palb et aucune différence de cette valeur n'a été observée chez les patients en rechute et en rémission (Cattran et al. 2003).

Par précipitation au sulfate d'ammonium et après avoir ôté les lipides et les Ig, cette équipe a réussi à purifier partiellement le facteur. Celui-ci est capable de s'accrocher à des colonnes de protéine A, d'héparine, et d'échangeuse faible d'anion, mais pas à la con A ou à des échangeuses de cations (Savin et al. 1996). Le facteur est présent dans la fraction de 70% de sulfate d'ammonium, et il est sensible à la dénaturation et aux protéases (Sharma et al. 1999). Tout d'abord estimé entre 100 et 120 kD (Savin et al. 1992), le facteur aurait une masse moléculaire comprise entre 30 et 50 kD (Sharma et al. 1999). L'injection de la partie enrichie en ce facteur en intraveineux à des rats induit une augmentation significative de la protéinurie (Sharma et al. 2002). Cependant, à ce jour, ce facteur n'a toujours pas été caractérisé.

Une technique très similaire pour mesurer la perméabilité glomérulaire a été utilisée par Godfrin en 1996. Le système vidéo a été remplacé par l'utilisation d'un compteur à particules pour évaluer le changement de volume des glomérules. Cette variante permet de mesurer un grand nombre de glomérules : 1500 en moyenne au lieu de 5. Les essais réalisés avec le sulfate de protamine ont montré une augmentation de la perméabilité glomérulaire (GVV : Glomerular Volume Variation) due à la neutralisation des sites anioniques de la barrière glomérulaire (Godfrin et al. 1996).

Dans une étude comparant le GVV de sérums de patients SNI récidivant ou non et de patients néphrotiques non SNI, il a été montré que les patients HSF présentent une augmentation de leur GVV avant transplantation et que ceux ne récidivant pas voient leur GVV diminuer. Cependant, aucune prédictivité de la récurrence n'a pu être mise en évidence avant transplantation grâce à ce test chez les patients SNI/HSF présentant une récurrence (Godfrin et al. 1997).

L'équipe de Souillou a pu isoler le facteur « HSF » sur des colonnes d'immunoabsorption de protéine A et a montré qu'il était capable d'induire une protéinurie chez le rat. Le facteur actif a été estimé inférieur à 100 kD suggérant que ce dernier ne correspond pas simplement à une IgG (Dantal et al. 1994). Des études complémentaires à partir de colonnes d'immunoabsorption anti-

IgG ont montré que le facteur était capable de s'y accrocher (Dantal et al. 1998). En utilisant la même méthode de fractionnement que Savin, cette équipe a elle aussi trouvé que la fraction active correspondait à la fraction de 70%. Cependant, une activité a également été trouvée après fractionnement de plasma d'individus sains et après l'injection de solution saline seule, mettant en évidence l'importance des contrôles lors des expérimentations *in vivo* (Le Berre et al. 2000). Après purification, une bande spécifique, correspondant à l'orosomucoïde, a été isolée du plasma des patients récidivant. Malheureusement, l'injection de la protéine purifiée en intra artériel chez le rat n'a pu entraîner de protéinurie.

D'autres molécules ont été décrites pour leur capacité à augmenter le Palb de glomérules isolés : la protamine (Savin et al. 1992), les superoxydes (Dileepan et al. 1993), le complément (Li et al. 1994; Savin et al. 1994), le monoxyde d'azote (Li et al. 2001), certaines cytokines telles que le TNF α (McCarthy et al. 1998) ou le TGF β (Sharma et al. 2000), les anticorps anti- β 1 intégrine (Adler et al. 1996), les éicosanoïdes (Sharma et al. 2000). Récemment, Musante a décrit plusieurs protéines isolées à partir de sérum de patients SNI/HSF et induisant une perméabilité glomérulaire *in vitro*: l'apolipoprotéine J, la vitronectine, des isoformes de l'albumine, la chaîne gamma du fibrinogène et une sérine protéase (Musante et al. 2002).

Il semble que les mécanismes permettant au(x) facteur(s) circulant(s) d'augmenter la perméabilité glomérulaire lors de la récurrence dépendent plutôt d'un métabolisme cellulaire actif que d'une neutralisation de charges. Cette conclusion se base sur la rapidité de la récurrence, la faible quantité de facteur requise, sa charge anionique plutôt que cationique et le fait que de nombreux inhibiteurs peuvent empêcher l'augmentation de la perméabilité.

E.2.4 Existence de contre-facteurs

Plusieurs facteurs ont été décrits comme pouvant prévenir une élévation du Palb : certaines apolipoprotéines (Candiano et al. 2001), les inhibiteurs de cyclooxygénases (McCarthy et al. 2002) et de calcineurine (Sharma et al. 1996; Sharma et al. 1996). Les plasmaphèreses sont également capables de diminuer le Palb (Artero et al. 1994; Savin et al. 1996) tout comme la protéinurie.

Une augmentation de Palb a également été décrite avec le sérum de patients NPHS2 avant transplantation et chez les mêmes patients présentant une récurrence après transplantation (Carraro et al. 2002). Aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre le taux de

protéinurie et l'augmentation de Palb. Par contre, cette élévation pourrait être due à la perte d'un facteur antagoniste protecteur dans les urines. Cette hypothèse a d'ailleurs été confirmée ultérieurement puisque la même équipe a montré que l'addition de l'urine d'un patient néphrotique mais pas d'individu sain simultanément avec le sérum d'un patient SNI bloquait l'augmentation de Palb (Carraro et al. 2003). Ces résultats très intéressants suggèrent la présence d'un contre facteur sérique chez les individus sains ainsi que la perte de ce facteur protecteur chez les patients SNI.

Cette hypothèse avait été évoquée plus tôt par l'équipe de Savin (Sharma et al. 2000), montrant que l'addition de sérum d'un individu sain à du sérum de patient SNI/HSF « actif » prévenait l'augmentation de Palb. Cet effet bénéfique décrit est dose-dépendant et le facteur protecteur semble être enrichi dans la fraction à 80% de sulfate d'ammonium.

Récemment, grâce à l'utilisation d'une culture de podocytes murins immortalisés, il a été montré que du sérum normal pouvait inverser la délocalisation de la néphrine entraînée suite à une incubation de ces cellules avec du sérum de patients SNI/HSF (Coward et al. 2005). L'hypothèse d'un contre-facteur pourrait expliquer la difficulté de transférer une albuminurie à l'animal ainsi que la difficulté à obtenir des résultats reproductibles dans les tests *in vitro*. Cependant, certaines observations cliniques suggèrent plutôt la production plus importante d'un facteur de perméabilité que la disparition d'un facteur protecteur chez les patients SNI (Herve et al. 2005).

E-3-Anomalies du système immunitaire dans le SNI

Comme nous l'avons vu précédemment, l'existence de facteurs de perméabilité capables d'altérer le filtre glomérulaire a pu être caractérisée, et la plupart de ces facteurs provenaient de surnageants de lymphocytes T activés *in vitro*. Ainsi, les lymphocytes T et leurs produits (cytokines, lymphokines...) ainsi que les autres cellules de l'immunité ont été activement étudiés au cours de la maladie initiale, et à bien moindre échelle dans le phénomène de récurrence. Dans cette partie, essentielle à la compréhension de mon travail de thèse, je détaillerai le rationnel d'une telle hypothèse ainsi que les anomalies décrites jusqu'à ce jour dans les cellules immunitaires.

E.3.1 Observations cliniques

Shalhoub a été le premier en 1974 à émettre l'hypothèse qu'une altération du système immunitaire T des patients atteints de SNI serait responsable de la sécrétion d'un médiateur

circulant, toxique pour le glomérule (Shalhoub 1974). Il existe en effet un faisceau d'arguments cliniques évocateurs indirects d'une telle hypothèse : l'association du SNI à des hémopathies lymphoïdes comme des leucémies lymphoïdes chroniques (Row et al. 1975; Moulin et al. 1992; Yahata et al. 2000; Sahiner et al. 2004), la maladie de Hodgkin (Couser et al. 1977; Peces et al. 1991; Stephan et al. 1997) et certaines observations de thymomes (Varsano et al. 1980; McDonald et al. 1992; Karras et al. 2005). La néphrose peut également survenir dans un contexte d'activation du système immunitaire déclenchée par une infection virale (Burstein et al. 1993; Tanawattanacharoen et al. 2000). A l'inverse, la rémission du syndrome néphrotique peut survenir au cours d'une maladie infectieuse connue pour induire une immunosuppression T (en particulier la rougeole) (Lin et al. 1986).

L'incidence d'une atopie est également plus importante chez les patients atteints de SN que chez les sujets sains (Thomson et al. 1976; Yap et al. 1983). En 1959, Hardwicke et al. ont pour la première fois reporté une association du syndrome néphrotique avec une hypersensibilité au pollen (Hardwicke et al. 1959). Depuis cette étude, beaucoup d'observations ont décrit l'association du syndrome néphrotique avec des réactions allergiques dues à des allergènes inhalés (Williamson 1970; Wittig et al. 1970; Reeves et al. 1975; Sandberg et al. 1977; Florido et al. 1992), des vaccinations (Kuzemko 1972; Macario et al. 1995), des aliments (Law-Chin-Yung et al. 1977; Sandberg et al. 1977; Howanietz et al. 1985; Genova et al. 1987; Lagrue et al. 1989), et des piqûres d'insectes (Tareyeva et al. 1982; Cuoghi et al. 1988). Le rôle du lymphocyte T est aussi évoqué par l'effet curatif de différents traitements immunosuppresseurs (corticostéroïdes et cyclosporine A) (Tejani et al. 1988; Durkan et al. 2001).

E.3.2 Anomalies des Immunoglobulines

Certaines anomalies de répartition des immunoglobulines ont été décrites principalement dans le SNI à lésions glomérulaires minimes (Giangiacomo et al. 1975)(Aro et al. 1984). Lors des poussées, le taux d'IgG sérique est diminué, le taux d'IgA tend à diminuer mais est aussi décrit comme normal (Chan et al. 1987; Mishra et al. 1997), et le taux d'IgM est fortement augmenté (Giangiacomo et al. 1975; Aro et al. 1984; Chan et al. 1987; Mishra et al. 1997). Le taux des différentes Ig décrites précédemment tend à retrouver des valeurs normales lors de la rémission du SNI, sauf pour les IgM. Au vu de ces résultats, il a été suggéré que les patients SNI présentaient une anomalie au niveau des cellules T responsables du switch IgM/IgG.

Les allergies sont associées avec une élévation de la production des IgE par les lymphocytes B. C'est donc logiquement que plusieurs travaux ont rapporté une élévation du taux d'IgE sérique chez les patients présentant un syndrome néphrotique (Schulte-Wissermann et al. 1979; Lagrue et al. 1984; Mishra et al. 2004), aussi bien en rechute qu'en rémission. Un taux d'IgE plus élevé a été décrit chez les patients SNI avec des rechutes fréquentes, suggérant que la concentration d'IgE puisse être un indicateur prédictif de la réponse aux stéroïdes (Shu et al. 1988). Cependant cette hypothèse n'a pas été validée par d'autres travaux (Laurent et al. 1989). D'autres études s'intéressant à la présence d'IgE dans les glomérules de patients SN donnent des résultats controversés (Gerber et al. 1971; Lewis et al. 1973).

E.3.3 Perturbations des fonctions lymphocytaires

E.3.3.1 Anomalies du phénotype

L'activation des cellules T est le premier événement déclenché lors d'une réponse immune et est dépendante d'une interaction entre les CPA (Cellules Présentatrices d'Antigènes) et les récepteurs de surface du lymphocyte T. Une baisse du ratio $CD4^+/CD8^+$ a été décrite durant la phase néphrotique dans la plupart des cas (Topaloglu et al. 1994; Daniel et al. 1997), suggérant le recrutement de cellules T cytotoxiques lors des poussées. Récemment, une restriction du répertoire avec une expression sélective de certaines familles de gènes $V\beta$ a été mise en évidence au niveau de la région hypervariable CDR3 de la chaîne β du TCR des lymphocytes T $CD8^+$ chez des patients SNI présentant des rechutes fréquentes (Frank et al. 2000), confirmant l'implication de cette sous-population.

Une expansion des lymphocytes T qui expriment le marqueur CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL-2) (Kobayashi et al. 1994; Neuhaus et al. 1995) ainsi que des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ exprimant le marqueur des cellules mémoires CD45RO a également été décrite (Yan et al. 1998). Une augmentation du nombre de cellules NK (Natural Killer) a été rapportée durant la rechute, mais cette observation reste isolée (Daniel et al. 1997). L'expression du marqueur CD25 au cours des poussées peut refléter une activation des cellules T $CD4^+$ ou bien traduire le recrutement d'une sous population mineure dotée de fonctions régulatrices (Baecher-Allan et al. 2001). Cette dernière éventualité est compatible avec certaines études fonctionnelles qui ont montré une diminution de l'immunité à médiation cellulaire et une réduction de la capacité des lymphocytes à proliférer en présence de mitogènes (Fodor et al. 1982; Matsumoto et al. 1984; Hewitt et al. 1992). Le rôle spécifique et une meilleure caractérisation des lymphocytes

T régulateurs restent à établir dans le SNI. Tous ces résultats suggèrent l'implication de lymphocytes T activés dans la phase néphrotique du SNI.

Une étude récente, se basant sur l'analyse du transcriptome du même individu en poussée et en rémission par la technique SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), a montré qu'une population significative de lymphocytes T périphériques lors de la phase active possédaient un phénotype de type naïf pouvant correspondre à des thymocytes (Mansour et al. 2005). En effet, une augmentation du marqueur membranaire CD62L, exprimé sur les cellules naïves et impliqué dans le « homing » thymique, a été décrite dans la poussée de SNI/LGM (Sahali et al. 2002; Mansour et al. 2005).

E.3.3.2 Anomalies de distribution des cytokines

D'autres travaux se sont penchés sur la production des cytokines par les PBMC ou les lymphocytes T des patients SNI. Les cytokines sont de petites protéines qui jouent le rôle de médiateurs solubles de façon autocrine ou paracrine. Les cytokines sont produites et ont pour cible les cellules immunes et non immunes. Selon leur profil de production cytokinique, les lymphocytes T helper (Th) peuvent se diviser en cellules Th1 ou Th2. Les cellules Th1 produisent essentiellement de l'interféron γ (IFN γ), du TNF α (Tumor Necrosis factor), et de l'IL-2, qui activent les réactions cytotoxiques et inflammatoires. A l'inverse, les cellules Th2 produisent de l'IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 et IL-13, impliquées dans la régulation des réponses antigéniques et inflammatoires. (Abbas et al. 1996; Romagnani et al. 1997) (figure 10).

La dichotomie Th1/Th2

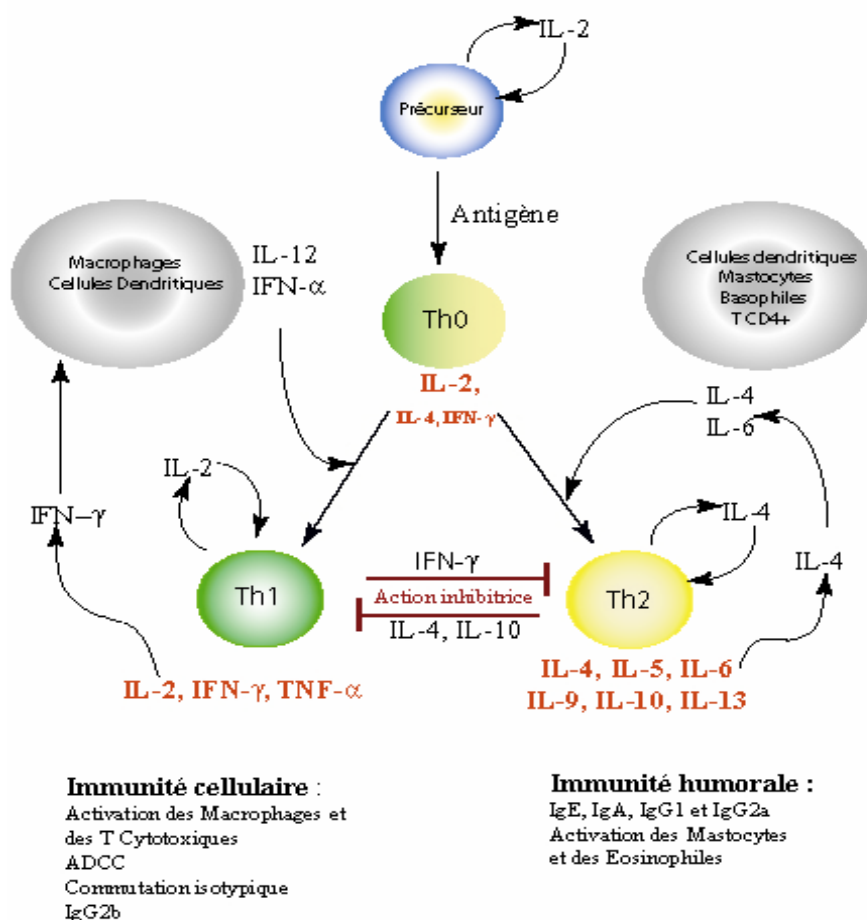


Figure 10 : Dichotomie des lymphocytes T CD4⁺ vers un profil Th1 ou Th2

Suite à une stimulation, les cellules T CD4⁺ naïves deviennent Th0 et possèdent à la fois les caractéristiques des Th1 et des Th2 (production d'IL-2, d'IL-4 et d'IFN γ). Si la stimulation persiste, les cellules Th0 vont évoluer soit vers un profil Th1, soit vers un profil Th2. Les cytokines produites par les cellules Th1 sont l'IL-2, l'IFN γ et le TNF α , alors que celles produites par les lymphocytes Th2 sont l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13. Les lymphocytes Th1 jouent un rôle central dans l'immunité à médiation cellulaire, que ce soit pour les réactions de type hypersensibilité retardée (action de l'IFN γ sur les macrophages) ou de type cytotoxique (action de l'IL-2 sur les lymphocytes cytotoxiques et les cellules NK). Les lymphocytes Th2 jouent un rôle important dans les réactions allergiques par la sécrétion d'IL-4 qui stimule la production d'IgE et l'IL-5 qui active les éosinophiles. L'IL-4, l'IL-6 et l'IL-10 stimulent les lymphocytes B. Chaque sous-population possède la capacité de s'auto-amplifier : l'IL-2, produite par les Th1, stimule la prolifération des Th1; l'IL-4 produite par les Th2, stimule la prolifération des Th2. Il existe également une inhibition réciproque des deux sous-populations : l'IFN γ inhibe la génération des Th2, tandis que l'IL-4 et l'IL-10 inhibent la génération des Th1. Des cellules autres que les lymphocytes T peuvent également produire des cytokines affectant l'équilibre entre les lymphocytes Th1 et Th2. C'est le cas de l'IL-12 et de l'IFN α , produits par les macrophages et les cellules dendritiques, qui stimulent puissamment la génération des Th1. A l'inverse, les basophiles et les mastocytes produisent de l'IL-4 et l'IL-6, qui stimulent les Th2.

De nombreuses études de l'expression des cytokines ont été entreprises chez les patients SNI en poussée et sont répertoriées dans le tableau 4. Les résultats obtenus sont très fluctuants et parfois contradictoires. Plusieurs raisons peuvent être évoquées pour expliquer ces variations :

(1) de nombreuses études ont été réalisées sur des cellules stimulées *in vitro*, ne tenant pas compte des contraintes cellulaires et moléculaires qui prévalent *in vivo* (2) une variabilité dans les différentes techniques de dosage (3) certains patients présentent un terrain atopique, ce qui peut fausser les profils observés (4) et enfin, il existe une dispersion considérable du niveau d'expression des cytokines selon la situation immunologique antérieure de chaque patient. En dépit de ces critiques, il semble qu'une augmentation du TNF α (Koyama et al. 1991; Suranyi et al. 1993; Bustos et al. 1994; Cho et al. 2003), de l'IFN γ (Neuhaus et al. 1995; Daniel et al. 1997) et de l'IL-13 (Kimata et al. 1995; Yap et al. 1999) soit le plus souvent retrouvée au cours des néphroses.

Tableau 4 : Synthèse des données de la littérature concernant le niveau d'expression des cytokines dans le SNI (d'après D.Sahali, *Actualités Néphrologiques 2003-Nécker*)

Cytokine	Augmentée	Diminuée	Inchangée
IL-1	•		•••••
IL-2	•••		••••
IL-4	•		••••
IL-6		•	
IL-8	••	••	•
IL-10		•	
IL-12	••	•	•
IL-13	••		
IL-18	•		
TNF α	•••••		
IFN γ	••		•

Chaque point correspond aux données rapportées dans la littérature.

Les études décrites dans le tableau 4 ont toutes analysé un panel de cytokines prédéterminées. Grâce à l'utilisation du clonage soustractif et différentiel des gènes d'un patient SNI/LGM en poussée et en rémission en l'absence de traitements, l'équipe de D.Sahali a montré que l'expression du récepteur $\beta 2$ de l'IL-12, spécifique des lymphocytes Th1, était réprimée en poussée (Sahali et al. 2002). Cette observation suggère une activation précoce des lymphocytes T CD4⁺ vers la voie Th2.

Les cytokines étant des facteurs solubles, leur action sur des glomérules a été testée d'autant plus que le podocyte possède constitutivement des récepteurs à l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 (Van Den Berg et al. 2000) (Parry et al. 2001) et au TNF α (Aten et al. 2000). Sur des cultures podocytaires, il a été montré que l'IL-4 et l'IL-13 pouvaient altérer directement l'expression de certaines protéines, le transport ionique et l'activité d'enzymes lysosomales comme la cathépsine L et l'héparanase (Van Den Berg et al. 2000) (Van Den Berg et al. 2002). L'IL1- β et le TNF α , cytokines proinflammatoires, ont un effet sur l'expression de la néphrine par les podocytes (Huwiler et al. 2003) et sur la réorganisation du cytosquelette des cellules épithéliales viscérales (Koukouritaki et al. 1999). Il est difficile de transcrire *in vitro* un phénomène *in vivo*, étant donné que le filtre glomérulaire est une structure complexe avec de multiples interactions qui ne peuvent être reproduites fidèlement *in vitro*. Cependant, l'effet de l'IL-4 sur la barrière capillaire glomérulaire a été démontré *in vivo* dans deux études chez la souris transgénique pour l'IL-4. Les souris surexprimant ce gène développent des lésions similaires à celles de HSF, une protéinurie et des dépôts d'Ig au niveau de la barrière glomérulaire (Erb et al. 1997). Dans une autre étude, des souris transgéniques pour l'IL-4 mais incapables de synthétiser des immunoglobulines ont été générées et ont présenté les mêmes signes que les précédentes souris transgéniques (Ruger et al. 2000). Ces résultats indiquent que l'attaque glomérulaire ne semble pas due aux dépôts immuns observés.

Pour conclure, l'INS est associée à des anomalies complexes et variées du système immunitaire, comme l'atopie et un profil cytokinique de type Th2. Bien que les cytokines puissent agir directement sur les podocytes et la barrière de filtration glomérulaire, l'action d'une seule cytokine semble insuffisante *in vivo* pour induire la maladie.

E.3.3.3 Anomalies des voies de régulation et d'activation

L'hypothèse d'une dysrégulation des lymphocytes T dans le SNI a été émise depuis longtemps sur des observations indirectes mais aucune publication n'a vraiment décrit un tel phénomène au niveau moléculaire. Récemment, grâce à des techniques sophistiquées, plusieurs groupes ont décrit des anomalies dans les voies de régulation et d'activation des lymphocytes T de patients SNI/LGM, résumées dans la figure 11.

⌘ Anomalies « générales »

D. Sahali et son équipe, en comparant le transcriptome du même patient SNI/LGM en poussée et en rémission grâce à la technique du clonage soustractif et différentiel (Sahali et al. 2002), ont pu isoler 84 transcrits surexprimés lors de la phase néphrotique. Parmi ces transcrits, 42 correspondent à des gènes de fonction connue, 12 à des gènes identifiés mais de fonction inconnue et 30 à des transcrits inconnus. Parmi les gènes connus, 18 sont impliqués dans les voies de signalisation recrutées lors de l'activation du complexe TCR. Trois protéines jouant un rôle dans la réorganisation du cytosquelette et la redistribution des intégrines dans les lymphocytes T (Fyb/Slap, Grancalcine, L-Plastine), ont également une augmentation de leurs transcrits en poussée vs. rémission. La présence d'un nombre important d'ARN messagers générés par épissage alternatif inhabituel a pu être observée à partir de gènes impliqués dans des fonctions diverses : facteurs transcriptionnels, cytokines, organisation du cytosquelette, transmission des signaux. Ces épissages alternatifs inhabituels ont pu être reliés à la sous régulation dans le SNI/LGM de deux protéines riches en sérine, SRp75 et SRp40, impliquées dans le phénomène d'épissage (Grimbert et al. 2005).

Beaucoup de gènes différentiellement exprimés sont impliqués dans la voie de NFκB (Nuclear Factor κB), comme l'IL-1β, p38 Map Kinase, Traf6, Macropain (sous unité α2 du protéasome), suggérant une anomalie de régulation de cette voie chez les patients SNI/LGM en poussée.

⌘ Dysrégulation de la voie NFκB

Dans les lymphocytes T inactivés, l'hétérodimère principal NFκB p50/p65 est séquestré dans le compartiment cytoplasmique par son inhibiteur IκB. L'activation de NFκB requiert donc l'élimination de IκB. La phosphorylation de IκB au niveau des résidus sérines 32 et 36 permet son ubiquitinylation puis sa dégradation par le protéasome. NFκB, libéré, peut alors migrer vers le noyau où il va se lier à des éléments de réponse présents sur les promoteurs de gènes cibles et en activer la transcription. Ce système est doté d'un rétrocontrôle strict puisque le complexe NFκB induit également la transcription de son propre inhibiteur IκB, qui va bloquer en retour cette activation (rétrocontrôle négatif). La voie de NFκB a été montrée fortement activée dans les lymphocytes T CD4⁺ au cours des poussées de néphrose et réprimée en rémission (Sahali et al. 2001). L'activation de NFκB persiste tant que la maladie est active alors qu'elle devrait être rapidement réprimée du fait du rétrocontrôle négatif, suggérant une rupture de la boucle de régulation durant les poussées. De plus, l'inhibition de la synthèse des cytokines observée au cours des rémissions pourrait être secondaire au blocage de NFκB (Almawi et al. 2002).

Deux mécanismes au moins contribuent à la dérégulation de NFκB dans les lymphocytes T de patients SNI/LGM : une suractivation du protéasome et une dégradation accrue de l'ARNm codant pour IκB, associées à un défaut de transactivation de son gène (Sahali et al. 2001).

D'autres études, moins détaillées, ont également rapporté une régulation de la voie NFκB lors des rémissions : grâce à la technique SAGE, Mansour et al. ont montré une induction de la kinase de IκB ainsi qu'une répression de la transcription de IκB au cours des rémissions.

L'expression de NFκB dans les greffons de patients SNI/HSF a été analysée et a montré que les patients récidivant après transplantation avaient une augmentation de NFκB dans le rein (Schachter et al. 2000). Récemment, une augmentation de la phosphorylation de la MAP kinase p38, impliquée dans la voie d'activation de NFκB, a également été reportée dans les reins de patients présentant différents types de glomérulopathies (Koshikawa et al. 2005).

∅ Activation de la voie c-maf

Le clonage soustractif et différentiel a également permis d'identifier une sur-expression de c-maf, un proto-oncogène membre de la famille des facteurs de transcription à fermeture éclair leucine. Grâce à des techniques de retard sur gel, il a été montré que c-maf est spécifiquement recruté au cours du SNI/LGM : au cours des poussées, c-maf est localisé dans le noyau des lymphocytes T CD4⁺ (forme active) alors que lors des rémissions, il se trouve dans leur cytoplasme (forme inactive) (Valanciute et al. 2004). La seule cytokine connue régulée par c-maf est l'IL-4, hors celle-ci est faiblement exprimée lors des poussées. Suite à des expériences de cotransfection de c-maf et p65 dans des lymphocytes Jurkat et d'inhibition de la voie NFκB, les résultats ont montré que la transactivation du gène de l'IL-4 par c-maf était bloquée par l'hyperactivité de NFκB dans le SNI/LGM (Valanciute et al. 2004). Les conséquences de l'activation de c-maf chez les patients SNI sont encore à déterminer, mais elles pourraient conduire à l'expression du ou des facteurs de perméabilité par les cellules immunitaires.

Toujours grâce aux banques soustraites, un gène inconnu a été isolé, étudié puis nommé Tc-mip (Truncated c-maf inducing protein). Le transcrite Tc-mip est produit par épissage de l'ARN primaire codant pour le gène c-mip, et diffère de celui-ci par la troncation du domaine pleckstrine. L'ARNm de Tc-mip ainsi que la protéine ne sont ni présents chez les individus sains, ni chez les patients atteints d'autres glomérulopathies, alors qu'ils sont fortement exprimés dans les lymphocytes TCD4⁺ principalement des patients SNI/LGM. La surexpression de Tc-mip dans des cellules Jurkat est capable d'induire l'expression de c-maf, de transactiver le gène de l'IL-4 et d'inhiber la synthèse de l'IFNγ, événements caractéristique d'une réponse Th2. Par

ailleurs, cette surexpression est responsable de la phosphorylation de Src, d'adhésions intercellulaires, et d'une redistribution cellulaire du cytosquelette associée à la L-Plastine, grâce à une activation indépendante de la voie PI3 kinase (Phosphatidyl Inositol 3) (Valanciute et al. 2004).

L'activation concomitante de plusieurs voies, en particulier NFκB et c-maf, n'est pas habituelle et pourrait expliquer les variabilités d'expression des cytokines rapportées dans la littérature. Ces résultats offrent une base moléculaire à une hypothèse énoncée il y a plus de trente ans, postulant que le syndrome néphrotique idiopathique résulterait d'une réponse immune anormale médiée par le lymphocyte T. Les mécanismes et phénomènes déclencheurs d'une telle dérégulation des facteurs de transcription sont encore à élucider.

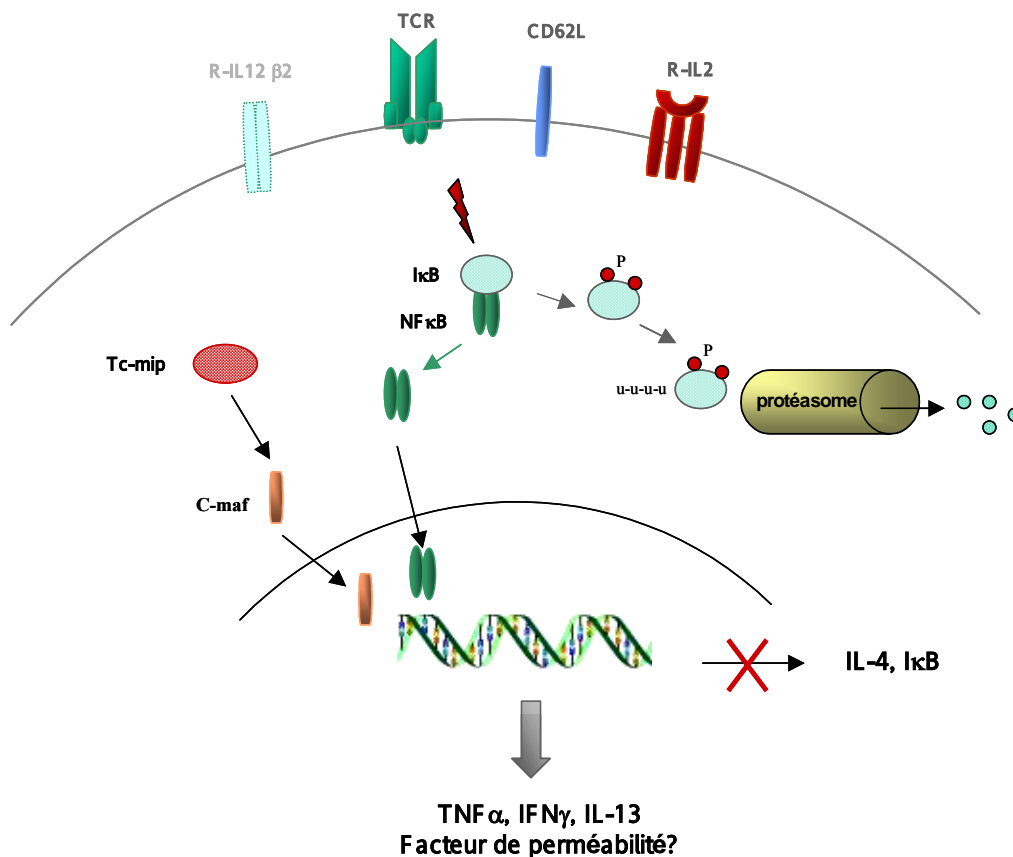


Figure 11 : Schéma récapitulatif des principales anomalies lymphocytaires T observées lors des poussées de SNI/LGM.

Au niveau membranaire, une augmentation de l'expression des marqueurs CD62L, R-IL2 (CD25) et une baisse de l'expression du récepteur β2 de l'IL-12 (R-IL12β2) ont été décrites lors des poussées de SNI/LGM. Au niveau des voies de régulation, une suractivation du facteur de transcription NFκB, résultant d'une dégradation accrue et d'un défaut de transactivation de son inhibiteur IκB a été rapportée dans les lymphocytes T des patients. Une suractivation du protooncogène c-maf due à l'expression de la protéine tronquée Tc-mip a également été décrite. Cette suractivation transcriptionnelle peut être à l'origine de la synthèse de cytokines telles que l'IFNγ, le TNFα et l'IL-13, fréquemment retrouvées en excès dans le sérum des patients, et de la synthèse d'un facteur de perméabilité.

F-Modèles d'étude du Syndrome Néphrotique Idiopathique

La compréhension des mécanismes à l'origine de l'atteinte glomérulaire et du détachement des podocytes lors du syndrome néphrotique a été possible grâce à l'utilisation de modèles *in vitro* et *in vivo*. Nous verrons au cours de ce chapitre les principaux modèles d'études cellulaires et animaux utilisés et les découvertes fondamentales qu'ils ont pu nous procurer.

F-1 Modèles *in vitro*

L'emploi de modèles *in vitro* a déjà été évoqué dans le chapitre relatif aux facteurs de perméabilité, notamment grâce à l'utilisation de tests sur les glomérules isolés. Je ne reviendrai pas sur ce test mais je détaillerai principalement les cultures podocytaires immortalisées murines et humaines.

F.1.1 Culture de podocytes immortalisés

Les cultures primaires de podocytes différenciés montrent une faible prolifération et sont difficiles à propager, ce qui rend leur utilisation difficile pour des expériences nécessitant une grande quantité de matériel. De plus, des contaminations par d'autres types cellulaires glomérulaires peuvent avoir lieu lors des premiers passages en culture. C'est pour cela que des cultures immortalisées de podocytes ont été mises au point à partir de souris transgéniques exprimant l'antigène large T du SV40 sensible à la température, sous le contrôle d'un promoteur H-2Kb inducible par l'interféron (Mundel et al. 1997). Ces cellules possèdent la capacité de proliférer à 33°C en présence d'IFN γ (conditions permissives) et de se différencier en cellules matures en 14 jours à 37°C sans IFN γ (conditions non permissives). En effet, le passage à 37°C provoque une différenciation qui se traduit par un élargissement du corps cellulaire vers une forme irrégulière avec la formation de prolongements cytoplasmiques semblables à des pédicelles (figure 12).

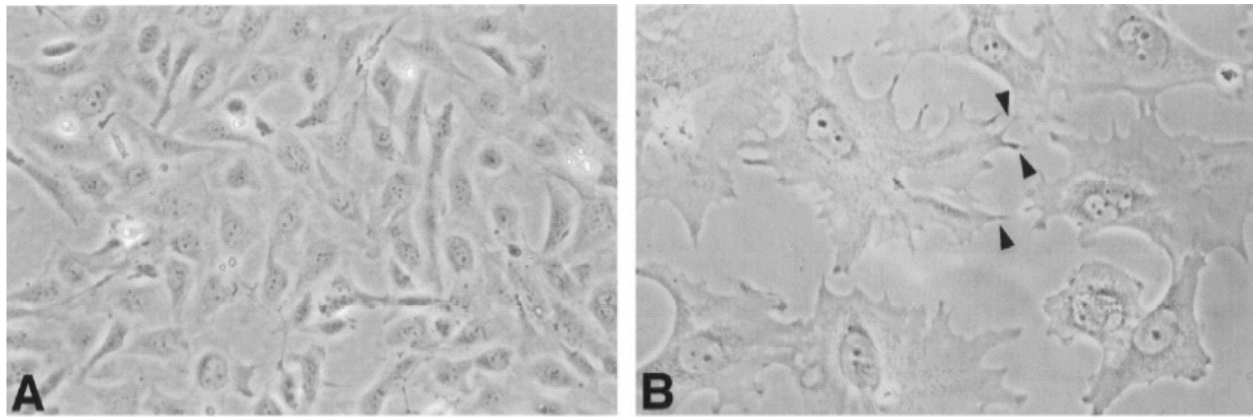


Figure 12: Aspect de culture de podocytes non-différenciés et différenciés en microscopie optique

A) Morphologie en cobblestone caractéristique obtenue sous conditions permissives (33°C, +TNF α). Les cellules forment une monocouche lorsqu'elles ont atteint la confluence. **B)** Cellules différenciées et arborisées en conditions non permissives (37°C, -TNF α). Les cellules se sont étendues et ont développé un large noyau ainsi que des prolongements (flèches) (*d'après P. mundel, 1997*).

Une lignée cellulaire de podocytes immortalisés humains a également été établie selon le même principe (Saleem et al. 2002). Ces cellules podocytaires différenciées expriment les marqueurs spécifiques des podocytes *in vivo* tels que la synaptopodine, la P-cadhérine, la podocine, CD2AP et la néphrine en assez faible quantité. Récemment, une nouvelle lignée podocytaire immortalisée de souris exprimant plus abondamment la néphrine au niveau des ponts de contact a été générée (Schiwek et al. 2004). Une lignée de cellules endothéliales immortalisées a également été mise au point, complétant les outils de recherche *in vitro* (Rops et al. 2004). Ces cellules semblent être de bons modèles pour les études de signalisation et de modifications structurales.

F.1.2 Apport des cultures podocytaires

F.1.2.1 Modifications structurales

L'effacement des pieds des podocytes ainsi que leur détachement est un évènement majeur et précoce qui intervient dans la plupart des maladies glomérulaires associées à une protéinurie. Cet évènement s'accompagne d'une réorganisation du cytosquelette d'actine, mais les mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénomène sont peu clairs. L'équipe de P. Mundel a montré que l'incubation des podocytes immortalisés en culture avec de la protamine ou l'aminonucléoside de puromycine induisaient une rétractation des podocytes et un détachement de la matrice, s'accompagnant d'une réorganisation du cytosquelette d'actine et des points focaux. Ces modifications sont accompagnées d'une augmentation des tyrosine-

phosphorylations, et l'incubation des podocytes avec un inhibiteur de phosphatases provoque les mêmes désordres, montrant l'importance des phosphorylations dans le phénomène de détachement podocytaire (Reiser et al. 2000). La kinase liée à l'intégrine (ILK) a d'ailleurs été montrée comme étant activée après incubation et désorganisation des podocytes par l'aminonucléoside de puromycine, avec une localisation privilégiée au niveau des points d'adhésions focaux (Kretzler et al. 2001). La même étude a montré une augmentation des transcrits de l'ILK au niveau des glomérules de patients atteints de syndrome congénital finlandais et dans les glomérules d'un modèle murin protéinurique. L'ILK induit la translocation et la colocalisation de la β -caténine et de LEF-1 (Lymphoïde Enhancer Factor 1), qui est un facteur de transcription T, dans le noyau. L'inhibiteur de l'ILK, le MC5, est capable de bloquer la translocation de la β -caténine, le détachement podocytaire et la répression de la P-cadhérine et de CD2AP dans le modèle de puromycine (Teixeira Vde et al. 2005), tout comme le facteur de croissance à l'insuline (Bridgewater et al. 2005). Ces résultats très intéressants demandent à être confirmés chez les patients atteints de la forme immune de SN mais pourraient apporter une nouvelle stratégie thérapeutique dans le traitement de la protéinurie.

Une étude récente a testé l'effet de l'incubation de plasmas de patients SNI sur des cultures de podocytes humains immortalisés (Coward et al. 2005). Il a été montré que les podocytes exposés à du plasma « normal » présentaient une distribution de la néphrine, de la podocine et de CD2AP au niveau de la membrane plasmique, alors que l'exposition de ces cellules avec du plasma néphrotique entraînait une délocalisation de ces protéines dans le cytoplasme. Cette délocalisation est accompagnée d'une altération de la voie intracellulaire calcique médiée par la phosphorylation de tyrosines kinases. Ces observations rejoignent les anomalies décrites plus haut dans les modèles puromycine, suggérant l'implication d'une kinase dans l'atteinte glomérulaire des patients SNI.

F.1.2.2 Apoptose

La réduction du nombre de podocytes est un événement déterminant dans le développement de la glomérulosclérose, d'autant que les podocytes dans le rein adulte sont incapables de se régénérer pour compenser cette perte. Le détachement du podocyte de la membrane basale glomérulaire suivi de l'apoptose est un phénomène connu sous le terme d'anoïkis (Frisch et al. 1994). Le TGF β est une cytokine qui est augmentée lors de l'agression glomérulaire. Grâce à l'utilisation des podocytes immortalisés en culture, deux rôles distincts du

TGF β ont pu être établis : d'une part, la sécrétion autocrine du TGF β 2 induit l'arrêt de la phase G0/G1 et la différenciation des podocytes grâce à l'induction d'une voie Smad3-dépendante de l'inhibiteur de kinase cycline-dépendante p15 (Cdkn2b). D'autre part, les podocytes exposés au TGF β 1 recombinant à forte concentration entrent en apoptose, et ce grâce à une suppression de Cdkn2b et à une activation de la kinase pro-apoptotique p38 (Wu et al. 2005). Une autre étude a montré que le TGF β 1, ainsi que l'aminonucléoside de puromycine, nécessitait l'inhibiteur de caspase cycline-dépendante p21 ainsi que Bcl-2 (Wada et al. 2005).

Le VEGF est un facteur anti-cytotoxique qui est produit par les podocytes suite à une agression. Il a été montré que le VEGF exogène, mais également endogène (produit par les podocytes), pouvait prévenir l'apoptose en phosphorylant la néphrine (Foster et al. 2005).

F-2 Modèles animaux

De nombreux modèles ont été établis chez le rat afin de mimer les différents événements impliqués dans la glomérulosclérose humaine. Suite à la mise au point des techniques de gènes *knock out*, des modèles de souris ont également été développés mais la manipulation de petits animaux reste délicate surtout en ce qui concerne les mesures physiologiques. Cette partie détaillera les modèles animaux dits « mécaniques », obtenus après ablation partielle ou totale du rein, puis les modèles « chimio-induits » et « immuno-induits » et pour finir les modèles spontanés tels que le rat Buffalo/Mna utilisé dans le laboratoire.

F.2.1 Les modèles mécaniques

Le modèle de réduction néphronique chez le rat a été décrit initialement en 1932, grâce aux investigations de l'équipe de Brenner entre autre (Chanutin 1932; Hostetter et al. 1981). L'ablation d'une large portion de la masse rénale entraîne une augmentation graduelle de la protéinurie et une hyperperfusion progressive, une hyperfiltration, une hypertrophie et des lésions segmentaires et focales affectant dans un premier temps les glomérules juxtamédullaires comme dans la forme de SNI humaine (Morrison et al. 1966; Shimamura et al. 1975; Hostetter et al. 1981). Une glomérulosclérose précoce apparaît 4 semaines après l'ablation rénale par ligation puis, au bout de 8 semaines, la sclérose segmentaire affecte 20% des glomérules et s'accompagne d'une fibrose tubulointerstitielle. Les animaux meurent d'urémie entre la 14^{ème} et la 16^{ème} semaine (Hostetter et al. 1981; Yoshida et al. 1988).

Techniquement, on distingue la néphrectomie unilatérale, et la néphrectomie 5/6^{ème}, qui consiste en l'ablation d'un rein associée à l'ablation de 2/3 du rein controlatéral par ligation des branches de l'artère rénale. Suite à l'ablation et au phénomène de dilatation capillaire (Lax et al. 1992), une hypertrophie glomérulaire, associée à une hypertrophie cellulaire et à une hyperplasie, s'installe. L'hyperplasie domine dans le modèle de néphrectomie 5/6^{ème}, alors que l'hypertrophie est la cause majeure de progression après une uni-néphrectomie. L'expression de proto-oncogènes tels que c-fos, c-myc et c-ras apparaît rapidement après la néphrectomie (Kujubu et al. 1991; Lee et al. 1998). La capacité limitée des podocytes à proliférer, à cause de leur forte expression de l'inhibiteur de kinase cycline-dépendante p27^{kip1} (Shankland 1999), se traduit par un détachement des cellules épithéliales, suite au gonflement des glomérules en réponse à l'ablation. Un autre inhibiteur de kinase cycline-dépendante, p21, semble jouer un rôle important dans le mécanisme d'hypertrophie engendré par la néphrectomie 5/6^{ème} (Megyesi et al. 1999).

La sclérose est le résultat d'une synthèse de matrice exacerbée par rapport à sa dégradation. La dérégulation de la synthèse de matrice extracellulaire est influencée par de nombreux facteurs de croissance, cytokines et chimiokines (Schena 1999). Ainsi, le PDGF (Platelet Derived Growth factor), les TGF β et α , les hormones de croissance, l'EGF (Epithelial Growth Factor), l'endothéline et le PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) ont pu être impliqués dans la progression des lésions suite à une néphrectomie (Fogo 1999; Fogo 2000). Les modèles mécaniques se sont avérés de bons modèles pour l'étude de mécanismes à l'origine de l'hypertrophie compensatrice et de sclérose, mais restent limités et assez éloignés des mécanismes à l'origine du SNI.

F.2.2 Modèles inductibles

F.2.2.1 Modèles chimio-induits

L'un des modèles le plus utilisé est la néphropathie induite par l'aminonucléoside de puromycine (PAN). Le PAN est un toxique spécifique du podocyte, et la néphropathie associée peut être induite de plusieurs façons chez le rat : soit par plusieurs injections intra-péritonéales, soit par une administration unique en intraveineuse, associées ou non à une néphrectomie unilatérale (Glasser et al. 1977; Diamond et al. 1986; Anderson et al. 1988; Fogo et al. 1988). Suite à une seule injection en intraveineuse (50 mg/Kg), une phase précoce néphrotique apparaît associée à un pic de protéinurie après 10 jours, et présente des lésions semblables aux lésions de LGM avec un effacement complet des pieds des podocytes. Entre la 10^{ème} et la 13^{ème} semaine,

les premières lésions de sclérose segmentaire apparaissent et à la 18^{ème} semaine, environ 10 à 15% des glomérules montrent des lésions de HSF bien caractérisées (Diamond et al. 1986). La cinétique d'apparition des lésions est accélérée si l'on associe une uni-nephrectomie à des injections répétées de PAN intrapéritonéales (première dose à 10 mg/Kg puis 40 mg/Kg toutes les 4 semaines) (Glasser et al. 1977; Fogo et al. 1988).

L'adriamycine, une drogue chimiquement différente du PAN, est capable d'induire des lésions identiques chez le rat. L'adriamycine, injectée en i.v. (2 injections de 2 mg/Kg, 3 semaines d'intervalle), provoque également une protéinurie précoce associée à un effacement des pieds des pédicelles peu après la deuxième injection. Les reins montrent une sclérose segmentaire après 18 semaines, puis une progression de la glomérulosclérose avec une fibrose tubulointerstitielle au bout de 24 semaines (Okuda et al. 1986; Fogo et al. 1988).

Les modèles de néphropathies induites par le PAN ou l'adriamycine ont été testés chez la souris. Bien que toutes les souches de rat soient susceptibles à ces drogues, seule la souche de souris Balb/c est capable de développer des lésions de HSF et une protéinurie suite à l'injection en i.v. d'une forte dose d'adriamycine (10-11 mg/Kg) (Chen et al. 1998; Wang et al. 2000). Par contre les souris sont résistantes au PAN (Chen et al. 1995).

L'action principale de l'aminonucléoside de puromycine et de l'adriamycine semble être l'atteinte des podocytes, comme suggéré par les changements morphologiques et la toxicité directe de ces drogues sur des podocytes en culture (Fishman et al. 1985). En effet, dans la néphropathie induite par PAN, les podocytes montrent une sous-régulation de la podoplanine (Breiteneder-Geleff et al. 1997) et de la néphrine (Ahola et al. 1999) et une sur-régulation de l' α -actinine (Smoyer et al. 1997), protéines jouant un rôle clé dans la structure du diaphragme de fente, ce qui explique l'effacement des pédicelles et la diminution des fentes de filtration observés dans ce modèle (Anderson et al. 1988).

Ces drogues exercent, par ailleurs, des dommages oxydatifs sur la structure cellulaire à travers la production de dérivés réactifs à l'oxygène (ROS) ou la réduction directe de radicaux semiquinone (Diamond et al. 1986). Le PAN peut également augmenter la production de H₂O₂ en culture podocytaire (Kawaguchi et al. 1992) et réduire l'expression de l'isozyme du cytochrome P450 (CYP2B1) (Liu et al. 2003). L'injection de ROS dans l'artère rénale de rats entraîne une protéinurie importante mais transitoire, sans effacement des pédicelles et sans altération de la MBG (Yoshioka et al. 1991). L'attaque médiée par ROS est associée à une baisse d'expression ainsi qu'une inversion de polarité de l' α 3 intégrine (Kojima et al. 2000). A l'inverse, l'administration de molécules anti-ROS dans les modèles de néphropathie PAN et adriamycine réduit significativement la protéinurie (Diamond et al. 1986; Milner et al. 1991). La

taurine, un antioxydant endogène, est également efficace pour limiter l'augmentation de la protéinurie suite à l'injection du PAN et pour normaliser la production de ROS dans le rein (Trachtman et al. 1992). Ainsi, les dérivés réactifs à l'oxygène semblent médier, en partie, l'apparition de la protéinurie ainsi que l'atteinte podocytaire dans les néphropathies induites par PAN ou l'adriamycine.

Le développement de la sclérose chez les rats traités au PAN semble lié à une baisse d'expression de VEGF dans les podocytes ainsi que de son récepteur flk-1 dans les cellules endothéliales (Fan et al. 2002). La fibrose tubulointersticielle quant à elle est associée à une forte infiltration macrophagique ainsi qu'à une reprise de la protéinurie (Baboolal et al. 1995). L'expression de l'héparanase dans les podocytes est également fortement augmentée et pourrait contribuer à la perte des charges glomérulaires et à la protéinurie en résultant (Levidiotis et al. 2001). De nombreuses chemokines sont sur-régulées dans la néphropathie PAN, avec une augmentation transitoire dès les premiers signes de protéinurie de MCP-1 et 3 (Monocyte Chemoattractant Protein) et de la lymphotactine, de la chemokine TCA3 et de MIP-1 α , accompagnée d'une infiltration macrophagique prédominante (Ou et al. 2000). L'ostéopontine, qui entre autre peut recruter les macrophages, est également augmentée (Magil et al. 1997). Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques sont également impliqués dans l'atteinte rénale progressive observée dans le modèle de rats traités à l'adriamycine, puisqu'un traitement avec un anti-CD8 empêche l'apparition des lésions (Wang et al. 2001). Ces derniers résultats suggèrent que des cellules autres que les macrophages pourraient contribuer au développement de la fibrose.

F.2.2.2 Modèles immuno-induits

Récemment, l'équipe de Mundel a montré chez la souris sauvage et SCID que l'exposition à de faibles doses de LPS (lipopolysaccharide) entraînait une protéinurie associée à une sur-expression de B7-1 (CD80) sur les podocytes (Reiser et al. 2004). B7-1 est une protéine transmembranaire normalement exprimée à la surface des lymphocytes B et sur les CPAs (Abbas et al. 1999; Chambers et al. 1999). Les souris *knock out* pour B7-1 sont protégées de l'induction d'un syndrome néphrotique par le LPS, suggérant un lien entre l'expression de B7-1 et l'apparition de la protéinurie. De plus, le LPS, à travers la voie du TLR-4 (Toll Like Receptor-4), réorganise le cytosquelette d'actine du podocyte tandis que l'activation de B7-1 entraîne la réorganisation des protéines du diaphragme de fente telles que la néphrine, CD2AP et ZO-1 (Reiser et al. 2004). Ces résultats très originaux suggèrent une nouvelle fonction de B7-1 dans la réponse des podocytes aux agressions.

Plusieurs anticorps dirigés contre la membrane basale glomérulaire ou directement contre les podocytes ont été utilisés pour induire une protéinurie et étudiés plus spécifiquement le rôle des différents composants glomérulaires.

L'injection de l'anticorps SGP-115/107 chez le rat, dirigé contre une glycoprotéine épithéliale, induit une protéinurie transitoire accompagnée d'un effacement des pédicelles et d'un détachement des cellules épithéliales de la membrane basale glomérulaire (Mendrick et al. 1988). Chez le rat, l'injection unique de l'anticorps monoclonal 5-1-6, dirigé contre une protéine podocytaire de 51 kD entraîne une protéinurie massive atteignant son maximal au huitième jour (Orikasa et al. 1988). Cet anticorps se fixe au niveau des fentes de filtration (Blantz et al. 1994), au même niveau que la protéine de jonction ZO-1 (Kawachi et al. 1995). La protéine cible de cet anticorps a été identifiée comme étant la néphrine (Topham et al. 1999).

Un autre anticorps monoclonal, nommé le LF-3, reconnaît une protéine de 43 kD disparaissant lors des dommages glomérulaires générés dans la néphropathie PAN, et qui correspond à la podoplanine (Breiteneder-Geleff et al. 1997). L'injection de LF3 provoque une protéinurie massive chez le rat associée à un affaissement des pédicelles, mettant en avant le rôle de la podoplanine dans le maintien de l'architecture podocytaire (Matsui et al. 1998).

F.2.3 Modèles spontanés de néphropathies secondaires

De très nombreux modèles sont utilisés et seuls les deux principaux seront indiqués brièvement à titre d'exemple :

Les rats Zucker sont caractérisés par une obésité et une résistance à l'insuline (Ruckebusch et al. 1976) ainsi qu'une hypertension artérielle et une hyperlipidémie. Les lésions rénales qu'ils développent correspondent à une hyalinose segmentaire et focale, associée à une protéinurie (Shimamura 1983). Ce modèle a été largement utilisé pour évaluer l'effet de médicaments sur la progression des lésions rénales (Stevenson et al. 1999; Rodriguez-Iturbe et al. 2005).

La souche de rats Fawn-hooded est apparue par mutation spontanée et doit son nom à son pelage fauve (Tschopp et al. 1974). Ces rats développent une hypertension artérielle spontanée (Kuijpers et al. 1984), des lésions rénales caractérisées par une hyalinose segmentaire et focale avec protéinurie (Kreisberg et al. 1978; Kuijpers et al. 1984), des dépôts d'IgA, IgG, IgM, C3 et fibrinogène (Kreisberg et al. 1978). Cette souche a été utilisée, entre autre, pour valider l'effet de médicaments anti-hypertenseurs sur la progression de l'insuffisance rénale chronique (Verseput et al. 1997).

F.2.4 Le Rat Buffalo/Mna

Cette souche de rat a été obtenue au Japon en 1972. Sa description initiale était centrée sur la présence d'un thymome associée à une myopathie difficile à classer.

F.2.4.1 La myasthénie

Le mécanisme de l'atteinte musculaire reste assez discuté, et a été présenté initialement comme une myasthénie (Matsuyama et al. 1975) puis comme une atrophie musculaire de mécanisme dégénératif (Matsuyama 1981). Les dysfonctions motrices résultent principalement d'une faiblesse musculaire et d'une fatigabilité myogénique des muscles extenseurs (Kato et al. 1982). Grâce à des études électrophysiologiques et pharmacologiques, il a été montré que ces dysfonctions étaient probablement la conséquence d'anomalies du signal au niveau de la jonction neuro-musculaire et donc du mécanisme contractile (Kato et al. 1982). Des publications plus récentes rapportent la présence d'auto-anticorps circulants anti-récepteur de la ryanodine probablement secondaires à la myopathie (Iwasa et al. 1998).

F.2.4.2 Le thymome

La pathologie thymique de ces rats correspond à une hyperplasie thymique constituée au dépend des cellules épithéliales (Matsuyama et al. 1972). Ces cellules épithéliales ne présentent pas de caractère malin (prolifération, anomalies chromosomiques) mais sont anormales en taille et en forme et sont très sensibles à l'action de l'EGF (Masuda et al. 1984). Cette hyperplasie thymique apparaît dès le premier mois de vie et progresse avec l'âge jusqu'à créer un véritable encombrement responsable de la mort des animaux par complications respiratoires (le poids du thymus étant de 370 ± 18 mg à 1 mois, 5092 ± 721 mg à 12 mois et 20607 ± 460 mg à 24 mois) (figure 13).



Figure 13 : Comparaison macroscopique du thymus d'un rat normal de 5 mois (à gauche) avec le thymus d'un rat Buffalo/Mna du même âge (d'après saito, 1997)

La description phénotypique des populations lymphocytaires T médullaires, thymiques et périphériques, par des marqueurs classiques est normale ainsi que leurs fonctions jugées par, *in vivo* la réponse anticorps à des antigènes T dépendant et la réaction du greffon contre l'hôte et, *in vitro* la prolifération induite par les lectines et les expériences de culture mixte (Hirokawa et al. 1990). Il existe néanmoins une diminution de la réponse aux mitogènes pour les rats âgés (Toyokawa et al. 1987), cette anomalie pouvant être secondaire au syndrome néphrotique. Cette hyperplasie thymique touche tous les animaux avec une présentation plus sévère pour les mâles et reste sous contrôle hormonal comme le démontre sa régression complète après hypophysectomie (Hirokawa et al. 1990). Il existe aussi une prolifération lymphocytaire T secondaire intra-thymique avec une répartition normale des sous populations lymphocytaires (Ezaki et al. 1990). Une importante émigration thymique de lymphocytes T persiste donc toute la vie, responsable d'un enrichissement splénique en lymphocytes T à partir de 1 mois de vie passant à cet âge de 27% de la population totale (versus 25% pour des rats Wistar) à plus de 60% à 1 an (versus 30%). Les sous populations lymphocytaires T spléniques ne sont pas différentes de celles de rats contrôles. Cet enrichissement est retrouvé au niveau des ganglions lymphatiques pour atteindre 88% des lymphocytes à 20 mois avec, à cet âge, une nette augmentation de la proportion des lymphocytes CD8⁺. L'analyse de la transmission de la susceptibilité à développer une hyperplasie thymique se fait selon un mode autosomique dominant. Deux gènes ont été récemment localisés : Ten1 sur le chromosome 1 et Ten2 sur le chromosome 13 (Ye et al. 2000).

F.2.4.3 La néphropathie

La néphropathie spontanée de ces rats a été rapportée en 1983 (Kato et al. 1983). Elle se manifeste dès l'âge de 10 semaines par une protéinurie composée à plus de 70% d'albumine associée à une hypoalbuminémie et à une hypercholestérolémie. Des oedèmes sont signalés, en particulier au niveau des glandes submandibulaires. Cette protéinurie est plus importante et d'apparition un peu plus précoce pour les femelles. Elle augmente jusqu'à l'âge de 20 semaines pour rester en plateau par la suite (analyse jusqu'à 1 an). La fonction rénale (estimée par des dosages d'urée) reste préservée jusqu'à l'âge de 1 an (Kato et al. 1983). En microscopie optique standard, les lésions histologiques de hyalinose segmentaires et focale commencent à apparaître chez certains animaux vers l'âge de 4 mois. Ces lésions, avec synéchies floculo-capsulaires, sont retrouvées pour quelques glomérules mais présentes chez tous les animaux à 6 mois. A 1 an, de 8,2 à 23,9% des glomérules sont atteints et ceci quelque soit le sexe de l'animal (Nakamura et al. 1986). Ces lésions continuent à progresser avec le temps pour atteindre 38 à 52% des glomérules à 2 ans. Des dépôts d'immunoglobulines sont retrouvés de façon classique au niveau des zones de hyalinose (IgM surtout). L'analyse en microscopie électronique montre des lésions des podocytes dès l'âge de 2 mois avec un étalement des pédicelles et la présence de vacuoles lipidiques intracytoplasmiques. Un décollement des podocytes de la lame basale glomérulaire est fréquemment retrouvé à partir de 6 mois. La transmission de cette néphropathie se fait sur un mode autosomique récessif avec probablement la participation de 2 gènes (Pur 1 et Pur 2 (Matsuyama et al. 1990). Le locus Pur1, décisif dans la susceptibilité de la néphropathie, a été localisé sur le chromosome 13. Ce chromosome est l'équivalent du chromosome 1 de l'homme connu pour être porteur du gène de la néphrine (Murayama et al. 1998). Le deuxième locus n'a pas pu être localisé mais pourrait être proche de Pur1. A ce jour aucune anomalie génétique spécifique du podocyte ou du glomérule n'a été identifiée. Pour finir, cette néphropathie a été décrite comme résistante à un traitement par corticoïdes (2mg/kg/j par voie sous cutanée pendant 4 semaines) (Kato et al. 1983).

Comme en clinique, la démonstration chez ces rats Buffalo/Mna, d'une récurrence post transplantation rénale d'une protéinurie sur un greffon non protéinurique (rat Lew1W comme donneur) est très évocateur du rôle d'un facteur extra rénal dans l'apparition de cette néphropathie. Une série de transplantations a donc été réalisée avec des transfusions donneur spécifique (DST) administrées 14 et 7 jours avant la transplantation, afin d'induire un état de tolérance (Le Berre et al. 2001). La récurrence de la glomérulopathie est confirmée par l'apparition

d'une protéinurie (dépassant le seuil de 0,2 g/mmol) en moyenne à 20 jours post transplantation. Sur le plan histologique, il existait un infiltrat interstitiel sans tubulite, des lésions glomérulaires de hyalinose segmentaire et focale touchant $15,8 \pm 3\%$ des glomérules et surtout l'absence de lésions vasculaires évocatrices de rejet chronique. La recherche de dépôts d'immunoglobulines était négative montrant simplement des traces d'IgM au niveau des zones de sclérose glomérulaire.

La description de la rémission complète de la protéinurie d'un rein malade de Buffalo/Mna transplanté chez un rat sain (LEW1W) apporte un deuxième argument en faveur d'un facteur extra-rénal (Le Berre et al. 2001). Cette rémission s'accompagne d'une régression complète des lésions parenchymateuses rénales.

Les auteurs Japonais suggèrent que ces rats présentent une accumulation d'anomalies génétiques et qu'il n'existe pas de relation entre les anomalies thymiques, musculaires et rénales. Néanmoins, les publications à ce sujet restent floues et d'interprétation difficile, voire contradictoires. Des expériences de croisement ont été décrites avec des résultats montrant qu'il était possible de séparer les pathologies thymiques et rénales (Matsuyama et al. 1990). La réalisation d'une thymectomie néonatale ne semble pas influencer l'apparition de la néphropathie de ces animaux (Nakamura et al. 1988). Néanmoins, les animaux thymectomisés et contrôles présentaient dans cette publication une maladie peu agressive avec seulement environ 5% des glomérules altérés à un an. D'autre part, l'absence de « thymome » et de protéinurie a été signalée chez les rats pour qui le gène nude a pu être introduit (Matsuyama et al. 1987).

II-METHODOLOGIE

A-But de l'étude

Les mécanismes immuns impliqués dans la maladie initiale du syndrome néphrotique restent encore mal compris. Bien que de nombreuses études aient décrit des anomalies immunitaires dans la maladie initiale et en particulier lors des poussées chez les patients corticosensibles, les observations sont assez disparates et parfois contradictoires. De plus, il est difficile de savoir si les anomalies observées sont la cause ou une conséquence de la maladie.

La première partie de cette étude a été effectuée chez le rat Buffalo/Mna, un modèle spontané de syndrome néphrotique idiopathique disponible dans notre laboratoire et assez proche de la maladie humaine (cf F.2.4 de l'introduction). Nous avons cherché à savoir si l'apparition de la maladie chez ce rat était précédée d'anomalies immunitaires majeures, étude non réalisable chez l'homme. Pour cela, nous avons analysé le phénotype des cellules immunitaires infiltrant le greffon ainsi que le profil des cytokines et des chémokines associées avant l'apparition des lésions et de la protéinurie, puis à différents moments après l'installation de la protéinurie (**article 1**). Nous espérons ainsi éclaircir l'implication des cellules immunitaires dans l'apparition des lésions dans ce modèle spontané. Une autre étude portant sur l'effet des traitements sur la protéinurie du rat Buffalo a également été réalisée mais ne sera pas détaillée dans l'exposé, par soucis de clarté et dans le but de s'intéresser plus spécifiquement aux anomalies immunitaires (**annexe 2**).

Au cours de la deuxième partie, nous nous sommes intéressés à la récurrence du syndrome néphrotique idiopathique corticorésistant après transplantation rénale chez l'homme. En effet, de par leur récurrence immédiate, ces patients représentent une population homogène de la « forme immune » de SNI, avec une maladie active et la présence du ou des facteurs de perméabilité dans leur sérum. Pour cette étude, nous sommes partis d'une hypothèse représentée figure 14 suggérée par les études effectuées chez les patients corticosensibles et nous en avons étudié les différents axes.

Nous pensons que dans un contexte de conflits immunologiques, les lymphocytes T des patients allant récidiver vont produire une réponse anormale, à cause d'anomalies de régulation. Cette réponse anormale va s'accompagner de l'expression d'un phénotype lymphocytaire T particulier ainsi que de la sécrétion du ou des facteurs de perméabilité toxiques pour les podocytes.

Soit les anomalies sont présentes avant la transplantation chez ces patients et on peut alors espérer prédire la récurrence, soit elles apparaissent après. Le problème de l'étude de la récurrence après transplantation est que le traitement immunosuppresseur peut interférer avec les résultats et que l'on se place dans un contexte de réponse allogénique. Le groupe contrôle doit pour cela se rapprocher le plus fidèlement possible du groupe récurrence au niveau du traitement, des incompatibilités HLA, de l'âge et globalement de tout ce qui peut moduler la réponse immunitaire (virus, rejet).

La réponse immunitaire des patients SNI a été étudiée grâce à l'analyse des altérations des transcrits V β au niveau de la région hypervariable CDR3 du récepteur T (TCR), avant et après transplantation, afin de déterminer si la récurrence corrèle avec des expansions clonales spécifiques (**article 2**) et si ces anomalies sont présentes avant transplantation. L'analyse utilisée est à la fois qualitative et quantitative, et a été développée au sein de l'unité INSERM 643 (TcLandscape). Cette méthode se basant sur les techniques Immunoscope® et PCR quantitative Taqman® sera développée dans le prochain paragraphe. L'analyse d'éventuelles anomalies de régulation a été évaluée grâce à l'étude du profil des tyrosines phosphorylations dans les PBMC de patients SNI, avant et après stimulation par la PMA/ionomycine. L'étude des sous populations lymphocytaires a été appréhendée par cytométrie en flux et l'analyse de l'expression des différents transcrits de cytokines et protéines impliquées dans l'activation et la régulation a été effectuée par PCR quantitative (**article 3**).

Enfin nous avons étudié, en collaboration avec l'INSERM U581 de Créteil, un facteur de perméabilité potentiel produit par les lymphocytes Th2 et impliqué dans la réponse anti-inflammatoire. Nous avons tout d'abord dosé sa concentration dans les sérums de patients SNI récidivant ou non avant et après transplantation et dans le sérum de patients contrôles protéinuriques non-SNI. Puis nous avons testé l'action des différents sérums et de la protéine recombinante seule sur une culture de podocytes immortalisés de souris (**article 4**).

Le but de cette deuxième partie chez l'homme est de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la récurrence afin de pouvoir, à long terme, traiter plus efficacement ce phénomène. Un autre but serait de pouvoir isoler une caractéristique spécifique aux patients récidivants (phénotype, profil de phosphorylation, taux sérique d'une protéine) afin de pouvoir prédire cette récurrence avant transplantation.

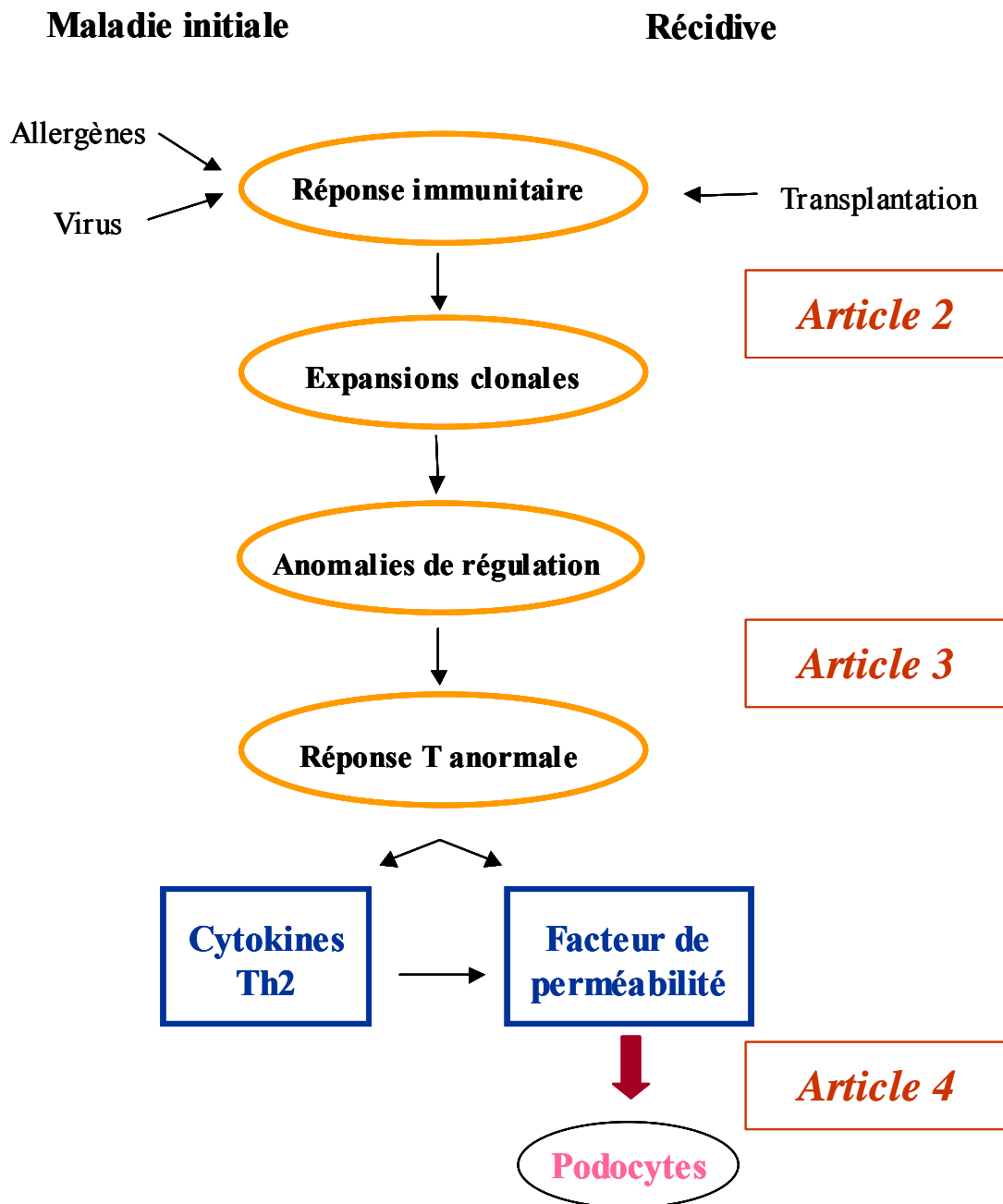


Figure 14 : Schéma récapitulatif de l'hypothèse de départ utilisée chez l'homme ainsi que les articles s'y rapportant.

B-Matériels et Méthodes

B-1 Patients

Définition des patients SNI/HSF : Il s'agit de patients inscrits sur la liste de transplantation avec ce diagnostic histologique à l'exclusion de tout autre diagnostic de glomérulopathie et de HSF dites secondaires (uropathies malformatives, lésions satellites de néphroangiosclérose). Il est clair que ce diagnostic prête à la critique étant donné les difficultés de classification : forme corticosensible à rechute, corticodépendante ou corticorésistante d'emblée, forme non traitée due à un diagnostic tardif ou à une faible protéinurie, formes familiales...

Définition de la récurrence: Le diagnostic de la récurrence est plus clair bien qu'il existe quelques différences dans la littérature. Nous avons considéré comme récurrence les formes caricaturales, c'est à dire les récurrences immédiates après transplantation dans les 24 premières heures ou les 24 heures suivant la reprise de la diurèse. Nous n'exigeons pas de récurrence des lésions de HSF car les altérations initiales podocytaires comportent essentiellement des lésions glomérulaires minimales. Le niveau de protéinurie peut par la suite être très variable en fonction de l'agressivité de la récurrence mais aussi du traitement mis en place (forte posologie de CsA, IEC, ARA_{II}...). Nous n'avons conservé ici que les patients avec une protéinurie sélective permanente et supérieure à 1g/j.

A l'opposé, les patients n'ayant pas de récurrence n'ont pas présenté de protéinurie significative (i.e <1g/j) au delà de la première semaine ayant suivi le démarrage du greffon. Comme ces patients ne sont pas fréquents et que les techniques utilisées demandent pour leur majorité un travail sur des échantillons fraîchement prélevés, les groupes de patients peuvent varier d'une expérience à une autre et sont résumés dans les publications.

B-2 L'analyse du V β transcriptome

Le terme de « répertoire » désigne l'ensemble des TCR exprimés par les lymphocytes T. Les techniques d'analyse du répertoire T permettent de visualiser la diversité des TCR et donc indirectement la diversité d'une population de cellules T et d'en suivre l'évolution.

B-1.2 Rappels sur l'origine de la diversité lymphocytaire T

Deux types de TCR ont été identifiés : le TCR $\alpha\beta$ et le TCR $\gamma\delta$. Il s'agit d'hétérodimères formés respectivement de deux chaînes : soit α et β , ou γ et δ , associés au complexe CD3 impliqué dans l'expression du TCR à la surface des lymphocytes et indispensable à la transduction du signal. Le TCR est impliqué dans la reconnaissance du peptide présenté par une molécule de CMH. Les TCR $\gamma\delta$ représentent environ 5% des cellules T et sont essentiellement présents au niveau des muqueuses digestives. Nous nous sommes donc intéressés aux lymphocytes T $\alpha\beta$, présents dans le sang.

Les gènes codant pour les chaînes du TCR sont regroupés en loci et sont composés chez l'homme de 45 segments V β , 2D β , 13J β et 2C β . La synthèse du TCR commence par le réarrangement au niveau somatique des segments D β et J β , suivi de l'assemblage de ce segment réarrangé D β J β avec un segment V β et enfin l'ajout d'un segment constant C (Chien et al. 1984). Cette chaîne β est ensuite exprimée à la surface des thymocytes et s'associe avec la chaîne α , issue elle aussi du réarrangement des gènes V α et J α .

Lors du réarrangement, la jonction des segments VDJ se produit avec une imprécision pouvant entraîner un décalage du cadre de lecture et est accompagnée de l'addition d'un nombre aléatoire de nucléotides au niveau des jonctions par une enzyme: la TdT (Bogue et al. 1996). Ces deux mécanismes sont source de diversités qualifiées respectivement de diversité combinatoire et jonctionnelle (figure 15). A ces deux mécanismes s'ajoute une diversité liée à l'association d'une chaîne β à une chaîne α . On estime ainsi que $2,5 \cdot 10^6$ TCR $\alpha\beta$ différents peuvent être générés chez l'homme (Arstila et al. 1999).

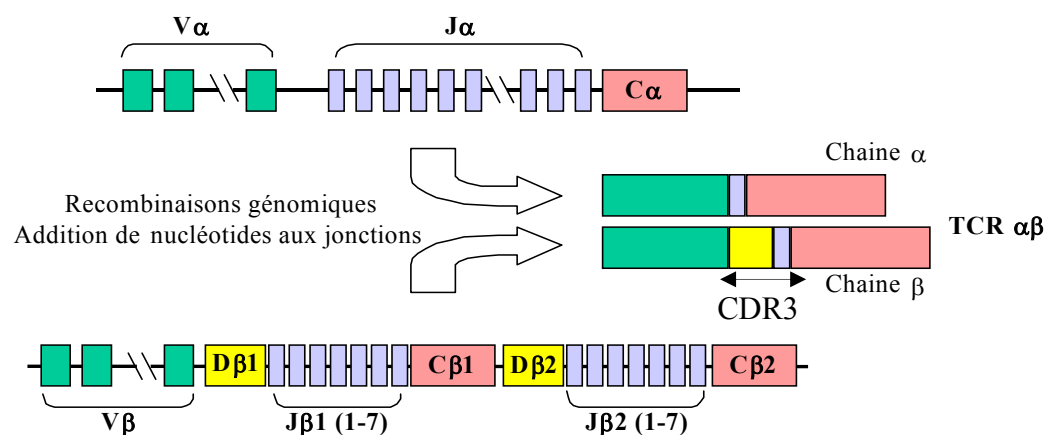


Figure 15: Les mécanismes de réarrangements génomiques et d'addition de nucléotides au niveau des jonctions, ajoutés aux nombreuses associations α/β sont source d'une grande diversité des TCR.

Au niveau des domaines variables des chaînes du TCR, il existe des boucles hypervariables CDR1, CDR2, CDR3 impliquées dans l'interaction avec le CMH et le peptide. La boucle CDR3, composée de l'extrémité 3' du segment V, de D et de l'extrémité 5' de J, est la région la plus hypervariable, et est plus fortement impliquée dans la reconnaissance du peptide (Jorgensen et al. 1992). De plus, du fait de la diversité jonctionnelle, cette région CDR3 est de différentes longueurs pouvant aller de 10 à 33 nucléotides.

B-1.3 Principe du TcLandscape

L'analyse qualitative consiste en la représentation de la distribution des tailles de CDR3 dans chaque famille V β (26 chez l'homme, 21 chez le rat) et est facilitée par le programme Immunoscope® qui fournit les résultats sous forme de pics (Pannetier et al. 1995). Chaque profil V β est représenté par 7 à 11 pics correspondant à 7 à 11 tailles différentes de CDR3, séparées chacune de trois nucléotides. Cette analyse du répertoire des cellules T permet de détecter des familles V β présentant certaines tailles de CDR3 particulièrement impliquées dans la réponse étudiée et qui sont représentatives de clones T sélectionnés et amplifiés lors de réponses immunes.

Cette analyse permet de discerner deux types de répertoires, altérés ou non. Un profil est non altéré ou gaussien lorsque que la totalité des familles V β présente une distribution gaussienne des tailles du CDR3 (figure 16). Le terme altéré désigne un répertoire dans lequel certaines familles V β présentent des expansions clonales.

Le logiciel Immunoscope® permet d'analyser la distribution de tailles CDR3 au sein d'une famille V β . Chaque profil CDR3 obtenu est traduit en une distribution de probabilité selon la méthode décrite par Gorochov (Gorochov et al. 1998). L'altération d'une certaine taille du CDR3 dans une certaine famille V β est alors comparée à un profil contrôle et la différence entre sa fréquence dans la distribution étudiée et la fréquence de cette même taille de CDR3 dans la distribution contrôle gaussienne permet de calculer un pourcentage de perturbation.

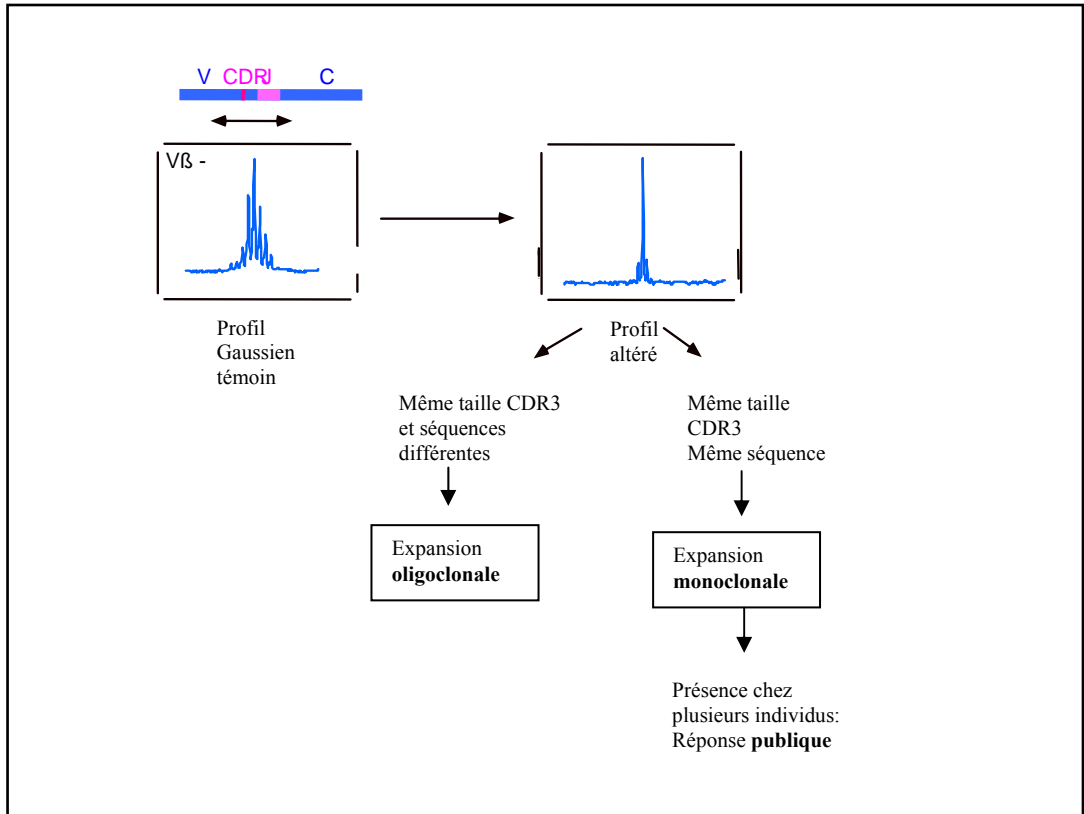


Figure 16 : Analyse par Immunoscope®

Le répertoire des lymphocytes T au repos montre un profil gaussien de la répartition des tailles du CDR3. Après une stimulation, des expansions de certaines familles V β peuvent apparaître, monoclonales ou oligoclonales selon la taille et la séquence du CDR3.

La méthode choisie pour l'analyse quantitative est une PCR quantitative en temps réel faisant appel à la technologie TaqMan®. Le programme « ABI Prism 7700 Sequence Detection System » permet de détecter et de mesurer la fluorescence émise par un marqueur non spécifique (Syber Green) , qui se loge dans le petit sillon de l'ADN au fur et à mesure de l'amplification. Les valeurs obtenues pour chaque échantillon sont rapportées à la valeur mesurée pour le gène de l'Hypoxanthine PhosphoRibosyl Transférerase (HPRT, gène de ménage) afin de s'affranchir des variations de quantité en ADNc.

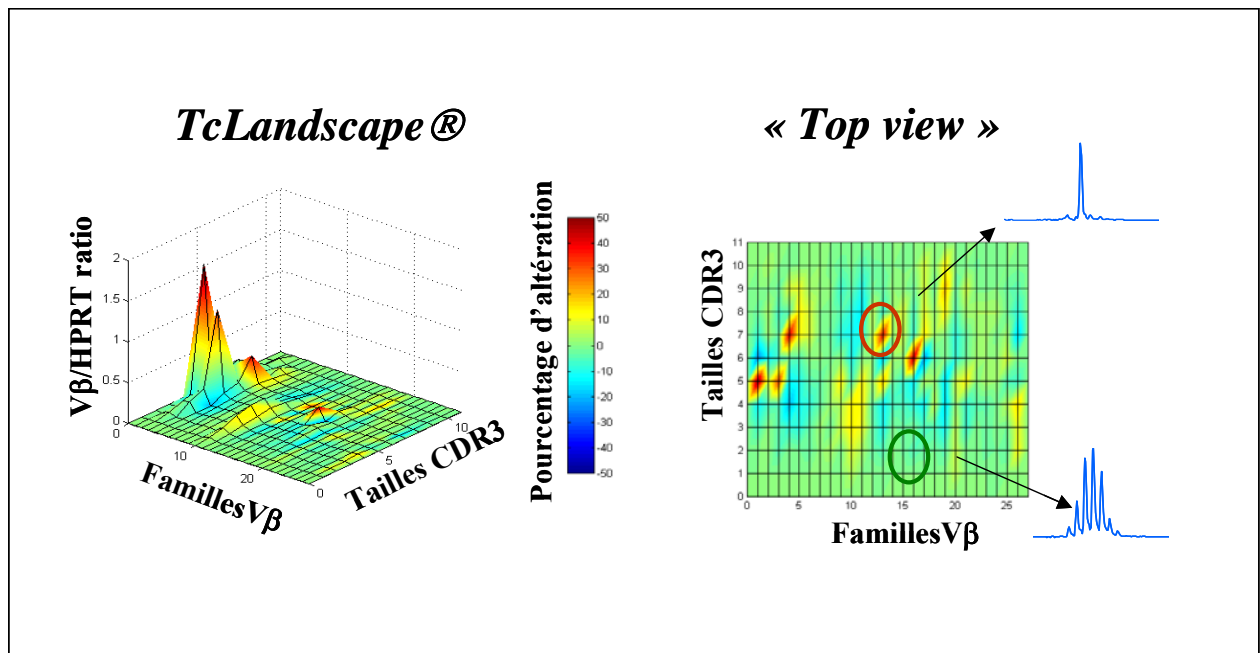


Figure 17: Le TcLandscape est la seule approche permettant une représentation globale à la fois qualitative et quantitative du répertoire.

L'échelle colorimétrique représente le pourcentage d'altérations, du vert pour un profil gaussien (ellipse verte) au rouge pour un profil altéré (ellipse rouge). Le « Top View » est une autre représentation du TcLandscape qui ne met en évidence que les altérations qualitatives du répertoire.

Le TcLandscape permet d'obtenir une vision globale du répertoire: l'axe des x représente les familles $V\beta$, l'axe des y les tailles de CDR3 et l'axe des z le rapport des transcrits $V\beta/HPRT$. Elle permet de suivre non seulement les familles $V\beta$ présentant une altération clonale mais également les familles $V\beta$ présentant une distribution gaussienne des tailles de CDR3 et fortement exprimées (figure 17).

III RESULTATS

A-Article 1 : Mise en évidence d'anomalies immunologiques précédant l'apparition du Syndrome Néphrotique chez le rat Buffalo/Mna

A-1 Résumé de l'article 1

A l'âge de huit semaines, les rats Buffalo/Mna développent spontanément un syndrome néphrotique associé à des lésions de hyalinose segmentaire et focale (HSF). Nous avons précédemment démontré que la glomérulopathie du Buffalo/Mna récidive après transplantation rénale, faisant de ce rat un modèle d'étude pertinent de la maladie humaine. Dans cet article, nous décrivons des anomalies immunitaires rénales qui semblent être parallèles au développement et à la progression de la néphropathie spontanée du Buffalo/Mna.

Des échantillons de reins de rats Buffalo/Mna ont été prélevés avant (4 semaines) et après l'apparition de la protéinurie (à 10, 15, et 18 semaines et à 12, 15, 18 et 24 mois). Les populations cellulaires rénales ainsi que l'expression cinétique de transcrits de différentes cytokines, chémokines et de la chaîne β du TCR ont été analysées tout au long de la maladie.

Dans les reins de Buffalo/Mna, parallèlement à la protéinurie, les lésions de hyalinose segmentaire et focale apparaissent à la dixième semaine, touchant environ 2.4% des glomérules, puis s'étendent pour représenter 10.4% des glomérules à 24 semaines, 14.6% à 12 mois et environ 29% à 18 mois. Avant l'apparition des premiers symptômes de la maladie et de la protéinurie, l'analyse de l'expression des différents transcrits révèle une forte production de cytokines associées aux macrophages, en particulier le $\text{TNF}\alpha$ (350 fois le niveau d'expression d'un rat normal), s'accompagnant d'un infiltrat monocytaire. Un faible infiltrat lymphocytaire associé à un profil Th2 prédominant et une sous-régulation des cytokines Th1 a également été observé. Ces profils décrits ont perduré après l'apparition de la protéinurie. Par ailleurs, aucune variation des transcrits des chémokines et du $\text{TGF}\beta$ n'a été relevée dans les premiers moments de la maladie.

Nos résultats suggèrent que la maladie du Buffalo/Mna pourrait être le résultat d'un désordre immunologique, impliquant les macrophages et les lymphocytes Th2. Nous avons émis l'hypothèse que cet environnement immunologique modifié pourrait être à l'origine de la production d'un facteur toxique pour le glomérule.

Renal macrophage activation and Th2 polarization precedes the development of nephrotic syndrome in Buffalo/Mna rats

LUDMILLA LE BERRE, CAROLINE HERVÉ, FRANÇOISE BUZELIN, CLAIRE USAL, JEAN-PAUL SOULLILLOU, and JACQUES DANTAL

Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité 643 "Immunointervention dans les Allo et Xenotransplantations" and Institut de Transplantation et Recherche en Transplantation (ITERT), Nantes, France; and Service d'Anatomopathologie, CHU Hotel Dieu, Nantes, France

Renal macrophage activation and Th2 polarization precedes the development of nephrotic syndrome in Buffalo/Mna rats.

Background. At 8 weeks, Buffalo/Mna rats spontaneously develop a nephrotic syndrome associated with focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). We have previously demonstrated that this glomerulopathy recurs after renal transplantation, thus supporting the relevance of this rat model to human idiopathic nephrotic syndrome [1]. In this study, we describe renal immune abnormalities which appear in parallel to the initiation and progression of the spontaneous Buffalo/Mna nephropathy.

Methods. Buffalo/Mna rat kidney samples were harvested before (4 weeks) and after the occurrence of proteinuria (at 10, 18, and 24 weeks, and at 12, 15, 18, and 24 months). Renal immune cell populations [total lymphocytes, macrophages, T, B, and natural killer (NK) cells] and the expression kinetics of various related cytokine [transforming growth factor- β (TGF- β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleukin (IL)-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, and IL-13], chemokine [regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)] and T-cell receptor β (TCR β) chain transcripts were studied serially during the course of the disease.

Results. In the Buffalo/Mna kidneys, in parallel to the proteinuria, the focal and segmental glomerular lesions began to develop at 10 weeks (affecting $2.4 \pm 0.8\%$ of glomeruli), increased in number, then in intensity ($10.4 \pm 0.8\%$ at 24 weeks, $14.6 \pm 2.3\%$ at 12 months, and $28.9 \pm 7.4\%$ at 18 months). Before the onset of the disease, at a nonproteinuric stage, the transcript expression analysis revealed a strong production of some macrophage-associated cytokines, particularly TNF- α (350-fold higher than control levels), which was corroborated by monocyte infiltration. A minor T-cell infiltrate (associated with an increase in C β TCR transcripts), with a predominantly Th2 profile and the down-regulation of Th1 cytokines was also observed. These abnormal macrophage and T-cell patterns remained stable after the onset of the disease. No changes in chemokine and

TGF- β transcripts were observed during the initial stages of the disease.

Conclusion. Our data suggest that the Buffalo/Mna rat disease may be the result of an immunologic disorder, involving macrophages and Th2 lymphocytes. We hypothesize that this modified environment could result in the production of a factor deleterious to the glomeruli. Thus, this rat strain could provide a new model for the study of human nephrotic syndrome.

Idiopathic nephrotic syndrome with primary focal segmental glomerular sclerosis (FSGS) is a disease of unknown etiology, whose symptoms include a selective proteinuria and nonspecific lesions with a hyalinosis and synechia between the floculus and Bowman's capsule. Immunosuppressive regimens such as corticoids, cyclosporine A, and cyclophosphamide can influence the disease outcome to some extent (for review see [2]) but at least 20% of patients ultimately require hemodialysis and/or kidney transplantation for end-stage renal failure (ESRF) [3]. In addition, in 25% to 40% of transplanted patients, the initial disease immediately relapses, leading to graft loss in 50% of cases [4]. This immediate recurrence strongly suggests the presence of an albuminuric plasmatic factor(s), a hypothesis that has been strengthened by the beneficial effect of plasmatic exchanges [5–7] and immunoabsorptions [8, 9].

Despite significant recent progress in the understanding of the genetic abnormalities associated with idiopathic nephrotic syndrome [10], the disease mechanisms, particularly those at the disease onset, are unknown. Several animal models of proteinuria have been described, including age-associated nephropathy [11], nephron reduction [12, 13], and toxic-induced nephrosis [14, 15]. However, although these experimental models can help to identify the mechanisms involved in glomerular sclerosis progression, they are not pertinent as models for the initial stages of the human disease. For this reason, we have been studying the Buffalo/Mna rat strain which, at 8 weeks of age, spontaneously develops a selective

Key words: FSGS, idiopathic nephrotic syndrome, rat, Buffalo/Mna, immunologic disorders.

Received for publication December 1, 2004
and in revised form March 16, 2005, and April 13, 2005
Accepted for publication June 10, 2005

© 2005 by the International Society of Nephrology

proteinuria associated with hypoalbuminemia, hyperlipidemia, and glomerular epithelial cell alterations with foot process flattening and cytoplasmic vacuolization at the ultrastructural level [16, 17]. The Buffalo/Mna rats were first reported because they present a spontaneous thymoma [18] regulated by an autosomal-dominant gene [19] associated with muscular weakness and demonstrated to be linked to plasmatic antiryanodine receptor antibodies [20]. Following analysis of genetic segregation, two autosomal-recessive genes were proposed to determine susceptibility to glomerular sclerotic lesions [21]. Both genes are located on chromosome 13, but are separate from the proteinuria gene *Pur 1* located on the long arm of human chromosome 1 [22]. Moreover, neonatal thymectomy experiments have shown that nephrotic syndrome is functionally unrelated to the thymic disease [23]. In the same way, in our hands, thymectomy in adult Buffalo/Mna rats has no effect on their proteinuria (unpublished personal data), suggesting the absence of a direct interaction between the renal disease and that of the thymoma.

In addition to a genetic susceptibility to develop proteinuria [21, 22], the involvement of an extrarenal factor has been demonstrated by our group in a previous study [1]. We showed that the disease recurs on normal kidneys after renal transplantation into Buffalo/Mna recipients whereas the glomerulopathy regresses when a Buffalo/Mna kidney is transplanted into a normal recipient [1].

In this study, we have attempted to characterize the development of Buffalo/Mna nephropathy by analyzing the histologic lesions, the cells infiltrating the diseased kidneys, and the renal cytokine transcript accumulation. We report here that the prealbuminuric stage of the disease is characterized by an early macrophage infiltration and a Th2 polarization. We suggest that these immunologic disorders could be involved in the Buffalo/Mna nephropathy and that these observations may help to understand this rat disease. Such observations may also be related to the human disease and used to elucidate the human pathologic mechanisms.

METHODS

Animals

The Buffalo/Mna rat line, maintained in our laboratory, was originally kindly provided by Dr Saito (Central Experimental Institute, Nokawa, Kawasaki, Japan). All animals were born from a unique couple and bred for at least 10 generations. Five Buffalo/Mna rats were sacrificed at each time point: 4, 10, 18, and 24 weeks and 12, 15, and 18 months. Five inbred, age-matched Wistar-Furth rats [with the same major histocompatibility complex background (MHC) as Buffalo/Mna], obtained from an established colony (Janvier, Le Genest Saint Isle, France), were used as controls and sacrificed at 4, 10, 18, and 24 weeks.

All animals were fed with standard laboratory food. The animal care was in strict accordance with our institutional guidelines.

Proteinuria measurement

The animals were placed in metabolic cages for 24 hours before measurement with free access to drink but without food to avoid contamination of urinary samples. The total urinary protein concentration (g/L) was measured by a colorimetric method using a Hitachi autoanalyzer (Boehringer Mannheim, Grenoble, France). Urinary creatinine (mmol/L) was measured by the Jaffé method. Proteinuria was expressed according to the following formula: proteinuria (g/mmol) = (urinary protein) (g/L)/(urinary creatinine) (mmol/L).

Light microscopic examination

Kidney samples were fixed for 20 minutes in Carnoy solution and then in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Three micro meter sections were stained with hematoxylin and eosin, periodic acid-Schiff (PAS), Masson trichrome, or periodic acid-silver methenamine (PAM). Slides were analyzed in a blind fashion by an independent pathologist. Lesions were estimated and counted in five fields at a 100× magnification.

Immunohistology and quantitative analysis of cellular populations

Kidney pieces from Buffalo/Mna and Wistar-Furth rats were embedded in optimal cutting tissue compound (Tissue Tek) (Miles, Elkhart, IN, USA), snap-frozen in precooled isopentane and stored at -80°C until use. Frozen 6 μm tissue sections were fixed in acetone, permeabilized with a solution of methanol 10% H_2O_2 , incubated with a Biotin Blocking System (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA), then saturated with rat serum diluted 1/10 in phosphate-buffered saline (PBS)/1% bovine serum albumin (BSA) and stained using a three-step indirect immunoperoxidase technique [20]. The primary antibodies were mouse IgG antirat monoclonal antibodies: Ox1-Ox30 (a mix of two anti-CD45 antibodies, a pan-leukocyte marker), R7.3 [anti-T-cell receptor $\alpha\beta$ (anti-TCR $\alpha\beta$)], Ox33 [anti-CD45 receptor antagonist (anti-CD45 RA)], ED-1 (anti-CD68), or 3.2.3 [(anti-CD161 or natural killer receptor (NKR)]. All of these monoclonal antibodies were obtained from the European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), then purified in our laboratory and pretested on healthy rat splenocytes to assess their optimal dilution. Nonspecific staining was taken into account by omission of the first antibody. The secondary antibody used was a rat adsorbed (negligible cross-reactivity) horse biotinylated antimouse IgG (Vector Laboratories, Burlingame,

CA, USA). Finally, tissues sections were incubated with horseradish peroxidase (HRP) streptavidin and developed with "Very Intense Purple" (VIP Kit) (Vector Laboratories).

The cell-infiltrated area was determined by quantitative morphometric analysis [24]. 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 SEM). The percentage of area infiltrate was calculated as follows: [(number of positive cells under grid intersections) \div (total number of grid intersections = 121)] \times 100. The sections were examined at a \times 400 magnification. The accuracy of the technique is proportional to the number of points counted. Thus, 15 fields were counted for each labeled section of high density and 40 fields for sections of low density (<10%). We chose a random start point on a border section and moved from field to field. Each counted field was adjacent to the previous and subsequent field [24]. Counting was scored in a blind fashion by two observers.

RNA extraction and cDNA synthesis

The decapsulated kidneys of each animal were ligatured, cut, immediately snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until used for RNA extraction. Total RNA from kidney pieces was isolated by the guanidium isothiocyanate procedure and purified on a Cesium chloride gradient [25]. Ten micrograms of RNA were reverse-transcribed into cDNA using 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of oligo (dT)₂₅₋₃₀, 10 mmol/L dithiothreitol (DTT), 0.5 mmol/L of each deoxynucleosidetriphosphate (dNTP), 40 U RNasin (Promega, Madison, WI, USA), and 200 U Maloney-murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase in 5 \times first-strand buffer (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). The cDNA synthesis reaction was brought to a final reaction volume of 100 μL .

Relative quantification of mRNA transcripts

The principle of quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using the SYBR Green[®] method has been described previously [26]. Direct detection of PCR products was monitored by measuring the increase in fluorescence due to the binding of the dye labeler SYBR Green[®] to double-stranded DNA. The level of fluorescence, monitored by the ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detection Application program (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), was thus directly proportional to the level of PCR product.

Oligonucleotides and standard construction. Standards were amplified from samples known to contain the given mRNA sequences using specific primers (Table 1). The amplification products were separated

Table 1. Sequences of amplification primers

mRNA	Sequences 5'-3'	Length of amplification product
5' r HPRT	gcgaaagtggaaaagccaagt	76
3' r HPRT	gccacatcaacaggactctgtag	
5' r IL-1 α	agtcaactcggcatgcatg	100
3' r IL-1 α	atagtctgggctggttccac	
5' r IL-2	ccttgtaacagcgcacc	399
3' r IL-2	gccttgacagatggctatcc	
5' r IL-4	ccacctgctgcaacctgt	390
3' r IL-4	aggatgcttttaggcttcc	
5' r IL-10	tcagcactgctatgttgcc	403
3' r IL-10	ccttgctttatttccacagg	
5' r IL-12 p40	gaaacagtgaacctcacctg	261
3' r IL-12 p40	tgcttcaactcaggaaggt	
5' r IL-13	agcaacatcaacaagaacag	320
3' r IL-13	cacaactgaggtccacagct	
5' r IFN- γ	tgatgatgatgaaagaaaga	314
3' r IFN- γ	gattctggtgacagctgggt	
5' r TGF- β	ctactgctcagctccacagaga	279
3' r TGF- β	acctgggcttgccgacc	
5' r TNF- α	cttatctactccaggttctctcaa	204
3' r TNF- α	gagactctccaggtacatgg	
5' r MCP-1	atcaggctctctgtccagct	341
3' r MCP-1	gggtctgaagcttagggt	
5' r RANTES	gcacccctcaocgctcatcct	260
3' r RANTES	tagctcatcctcaaatagttgat	
5' r C β	tctgtgctgaccccattgc	69
3' r C β	ttccctgaccatgtggagct	

Abbreviations are: HPRT, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase; IL, interleukin; INF- γ , interferon- γ ; TGF- β , transforming growth factor- β ; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; RANTES, regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted; C β , constant part of TGF- β chain.

electrophoretically and purified using a gel extraction kit (QIAquick Gel Extraction kit) (Qiagen, Hilden, Germany). The absorbance of each standard at 260 nm and the molecular weight of the cDNA enabled the calculation of the number of copies per milliliter and the preparation of a serial dilution from 10^7 to 10^2 copies per well.

PCR amplification and analysis. Ten microliters of 1/10-diluted cDNA sample were amplified in 25 μL of SYBR Green[®] PCR Core Reagent (Applied Biosystem) with 0.6 U of AmpliTaq Gold polymerase, 0.25 U of Amperase uracyl-H-glycosylase, 200 nmol/L of each dNTP, 300 nmol/L of each primer and 3 mmol/L of MgCl₂, in 10 \times SYBR Green[®] PCR Buffer (1 \times final concentration). Amplifications were performed in an ABI Prism[®] 7700 Sequence Detector (TaqMan) (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA). Each sample was analyzed in duplicate. The number of copies of the cDNA target sequence was deduced from a comparison of the measured fluorescence with the standard curve. To normalize the levels of the target sequences, the quantity of each given transcript was divided by the quantity of housekeeping gene (HPRT) transcripts obtained for each sample.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software. The nonparametric Mann-Whitney test was used to compare ratio values between groups for

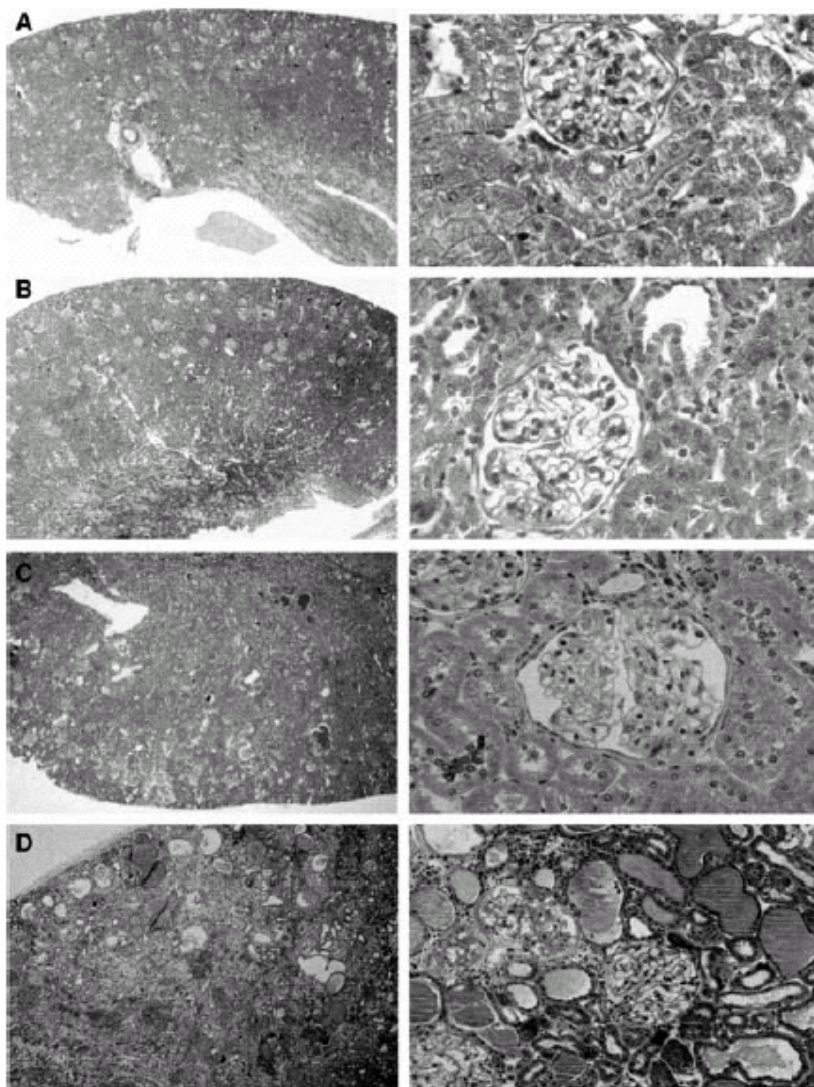


Fig. 1. Light microscopic examination of Buffalo/Mna kidneys during the course of initial disease development ($N = 3$). (A) At 10 weeks, onset of glomerular lesions ($\times 25$ and $\times 400$). (B) At 18 weeks, increase in glomerular lesions and development of tubular lesions ($\times 25$ and $\times 400$). (C) At 12 months, damaged glomeruli were numerous (with the onset of flocculocapsular synechia), sclerotic lesions and tubular dilatations were extensive ($\times 25$ and $\times 400$). (D) At 18 months, microcystic tubular dilatations were numerous. Some glomeruli were completely sclerotic and atrophic, whereas others presented segmental lesions with flocculocapsular synechia or had a subnormal appearance ($\times 25$ and $\times 200$).

each time point and to compare the % of surface area between groups for each point. $P < 0.05$ was considered as significant.

RESULTS

Histologic examination of Buffalo/Mna kidneys during the course of the disease

At 4 weeks, the Buffalo/Mna kidneys showed no glomerular lesions but marked podocyte swelling was apparent. At 10 weeks, glomerular lesions began to appear but remained scarce (affecting only $2.4 \pm 0.8\%$ of the glomeruli) and were not extensive in the flocculi. In addition, dilated tubules were rare and isolated. From 18 weeks to 12 months, glomerular and tubular lesions increased in number and intensity, damaged glomeruli represented successively $6.4 \pm 4.1\%$, $10.4 \pm 0.8\%$ (24 weeks),

Table 2. Histologic evaluation of Buffalo/Mna kidneys at different stages during the course of the disease

Buffalo/Mna	% of damaged glomeruli	Tubular dilatation	Interstitial fibrosis
4 weeks	0 ± 0	0.3 ± 0.6	—
10 weeks	2.4 ± 1.4	3.3 ± 1.2	—
18 weeks	6.4 ± 7.1	2 ± 2	—
24 weeks	10.4 ± 1.4	22 ± 14.9	—
12 months	14.6 ± 4	19.7 ± 7.2	—
15 months	16.3 ± 5.9	42.3 ± 15.6	+/-
18 months	28.9 ± 12.9	56.3 ± 20.5	+
24 months	43.2 ± 27	54.7 ± 30.1	+

Slides were analyzed in a blinded fashion by an independent pathologist. Lesions were estimated and counted in five fields at a $100\times$ magnification. Three series of samples were examined. Results were expressed as mean \pm SE. Under the term "damaged glomeruli," we counted all glomeruli with focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) lesions [i.e., segmental lesions of flocculus, sclerotic areas (\pm extensive), flocculocapsular synechia, or atrophic glomeruli].

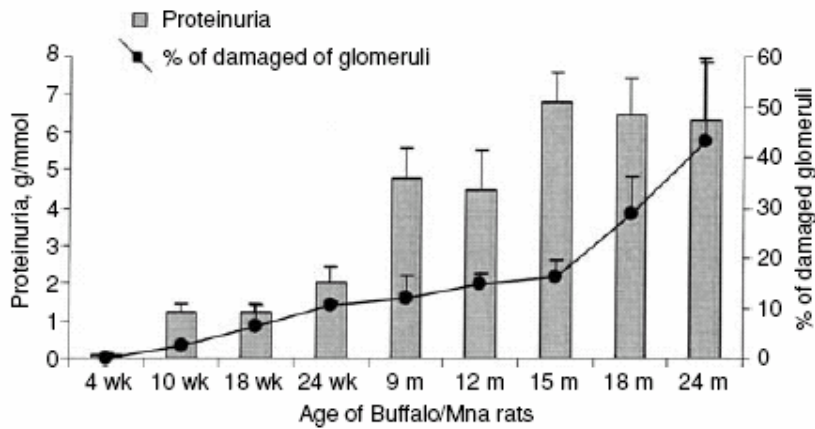


Fig. 2. Parallel evolution of the proteinuria during the course of the disease. Results expressed as grams of urinary proteins/mmol of urinary creatinine \pm SEM ($N = 6$ to 21) and progression of glomerular lesions (results expressed as % of damaged glomeruli \pm SEM) ($N = 3$) (see Table 2).

and $14.6 \pm 2.3\%$ of the total glomeruli (Fig. 1) (Table 2) with the appearance of flocculo-capsular synechia and an increase in the sclerotic area. At 12 months, tubular dilatations were substantial and were either isolated or in clusters. From 15 to 24 months, sclerohyalinosis spread to the flocculi ($16.3 \pm 3.4\%$ of affected glomeruli at 15 months, then $28.9 \pm 7.4\%$ at 18 months and $43.2 \pm 15.6\%$ at 24 months) and was associated with a global glomerular atrophy. Moreover, the onset of a moderate mononuclear lymphoid infiltration was observed at this point (Table 2). Tubular dilatations continued to expand and their disposition in clusters was maximal around 18 to 24 months. In parallel, proteinuria began at 10 weeks, increased regularly until 15 months, then increased more rapidly when the glomerular sclerosis spread throughout the kidney (Fig. 2).

Initially, segmental glomerular lesions result from partial densification of the flocculus. At this level, the basal membranes appeared less defined, then pleated. The capillary lumina became very reduced or even nonexistent, without any endo- or extracapillary hypercellularity. The development of these lesions was associated with flocculo-capsular synechia. These lesions spread to the entire flocculus, leading to small atrophic glomeruli. Basal capillary membranes were completely pleated and squeezed together, leading to a total disappearance of the capillary lumen.

In parallel, proximal tubules, which were only dilated at the beginning, became highly microcystic. These dilatations were clustered. The epithelium of these tubules was flat and their lumen contained voluminous cylinders with a protein aspect.

Quantitative assessment of Buffalo/Mna kidney infiltration

Buffalo/Mna kidneys displayed a global but moderate increase in their total leukocyte population during the course of the disease. In comparison with age-matched, healthy rat kidneys, these values were significantly dif-

ferent at 4, 18, and 24 weeks ($4.6 \pm 0.4\%$ vs. $3.5 \pm 0.3\%$; $6 \pm 0.4\%$ vs. $4.2 \pm 0.2\%$, and $5.9 \pm 0.3\%$ vs. $4.8 \pm 0.15\%$, respectively) ($P < 0.05$) (Figs. 3A and 4, upper panels).

The predominant infiltrating population was the monocyte-macrophage lineage which was significantly higher ($P < 0.01$) than in the controls at 4 weeks ($0.95 \pm 0.23\%$ vs. $0.55 \pm 0.03\%$), 10 weeks ($1.45 \pm 0.16\%$ vs. $0.6 \pm 0.12\%$), 18 weeks ($1.3 \pm 0.2\%$ vs. $0.6 \pm 0.08\%$), and 24 weeks ($1.56 \pm 0.33\%$ vs. $0.6 \pm 0.03\%$) (Figs. 3B and 4, middle panels). On the other hand, the T-cell population present in the Buffalo/Mna kidneys increased and was significantly more represented than in control kidneys from the first month to 10 weeks ($0.45 \pm 0.06\%$ vs. $0.28 \pm 0.01\%$; $0.5 \pm 0.07\%$ vs. $0.3 \pm 0.05\%$; respectively) ($P < 0.05$) (Figs. 3C and 4, lower panels). The levels of B lymphocytes and NK cell populations did not significantly differ between Buffalo/Mna and control rats (data not shown). A trend (albeit non significant) toward a periglomerular and glomerular staining of infiltrating cells was also noted (Fig. 4).

Quantitative analysis of mRNA transcripts in Buffalo/Mna kidneys during the course of the disease

In accordance with the increase in the monocyte population in the Buffalo/Mna kidneys, tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA showed an early and strong accumulation in Buffalo/Mna kidneys at 4 weeks, before the onset of the disease ($1.7 \pm 0.5\%$ vs. $0.05 \pm 0.006\%$) ($P < 0.01$) (Fig. 5). Interleukin (IL)-12 (Fig. 5), IL-1, and IL-6 transcripts (data not shown) were also significantly increased at this time ($P < 0.01$). Transcript accumulations decreased thereafter, albeit remaining significantly elevated at 10 weeks for TNF- α and at 18 weeks for IL-12.

To evaluate the global T-lymphocyte infiltrate and/or activation in the Buffalo/Mna kidney, β chain accumulation was also measured. TCR β chain mRNA was strongly increased as early as 4 weeks ($0.62 \pm 0.17\%$ vs. $0.018 \pm 0.002\%$) ($P < 0.005$) and remained elevated throughout

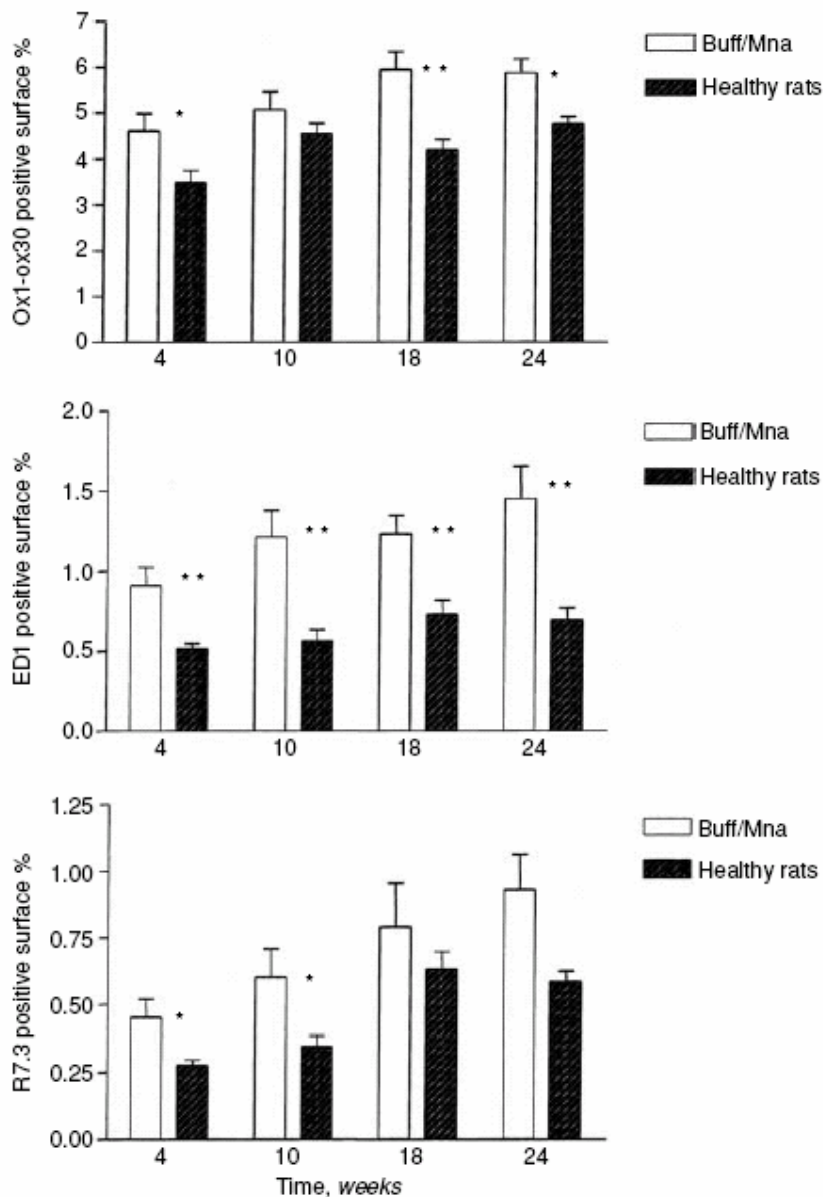


Fig. 3. Kinetics of infiltration by the cellular populations during the course of the initial disease in Buffalo/Mna (Buff/Mna) rats versus control kidneys. Results are expressed as the % (mean \pm SEM) of surface area occupied by positive cells. At each time point, each group consisted of five animals. The control group consisted of age-matched healthy rats. (A) Pan-leukocyte (Ox1-Ox30 antibody) populations were examined. (B) Monocyte-macrophage ED-1 antibody populations were examined. (C) T lymphocytes (R7.3 antibody) were examined. *Significant difference <0.05 between the two groups; ** Significant difference <0.01 .

the course of the disease (at 10 weeks $0.2 \pm 0.08\%$ vs. $0.04 \pm 0.003\%$ and at 18 weeks $0.243 \pm 0.03\%$ vs. $0.035 \pm 0.002\%$) ($P < 0.005$) (Fig. 6). The activation profile of the T-cell population present in the kidney sections was then measured for Th1 [IL-2 and interferon- γ (IFN- γ)] and Th2 cytokine transcripts (IL-4, IL-10, and IL-13). Interestingly, IL-2 and IFN- γ mRNA was weak until 24 weeks (and inferior to controls), indicating no Th1 polarization during the onset of the disease (data not shown). In contrast, at 4 weeks, Th2-related IL-10 and IL-13 transcripts were significantly higher in the Buffalo/Mna rats than in the controls (IL-10 $0.075 \pm 0.001\%$ vs. $0.002 \pm 0.0004\%$) ($P < 0.005$) (IL13 $0.006 \pm 0.002\%$ vs. $0.001 \pm$

0.0002%) ($P < 0.05$) while IL-10 mRNA remained significantly more accumulated in Buffalo/Mna at 18 weeks ($P < 0.005$) and 24 weeks ($P < 0.01$) (Fig. 7). However, despite being significant, the level of IL-10 and IL-13 transcript accumulation remained low. In addition, as is often the case in rats, the level of IL-4 mRNA was at the technical limit of the SYBR Green[®] method and thus considered as negligible in both groups.

Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) chemokine transcripts were also measured. Both types of mRNA were decreased at 4 weeks ($0.01 \pm 0.004\%$ vs. $0.145 \pm 0.01\%$; $0.0001 \pm 0.0002\%$

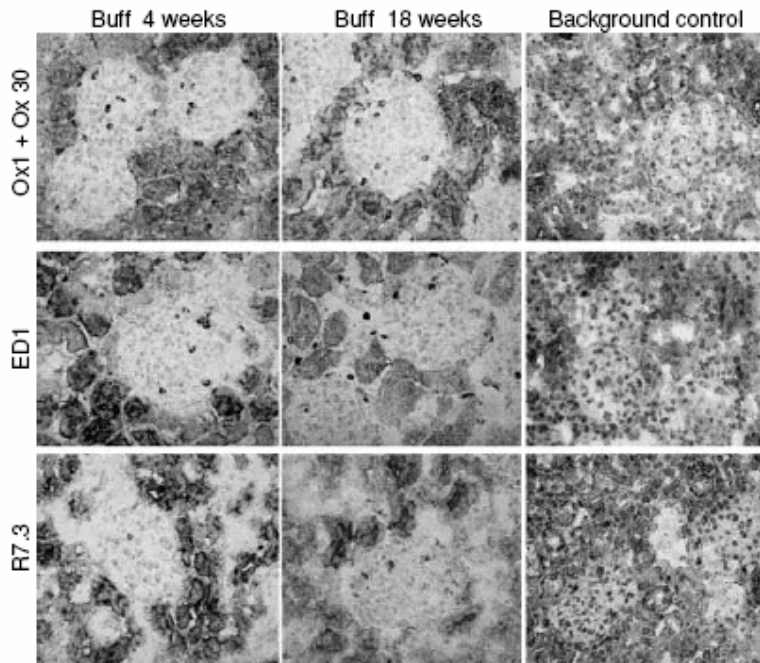


Fig. 4. Representative immunostaining of renal cellular infiltration during the course of the Buffalo/Mna (Buff/Mna) disease ($N = 5$). Upper panels show OX1 + OX30 positive staining. Middle panels show ED-1+ cells. Lower panels show R7.3⁺ populations, at 4 and 18 weeks. Background control pictures are of nonspecific staining taken into account by omission of the first antibody (magnification for each picture was $\times 400$).

vs. $0.17 \pm 0.03\%$; respectively) ($P < 0.005$). Whereas RANTES mRNA was lower only at the early time point (4 weeks), MCP-1 mRNA remained lower at all times ($P < 0.05$) (Fig. 8). Similarly, transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) mRNA levels were low in the early phases of the disease (at 4 weeks $0.04 \pm 0.0008\%$ vs. $6.26 \pm 0.65\%$; at 10 weeks $1.4 \pm 0.67\%$ vs. $6.6 \pm 0.45\%$) ($P < 0.005$), but reverted to normal levels at 18 weeks (Fig. 9).

Finally, we performed immunohistology to define which cell types were responsible for the production of the cytokines measured in the Buffalo/Mna kidneys. Unfortunately, the staining revealed by this technique was very weak, thus making it impossible to identify the origin of the cytokine production. Furthermore, we were unable to demonstrate that certain cytokines (such as IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , and TGF- β) were produced by resident renal cells, which would expect to be easier to detect.

DISCUSSION

In this study, we have shown that initial glomerular lesions of the spontaneous Buffalo/Mna disease, as assessed by proteinuria and histologic examination, developed progressively from 10 weeks until 12 months (Fig. 1) (Table 2). After 1 year, the sclerohyalinosis spread inside the flocculi. These glomerular changes were paralleled by the development of proteinuria, which began at 10 weeks, increased until 15 months, and then increased rapidly when glomerular sclerosis spread throughout the kidney (Fig. 2). In addition, the number of total leukocytes of Buffalo/Mna kidneys was increased compared to that in the controls. This increase was principally due

to an early rise in monocyte infiltration and a minor T-cell infiltrate, which preceded the occurrence of proteinuria and the ultrastructural podocyte alterations (data not shown). Moreover, cytokines typically produced by monocytes/macrophages, TNF- α , IL-12, IL-6, and IL-1, were significantly increased at the very onset of the disease (4 weeks), before the appearance of proteinuria and histologic lesions. The subsequent levels of these cytokines remained higher than in the control group. Similarly, an increase in TCR C β chain transcripts was observed early-on during the course of the disease. This increase could be related to T-cell activation, rather than an increase in the number of these cells (with regards to the mild T-cell infiltrate). Finally, despite this T-cell infiltrate, IL-2 and IFN- γ (Th1) transcripts were only barely detectable and were even lower than in the control group. In contrast, Th2-related cytokines (IL-10 and IL-13) were increased.

This finding of an early increase in TNF- α and Th2-related cytokines, in addition to our previous demonstration of the involvement of an extrarenal factor in this model of glomerulonephritis, highlights the Buffalo/Mna nephropathy as a relevant model for human idiopathic nephrotic syndrome. Indeed, in humans, TNF- α has been reported to be increased in the blood and urine of FSGS patients [27, 28] and TNF- α mRNA levels were elevated in the monocytes of these patients [28]. TNF- α has also been found to be increased in monocyte supernatants in puromycin aminonucleoside nephropathy (PAN) [29], and the injection of TNF- α into rats can trigger glomerular injury [30, 31]. In the Buffalo/Mna rats, the peak of

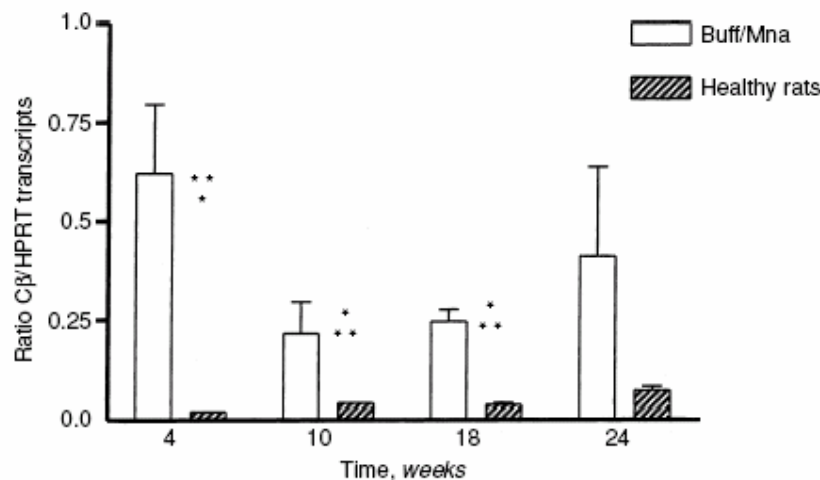
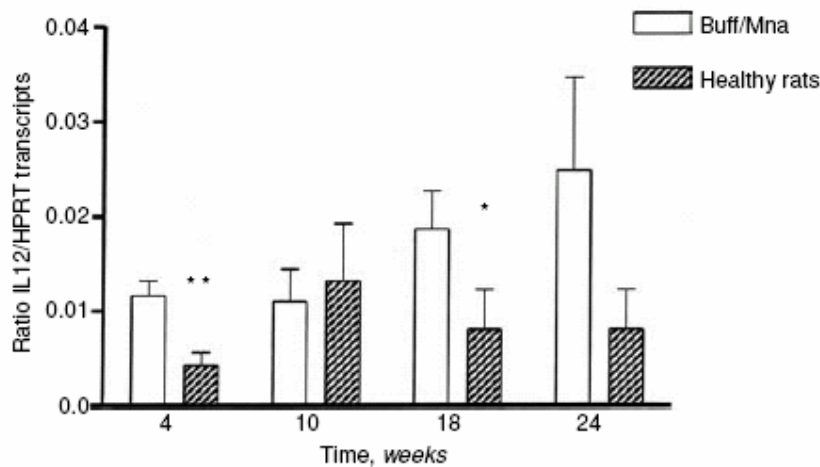
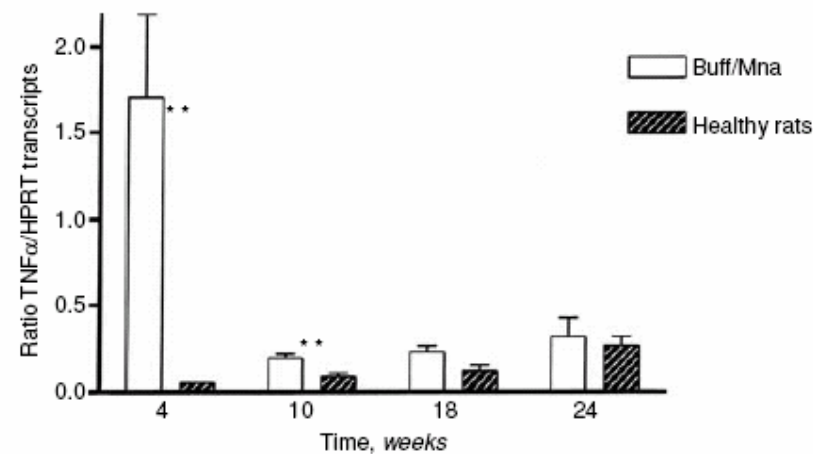


Fig. 5. Kinetics of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL)-12 mRNA expression in Buffalo/Mna (Buff/Mna) kidneys versus healthy kidneys during the initial course of the disease. Results are expressed as means \pm SEM of the ratio of the number of cytokine transcripts to the number of HPRT transcripts for five animals at each time point. *Significant difference <0.05 between the two groups; **Significant difference <0.01 ; ***Significant difference <0.005 .

Fig. 6. Kinetics of C β mRNA expression in Buffalo/Mna (Buff/Mna) kidneys versus healthy kidneys during the initial course of the disease. Results are expressed as means \pm SEM of the ratio of the number of cytokine transcripts to the number of HPRT transcripts for five animals at each time point. *Significant difference <0.05 between the two groups; **Significant difference <0.01 ; ***Significant difference <0.005 .

TNF- α expression at 4 weeks occurred clearly before the onset of the nephropathy and could thus be an initiating factor of the glomerulonephritis. In the same manner, an increase in IL-12 production by the monocytes

of idiopathic nephrotic syndrome patients has also been described [32], but this was not the case for IL-6 [33, 34]. However, IL-6 has been associated with glomerular damage in glomerulonephritis [33]. The role of macrophages

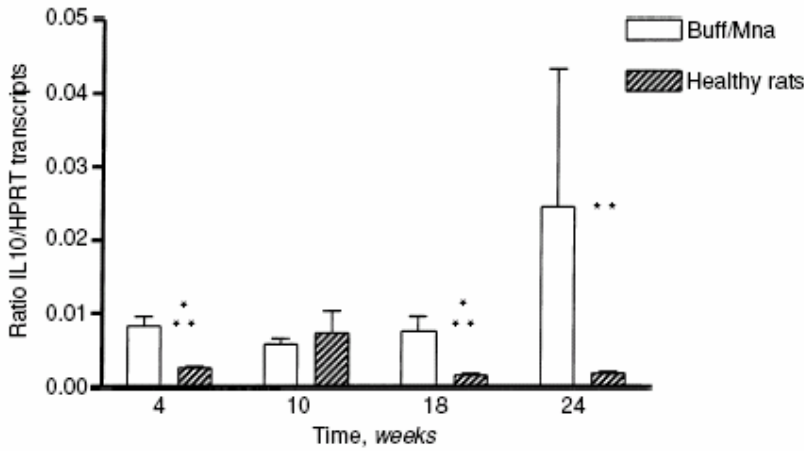


Fig. 7. Kinetics of interleukin (IL)-10 mRNA expression in Buffalo/Mna (Buff/Mna) kidneys versus controls kidneys during the initial course of the disease. Results are expressed as means \pm SEM of the ratio of the number of cytokine transcripts to the number of HPRT transcripts for five animals at each time point. *Significant difference <0.05 between the two groups; **Significant difference <0.01 ; ***Significant difference <0.005 .

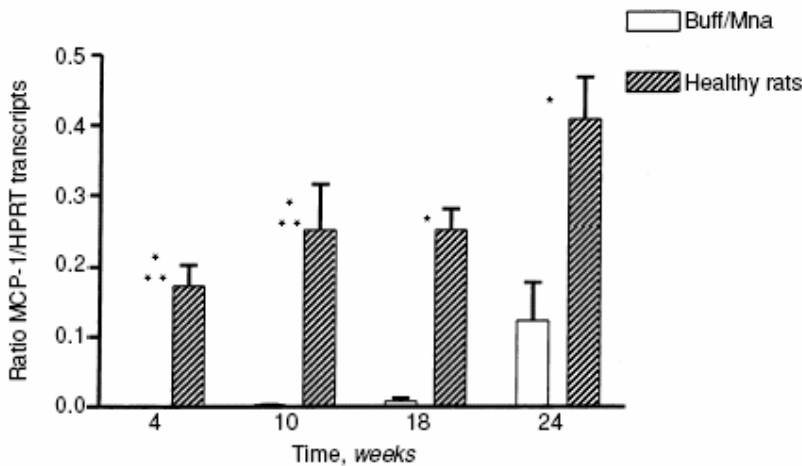
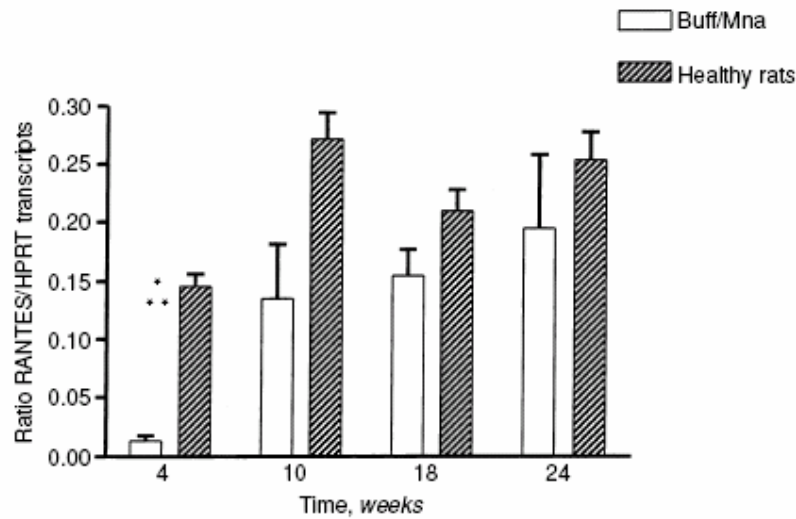


Fig. 8. Kinetics of regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) chemokine mRNA expression in Buffalo/Mna (Buff/Mna) kidneys versus controls kidneys during the initial course of the disease. Results are expressed as means \pm SEM of the ratio of the number of cytokine transcripts to the number of HPRT transcripts for five animals at each time point. *Significant difference <0.05 between the two groups; **Significant difference <0.01 ; ***Significant difference <0.005 .

that release these cytokines [35] can thus be suspected in the onset of the Buffalo/Mna disease. In the human disease, macrophages, named foam cells, were abundant in the lesion area [36], as well as in the PAN model. Their re-

cruitment is favored by nephrotic syndrome-associated lipidic disorders and the macrophage-related production of TGF- β [37] may contribute to the late phases of glomerulosclerosis [38].

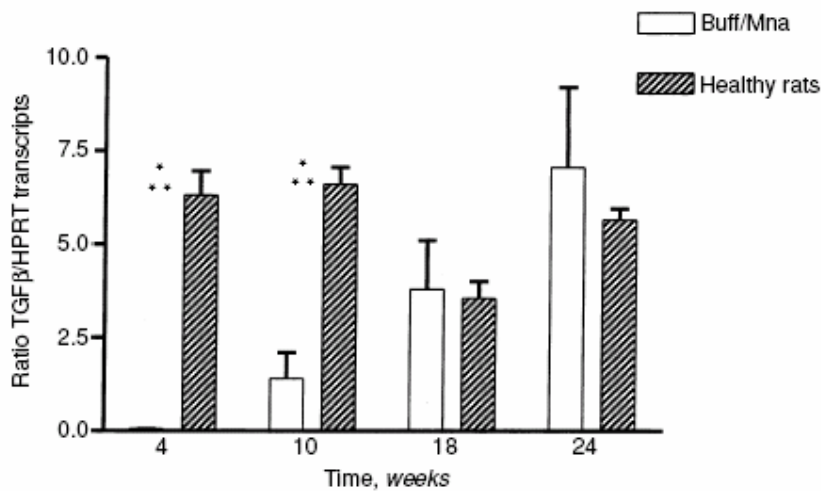


Fig. 9. Kinetics of transforming growth factor- β (TGF- β) mRNA expression in Buffalo/Mna (Buff/Mna) kidneys versus controls kidneys during the initial course of the disease. Results are expressed as means \pm SEM of the ratio of the number of cytokine transcripts to the number of HPRT transcripts for five animals at each time point. *Significant difference <0.05 between the two groups; **Significant difference <0.01 ; ***Significant difference <0.005 .

The cytokine profile in the peripheral blood lymphocytes (PBL) of idiopathic nephrotic syndrome patients has also been recently studied [39]. Despite initial reports showing an increase in plasmatic or urinary IL-2 and sIL-2R [34, 40–43], a Th2 profile appeared to predominate [44, 45], with a considerable rise in IL-13 [39, 46, 47] as well as IL-4 [47, 48]. These findings are in agreement with the known association of idiopathic nephrotic syndrome with atopic phenomena [49, 50] and an abnormal isotypic switch (high levels of IgE) [51]. Our study in the Buffalo/Mna rats revealed a very low Th1 profile and, despite a weak IL-4 expression (frequently described in rats, even in the context of Th2-mediated disease), an increase in IL-13 and IL-10. An active role for T cells in this model is suggested by the presence of this Th2 profile before the onset of proteinuria and podocyte injury. In addition, the down-regulation of the chemokines tested (RANTES and MCP-1) may be related to this cytokine environment (IL-4 and IL-10 inhibit while IFN- γ induces RANTES production) [52]. In humans, an increase in plasmatic and lymphocytic IL-8 has been reported in idiopathic nephrotic syndrome, but the rat IL-8 counterpart has never really been defined and therefore has not yet been tested [53]. Finally, our study showed that TGF- β mRNA does not accumulate in the early phase of the Buffalo/Mna disease but may promote the late accumulation of extracellular matrix. An increase in urinary TGF- β has been found in FSGS patients in the late phases of the disease, where sclerotic lesions were advanced [54]. However, whereas the role of TGF- β in the progression of various glomerular diseases is well known [55], its role at a very early stage of the disease remains elusive.

The role of thymic hyperplasia in the Buffalo/Mna renal disease is questionable. We measured the blood formula of 20 Buffalo/Mna rats and 20 healthy rats of other strains (Wistar-Furth, Lewis 1A, Lewis 1W, Sprague-Dawley). We found a roughly similar leukocyte number

but a slight increase in the percentage of blood lymphocytes, as also reported by other groups [56]. This increase could partly explain the increase in T lymphocytes in Buffalo/Mna kidneys, but not the rise in monocytes or the activation of monocytes and T lymphocytes within the Buffalo/Mna kidneys. We cannot exclude the possibility that these expanded “thymic” lymphocytes, which have been described as being phenotypically and functionally unchanged [56, 57], explain the increased number of T cells in the Buffalo/Mna kidneys. Nevertheless, neonatal [23] or adult thymectomy (personal unpublished data) have no effect on proteinuria and Buffalo/Mna nephrotic syndrome, thus suggesting that this nephropathy is not secondary to or dependent on the thymic abnormalities.

Idiopathic nephrotic syndrome represents a heterogeneous group of glomerular disorders in humans, with different outcomes depending on the response to steroid therapy and the possibility of recurrence after transplantation. Furthermore, recent progress in understanding the putative mechanisms of acquired idiopathic nephrotic syndrome suggests two caricatural forms of steroid-resistant nephrotic syndrome: an “immune mediated” form and a form related to genetic changes and characterized by architectural podocyte cytoskeleton alterations. The Buffalo/Mna disease is resistant to steroid treatment (unpublished data) [16] and previous studies have shown a genetic predisposition to proteinuria in this strain regulated by two autosomal-recessive genes. One locus was identified as Pur1 on chromosome 13 that is syntenic to the long arm of chromosome 1 in humans (which contains the NPSH2 gene) [21]. However, the podocin sequence in the Buffalo/Mna rats is normal [abstract; Morita et al, ASN 2002, SU-PO297] and the role of an extrarenal factor in the development of proteinuria suggests that the genetic background represents rather a susceptibility factor for proteinuria development. In this study, we have shown that macrophages and activated T lymphocytes

are likely to be involved in Buffalo/Mna disease pathogenesis. The early infiltration by these cells and the simultaneous expression of their respective products did not enable the population responsible for the initiation of the injury process to be defined. The production of a factor toxic for the glomeruli, as suggested by the recurrence of the initial disease after transplantation, which is related to the presence of the mononuclear infiltrate, remains elusive.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partly supported by the Fondation pour la Recherche Médicale by the Fondation Progreffe and the Fondation du Rein/Amgen. We thank Joanna Ashton-Chess for editing the manuscript.

Reprint requests to Professor Jacques Dantal, INSERM U643, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France.
E-mail: jacques.dantal@chu-nantes.fr

REFERENCES

- LE BERRE L, GODFRIN Y, GUNHTER E, et al: Extrarenal effects on the pathogenesis and relapse of idiopathic nephrotic syndrome in Buffalo/Mna rats. *J Clin Invest* 109:491-98, 2002
- KORBET SM: Management of idiopathic nephrosis in adults, including steroid-resistant nephrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 4:169-176, 1995
- D'AGATI V: The many masks of focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 46:1223-1241, 1994
- DANTAL J, GIRAL M, HOURMANT M, SOULILLOU JP: Glomerulonephritis recurrences after kidney transplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 4:146-154, 1995
- DANTAL J, BAATARD R, HOURMANT M, et al: Recurrent nephrotic syndrome following renal transplantation in patients with focal glomerulosclerosis. A one-center study of plasma exchange effects. *Transplantation* 52:827-831, 1991
- COCHAT P, KASSIR A, COLON S, et al: Recurrent nephrotic syndrome after transplantation: Early treatment with plasmapheresis and cyclophosphamide. *Pediatr Nephrol* 7:50-54, 1993
- 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, et al: 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, et al: Antihuman immunoglobulin affinity immunoadsorption strongly decreases proteinuria in patients with relapsing nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 9:1709-1715, 1998
- POLLAK MR: The genetic basis of FSGS and steroid-resistant nephrosis. *Semin Nephrol* 23:141-146, 2003
- KUIPERS 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
- OLIVIER J, SIMONS J, TROY J, et al: Proteinuria and impaired glomerular permselectivity in uninephrectomized fawn-hooded rats. *Am J Physiol* 267:F917-F925, 1994
- VAN GOOR H, FIDLER V, WEENING JJ, GROND J: Determinants of focal and segmental glomerulosclerosis in the rat after renal ablation. Evidence for involvement of macrophages and lipids. *Lab Invest* 64:754-765, 1991
- BERTANI T, POGGI A, POZZONI R, et al: Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest* 46:16-23, 1982
- WHITESIDE CI, CAMERON R, MUNK S, LEVY J: Podocytic cytoskeletal disorganization and basement-membrane detachment in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* 142:1641-1653, 1993
- KATO F, WATANABE M, MATSUYAMA M: Nephrotic syndrome in spontaneous thymoma rats, Buffalo/Mna. *Biomed Res* 4:105-110, 1983
- NAKAMURA T, OITE T, SHIMIZU F, et al: Sclerotic lesions in the glomeruli of Buffalo/Mna rats. *Nephron* 43:50-55, 1986
- MATSUYAMA M, NAGAYO T: Development of thymoma and myasthenia in Buffalo/Mna rats. Proceeding of the Japanese Cancer Association, 36th Annual Meeting, 30, 1977
- MATSUYAMA M, YAMADA C, HIAI H: A single dominant susceptible gene determines spontaneous development of thymoma in BUF/Mna rat. *Jpn J Cancer Res* 77:1066-1068, 1986
- IWASA K, KOMAI K, TAKAMORI M: Spontaneous thymoma rat as a model for myasthenic weakness caused by anti-ryanodine receptor antibodies. *Muscle Nerve* 21:1655-1660, 1998
- MATSUYAMA M, OGIU T, KONTANI K, et al: Genetic regulation of the development of glomerular sclerotic lesions in the BUF/Mna rat. *Nephron* 54:334-337, 1990
- MURAYAMA S, YAGYU S, HIGO K, et al: A genetic locus susceptible to the overt proteinuria in BUF/Mna rat. *Mamm Genome* 9:886-888, 1998
- NAKAMURA T, MATSUYAMA M, KOJIMA A, et al: The effect of thymectomy on the development of nephropathy in spontaneous thymoma rats of the BUF/Mna strain. *Clin Exp Immunol* 71:350-352, 1988
- MCWHINNIE DL, THOMPSON JF, TAYLOR HM, et al: Morphometric analysis of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labeling in sequential human renal allograft biopsies. *Transplantation* 42:352-358, 1986
- CHIRGWIN JM, PRZYBYLA AE, MACDONALD RJ, RUTTER WJ: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294-5299, 1979
- GAGNE K, BROUARD S, GIRAL M, et al: Highly altered V β repertoire of T cells infiltrating long-term rejected kidney allografts. *J Immunol* 164:1553-1563, 2000
- SURANYI MG, GUASCH A, HALL BM, MYERS BD: Elevated levels of tumor necrosis factor- α in the nephrotic syndrome in humans. *Am J Kidney Dis* 21:251-259, 1993
- BUSTOS C, GONZALEZ E, MULEY R, et al: Increase of tumour necrosis factor α synthesis and gene expression in peripheral blood mononuclear cells of children with idiopathic nephrotic syndrome. *Eur J Clin Invest* 24:799-805, 1994
- GOMEZ-CHIARRI M, ORTIZ A, LERMA JL, et al: Involvement of tumor necrosis factor and platelet-activating factor in the pathogenesis of experimental nephrosis in rats. *Lab Invest* 70:449-459, 1994
- BERTANI T, ABBATE M, ZOJA C, et al: Tumor necrosis factor induces glomerular damage in the rabbit. *Am J Pathol* 134:419-430, 1989
- ORTIZ A, EGIDO J: Is there a role for specific anti-TNF strategies in glomerular diseases? *Nephrol Dial Transplant* 10:309-311, 1995
- MATSUMOTO K, KANMATSUSE K: Increased IL-12 release by monocytes in nephrotic patients. *Clin Exp Immunol* 117:361-367, 1999
- HORII Y, IWANO M, HIRATA E, SHIKI M, et al: Role of interleukin-6 in the progression of mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int (Suppl 39):S71-S75*, 1993
- DANIEL V, TRAUTMANN Y, KONRAD M: T-lymphocyte populations, cytokines and other growth factors in serum and urine of children with idiopathic nephrotic syndrome. *Clin Nephrol* 47:289-297, 1997
- MARTIN A, MOLINA A, BRICIO T, MAMPASO F: Passive dual immunization against tumour necrosis factor- α (TNF- α) and IL-1 β maximally ameliorates acute aminonucleoside nephrosis. *Clin Exp Immunol* 99:283-288, 1995
- MAGIL AB, COHEN AH: Monocytes and focal glomerulosclerosis. *Lab Invest* 61:404-409, 1989
- KEES-FOLTS D, DIAMOND JR: Relationship between hyperlipidemia, lipid mediators, and progressive glomerulosclerosis in the nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 13: 365-375, 1993
- DING G, PESEK-DIAMOND I, DIAMOND JR: Cholesterol, macrophages, and gene expression of TGF- β 1 and fibronectin during nephrosis. *Am J Physiol* 264:F577-F584, 1993
- YAP HK, CHEUNG W, MURUGASU B, et al: Th1 and Th2 cytokine mRNA profiles in childhood nephrotic syndrome: evidence for increased IL-13 mRNA expression in relapse. *J Am Soc Nephrol* 10:529-537, 1999

40. JORDAN SC, QUERFELD U, TOYODA M, PREHN J: Serum interleukin-2 levels in a patient with focal segmental glomerulosclerosis. Relationship to clinical course and cyclosporin A therapy. *Pediatr Nephrol* 4:166-168, 1990
41. NEUHAUS TJ, WADHWA M, CALLARD R, BARRATT TM: Increased IL-2, IL-4 and interferon-gamma (IFN-gamma) in steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Clin Exp Immunol* 100:475-479, 1995
42. HULTON SA, SHAH V, BYRNE MR, et al: Lymphocyte subpopulations, interleukin-2 and interleukin-2 receptor expression in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 8:135-139, 1994
43. INGULLI E, HARMON W, ARBUS G: Alterations in interleukins during the active phase of idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 33:358, 1993
44. 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* 13:1238-1247, 2002
45. GRIMBERT 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* 198:797-807, 2003
46. KIMATA H, FUJIMOTO M, FURUSHO K: Involvement of interleukin (IL)-13, but not IL-4, in spontaneous IgE and IgG4 production in nephrotic syndrome. *Eur J Immunol* 25:1497-1501, 1995
47. VAN DEN BERG JG, ATEN J, CHAND MA, et al: Interleukin-4 and interleukin-13 act on glomerular visceral epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 11:413-422, 2000
48. CHO BS, YOON SR, JANG JY, et al: Up-regulation of interleukin-4 and CD23/FcepsilonRII in minimal change nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 13:199-204, 1999
49. LAGRUE G, LAURENT J, BELGHITI D: [Immunopathology of lipid nephrosis]. *Nephrologie* 3:40-45, 1982
50. LAURENT J, ROSTOKER G, ROBEVA R, et al: Is adult idiopathic nephrotic syndrome food allergy? Value of oligoantigenic diets. *Nephron* 47:7-11, 1987
51. LAGRUE G, LAURENT J, HIRBEC G, et al: Serum IgE in primary glomerular diseases. *Nephron* 36:5-9, 1984
52. MARFAING-KOKA A, DEVERGNE O, GORGONE G, et al: Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13. *J Immunol* 154:1870-1878, 1995
53. GARIN EH, BLANCHARD DK, MATSUSHIMA K, DJEU JY: IL-8 production by peripheral blood mononuclear cells in nephrotic patients. *Kidney Int* 45:1311-1317, 1994
54. KANAI H, MITSUHASHI H, ONO K, et al: Increased excretion of urinary transforming growth factor beta in patients with focal glomerular sclerosis. *Nephron* 66:391-395, 1994
55. BRUIJN JA, ROOS A, DE GEUS B, DE HEER E: Transforming growth factor-beta and the glomerular extracellular matrix in renal pathology. *J Lab Clin Med* 123:34-47, 1994
56. EZAKI T, KAWATSU R, MATSUNO K, KOTANI M: Characterization of intrathymic and extrathymic T cell development in spontaneous thymoma Buffalo/Mna rats. *Thymus* 16:67-87, 1990
57. HIROKAWA K, UTSUYAMA M, KASAI M, et al: Age-related hyperplasia of the thymus and T-cell system in the Buffalo rat. Immunological and immunohistological studies. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 59:38-47, 1990

A-2 Résultats complémentaires et discussion de l'article 1

Dans cette étude, nous avons pu étudier grâce à un modèle animal spontané de SNI, le rat Buffalo/Mna, les événements immuns précédant l'apparition de la protéinurie et des lésions rénales. Ce rat présente, avant le déclenchement de sa maladie, un contingent lymphocytaire intra rénal majoritairement macrophagique et dans une moindre mesure lymphocytaire T. Le terme d'infiltrat n'est pas très approprié dans ce modèle : nous observons bien la présence de cellules infiltrant le greffon mais en quantité insuffisante pour la qualifier d'infiltrat. Cependant, pour simplifier l'exposé, ce terme sera utilisé tout au long de la discussion.

L'expression intra-rénale de transcrits de cytokines produits par les monocytes/macrophages activés tels que le $\text{TNF}\alpha$, l'IL-12, l'IL-6 et l'IL-1 est également augmentée précocément, tout comme l'expression de cytokines de type Th2 (IL-10 et IL-13) suggérant que l'infiltrat lymphocytaire observé est plutôt de type Th2.

Parmi ces cytokines, le $\text{TNF}\alpha$ a été décrit comme augmenté dans le sang et l'urine de patients SNI/HSF (Suranyi et al. 1993) et l'expression de son ARNm est augmentée dans les monocytes de ces mêmes patients (Bustos et al. 1994). Expérimentalement, l'injection de $\text{TNF}\alpha$ à des rats peut engendrer une atteinte glomérulaire et une protéinurie (Bertani et al. 1989; Ortiz et al. 1995). Afin de vérifier si le $\text{TNF}\alpha$ était directement responsable de l'apparition des lésions dans notre modèle, nous avons traité les rats Buffalo/Mna en préventif avec un anticorps anti- $\text{TNF}\alpha$ (15 mg/Kg/j) puis nous avons mesuré la protéinurie. Les résultats préliminaires sont indiqués sur la figure 18.

A la dose et à la fréquence utilisées, le traitement n'empêche pas l'apparition de la protéinurie chez le rat. On peut cependant s'interroger sur l'efficacité de l'anticorps à bloquer la production de $\text{TNF}\alpha$, notamment au niveau rénal, et sur la durée d'administration.

La durée du traitement utilisée dans un premier temps semble assez longue pour couvrir la période d'apparition du pic de production du $\text{TNF}\alpha$, mais nous ne savons pas si la dose utilisée est suffisante. Les rats traités peuvent également présenter des phénomènes d'immunisation contre l'anticorps et le dégrader. Il est encore trop tôt pour conclure que l'augmentation des transcrits de $\text{TNF}\alpha$ observée dans le rein n'est pas directement la cause de l'atteinte. Cependant, ce pic de transcrits reflète une activation macrophagique pouvant conduire à la production locale d'un autre facteur toxique pour le podocyte.

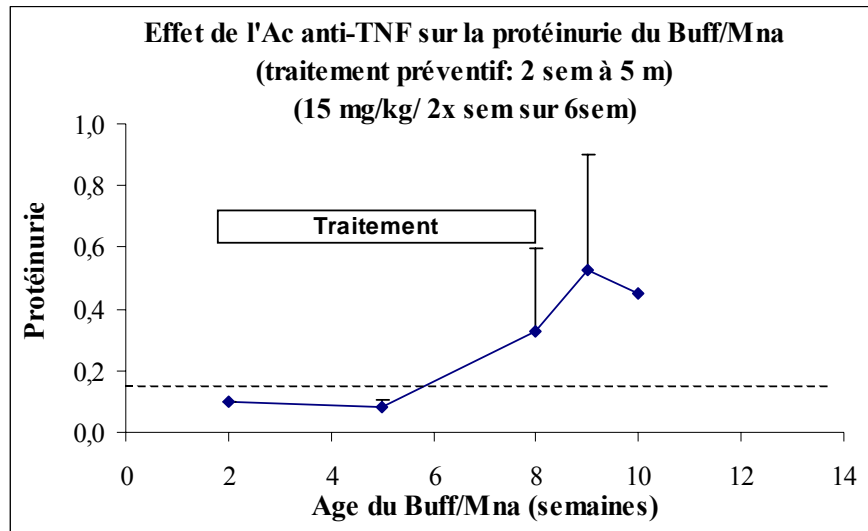


Figure 18 : Effet du traitement préventif par l'anticorps anti-TNF α sur la protéinurie (g/mmol) du rat Buffalo/Mna. L'anticorps a été administré à une dose de 15mg/Kg/j, 2 fois par semaine pendant 6 semaines chez 5 rats Buffalo agés de 2 semaines et non protéinuriques.

Dans la maladie humaine, les macrophages sont abondants au niveau des lésions (Magil et al. 1989). Leur recrutement est favorisé grâce à la présence d'anomalies lipidiques (Kees-Folts et al. 1993) et la production locale de TGF β par les macrophages pourrait contribuer à la glomérulosclérose (Ding et al. 1993). Dans notre étude, nous avons montré que l'ARNm du TGF β n'est pas accumulé dans la phase précoce de la maladie du Buffalo/Mna mais il pourrait jouer un rôle dans l'accumulation tardive de matrice extracellulaire. Bien que cette cytokine joue un rôle dans la progression de plusieurs maladies glomérulaires (Bruijn et al. 1994), elle ne semble pas être à l'origine du développement initial des lésions dans notre modèle.

Une étude assez récente a rapporté dans des biopsies de patients récidivant leur SNI/HSF après transplantation rénale, la présence de podocytes dérégulés exprimant des épitopes de cytokératines ainsi que des marqueurs macrophagiques tels que le CD16 et le HLA-DR (Bariety et al. 2001). Le signal conduisant à cette transdifférenciation podocytaire est encore inconnu. L'augmentation du marquage macrophagique observé dans le rein des rats buffalo (ED-1) pourrait correspondre à un marquage podocytaire et non à un infiltrat. Il serait intéressant de vérifier si les glomérules isolés de

rein de rat Buffalo expriment ED1 à des temps précoces ou si des podocytes en culture exposés à du sérum de rat Buffalo expriment le marqueur macrophagique murin F4/80.

Parallèlement à l'infiltrat macrophagique, nous avons également mis en évidence la présence d'un infiltrat lymphocytaire précoce de type plutôt Th2. L'infiltrat lymphocytaire dans la maladie humaine est quasi-inexistant chez l'homme. En périphérie, l'étude des cytokines produites par les PBMC de patients présentant un SNI tend à montrer un profil plutôt Th2, avec une augmentation de l'IL-13 (Kimata et al. 1995; Yap et al. 1999) et de l'IL-4 (Cho et al. 1999; Van Den Berg et al. 2000). Nous avons réalisé, en parallèle de notre étude, un phénotypage des populations périphériques chez le rat Buffalo/Mna à l'état non protéinurique et à différents niveaux de protéinurie. Trois rats Lewis 1W servent de contrôle (figure 19). Peu d'animaux ont été étudiés mais les résultats sont assez intéressants et mériteraient confirmation.

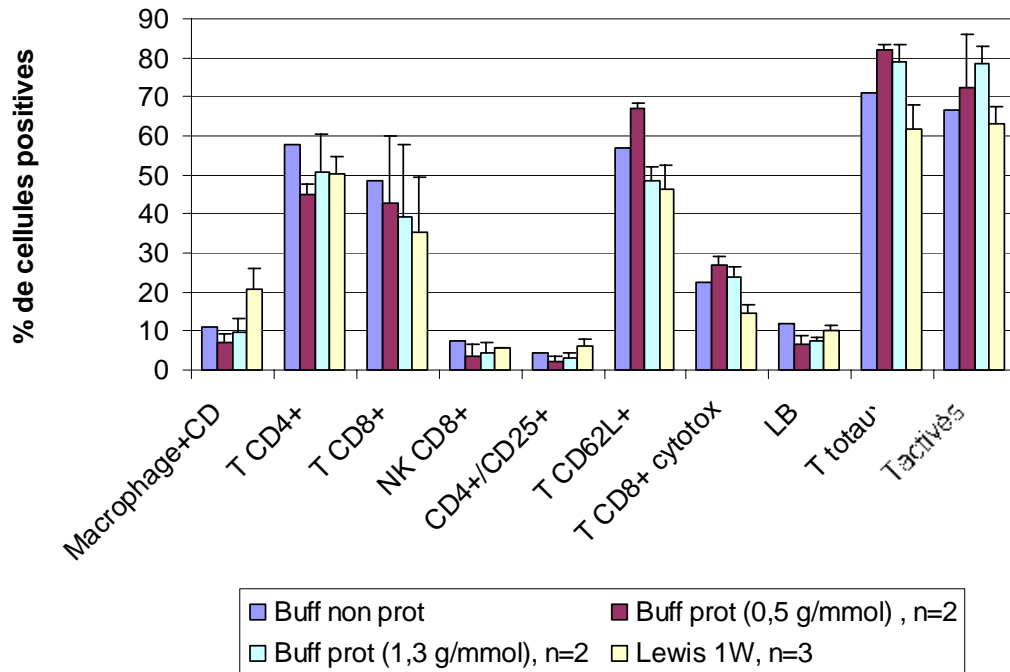


Figure 19 : Phénotypage par cytométrie en flux des différentes populations périphériques exprimées chez les rats Buffalo/Mna non protéinuriques (Buff non prot) et à différents degrés de protéinurie (Buff prot) et chez les rats contrôles Lewis 1W.

CD : Cellules Dendritiques, LB : Lymphocytes B

Globalement, les rats Buffalo, quelque soit leur degré de protéinurie, expriment une proportion plus faible en périphérie de macrophages et cellules dendritiques que les rats LEW 1W. D'autre part, le niveau de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (anticorps 3.4.1) et de lymphocytes T activés semblent plus élevé chez les rats Buffalo/Mna protéinuriques. La population T CD62L⁺

semble également augmentée en périphérie à des temps précoces (non prot et 0.5), pouvant traduire une production plus importante de lymphocytes T naïfs par le thymus, augmentation déjà décrite chez le Buffalo/Mna dans une autre publication (Hirokawa et al. 1990). Il est cependant difficile de conclure sur cette étude des populations périphériques étant donné que ce rat présente différentes maladies et une pathologie thymique. De plus, la thymectomie néonatale ou adulte n'a pas d'influence sur le développement ou la progression de la protéinurie du rat Buffalo/Mna (Nakamura et al. 1988), suggérant que les anomalies thymiques, et par conséquent les T naïfs, observées précocement ne sont pas directement responsables de l'apparition des lésions.

Bien entendu il ne faut pas perdre de vue que le rat Buffalo/Mna est un modèle génétique alors que les formes humaines sont dans leur grande majorité immunes et non transmissibles. La prédisposition génétique de ce rat à développer un SNI semble liée à 2 gènes autosomiques récessifs. L'un d'entre eux, Pur 1 est situé sur le chromosome 13 qui est l'analogue du bras long du chromosome 1 chez l'homme codant pour la podocine. Cependant, le séquençage du gène de la podocine chez ce rat n'a pu mettre en évidence de mutations (C. Antignac, non publié). De plus, la présence d'anomalies génétiques exclusivement intrinsèques au rein semble peu probable puisque le rat récidive après transplantation et qu'inversement, un rein malade guérit s'il est placé dans un environnement sain. Sa prédisposition génétique semble donc plutôt provenir de l'expression d'un ou plusieurs facteurs circulants capables d'altérer le glomérule et d'entraîner une protéinurie, faisant de lui un modèle fort intéressant.

B-Article 2 et 3 : La récurrence du syndrome néphrotique après transplantation est associée à un phénotype lymphocytaire naïf chez l'homme.

B-1 Résumé de l'article 2

La Hyalinose Segmentaire et Focale est une glomérulopathie qui récidive chez 30 à 50% des patients après transplantation, suggérant l'implication de facteurs albuminuriques sériques, probablement produits par les lymphocytes T activés.

Dans cette étude, nous avons voulu analyser les expansions et la sélection des cellules T périphériques avant et après transplantation afin d'identifier un profil lymphocytaire T éventuellement associé à la récurrence de HSF. Pour cela, nous avons effectué une évaluation qualitative et quantitative de l'altération des transcrits V β au niveau de la région hypervariable CDR3 du récepteur T (TCR). Les PBMC de 18 patients atteints de HSF (8 avec récurrence et 10 sans récurrence) ont été collectés le jour de la transplantation puis à 1 mois, 1 an et 5 ans après transplantation et leur V β transcriptome a été analysé.

Nos résultats montrent que les cellules T périphériques des patients présentant une récurrence exhibent un répertoire T stable dans le temps et ne présentent pas plus d'altérations au niveau de la région CDR3 que les contrôles, et ce avant et après transplantation. Ces observations suggèrent que le processus responsable de la récurrence de HSF n'implique pas d'activation du TCR ou une expansion clonale spécifique des cellules T. Cependant, ces résultats n'excluent pas un rôle des lymphocytes T dans la production d'un facteur albuminurique.

ARTICLE 2

[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. 2006 Sep;6(9):2144-51.

Caroline Hervé¹, Ludmilla Le Berre¹, Patrick Miqueu¹, Nicolas Degauque¹, Catherine Ruiz²,
Sophie Brouard¹, Marina Guillet¹, Jean Paul Souillou^{1*} and Jacques Dantal^{1*}.

¹ Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) and Nantes University
Unité mixte 643 : « Immunointervention dans les Allo et Xénotransplantations », Institut de
Transplantation Et de Recherche en Transplantation (ITERT) CHU Hôtel Dieu, 30 Bd Jean
Monnet, 44093 Nantes Cedex, France

² TcLand, CHU Hotel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex, France

* : Both senior authors contributed equally to this work

Acknowledgments

This work was supported in part by the “Fondation Progreffe”. We thank J. Ashton-Chess for
her help in editing the manuscript.

Running title : T cell repertoire in FSGS recurrence

ABSTRACT

Focal and Segmental Glomerulosclerosis (FSGS) is a glomerulopathy that recurs after kidney transplantation in 30 to 50% of patients, suggesting the involvement of systemic albuminuric factors, probably produced by activated T cells.

In this study, we investigated peripheral T cell selection and expansion before and after transplantation to identify and characterize any T lymphocyte patterns potentially associated with FSGS recurrence. For this purpose we used a combined qualitative and quantitative assessment of V β mRNA alterations at the level of the Complementary Determining Region 3-Length Distribution (CDR3-LD) of the TCR. PBMC were collected from 18 FSGS patients (8 with recurrence and 10 without recurrence) on the day of transplantation as well as at one month, one year and five years after transplantation, and their V β transcriptomes were analyzed.

Our data show that blood T cells from patients with FSGS recurrence display a TCR repertoire that is stable in time and has a similar level of CDR3-LD alterations as the T cell repertoire of control patients, both before and after transplantation. These results suggest that the process of FSGS recurrence does not involve TCR activation or specific clonal expansion of T cells. However, these results do not exclude a role for T cells in the production of an albuminuric factor.

INTRODUCTION

Idiopathic Nephrotic Syndrome (INS) is characterized by massive albuminuria and can be subdivided, based on renal biopsy findings, into MCNS (Minimal Change Nephrotic Syndrome) and FSGS (Focal Segmental Glomerulosclerosis). The incidence of idiopathic FSGS is progressively increasing and FSGS now constitutes the most frequent diagnosis in native adult kidneys, accounting for 35–50% of cases of adult NS [1]. The large heterogeneity of the disease is illustrated by the various responses to treatment observed in FSGS patients: some respond to corticosteroids [2, 3] whereas others show steroid-resistance [4] but benefit from treatment with cyclosporine or cyclophosphamide [4-6]. Such drug resistant patients eventually develop end-stage renal failure, requiring renal replacement therapy. Unfortunately however, the disease recurs immediately in 20–50% of patients [7, 8]. Thus following renal transplantation, the immediate recurrence in certain patients identifies them as a homogeneous group in whom active glomerulonephritis exists, even if some of them are on dialysis or under immunosuppression.

Major advances in understanding the physiopathology of INS have come from the identification of genetic alterations among the key proteins of the slit diaphragm [9, 10]. However, these podocytopathic forms of INS are minor and genetic abnormalities can only account for a small percentage of patients presenting a corticoreistant INS. The predominant form of INS is an “immunologic” form where the role of a circulating factor or factors has been suggested for more than three decades [11]. Other experimental studies have focused on the role of T-lymphocytes in the progression of INS [12] and have tried to make a link between these cells and the putative circulating factor. Using a subtractive cDNA library screening technique on PBMC, Sahali et al. showed a down regulation of the IL12-R β 2 mRNA subunit and an up regulation of c-maf during relapse compared with MCNS patients in remission [13]. These results suggested that activated T cells of MCNS patients were driven towards a Th2 phenotype. This hypothesis was strengthened by studies of the in vitro production of cytokines by PBMC from patients with idiopathic NS showing elevated expression of IL-13 [14] and IL-4 mRNA [15, 16]. Abnormal activities of transcription factors have also been reported in MCNS: high levels of NF- κ B (Nuclear Factor κ B) DNA-binding activity and an up regulation of Tc-mip were found in CD4⁺ T-cells from untreated MCNS patients during relapse [17, 18]. These data point toward an activation of T cells in MCNS. While the presence of a Th2 profile and immune abnormalities is now recognized in INS patients, the signal that leads to such

activation remains unknown. The association of INS with viral infections [19] and allergic responses [20] could suggest that, at least in some instances, antigen-driven responses are involved in the induction phase of the disease. Finally, by analysing the genetic polymorphism of the variable region of the TCR β -chain, Frank et al showed that CD8-positive T-cells of idiopathic NS patients were clonally expanded in long-lasting active disease [21].

In this study, we used a qualitative and quantitative approach of V β transcriptome analysis in PBMC to estimate the magnitude of any potential skewing of the T cell repertoire before and after transplantation in FSGS recurrence so as to better characterize the involvement of T lymphocytes in this phenomenon. PBMC from 8 patients in whom FSGS recurred after transplantation (“recurrent” patients; R) and 10 patients in whom FSGS did not recur (“non recurrent” patients; NR) were analysed before and after transplantation. Five patients with renal failure of non-FSGS origin under dialysis served as controls. Our data show that “recurrent” patients displayed a stable repertoire and lower global CDR3-LD alterations than control patients both before and after transplantation, thus providing no evidence of T cell clonal selection. Nevertheless, our results do not exclude a role for T lymphocytes in FSGS recurrence, but do however tend to go against the concept of an antigen-driven clonal response in these patients.

PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

Patients

Eighteen patients suffering from primitive biopsy-proven FSGS who had undergone kidney transplantation in our institution were included in this study. Among them, 8 patients presented an immediate recurrence of nephrotic syndrome after transplantation with a selective proteinuria above 3 g/d (mean 8.0 ± 2.3 g/d) within the first month post transplantation (or recovery of renal function) and an early kidney graft biopsy showing only a minimal change glomerulonephritis with an extensive foot cell process fusion at microscopic examination. All these recurrent patients were treated by plasmatic exchanges (PE) that failed to induce a complete remission. At the time of blood harvesting in this study, 4 patients were maintained on chronic PE-treatment and 4 were also treated by ACE and/or ARB drugs to reduce proteinuria. Long-term follow-up revealed graft failure due to FSGS recurrence in 5/8 patients within a median time of 25.5 months (range 12 to 72 months). The remaining 3 patients presented a good renal function with a partial remission of INS at 32, 54 and 113 months after transplantation. The 10 “non recurrent” FSGS patients presented a proteinuria below 0.5g/d one month after transplantation. The main clinical parameters of FSGS are presented in table I. No differences were found between the two groups concerning sex distribution, number of transplantations, HLA matching, panel reactive antibodies, type of induction or maintenance immunosuppressive therapy and duration of delayed graft function. All blood samples were harvested at the same time before and after transplantation, when patients displayed similar serum creatinine levels and immunosuppressive therapies. Nevertheless, some differences were observed between the two groups due to the clinical specificities of the patients presenting FSGS recurrence. By definition, proteinuria was significantly higher in the group of FSGS recurrent patients compared to “non recurrent” patients (4.1 ± 3.9 (median 2.71g/d) vs. 0.34 ± 0.21 g/d, $p < 0.01$). In addition, as patients with FSGS recurrence presented a more severe initial disease and a faster evolution to end stage renal failure than “non recurrent” patients, they were significantly younger at the time of transplantation (29.4 ± 17.1 vs. 45 ± 8.3 years, $p < 0.02$). A control group of 5 patients under dialysis with non-FSGS related end stage renal failure were included for comparison of pre-transplant values. All patients gave informed consent to this study according to French legislative guidelines.

Blood samples, RNA extraction and cDNA synthesis

Thirty mL of blood were collected by venopuncture. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were recovered after a Ficoll gradient (Eurobio, Les Ulis, France). After washing, 2×10^7 cells were frozen in Trizol® reagent (Invitrogen™, Life Technologies, CA) for RNA extraction according to the manufacturer's instructions. The RNA concentration for each sample was determined by optical density measurement, and RNA quality was checked by running samples on a 1% agarose gel. Two $2 \mu\text{g}$ of RNA were reverse transcribed using an Invitrogen cDNA synthesis kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) and diluted to a final volume of $100 \mu\text{L}$.

PCR amplification and elongation reactions for analysis of CDR3 length

cDNA was amplified by PCR using a C β primer and one of the 26 specific primers. The amplifications were performed in a 9600 Perkin-Elmer thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) as previously described [22]. Briefly, each amplification product was used for an elongation reaction using a dye-labelled C β primer, then heat-denatured, loaded onto a 6% acrylamide-8M urea gel, and electrophoresed for five hours using an Applied Biosystems 373A DNA sequencer (Perkin-Elmer®).

TCR repertoire analysis

Diversity and T cell selection were assessed by analysis of TCR (β chain) usage biases. In an immunologically quiescent state, the length distribution of the TCR β chain complementary determining region 3 (CDR3) hypervariable region is gaussian. Alteration of this gaussian distribution is the hallmark of an activation phenomenon and proliferation.

Analysis of CDR3-LD was performed using Immunoscope® software [23]. The percentage of CDR3-LD alteration for each V β family and a global percentage of CDR3-LD alteration for each individual or group was calculated as described [24]. The percentage of alteration was defined as the difference between the frequency of each CDR3 length in the distribution profile and the control distribution, calculated from the 13 age and sex-matched healthy individuals. The global CDR3-LD alteration is represented as a topview Tlandscape® enabling an easy appraisal of the “qualitative” measurement of the CDR3-LD bias. Only CDR3 lengths with an alteration above 30% were taken into account. The level of V β RNA was measured by real-time quantitative PCR and expressed as a

ratio of a non or minimally regulated gene, HPRT. The primers used were especially designed for quantitative PCR as previously described (Gagne et al, 2000). The data were displayed as a three-dimensional TcLandscape® [25, 26]. Percentages of CDR3-LD alterations are represented as a colour code, from deep blue (-50%) to dark red (+50%). The X axis displays the 26 human V β families, the Y axis gives the V β /HPRT ratios and the Z axis gives the CDR3 lengths. The colour code for the tridimensional TcLandscape® is the same as that used for the corresponding Topview.

Statistical analysis

Global CDR3-LD alterations were analysed before transplantation using a non parametric Kruskal Wallis test (3 groups) and after transplantation using a Mann-Whitney test (2 groups). Qualitative (percentage of alteration) and quantitative (V β /HPRT ratio) values were analysed separately for each V β family using SPSS software. The mean values for the different groups were first compared using a Welch test, and when appropriate, a T3 Dunnett post-hoc test was performed. In each case, a conventional *p*- value of <0.05 was used to indicate significance.

RESULTS

Longitudinal analysis of the V β transcriptome in FSGS patients

CDR3-LD alterations in FSGS patients were analyzed on the day of transplantation and at different time points after transplantation (1 month, 1 year, 5 years). The V β transcriptome profile of three representative patients presenting FSGS recurrence and three “non recurrent” patients are shown in Fig 1. A gaussian pattern is represented in green on the landscape, whereas red points indicate CDR3-LD alteration. V β /HPRT transcripts values are plotted on the Y axis.

For both groups (with or without recurrence), CDR3-LD analysis performed before and after transplantation revealed patterns roughly stable in time, in terms of both CDR3-LD alterations and V β /HPRT transcript ratios. However, over the five year interval, the global CDR3-LD alterations decreased from 25% to 16.6% in “non recurrent” patient (NR3), whereas they remained unchanged for the “recurrent” patients over the same period. As illustrated in the topviews (fig 1), some V β alterations with the same CDR3 length persisted longitudinally in the same patient: “Recurrent” patients R1, R2 and R3 displayed CDR3-LD alterations of the V β 23, V β 13.5 and V β 13.1 families respectively, that were stable in time. Likewise, patients without recurrence displayed stable CDR3-LD alterations of the V β 21 and V β 23 (NR1) and V β 17 and V β 23 (NR2) families. Finally, persistent V β alterations differed between individuals, indicating that each patient develops an individual pattern of T-cell predominance.

The blood T cells of “recurrent” patients do not display more global CDR3-LD alterations than those of controls before or after transplantation.

The peripheral T cell V β transcriptomes of “recurrent” and “non recurrent” patients were compared before and after transplantation (fig 2). Patients under dialysis served as controls. Calculation of the average percentage of global CDR3-LD alterations (all V β families), represented in fig 3, revealed only a borderline difference between “recurrent” patients, “non recurrent” patients and control patients under dialysis before transplantation ($17.6\pm 1.2\%$ vs. $22.9\pm 1.1\%$ and $21.2\pm 0.7\%$, $p<0.05$ and ns respectively). The same difference was observed after transplantation ($18.3\pm 0.9\%$ vs. $24.7\pm 2.6\%$, $p<0.05$), suggesting no clonal T selection associated with FSGS recurrence. To better document the differences found between the global percentages of alteration, the distribution of the CDR3-LD alterations was investigated according to a grading scale in the three groups, before and after

transplantation (table II). Patients without recurrence and non-FSGS controls displayed more CDR3-LD alterations above 30% than patients with FSGS recurrence, before (21.92% and 19.23% vs. 10.68%) and after transplantation (29.71% vs. 9.13%).

As the results of the global CDR3-LD alteration analysis indicated few V β CDR3-LD alterations in patients with recurrence, the percentage of alteration for each of the 26 V β families in each patient was determined and statistically compared. No significant differences were observed between FSGS patients and controls before transplantation and no V β family could discriminate and/or predict patients with or without INS recurrence.

V β /HPRT transcript ratios

As an indirect estimate of possible abnormal clonal selection, the levels of V β mRNA assessed by the V β /HPRT transcripts ratio were compared between the groups for the 26 V β families. The main difference was found in the V β 3 family. Before transplantation, 60% of “non recurrent” patients and 100% of controls accumulated V β 3 transcripts whereas 80% of patients with recurrence displayed a flat TcLandscape (figure 4). This observation was also made after transplantation.

Despite V β 3 accumulations being observed in 2 of the 8 patients with recurrence, they were less frequent and smaller than in patients without recurrence and controls. No differences were found for the other V β /HPRT transcripts.

DISCUSSION

The role of T cells in the initial stages of idiopathic nephrotic syndrome has been suggested for more than four decades but evidence for a direct involvement of these cells is still lacking. Most studies of INS relapse have reported the presence of T cells in the periphery with an activated phenotype. Moreover, when comparing cortico-sensitive patients during relapse to those in remission, an expansion of CD4+CD25+ T cell population has been reported [27], as well as an increase in IL13 mRNA production [14] and an increase in the transcription factor NFκB [18]. In addition, Franck et al. described clonal expansions of CD8+ T cells in corticoreistant patients, evoking the occurrence of antigenic stimulation and/or the presence of memory clones [21]. All these observations suggest an activation via the T cell receptor signaling pathway during the active stage of the disease.

Our aim was to better characterize the possible involvement of T lymphocytes by studying the T cell repertoire in a selected group of idiopathic nephrotic patients through a qualitative and quantitative analysis of the Vβ transcriptome. To this end, patients with an immediate recurrence of INS after kidney transplantation were selected for study. Such patients present a unique opportunity to analyze the role of T cells in a homogeneous form of nephrotic syndrome. The rapidity of INS recurrence [28] is suggestive of two hypotheses: the first is that these patients present a persistently active disease during dialysis and the second is that recurrence could be the result of a reactivation of T cell memory clones by alloreactivity or stimulation by viral or unknown antigens. The latter hypothesis is also sustained by a higher rate of acute rejection in patients with FSGS recurrence [29]. Our study clearly shows that, even during immediate recurrence after kidney transplantation, the blood T cells of FSGS patients show no increase in CDR3-LD alterations compared to pre-transplantation. At one month after transplantation, their peripheral T cells display even less CDR3-LD alterations than those from patients without recurrence. The absence of alteration of TCR usage in such overtly proteinuric patients is in contradiction with the idea of a direct role for clonal T cell activation during this process.

These results obtained in a very selected population (i.e. patients with immediate FSGS recurrence), are in opposition to those of a study of a less selective population of childhood nephrotic syndrome patients with frequent FSGS relapses where a persistent expansion of CD8+ T cells with an individual pattern of T cell predominance was found [21]. The results of the latter study argue for an antigen-specific stimulation with the expansion of specific and resistant clones in corticoreistant patients. It is well known that some viral infections or allergens can in some instances be associated

with onset or recurrence of INS, although healthy patients also display some persistent alterations of their T cell repertoire (Guillet et al., accepted) and such a control population was not included in this study. In our selected population, we detected only minor statistical differences between the Tlandscapes of “recurrent” and “non recurrent” patients before and after transplantation, as well as with patients under dialysis as a result of various non-FSGS renal diseases. Finally, when alterations *were* detected, they were patient-restricted, persisted for a long time regardless of the patient group, and were not directly related to the persistence of nephrotic syndrome. Surprisingly, the alloreactivity and/or the immunosuppressive therapy had only a marginal impact on the T cell repertoire of these patients. Several types of immunosuppressive regimen were administered in our small cohort of transplant patients and none of the patients had presented acute rejection. In addition, recurrent patients who subsequently lost their graft did not present any evidence of allograft nephropathy or chronic rejection. These observations reinforce the results obtained following analysis of the V β transcriptome of cells infiltrating rejected allografts with chronic dysfunction, where only one third of patients presented a skewed repertoire, supporting the hypothesis that the major cause of graft loss is not immunological (or TCR mediated) [22].

It is well known that FSGS will recur in around 30% of adult INS patients following their first kidney transplantation. The mechanisms responsible for this recurrence are not yet defined but as for the initial disease, T cells have been suspected to be the source of a permeability factor. Our results do not exclude a role for T lymphocytes in FSGS recurrence but discredit an antigen-driven response, a super-antigenic activation or a reactivation through allorecognition. Major recent advances concerning the abnormalities of T cells have been made by studies performed in minimal change glomerulonephritis [30]. The immune dysfunctions observed in MCNS were described mainly in CD4+ T cells and include a down regulation of the IL12R β 2 subunit that is selectively expressed by Th1 cells [13], an increased production of Th2 cytokines [14], and a strong induction of c-maf which promotes Th2 and attenuates Th1 differentiation [31]. Recently, T cell dysfunction associated with abnormal mRNA splicing was evoked in MCNS patients, highlighting the possibility that independent intrinsic TCR abnormalities could be involved in INS [32]. Studies to test these hypotheses are now ongoing in patients with recurrence of idiopathic nephrotic syndrome after kidney transplantation.

Overall, our data suggest that patients presenting FSGS recurrence display a stable repertoire and fewer CDR3-LD alterations than the control population, suggesting a limited T cell clonal selection

throughout the disease. These results suggest that INS recurrence after renal transplantation does not involve TCR activation or specific clonal expansion of T cells.

REFERENCES

1. Haas M, Meehan SM, Karrison TG, Spargo BH. Changing etiologies of unexplained adult nephrotic syndrome: a comparison of renal biopsy findings from 1976-1979 and 1995-1997. *Am J Kidney Dis* 1997;30(5):621-31.
2. Banfi G, Moriggi M, Sabadini E, et al. The impact of prolonged immunosuppression on the outcome of idiopathic focal-segmental glomerulosclerosis with nephrotic syndrome in adults. A collaborative retrospective study. *Clin Nephrol* 1991;36(2):53-9.
3. Rydel JJ, Korbet SM, Borok RZ, Schwartz MM. Focal segmental glomerular sclerosis in adults: presentation, course, and response to treatment. *Am J Kidney Dis* 1995;25(4):534-42.
4. Schulman SL, Kaiser BA, Polinsky MS, Srinivasan R, Baluarte HJ. Predicting the response to cytotoxic therapy for childhood nephrotic syndrome: superiority of response to corticosteroid therapy over histopathologic patterns. *J Pediatr* 1988;113(6):996-1001.
5. Ponticelli C, Passerini P. Conventional treatment of idiopathic nephrotic syndrome and membranous nephropathy in adults. *Clin Nephrol* 1991;35 Suppl 1:S16-21.
6. Lieberman KV, Tejani A. A randomized double-blind placebo-controlled trial of cyclosporine in steroid-resistant idiopathic focal segmental glomerulosclerosis in children. *J Am Soc Nephrol* 1996;7(1):56-63.
7. Dantal J, Baatard R, Hourmant M, et al. Recurrent nephrotic syndrome following renal transplantation in patients with focal glomerulosclerosis. A one-center study of plasma exchange effects. *Transplantation* 1991;52(5):827-31.
8. Tejani A, Stablein DH. Recurrence of focal segmental glomerulosclerosis posttransplantation: a special report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study. *J Am Soc Nephrol* 1992;2(12 Suppl):S258-63.
9. Niaudet P. Genetic forms of nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2004;19(12):1313-8.
10. Reiser J, Polu KR, Moller CC, et al. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet* 2005;37(7):739-44.
11. Shalhoub RJ. Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function. *Lancet* 1974;2(7880):556-60.
12. van den Berg JG, Weening JJ. Role of the immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *Clin Sci (Lond)* 2004;107(2):125-36.

13. 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):1238-47.
14. Yap HK, Cheung W, Murugasu B, et al. 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):529-37.
15. Neuhaus TJ, Wadhwa M, Callard R, Barratt TM. Increased IL-2, IL-4 and interferon-gamma (IFN-gamma) in steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Clin Exp Immunol* 1995;100(3):475-9.
16. Cho BS, Yoon SR, Jang JY, Pyun KH, Lee CE. Up-regulation of interleukin-4 and CD23/FcepsilonRII in minimal change nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 1999;13(3):199-204.
17. Grimbert 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.
18. 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):688-98.
19. Tanawattanacharoen S, Falk RJ, Jennette JC, Kopp JB. Parvovirus B19 DNA in kidney tissue of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 2000;35(6):1166-74.
20. Wittig HJ, Goldman AS. Nephrotic syndrome associated with inhaled allergens. *Lancet* 1970;1(7646):542-3.
21. Frank C, Herrmann M, Fernandez S, et al. Dominant T cells in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Kidney Int* 2000;57(2):510-7.
22. Gagne K, Brouard S, Giral M, et al. Highly altered V beta repertoire of T cells infiltrating long-term rejected kidney allografts. *J Immunol* 2000;164(3):1553-63.
23. Pannetier C, Even J, Kourilsky P. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today* 1995;16(4):176-81.
24. Gorochov G, Neumann AU, Kereveur A, et al. Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy. *Nat Med* 1998;4(2):215-21.
25. Sebille F, Gagne K, Guillet M, et al. Direct recognition of foreign MHC determinants by naive T cells mobilizes specific Vbeta families without skewing of the complementarity-determining region 3 length distribution. *J Immunol* 2001;167(6):3082-8.

26. Guillet M, Brouard S, Gagne K, et al. Different qualitative and quantitative regulation of V beta TCR transcripts during early acute allograft rejection and tolerance induction. *J Immunol* 2002;168(10):5088-95.
27. Neuhaus TJ, Shah V, Callard RE, Barratt TM. T-lymphocyte activation in steroid-sensitive nephrotic syndrome in childhood. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10(8):1348-52.
28. Striegel JE, Sibley RK, Fryd DS, Mauer SM. Recurrence of focal segmental sclerosis in children following renal transplantation. *Kidney Int Suppl* 1986;19:S44-50.
29. Kim EM, Striegel J, Kim Y, et al. Recurrence of steroid-resistant nephrotic syndrome in kidney transplants is associated with increased acute renal failure and acute rejection. *Kidney Int* 1994;45(5):1440-5.
30. Grimbert P, Audard V, Remy P, Lang P, Sahali D. Recent approaches to the pathogenesis of minimal-change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18(2):245-8.
31. Ho IC, Lo D, Glimcher LH. c-maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms. *J Exp Med* 1998;188(10):1859-66.
32. Grimbert P, Audard V, Valanciute A, et al. Abnormal RNA processing and altered expression of serin-rich proteins in minimal-change nephrotic syndrome. *Pediatr Res* 2005;57(1):133-7.

Table I-Hervé et al.

Table I. Main clinical characteristics of the FSGS patients.

	FSGS PATIENTS WITH RECURRENCE N=8	FSGS PATIENTS WITHOUT RECURRENCE N=10	P
Gender	5F/3M	5F/5M	ns
Age at the onset of dialysis (years)	27.4± 27.2	42.8± 8.5	ns
Duration of dialysis (months)	24.5± 23	34.7± 24.3	ns
Nb patients with positive PRA	3	4	ns
Age at transplantation (years)	29.4± 17.1 (from 8 to 63)	45± 8.3 (from 19 to 58)	0.02
HLAABDr incompatibilities	2.5± 1.6	2.1± 1.3	ns
Induction therapy for transplantation	ATG: 2 Anti-IL2 Mabs : 5 No induction :1	ATG: 2 Anti-IL2 Mabs : 7 No induction :1	ns
DGF duration (days)	9.4± 11.3	6.5± 5.8	ns
Day of serum harvesting (post-Tx)	1 month: 5 1 year: 1 5 years: 2	1 month: 7 1 year: 1 5 years: 1	ns
Maintenance therapy	CNI: 8/8 MMF/AZA/CS: 7/1/8	CNI: 10/10 MMF/AZA/CS: 9/1/7	ns
Serum creatinine (µmol/L)	152± 58	142± 48	ns
Proteinuria (g/d)	4.1± 3.9	0.34± 0.21	0.01

CS: Corticosteroids MMF: Mycophenolate Mofetil AZA: Azathioprin ATG: Anti-Thymocyte-Globulin CNI: Calcineurin Inhibitors

Table II-Hervé et al.

Table II. Distribution of the CDR3-LD alterations between the groups according to a grading scale of 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 and >50 % alteration.

% alteration	[10;20[[20;30[[30;40[[40;50[>=50
R before Tx	43.59%	23.93%	6.84%	2.56%	1.28%
NR before Tx	37.31%	32.69%	11.54%	6.92%	3.46%
Dial	47.69%	30.77%	12.31%	5.38%	1.54%
R after Tx	41.83%	29.81%	5.29%	2.40%	1.44%
NR after Tx	32.52%	29.37%	15.38%	6.99%	7.34%

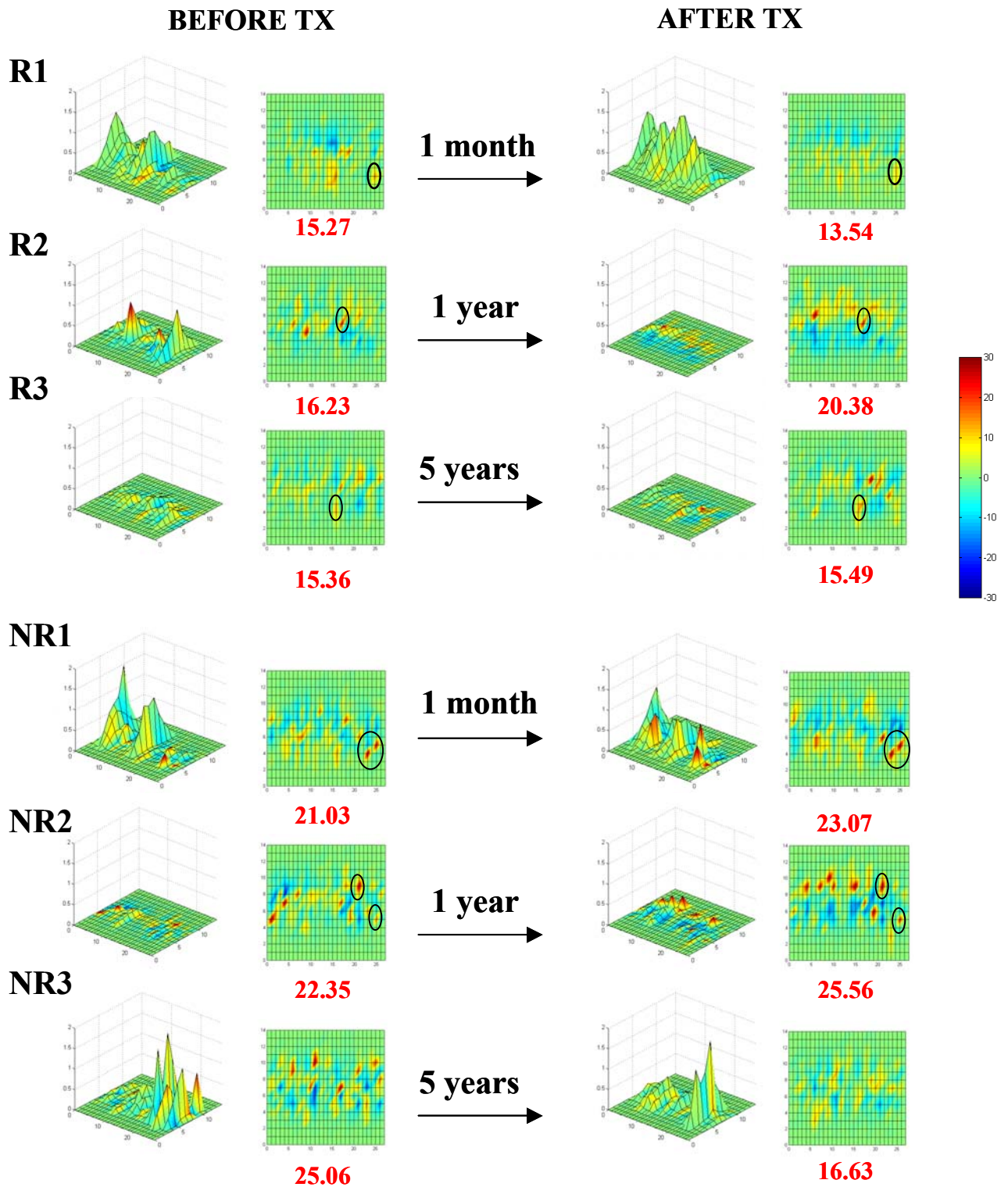


Figure 1. Alterations of the CDR3-LD before and after transplantation for the same patient. T-landscape and topview illustrations of PBMC from 3 representative “recurrent” patients (R) and 3 “non recurrent” patients (NR), the day of transplantation and one month, one year and six years after transplantation. The global CDR3-LD alteration is indicated below each Topview. CDR3 length alterations >25% appear in red. A black circle indicates the persistent families showing CDR3-LD alterations that are stable in time.

Figure 2. Hervé et al.

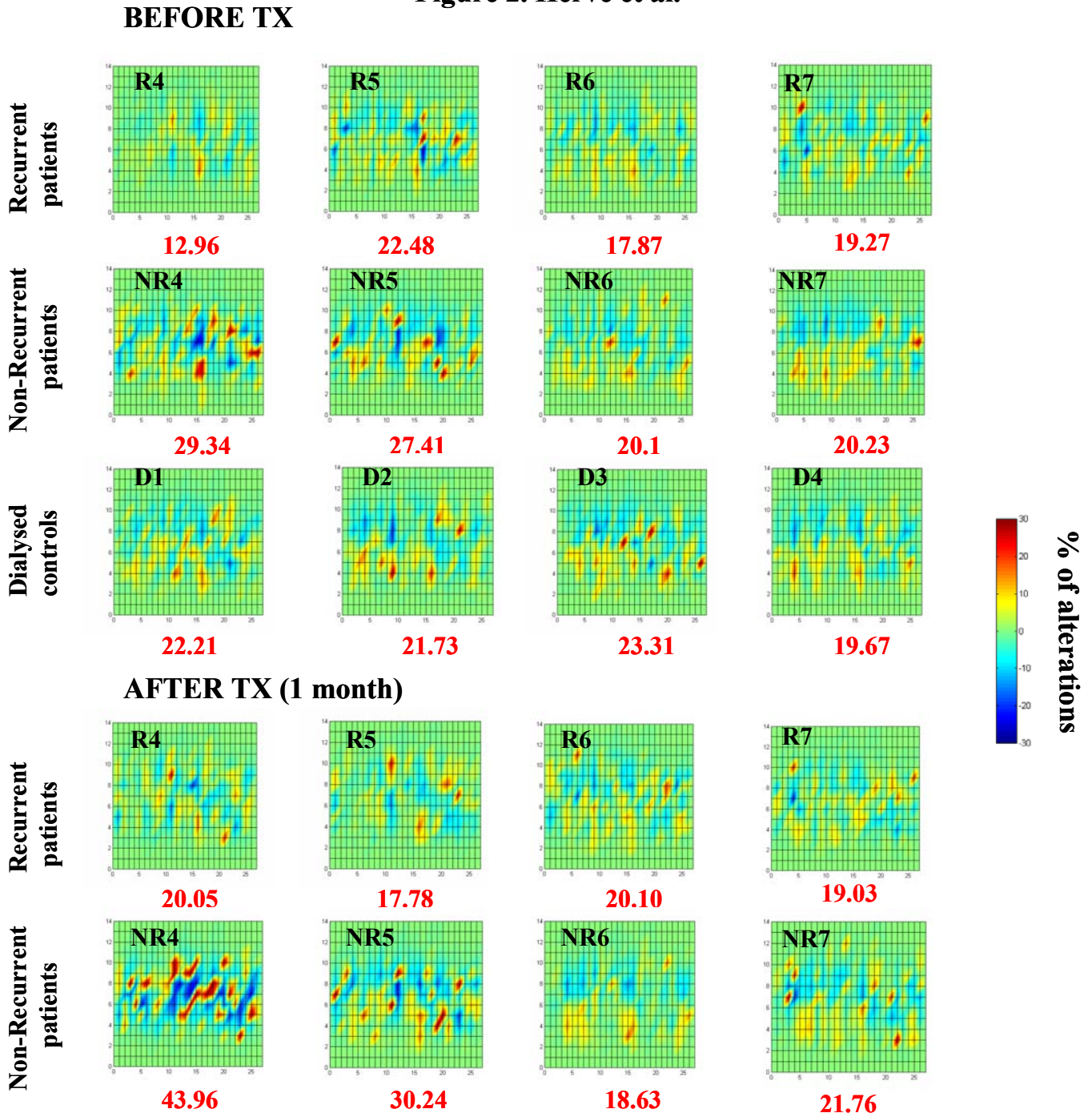


Figure 2. Topview representation of the T-cell V β transcriptome in the blood of each group of patients. 4/8 “recurrent” patients; 4 /10 “non recurrent” patients and 4/5 patients under dialysis that served as controls are represented before and after transplantation. The global CDR3-LD alteration is indicated below each Topview. CDR3 length alterations >25% appear in red. The X axis represents the 26 V β families and the Y axis gives the CDR3 length.

Figure 3. Hervé et al.

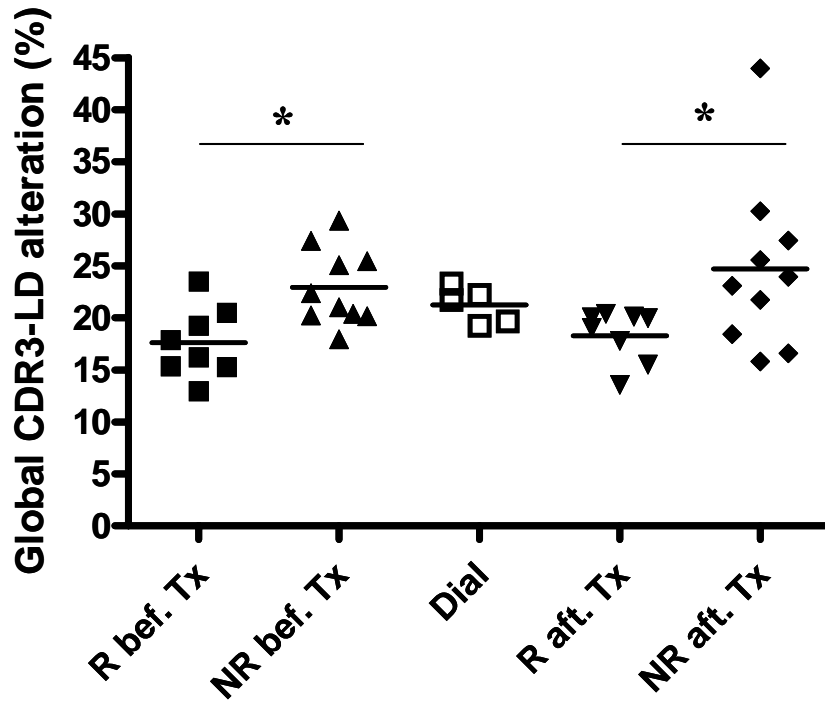


Figure 3. Patients presenting recurrence displayed fewer CDR3-LD alterations than controls before and after transplantation. Values of global CDR3-LD alteration for each patient are indicated. The mean value for each group is indicated by a bar. * $p < 0.05$

Figure 4. Hervé et al.

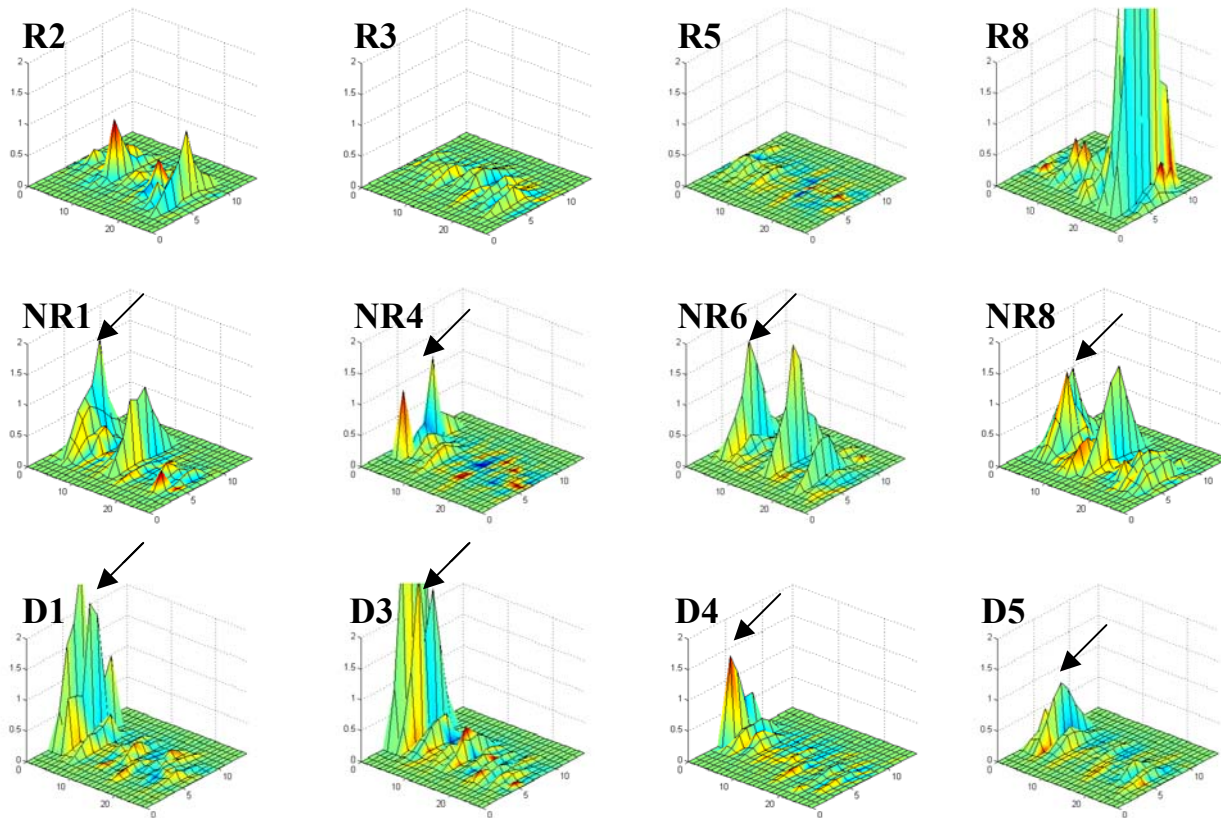


Figure 4. Vβ3 accumulation is mainly found in patients under dialysis rather than in patients presenting recurrence. Representation of the T cell Vβ transcriptome for four representative patients in each group before transplantation. The open arrow indicates an abundance of the Vβ3 family.

B-2 Résumé de l'article 3

L'étiologie du syndrome néphrotique primitif ainsi que les mécanismes conduisant à sa récurrence après transplantation n'ont pas encore été élucidés. Plusieurs observations suggèrent un désordre cellulaire T qui pourrait engendrer une dysfonction podocytaire. Le but de ce travail est de déterminer si la récurrence de HSF après transplantation corrèle avec un phénotype lymphocytaire et un profil d'activation particuliers.

Des patients HSF présentant une récurrence après transplantation (R, n=9) ont été comparés à des patients HSF sans récurrence (NR, n=9) et à des patients protéinuriques non-SNI (Non-FSGS, n=9). Le profil de phosphorylations des protéines des PBMC de chaque groupe a été étudié après stimulation polyclonale, ainsi que leur localisation intracellulaire. De plus, la distribution des différentes populations lymphocytaires a été déterminée par cytométrie en flux après transplantation, parallèlement à l'analyse de différents transcrits par PCR quantitative.

Les PBMC au repos des patients récidivant présentent une localisation des tyrosines-phosphorylations principalement nucléaire et montrent une persistance des phosphorylations des protéines cytoplasmiques après stimulation, comparés aux PBMC des groupes contrôles, suggérant une activation constitutive de certaines cellules immunitaires. Les analyses par cytométrie en flux indiquent que les patients récidivant possèdent plus de CD8⁺CD28⁺ (79.9±10% vs. 59.5±17%(NR) 60.7±12% (Non-FSGS), p=0.01) et de cellules T naïves CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁺ (64.15%±11.5 vs. 49.63±13.4% (Non-FSGS), p=0.02) que les contrôles. De plus, une baisse significative de l'expression des transcrits de CTLA-4 et de MAPK-9 a été trouvée dans les cellules T CD8⁺ des patients présentant une récurrence, appuyant l'hypothèse que les patients R exprimeraient plus de cellules T CD8⁺ naïves.

Dans leur globalité, ces observations suggèrent que les patients récidivant leur HSF après transplantation rénale pourraient présenter un défaut de régulation dans la cascade de phosphorylations des protéines associé à une augmentation de cellules thymiques émigrantes récentes.

ARTICLE 3

The recurrence of idiopathic nephrotic syndrome after kidney transplantation correlates with T lymphocyte abnormalities.

Caroline Hervé, Stéphanie Louis, Francois-Xavier Hubert, Jeanne Naulet, Ludmilla Le Berre, Sophie Brouard, Jean Paul Soulillou and Jacques Dantal.

Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) and Nantes University Unité mixte 643 : « Immunointervention dans les Allo et Xénotransplantations », Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation (ITERT) CHU Hôtel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex, France

Acknowledgments

This work was supported in part by the “Fondation Progreffe”. We thank Bernard Vanhove for his technical help and Dr Westeel P.F. (Amiens, France), Pr Merville P. (Bordeaux, France), Pr Bourbigot D. (Brest, France), Pr Favier A. (Grenoble, France), Pr Godin M. (Rouen, France) and Pr Niaudet P. (Paris, France) for biological patients’ samples and clinical data harvesting.

Correspondence : Jacques Dantal, INSERM U643, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex, France, tel : +33.2.40.08.74.10, Fax : +33.2.40.08.74.10
e-mail : jacques.dantal@chu-nantes.fr

running title: T lymphocyte abnormalities in INS recurrence

ABSTRACT

The etiology of primary Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS) and the mechanisms that lead to its recurrence after transplantation have not been elucidated. Several observations suggest a T cell disorder that may induce podocyte damage. The aim of this work was to determine whether FSGS recurrence correlates with particular T lymphocyte phenotypes and activation patterns.

FSGS recurrent patients (R, n=9) were compared with non recurrent patients (NR, n=9) and to patients with other proteinuric end stage renal diseases (Non-FSGS, n=9). Proteins phosphorylation pattern of peripheral mononuclear cells (PBMC) after polyclonal stimulation as well as their intracellular localization were studied in these 3 groups. In addition, the distribution of lymphocyte subsets after transplantation was determined by flow cytometry and transcript analysis was performed by quantitative PCR.

Resting PBMC of patients with FSGS recurrence displayed a strong nuclear localization and showed a persistence of cytoplasmic proteins phosphorylation after stimulation when compared to those of control groups, suggesting an abnormal immune response. Flow cytometry analyses revealed that R patients have more CD8⁺CD28⁺ (79.9±10% vs. 59.5±17%(NR) 60.7±12% (Non-FSGS), p=0.01) and naïve CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁺ T cells (64.15%±11.5 vs. 49.63±13.4% (Non-FSGS), p=0.02) than controls. Moreover, a significant decrease in MAPK9 (p=0.009) and CTLA-4 (p=0.01) transcripts was found in the CD8⁺ T cells of recurrent patients, reinforcing the hypothesis that R patients may display more CD8⁺ naïve T cells.

Taken together, these data suggest that patients with FSGS recurrence may display a defect in the regulation of phosphorylated proteins cascade associated with an increase of recent thymic emigrant cells.

INTRODUCTION

The pathogenesis of Idiopathic Nephrotic Syndrome (INS) remains unknown. Recently, genetic approaches have been determinant in elucidating several molecular aspects of pathophysiology of familial FSGS through identification of several genes playing a critical role in glomerular filtration barrier. Mutations in several podocyte proteins have been identified in families with inherited nephrotic syndrome, highlighting the central importance of the podocyte. Nephrin was the first slit-diaphragm protein identified as being involved in nephrotic syndrome¹, and since then, other mutated proteins have been described in humans^{2,3}. In contrast to the genetic form of INS, the implication of immune disorders has been suggested in the “idiopathic” form of the disease. For these forms, a yet uncharacterized soluble factor, which could alter capillary wall permeability and lead to albuminuria, has been evoked. The most compelling evidence for this comes from the clinical observation that FSGS can recur immediately in a normal kidney after transplantation in 30 to 50% of patients^{4,5} whereas a FSGS kidney transplanted into a patient without nephrotic syndrome becomes histologically normal and free of proteinuria⁶. In addition, this factor may also cross the placenta to induce transient neonatal proteinuria^{7,8} and may circulate in association with immunoglobulins, as suggested by the beneficial effects of different types of Ig depletion on FSGS proteinuria^{9,10}. Although several candidates have been proposed¹¹⁻¹⁴, the nature of this permeability factor remains unknown.

In 1974, Shaloub proposed a working hypothesis concerning the involvement of “a systemic abnormality in lymphocyte function”¹⁵. This proposal was based on the effect of steroid or cyclophosphamide treatment, or infection by “immunosuppressive” viruses as well as association between relapse and allergies^{16,17}. However, the precise molecular links between the immune system and INS remain elusive, despite the fact that differences between T cell phenotypes, cytokine expression and lymphocyte functions have been noted during relapse and remission¹⁸⁻²¹. Recently, a Th2 polarization pattern of cytokine synthesis emerges in disease relapses of steroid responsive patients²²⁻²⁴. A study by Grimbert et al. also revealed transcriptional abnormalities in c-mip, a protein involved in the c-maf-dependent Th2 signaling pathway in MCNS patients²⁵. Indeed, most studies have been carried out on the initial and steroid responsive MCNS but few of have been conducted on the post-transplantation recurrence of FSGS^{26,27}.

For our study, we hypothesized that immediate recurrent patients represent an homogeneous group suspected to suffer from the “immunological” form of INS and that they should display immune cell dysfunction in comparison to those of patients who did not recur after transplantation and proteinuric controls. We showed, in patients with INS recurrence, abnormal tyrosine phosphorylation pattern after PMA/ionomycin stimulation as well as a significant increase of nuclear tyrosine phosphorylated proteins in resting PBMC, in comparison to non recurrent and non FSGS patients. Phenotype analyses revealed in patients with FSGS recurrence a significant increase in the CD8⁺CD28⁺ and CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁺ naïve T cell population. In addition, a decrease in MAPK9 and CTLA-4 mRNA expression was found in the CD8⁺ T cells of recurrent patients, suggesting that recurrence is associated with regulation dysfunction and a naïve phenotype in CD8⁺ T cells.

PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

Patients. Nineteen kidney transplant recipients with biopsy-proven cortico-resistant idiopathic nephrotic syndrome as the original disease were included in this study (FSGS patients). These patients were divided into two groups according to the presence (Group R, n = 9) or absence (Group NR, n = 9) of an immediate recurrence of the initial disease on the kidney transplant. All patients received a cadaver kidney. The main clinical characteristics of the two groups are summarized in table I.

Recurrence was clinically defined as the occurrence of immediate nephrotic syndrome (above 3 g per day within one month after transplantation) and confirmed by evidence of podocyte foot processes on electronic examination. A third group (non-FSGS patients) consisted of proteinuric recipients in whom proteinuria was not related to INS (allograft glomerulopathy or recurrence of IgA nephritis, n=9). The patients of each group received similar immunosuppressive treatments and were roughly matched for age and sex (table I). Plasmatic exchanges were performed in all recurrent FSGS patients and have failed to decrease proteinuria in 5 patients while partial or transient effect was obtained in the four remaining patients. The absence of interfering infectious illness or other diseases was confirmed. Blood was collected at a time interval following induction treatments and transplantation, with a mean of 41.5 ± 13 , 43.8 ± 13 and 66.3 ± 14 months for FSGS patients with and without recurrence and non FSGS controls respectively (table I). In addition, five healthy individuals with a mean age of 31 years, with normal blood results and no known infectious pathology, were included as controls. All patients gave their informed consent to this study according to French legislative guidelines.

RNA extraction and cDNA synthesis. Depending on the count of peripheral mononuclear cells for each patient, thirty to fifty mL of blood were collected from a forearm vein into EDTA-containing tubes. Peripheral Blood Mononuclear cells (PBMC) were recovered after a Ficoll gradient (Eurobio, Les Ulis, France). After washing, 5×10^7 cells were frozen in Trizol® reagent (Invitrogen, Life Technologies, California) for RNA extraction according to the manufacturer's instructions. The remaining cells were kept for CD4/CD8 selection.

The RNA concentration for each sample was determined by optical density measurement and a quality control test was performed on a 1% agarose gel. Two μg of RNA were reverse transcribed

using an Invitrogen cDNA synthesis kit (Boeringher Mannheim, Indianapolis, IN) and diluted to a final volume of 100 μ L.

Immunocytochemistry. Cytospin preparations of 10000 cells/slide were made by centrifugation in a cytospin for 4 minutes at 3000 rpm. Slides were air dried and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for twenty minutes. Non specific binding sites were blocked and cells were permeabilized with 10% fetal bovine serum, 0.1% triton X100 in PBS 1X for 30 minutes. Primary (clone 4G10; UBI, Lake Placid, NY; 1:500) and secondary antibody (FITC-conjugated goat anti-mouse IgG ;1:200) were diluted at the appropriate dilutions according to standard techniques in PBS 1X-BSA 1%-triton 1X 0.1%, for 60 minutes at room temperature. After washing, cells were incubated 5 minutes with 0.5 μ g/mL DAPI to stain the nuclei and monted on glass slides with DABCO (Dakocytomation, Danemark). Images were obtained by using a Axioscop 2 plus photomicroscope attached to a Axiocam Hrc digital camera (Carl Zeiss, Germany) and processed with Axovision software (Carl Zeiss, Germany). The percentage of positive cells for 4G10 was determined by counting in four 200x microscope fields/spot the DAPI/4G10 positive cells (positive cells), normalized by the number of total cells (DAPI positive cells).

Cell stimulation and Western Blot. PBMC were cultured at 37°C in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum at a density of 2×10^6 cells/ml, in the presence or absence of 50 ng/mL PMA (Phorbol Myristate Acetate, Sigma Aldrich, France) and 1 μ g/mL calcium ionophore (ionomycin, Sigma Aldrich, France) for 15 min and 30 min. Proteins were extracted with lysis buffer (Tris-HCl: 50 mM, pH 7.4, NP-40: 1%, NaCl: 150 mM, EDTA: 1 mM), containing a cocktail of protease inhibitors (PMSF: 1 mM, aprotinin, leupeptin, pepstatin: 1 μ g/mL each) and a phosphatase inhibitor (Na_3VO_4 : 1 mM) and nuclei were pelleted and removed by centrifugation. After protein determination, samples were boiled for 5 minutes in Laemli buffer and run in reducing conditions on a 5-10% acrylamide gel. Proteins were then transferred onto nitrocellulose paper, blocked with 5% dry milk in PBS 1X, and incubated for 2 hours with monoclonal antibody to phosphotyrosine (clone 4G10; UBI, Lake Placid, NY; 1:1000). The nitrocellulose paper was then washed in PBS 1X and incubated in horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (1:3000) for 1 hour. Proteins were then visualized by enhanced chemiluminescence reagent (ECL; Amersham, Arlington Heights, IL). The Kodak Digital analysis software (1D version) was used to

analyze the scanned protein bands of 56 kDa and GAPDH. The band intensities of the 56 kDa protein were normalized with the GAPDH control and expressed in Arbitrary Units (AU).

CD4 and CD8 T cell separation. CD4 or CD8 T cell purification was performed using MACS microbeads according to manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Germany). The kit consists of an indirect magnetic labeling system composed of a biotin-hapten-monoclonal antibody cocktail (anti CD8/CD4, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 and TCR γ/δ) and iron microbeads coupled to an anti-biotin antibody, enabling the magnetic depletion of non-T cells. Briefly, cells were washed in buffer (PBS-SVF 0,1%-EDTA 1mM) and incubated 10 min on ice with the hapten monoclonal antibody cocktail. After adding buffer and incubating with mouse monoclonal anti-biotin antibody for 15 min on ice, cells were washed and resuspended in buffer. The labeled cells were depleted by passing the cells through a MACS MS column (Miltenyi Biotec, Germany). Purity, as determined by flow cytometry, was systematically >90%.

Transcript quantification. Cytokine and other protein transcript quantification was performed on RNA from CD4⁺ and CD8⁺ isolated T cells. Real time quantitative PCR was performed using TNF α , IFN γ , IL-4, IL-13, perforin, granzyme, MAPK9 (JNK-2), FOXP3 and CTLA-4-labeled Taqman[®] probes (table II). Target transcripts were amplified in 25 μ L of PCR mix containing 11 μ L diluted cDNA, 12.5 μ L of Taqman Universal 2X PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City) containing AmpliTaq Gold[®] DNA polymerase, dNTPs with dUTP and optimized buffer components, and 2.5 μ L of 20X Taqman[®] probes. The step-cycle program was set for denaturing at 95°C for 15 sec, and annealing and extension at 60°C for 1 min for a total of 40 cycles (ABI Prism 7900 sequence detection system; Applied Biosystems). The real-time PCR data were plotted as the Δ Rn fluorescence signal versus the cycle number. The Ct value is defined as the cycle number at which the Δ Rn crosses a threshold. The threshold was set above the background fluorescence to intersect the exponential portion of the amplification curve. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) was used as an endogenous control gene to normalize for varying starting amounts of RNA. Relative expression between a given sample and a reference sample was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method as described by the manufacturer (ABI PRISM 7700 user bulletin PE Applied Biosystems Foster City 2:11-24, 1997) and expressed in Arbitrary Units (AU).

Flow cytometry. 2×10^5 cells per sample were centrifuged in 96-well microtiter plates. $CD4^{+ve}$ or $CD8^{+ve}$ T cells were stained for 30 min with the following phycoerythrin (PE), fluorescein isothiocyanate (FITC), or Allophycocyanin (APC) –conjugated Mabs: anti-CD4-APC , anti CD8-APC, anti CD3-FITC, anti CD45RA-FITC, anti CD28 FITC, anti CCR7-PE, anti CD62L-PE (Beckman Coulter, Marseille, France), anti CD25-PE, and anti DR-PE (BD Biosciences, Mountain View, CA). PE, APC or FITC-labeled mouse IgG1 was used as a negative control. Antibody combinations that have been associated with cellular function in the literature were performed as followed: memory T cells: $CD4/8^+ CD45RA^{+/-} CD62L^+$, activated T cells: $CD4/8^+ DR^+$ or $CD25^+$, regulatory T cells: $CD8^+CD28^-$, $CD4^+CD25^{high}$. Cells were washed twice in phosphate–buffered saline (PBS) and fixed with PBS 1% formaldehyde. Fluorescence was measured by a FACScalibur cytofluorimeter and data were analyzed using CellQuest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA). T lymphocytes were identified using a forward and side scatter gate for lymphocytes in combination with a gate on $CD3^+$ cells. Non specific staining and autofluorescence were determined by isotype matched control mAb. Results are expressed as mean percentage positive cells.

Statistical analysis. A non parametric test (Mann-Whitney) was used for group comparisons; P values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

Resting PBMC of recurrent patients show high level of nuclear tyrosine phosphorylated proteins and display distinct phosphorylation patterns following polyclonal stimulation.

In order to document any dysregulations in T cell activation associated with disease recurrence, the localization of tyrosine phosphorylated proteins was investigated by immunocytofluorescence on non stimulated PBMC from FSGS patients with or without recurrence and proteinuric controls. PBMC from FSGS patients without recurrence (fig1A-b) and proteinuric controls (fig1A-c) showed few tyrosine phosphorylation, as well as in the cytoplasm or the nucleus. Conversely, patients with FSGS recurrence (fig 1A-a) displayed significantly more tyrosine phosphorylated proteins than non FSGS patients and controls in the nucleus ($30.2\pm 5.9\%$ vs. $7.9\pm 3.7\%$ and $13.5\pm 6.9\%$, $p=0.09$ and $p=0.017$ respectively), suggesting an activation of nuclear transcriptional factors (fig 1B).

PBMC from FSGS and non-FSGS patients were then cultured with PMA and ionomycin and their protein phosphorylation patterns were analyzed. A first series of experiments was carried out on unstimulated $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells from one representative patient of each group to assess the basal level of the tyrosine phosphorylated proteins in both populations. As similar phosphorylation patterns were observed within the $CD4^+$ and $CD8^+$ of a same patient (data not shown), unseparated PBMC were then used in a second series of experiments. PBMC from 4 patients of each group were incubated with PMA/ionomycin for 15 and 30 minutes and lysed; non-stimulated cells served as a control. After migration, the cytoplasmic lysates were incubated with an anti-phospho-tyrosine or with an anti-GAPDH antibody (fig. 2). At a basal level (unstimulated), the phosphorylation pattern of the different patients remained roughly similar within the three groups studied. However, after 15 to 30 minutes of stimulation, non-FSGS and non recurrent patients displayed a dephosphorylation of the majority of their proteins, whereas recurrent patients showed a persistence of phosphorylation, particularly for a protein of 56 kDa (apparent weight) (fig 2), supporting the presence of abnormal activation, or regulation, in PBMC from recurrent patients.

The $CD4^+$ T cell populations of patients with FSGS recurrence showed a profile similar to those of non recurrent and non-FSGS patients.

As an activation pattern was described in the PBMC of recurrent patients in term of phosphorylation, we wanted to determine if this profile was associated with an expansion of a specific population by flow cytometry. Thus, the CD4⁺ T cell phenotype of patients with FSGS recurrence (R) was compared to that of FSGS patients without recurrence (NR) and to non-FSGS patients with proteinuria. Recurrent patients displayed significantly less CD4⁺CD45RA⁻CD62L⁺ T cells, associated with central memory, than non-FSGS patients (35.7±8% vs. 48.4±9%, p=0.03) but not less than NR patients (35.7±8% vs. 37.5±14%, ns) (data not shown). No significant differences were observed in the other CD4⁺ T cell populations and finally, no CD4⁺ T cell phenotype could discriminate patients with recurrence from the two other groups.

CD8⁺ T cells from FSGS patients displayed less central memory and more naive T cells than non-FSGS proteinuric patients.

We next analyzed the CD8⁺ T cell compartment in FSGS and non-FSGS patients. A significant increase in proportion of CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁺ naive T cells was observed in patients with recurrence in comparison with non-FSGS patients and healthy subjects (64.15%±11.5 vs. 49.63±13.4% and 43.3±18.2%, p=0.02 and p=0.04 respectively), but not with non recurrent patients (64.15%±11.5 vs. 60.36%± 12.3, ns) (fig. 3). In addition, FSGS recurrent patients showed a decrease in CD8⁺CD45RA⁻CD62L⁺ (central memory) T cells in comparison with all the control groups, but the difference reached significance only for proteinuric controls and healthy individuals (7.23±3% vs. 19.6±10% and 17.8±5%, p=0.008 and p=0.004 respectively). Taken together, these data suggest a decrease of circulating memory T cells in FSGS patients without specific alteration associated with recurrence.

Recurrent patients also displayed significantly more CD8⁺CD28⁺ cells than non recurrent patients (79.9±10% vs. 59.5±17%, p=0.01). This difference was also significant compared to non-FSGS patients and healthy controls (79.9±10% vs. 60.7±12% and 57.2±13.6%, p=0.01 and p=0.007 respectively) (fig. 4). Conversely, the CD8⁺CD28⁻ T cells were decreased in recurrent patients in comparison to NR, non-FSGS patients and healthy controls (20.1 ±10% vs. 41.6±17%, 39.3±12. % and 42.8±13.6%, p=0.01, p=0.01 and p=0.007 respectively) (data not shown). Moreover, no difference was found in activation markers such as CD25 and DR between the different groups, suggesting that CD8⁺T cell are not in an activated state in FSGS patients with INS recurrence.

CD8⁺ T cells of patients with FSGS recurrence show a down-regulation of CTLA-4 and MAPK9 mRNA.

As CD8⁺ T cell phenotype alterations were observed in patients with disease recurrence, a quantitative PCR analysis of several transcripts including Th1 and Th2 cytokines, cytotoxic-associated proteins and proteins that have been linked to T cell regulation, was performed on CD4⁺ and CD8⁺ purified T cells from R and NR patients (fig 5). Perforin and granzyme mRNA levels were low in CD4⁺ T cells and no difference between R and NR patients was observed. However, a highly significant decrease was found in the perforin mRNA levels of the CD8⁺ T cells of R patients, compared to those of NR patients (2.2 ± 1.5 vs. 8.24 ± 1.5 , $p=0.004$). In addition, transcripts for CTLA-4 (0.09 ± 0.08 vs. 0.91 ± 0.4 , $p=0.01$) and MAPK9 (JNK-2; 0.37 ± 0.15 vs. 2.23 ± 0.98 , $p=0.009$) were also significantly decreased in the CD8⁺ T cells of recurrent patients. In fact, CTLA-4 transcripts were almost undetectable in the CD8⁺ T cells of R patients, whereas their CD4⁺ T cells displayed levels similar to those of NR patients. For the cytokine analysis, the level of IL-4 and IL-13 transcripts was undetectable in both groups. Similarly, no significant difference was observed in TNF α , IFN γ and FOXP3 mRNA levels (data not shown). Taken collectively, these observations suggest a decrease in the transcription of some proteins involved in the CD8⁺ T cell activation rather than an ongoing CD8 activation in active FSGS disease.

DISCUSSION

The course of corticosteroid-sensitive INS has been associated with a TH2 profile during relapse and, recently, with disorders and activation pattern in the CD4⁺ T cell compartment, supporting a role of T lymphocytes in the initial disease. Very few studies have focused on the corticosteroid-resistant form of INS that represent a more heterogeneous disease. Nevertheless, after transplantation, patients with recurrent INS are likely homogeneous in terms of disease mechanism and disease activity. Whereas the involvement of a circulating permeability factor in immediate INS recurrence is now well accepted, the implication of T lymphocytes remains to be determined. In this study, we have identified abnormal regulation of tyrosine phosphorylation associated with a resting CD8⁺ T cell phenotype in PBMC from patients with INS recurrence after transplantation compared to two control groups, FSGS patients without recurrence and non-FSGS proteinuric patients.

The activation profiles of T cells from FSGS patients with or without recurrence and proteinuric controls were analyzed when patient PBMC were stimulated with PMA and ionomycin. The basal level of tyrosine phosphorylation was high in the three groups suggesting T cell activation, probably due to the transplantation process. Whereas the PBMC stimulation of control patients led to the dephosphorylation of the majority of the proteins, PBMC from recurrent patients showed a persistence of tyrosine phosphorylated proteins, especially for a 56 kDa protein (apparent weight). Similar phosphorylation abnormalities were evidenced for Tc-mip²⁸: the expression of this protein was unchanged after PMA/ionomycin stimulation of T cells from relapsing MCNS patients, and the authors hypothesized that Tc-mip signaling pathway should be dysregulated. Immunofluorescence analyses on resting T cells from our patients also indicated that recurrent patients displayed more tyrosine phosphorylation localized in the nucleus in comparison to patients without recurrence and proteinuric controls. Several studies have previously described an increase in transcription factors activity during relapse in corticosteroid-sensitive patients, especially for NFκB^{25 29} and AP-1³⁰, and one observation reported an increase of intra graft NFκB expression in recurrent FSGS patients³¹. Our observations could be associated with an activation of transcription factors during recurrence that may result in the production of cytokines. Nevertheless, no increase of the measured cytokine transcripts was observed in the CD4⁺ and CD8⁺ T cells of recurrent patients.

To determine if any specific T cell population are involved in the recurrence of INS patients, their T cell phenotype was compared with that of controls previously described. We showed

that R patients displayed significantly less CD8⁺CD28⁻ T cells than NR and non-FSGS patients. CD8⁺CD28⁻ T cell numbers are known to increase with age³² and with long term exposure to alloantigens³³. From these observations, ages of the patients and time intervals following transplantation from the different groups were roughly matched in this study. Recent studies have demonstrated that some CD8⁺CD28⁻ cells could be suppressor T cells and play a role in controlling autoimmunity, allergy and transplant rejection^{34, 35}. Lower levels of CD8⁺ T suppressor cells in R patients could favor the development of an immune response, as suggested by the increased incidence of allograft rejection in patients with recurrent FSGS³⁶. Nevertheless, the hypothesis of a lack of regulatory T cells in recurrent patients seems improbable as no decrease in FOXP3 mRNA was found in their CD8⁺ T cells.

On the other hand, recurrent patients had more CD8⁺CD28⁺ T cells than the control groups. CD28 is a ligand for B7-1 that was recently found to be upregulated in podocytes during various genetic, drug induced, immune-mediated and bacterial toxin models of nephrotic syndrome³⁷. However, a CD8⁺CD28⁺ T cell population that could induce an over-stimulation of the podocyte through B7-1 in recurrent patients appears improbable since no cell infiltrate is observed in the kidneys of FSGS patients. Moreover, a soluble form of CD28, resulting from the shedding of the membrane form, has been described and could interact with B7-1 on the podocyte³⁸. However, the analysis of soluble CD28 concentrations in the sera of our three groups showed no significant difference between recurrent patients and the other groups (data not shown).

FSGS recurrent patients presented also a decrease in central memory T cells (CD8⁺/CD4⁺CD45RA⁻CD62L⁺) and an increase in naive T cells (CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁺) in comparison to non-FSGS patients and healthy individuals, suggesting that their CD8⁺CD28⁺ T cells should correspond to naive or recent thymic emigrant T cells. These results are in agreement with a recent publication which showed that relapsing nephrotic patients (i.e corticoid dependent) displayed a significant population of low-mature cells²⁹ and concluded to a thymic dysregulation of apoptosis in nephrotic patients. In the same study, a defect of apoptosis in CD8⁺ T cell population of recurrent patients was also suggested by quantitative mRNA analysis. We showed that CTLA-4 mRNA was down-regulated in the CD8⁺ cells of recurrent patients, as well as MAPK9 (JNK2). Thus, resting CD8⁺ T cells have very low levels of JNK2 mRNA³⁹ and do not express CTLA-4⁴⁰, reinforcing the hypothesis that recurrent patients may display more resting CD8⁺ T cells.

Nevertheless, the persistent phosphorylation pattern found in about 30% of PBMC nuclei of patients with INS recurrence contrast with the predominant naive phenotype in the CD8⁺ T cell compartment. The constitutive activation of nuclear proteins might be linked with a defect in CD8⁺ T cell apoptosis and selection. This hypothesis needs to be confirmed and is under investigation.

In conclusion, we have shown that FSGS recurrence after transplantation is associated with several complex significant changes in CD8⁺ T cells, including an increase in circulating CD8⁺CD28⁺ naive T cells and abnormalities in the regulation of T cell activation. Our data suggest that CD8⁺ T cells may play a role in the recurrence of INS after transplantation, although a link between these observations and podocyte damage remains to be determined.

REFERENCES

1. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, et al: Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1:575-82, 1998
2. Boute N, Gribouval O, Roselli S, et al: NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 24:349-54, 2000
3. Kaplan JM, Kim SH, North KN, et al: Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 24:251-6, 2000
4. Hoyer JR, Vernier RL, Najarian JS, et al: Recurrence of idiopathic nephrotic syndrome after renal transplantation. 1972. *J Am Soc Nephrol* 12:1994-2002, 2001
5. Hamburger J, Crosnier J, Noel LH: Recurrent glomerulonephritis after renal transplantation. *Annu Rev Med* 29:67-72, 1978
6. Rea R, Smith C, Sandhu K, Kwan J, Tomson C: Successful transplant of a kidney with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 16:416-7, 2001
7. Kemper MJ, Wolf G, Muller-Wiefel DE: Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child. *N Engl J Med* 344:386-7, 2001
8. Lagrue G, Branellec A, Niaudet P, et al: [Transmission of nephrotic syndrome to two neonates. Spontaneous regression]. *Presse Med* 20:255-7, 1991
9. Dantal J, Godfrin Y, Koll R, et al: Antihuman immunoglobulin affinity immunoadsorption strongly decreases proteinuria in patients with relapsing nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 9:1709-15, 1998
10. 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* 330:7-14, 1994
11. 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* 334:878-83, 1996
12. Bakker WW, Baller JF, van Luijk WH: A kallikrein-like molecule and plasma vasoactivity in minimal change disease. Increased turnover in relapse versus remission. *Contrib Nephrol* 67:31-6, 1988
13. Tanaka R, Yoshikawa N, Nakamura H, Ito H: Infusion of peripheral blood mononuclear cell products from nephrotic children increases albuminuria in rats. *Nephron* 60:35-41, 1992

14. Cheung PK, Klok PA, Baller JF, Bakker WW: Induction of experimental proteinuria in vivo following infusion of human plasma hemopexin. *Kidney Int* 57:1512-20, 2000
15. Shalhoub RJ: Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function. *Lancet* 2:556-60, 1974
16. Florido JF, Diaz Pena JM, Belchi J, et al: Nephrotic syndrome and respiratory allergy in childhood. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2:136-40, 1992
17. Lagrue G, Laurent J, Rostoker G: Food allergy and idiopathic nephrotic syndrome. *Kidney Int Suppl* 27:S147-51, 1989
18. Frank C, Herrmann M, Fernandez S, et al: Dominant T cells in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Kidney Int* 57:510-7, 2000
19. Matsumoto K, Kanmatsuse K: Elevated interleukin-18 levels in the urine of nephrotic patients. *Nephron* 88:334-9, 2001
20. Cunard R, Kelly CJ: T cells and minimal change disease. *J Am Soc Nephrol* 13:1409-11, 2002
21. Sahali D, Pawlak A, Le Gouvello S, et al: Transcriptional and post-transcriptional alterations of $\text{IkappaB}\alpha$ in active minimal-change nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 12:1648-58, 2001
22. Yap HK, Cheung W, Murugasu B, et al: Th1 and Th2 cytokine mRNA profiles in childhood nephrotic syndrome: evidence for increased IL-13 mRNA expression in relapse. *J Am Soc Nephrol* 10:529-37, 1999
23. Tain YL, Chen TY, Yang KD: Implications of serum TNF-beta and IL-13 in the treatment response of childhood nephrotic syndrome. *Cytokine* 21:155-9, 2003
24. Stachowski J, Barth C, Michalkiewicz J, et al: Th1/Th2 balance and CD45-positive T cell subsets in primary nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 14:779-85, 2000
25. 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* 172:688-98, 2004
26. Bariety J, Bruneval P, Hill G, et al: Posttransplantation relapse of FSGS is characterized by glomerular epithelial cell transdifferentiation. *J Am Soc Nephrol* 12:261-74, 2001
27. de Oliveira JG, Xavier P, Carvalho E, et al: T lymphocyte subsets and cytokine production by graft-infiltrating cells in FSGS recurrence post-transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 14:713-6, 1999

28. Grimbert 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* 198:797-807, 2003
29. Mansour H, Cheval L, Elalouf JM, et al: T-cell transcriptome analysis points up a thymic disorder in idiopathic nephrotic syndrome. *Kidney Int* 67:2168-77, 2005
30. Cao C, Lu S, Dong C, Zhao R: Abnormal DNA-binding of transcription factors in minimal change nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 16:790-5, 2001
31. Schachter AD, Strehlau J, Zurakowski D, et al: Increased nuclear factor-kappaB and angiotensinogen gene expression in posttransplant recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *Transplantation* 70:1107-10, 2000
32. Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, et al: T cells and aging, January 2002 update. *Front Biosci* 7:d1056-183, 2002
33. Colovai AI, Mirza M, Vlad G, et al: Regulatory CD8+CD28- T cells in heart transplant recipients. *Hum Immunol* 64:31-7, 2003
34. Sakaguchi S: Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101:455-8, 2000
35. Shevach EM: Regulatory T cells in autoimmunity*. *Annu Rev Immunol* 18:423-49, 2000
36. Kashtan CE, McEnery PT, Tejani A, Stablein DM: Renal allograft survival according to primary diagnosis: a report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study. *Pediatr Nephrol* 9:679-84, 1995
37. Reiser J, von Gersdorff G, Loos M, et al: Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 113:1390-7, 2004
38. Hebbbar M, Jeannin P, Magistrelli G, et al: Detection of circulating soluble CD28 in patients with systemic lupus erythematosus, primary Sjogren's syndrome and systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 136:388-92, 2004
39. Conze D, Krahl T, Kennedy N, et al: c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 have distinct roles in CD8(+) T cell activation. *J Exp Med* 195:811-23, 2002
40. Oosterwegel MA, Greenwald RJ, Mandelbrot DA, Lorschach RB, Sharpe AH: CTLA-4 and T cell activation. *Curr Opin Immunol* 11:294-300, 1999

Table I. Main clinical characteristics of the patients in the three groups.

Groups	Relapse	Non Relapse	Non-FSGS
Gender	5F/4M	5F/4M	5F/4M
Mean age (years)±S.E	33.4±5.3	35±3.4	35.6±4.2
Time after Tx (months) ±S.E	41.50±13.3	43.8±13.4	66.3±14
Serum creatinine (μmol/L)	268.75 ±87	116.4 ±9.9	256.9 ±36.9
Proteinuria (g/day)	4.6 ±1.5	0.21 ±0.06	2.37 ± 0.45
Calcineurin inhibitors	9/9	9/9	9/9
CS	6/9	5/9	2/9
MMF	5/9	5/9	4/9
AZA	1/9	3/9	2/9
Polyclonal antibodies (ATG, ALG)	3/9	3/9	4/9

Table II. Probe sequences used for cytokine and protein transcript quantification

Gene Symbol	Gene Name	Probe Sequence	GenBank accession number
TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	ATGTTGTAGCAAACCCCTCAAGCTGA	NM000594
IFNG	interferon, gamma	ATATTTTAATGCAGGTCATTGAGAT	NM000619
IL4	interleukin 4	GCGGGCTTGAATTCCTGCTGTGA	NM172348
IL13	interleukin 13	GAACCAGAAGGCTCCGCTCTGCAAT	NM002188
PRF1	perforin 1 (pore forming protein)	GGAGTGCCGCTTCTACAGTTCCAT	NM005401
GZMB	granzyme B	AAGACTTCCTTTAAGGGGGACTCTG	NM004131
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	TGTCTTCTGCAAAGCAATGCACGTG	NM005214
MAPK9	mitogen-activated protein kinase 9	GATTGTTTGTGCTGCATTTGATACA	NM139069
FOXP3	forkhead box P3	ATCCGCTGGGCCATCCTGGAGGCTC	NM014009
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	GGTCAAGGTCGCAAGCTTGCTGGTG	NM000194

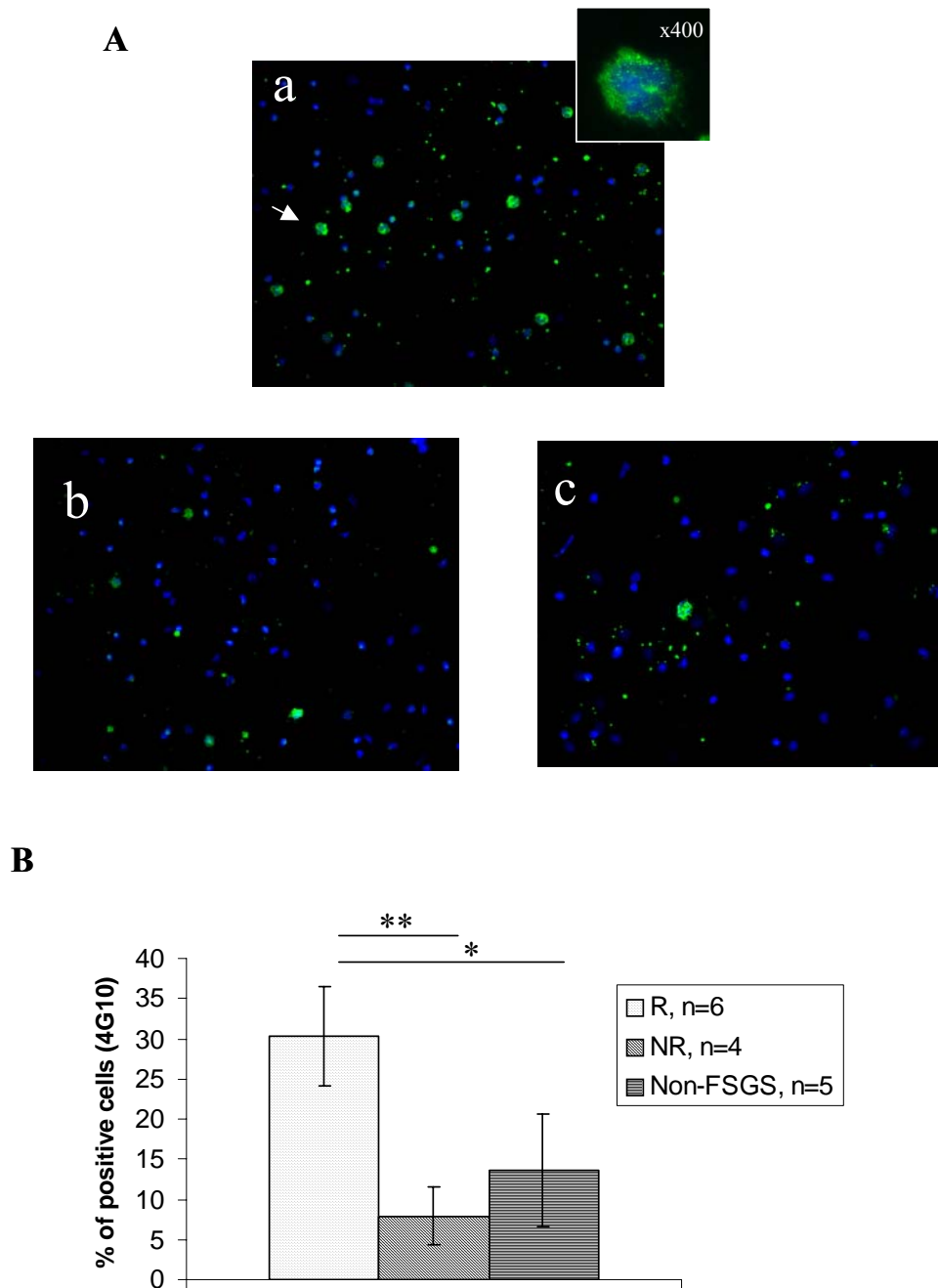


Figure 1: Analysis by immunocytochemistry of tyrosine phosphorylation points up a nuclear localization in the PBMC of recurrent patients. A- Non stimulated PBMC from INS patients with recurrence (a), INS patients without recurrence (b) and proteinuric controls (c) were cytopun, permeabilized and stain with a phospho-tyrosine antibody (4G10) coupled to an anti-mouse FITC antibody. Nuclei were stained with 0.5µg/mL DAPI. One representative patient for each group is represented at a x 200 magnification. The inset (a) represents a positive staining for 4G10 in the nucleus at a x 400 magnification. B-The percentage of positive cells for 4G10 was determined as described in the materiel and methods for six recurrent patients (R), four non recurrent patients (NR) and five proteinuric controls (non FSGS). The mean percentage of positive cells± S.D is represented on the graph for each group. *, p<0.05 and **, p<0.01

Figure 2. Hervé et al.

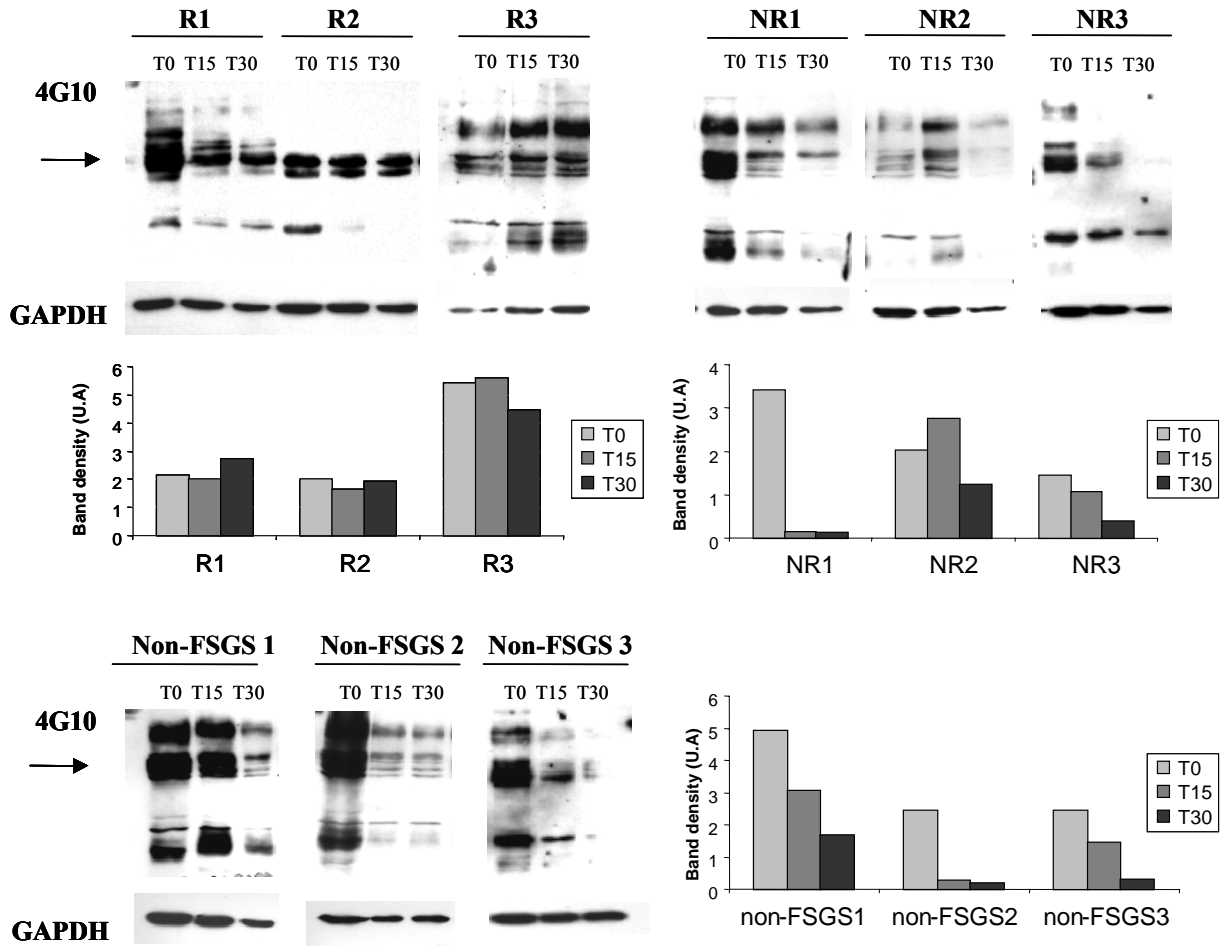


Figure 2. Tyrosine phosphorylation patterns in peripheral cells from FSGS patients and non-FSGS proteinuric patients after transplantation. PBMC from representative FSGS patients (3R and 3NR) and non-FSGS control group (n=3) were stimulated with 50 ng/mL PMA and 1 μ g/mL calcium ionophore for 15 min (T15) and 30 min (T30). Cytoplasmic protein lysates were separated on a SDS-PAGE gel and revealed with a phospho-tyrosine antibody (4G10) or a GAPDH antibody (housekeeping protein) (representative immunoblot). Non stimulated PBMC (T0) served as a control. The band densities of the 56 kDa protein, quantified using Kodak Digital analysis software (1D version) and normalized with the GAPDH protein intensity, are indicated for each patient.

Figure 3. Hervé et al.

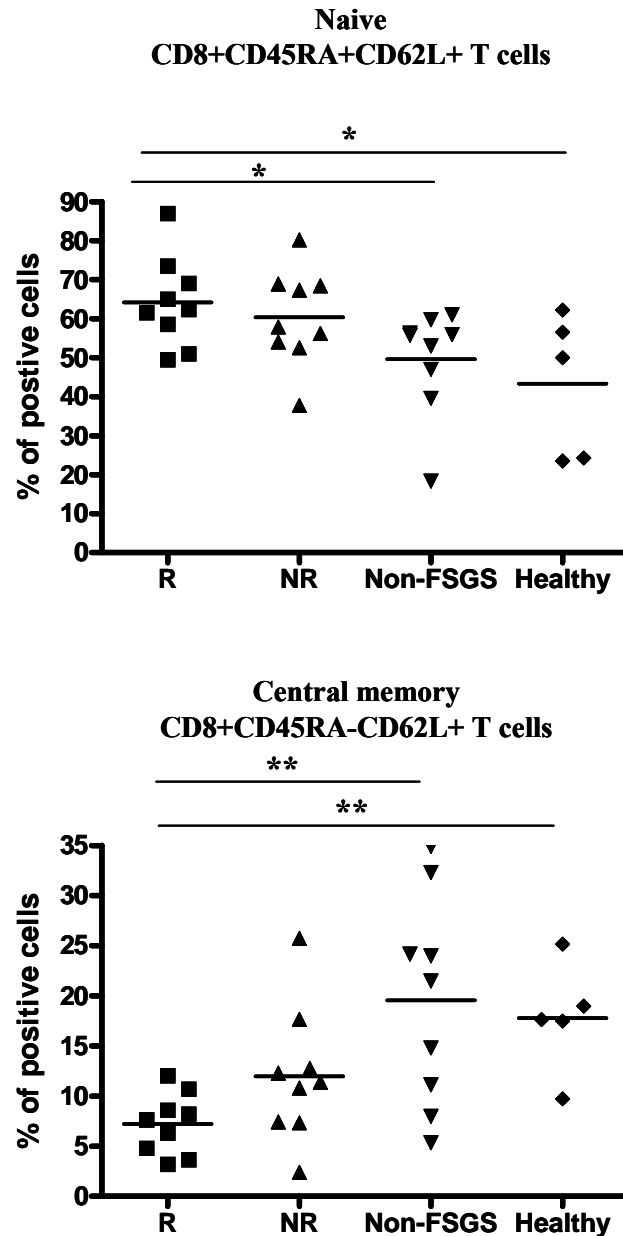


Figure 3. CD8+ memory T cells in FSGS patients and proteinuric controls after transplantation. CD8+ T cells were purified from the blood of patients from the three groups. A flow cytometry analysis was performed for the CD8, CD45RA and CD62L T cell surface markers. The results are expressed as the percentage of positive cells amongst the gated CD8⁺ T cells. A bar indicates the median range for each group. The non parametric Mann-Whitney test was performed to compare values of the R group (n=10) vs. the NR group (n=9) and the non-FSGS group (n=9), *, p<0.05 and **, p<0.01.

Figure 4. Hervé et al.

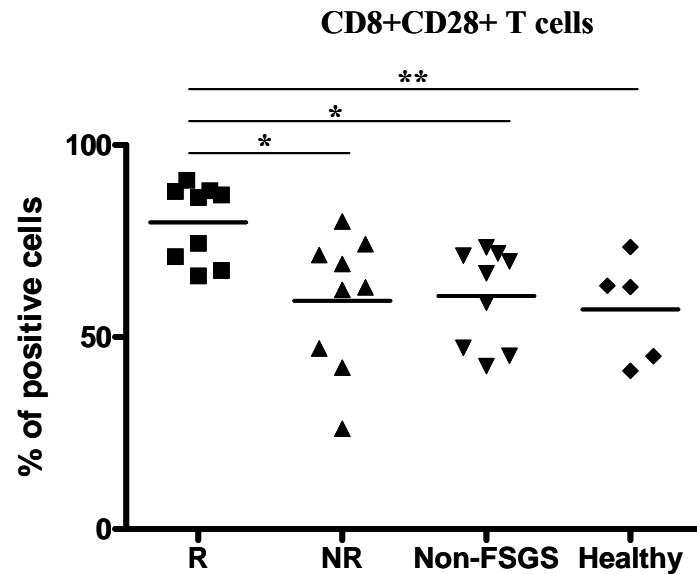


Figure 4. Recurrent patients displayed significantly more peripheral CD8⁺CD28⁺ T cells after transplantation than the Non Recurrent and non-FSGS control groups. PBMC from all the patients were extracted after transplantation and CD8⁺ cells were purified by negative separation. Flow cytometry was then performed for CD8 and CD28 cell surface markers. Statistical analysis of the percentage of CD8⁺CD28⁺ positive T cells in the three groups: R group (n=10) vs. NR group (n=9) and non-FSGS group (n=9) was performed. A bar indicates the median range for each group. The non parametric Mann-Whitney test was performed. *, p<0.05 and **, p<0.01

Figure 5. Hervé et al.

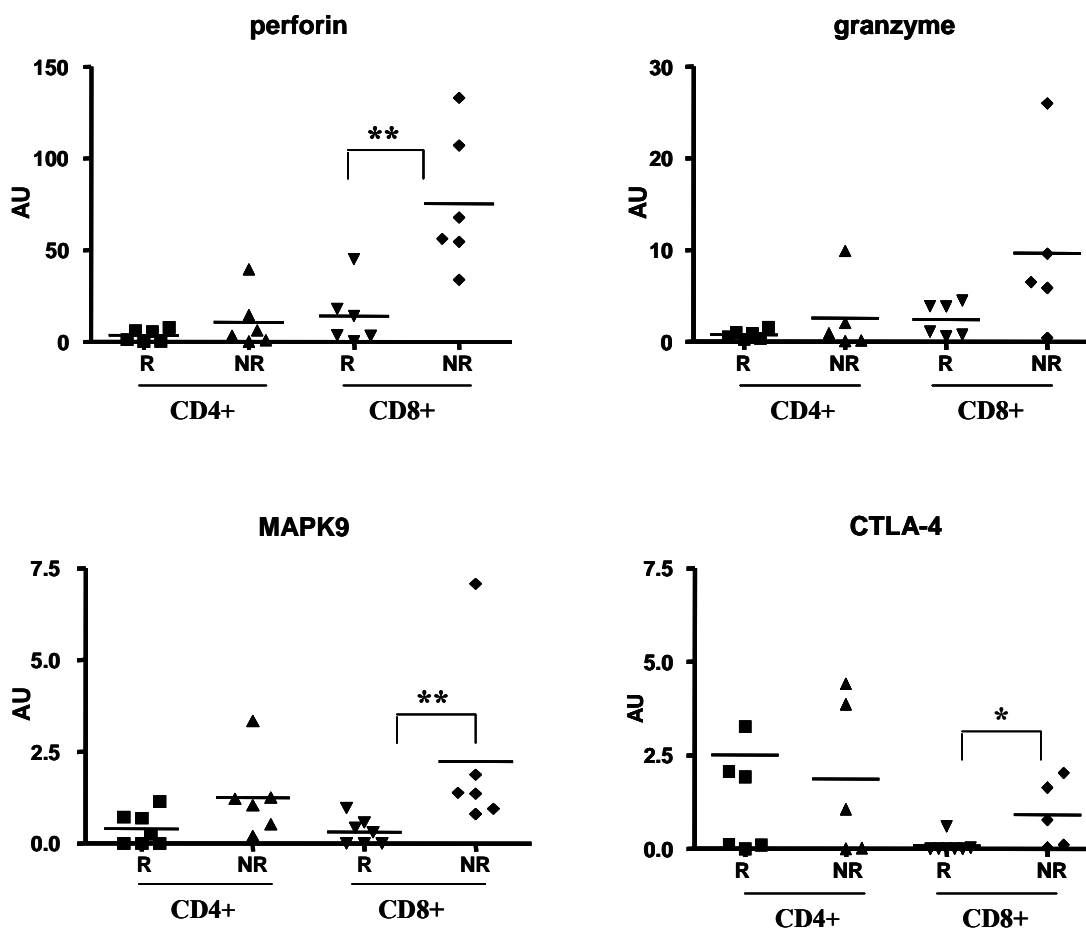


Figure 5. Quantitative mRNA expression for different proteins and cytokines in CD4⁺ and CD8⁺ purified T cells in FSGS patients after transplantation. cDNA from purified peripheral CD8⁺ and CD4⁺ T cells was synthesized and analyzed with perforin, granzyme, MAPK9 and CTLA-4 primers. A bar indicated the median range for each group. The non parametric Mann-Whitney test was performed to compare values of the R group (n=6) vs. NR group (n=6).*, p<0.05 and **, p<0.01.

B-3 Résultats complémentaires et discussion des articles 2 et 3

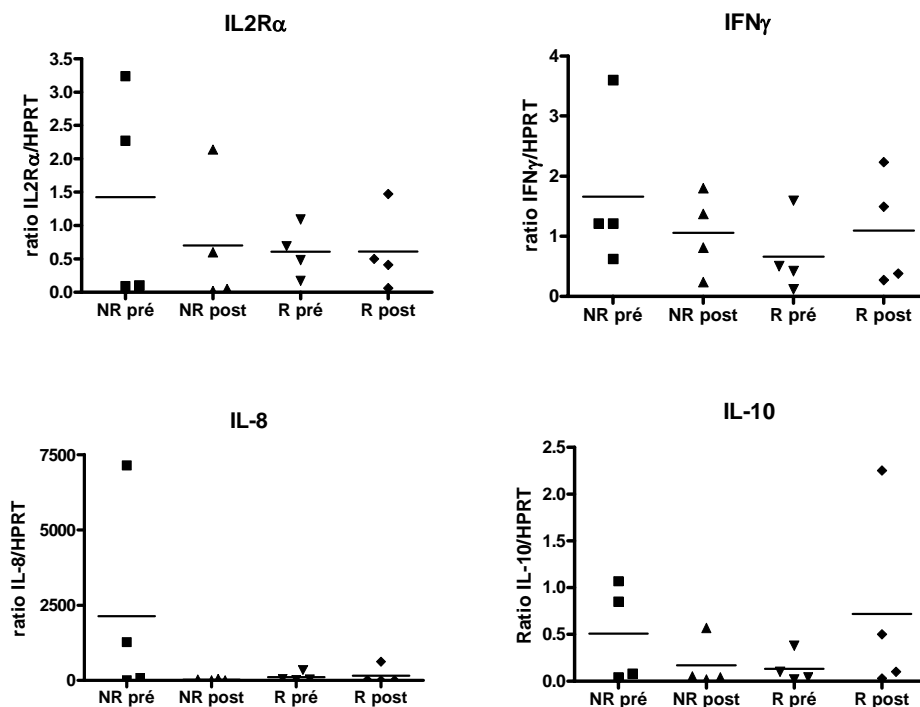
Nous avons montré grâce à l'utilisation de deux techniques différentes que les patients présentant une récurrence immédiate de SNI après transplantation exprimaient plus de cellules naïves que des patients ne récidivant pas ou des patients protéinurique d'une autre origine. Cette observation va plutôt à l'encontre de l'idée générale qui supposait que la phase active de la maladie (rechute) était associée à un phénotype lymphocytaire activé.

Prédominance d'une population naïve chez les patients récidivant

L'étude du répertoire T des patients SNI récidivant avant et après transplantation et comparée à celui des groupes contrôles n'a pas montré d'activations clonales spécifiques, suggérant que la récurrence n'est pas le résultat d'une activation T médiée par le TCR (article 2). Ces résultats sont en opposition avec une étude précédente qui avait montré que des patients SNI/HSF avec des rechutes fréquentes présentaient des expansions clonales persistantes dans la population T CD8⁺ (Frank et al. 2000). Les populations lymphocytaires naïves expriment un répertoire T gaussien, et le fait que les patients récidivant présentent moins d'altérations de leur répertoire T que les populations contrôles pourraient refléter une expansion de lymphocytes T naïfs.

Nous avons effectué en plus de l'analyse du répertoire T, une analyse par PCR quantitative de différents transcrits exprimés par les lymphocytes T activés chez les patients récidivant ou non leur SNI (figure 20). Parmi les transcrits de cytokines analysés (IL-2R α , IFN γ , IL-8, IL-10), aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les patients récidivant et ne récidivant pas, aussi bien avant qu'après transplantation (1 mois). Par ailleurs, les quantités de transcrits de l'IL-13 et de l'IL-2 étaient inférieures au seuil de détection. L'analyse a été effectuée sur les PBMC totaux des patients, ce qui pourraient expliquer l'absence de différences observées.

Les études de phénotypage chez les patients SNI après transplantation (article 3) montrent que les patients récidivant expriment moins de CD8⁺CD28⁻ que les patients ne récidivant pas, les patients protéinuriques non SNI et les contrôles sains.



ARNm de l'IL-13 et l'IL-2 indétectables

Figure 20 : Expression quantitative de différents transcrits de cytokines dans les PBMC de patients SNI récidivant (R) ou non (NR), avant (pré) et après transplantation (post).

La population $CD8^+CD28^-$ est connue pour augmenter suite à une activation et avec l'âge. Il a d'ailleurs été reporté une baisse d'activité du SNI avec l'âge (Fakhouri et al. 2003), associée à l'involution thymique (Steinmann et al. 1985). Ces observations suggèrent que les patients récidivant possèdent moins de cellules activées que les groupes contrôles, et par conséquent plus de cellules naïves. Nous avons également montré que ces patients présentaient plus de cellules naïves $CD8^+CD45RA^+CD62L^+$ que les contrôles, cellules pouvant correspondre à des cellules thymiques récemment émigrantes. Ces résultats rejoignent ceux décrits dans une publication récente : grâce à la technique SAGE, l'équipe de G. Deschênes a montré que les patients corticorésistants en rechute exprimaient une population plus importante de cellules immatures exprimant le marqueur CD62L, et conclut à une dérégulation de l'apoptose des cellules thymiques chez les patients SNI (Mansour et al. 2005). Cette même équipe a également décrit que le domaine C-lectine de la L sélectine (CD62) était

relargué après clivage dans le sérum de patients et que cette forme soluble pouvait interagir avec la podocalyxine exprimée par le podocyte. Cependant cette hypothèse n'a pas été confirmée par le dosage du domaine C-lectine dans le sérum des patients.

Rôle de CD28 soluble ?

Une sur-expression de B7-1 a été décrite récemment sur le podocyte dans plusieurs modèles de syndrome néphrotique (Reiser et al. 2004). Comme les patients récidivant expriment plus de marqueur CD28 et qu'une forme soluble de CD28 (CD28s) résultant du clivage de la forme membranaire a été décrite (Hebbar et al. 2004), nous avons dosé grâce à un test ELISA la concentration de CD28s dans les sérums des patients SNI (figure 21). Aucune différence de concentration n'a pu être mise en évidence entre les patients récidivant et ne récidivant pas leur SNI.

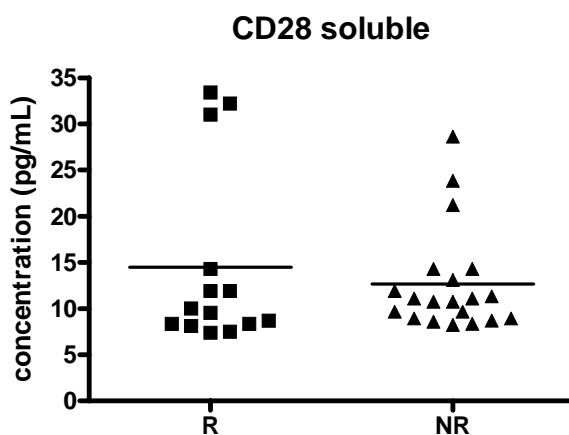


Figure 21 : Concentration sérique de CD28 soluble détectée par ELISA chez les patients récidivant (n=14) et ne récidivant pas leur SNI (n=20) après transplantation.

L'hypothèse d'une augmentation des populations CD8⁺ naïves chez nos patients récidivant est également suggérée par l'étude de différents transcrits exprimés par les PBMC des différents patients. En effet, nous avons montré que les lymphocytes T CD8⁺ des patients récidivant exprimaient moins de transcrits de perforine, de MAPK9 (JNK2) et de CTLA-4 que les lymphocytes T CD8⁺ de patients ne récidivant pas. Or il se trouve que les cellules CD8⁺ naïves expriment peu de perforine, ont de faible niveau d'ARNm de MAPK9 (Conze et al. 2002) et n'expriment pas le CTLA-4 (Oosterwegel et al. 1999).

Suite à ces résultats, nous avons voulu savoir si la quantité de transcrits de MAPK9 était également plus faible chez les patients récidivant avant transplantation comparé à celle de patients ne récidivant pas. Nous avons pour cela utilisé les PBMC des patients étudiés dans l'article 2. Nous n'avons malheureusement pas pu faire l'étude sur les cDNA de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ triées. Les résultats sont représentés sur la figure 22A.

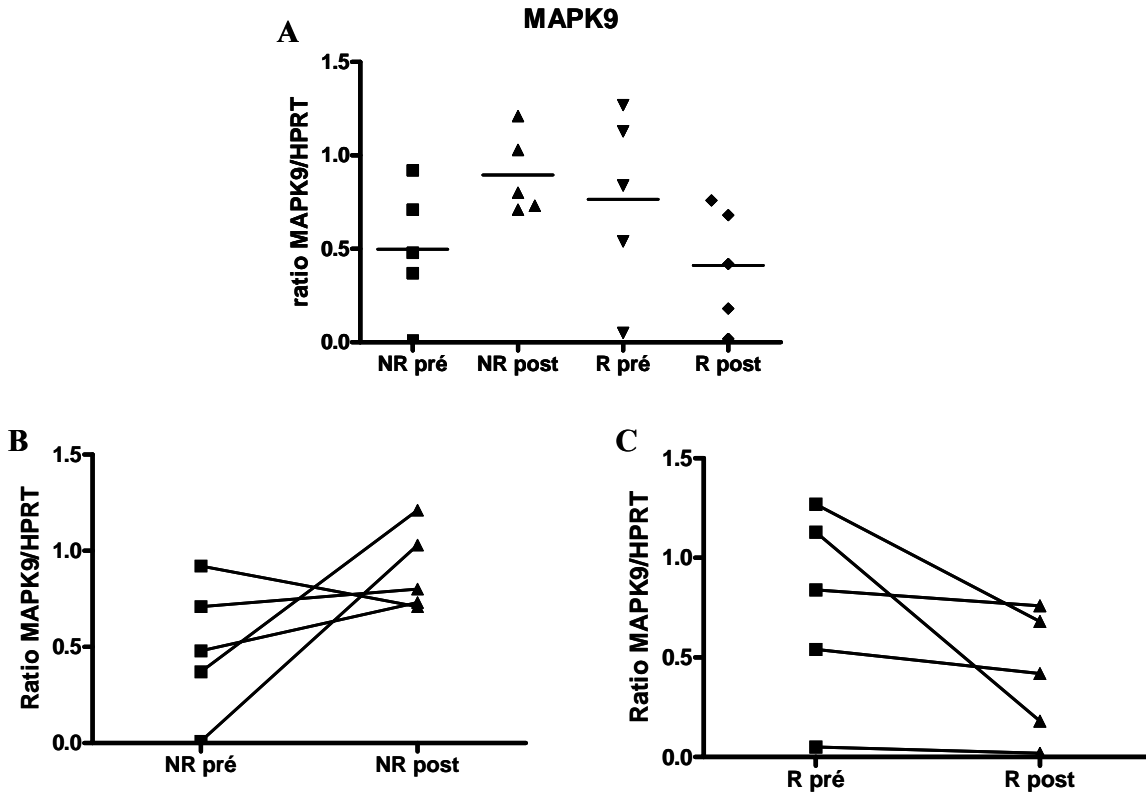


Figure 22 : Expression de la quantité de transcrits de MAPK9, obtenue par PCR quantitative, dans les PBMC de patients récidivant (R) et ne récidivant pas (NR), avant transplantation et à 1 mois après transplantation.

A : Expression de la moyenne du ratio MAPK9/HPRT pour 5 patients R et 5 patients NR avant et après transplantation. La valeur du ratio MAPK9/HPRT est également représentée avant et après transplantation pour un même patient NR (B) ou R (C).

La différence de quantité de transcrits de MAPK9 exprimée par les PBMC de patients récidivant et ne récidivant pas est retrouvée là aussi après transplantation, avec une expression plus faible dans la récurrence. Par contre, aucune différence d'expression n'est observée avant transplantation dans les PBMC totaux, suggérant que la baisse d'activité de transcription de MAPK9 intervienne après la transplantation chez les patients récidivant. En effet, si l'on observe la quantité de transcrit de

MAPK9 exprimée avant et après transplantation chez un même patient, on remarque que les patients ne récidivant pas présentent une augmentation de la transcription de MAPK9 après transplantation (figure 22B) alors que les patients récidivant présentent une chute (figure 22C).

Anomalies de régulation

JNK2 (MAPK9) joue un rôle dans l'activation des lymphocytes T, et en particulier dans le contrôle de l'expansion des lymphocytes T CD8⁺ in vivo (Arbour et al. 2002). Les cellules T JNK2^{-/-} montrent un défaut de prolifération et l'absence de JNK2 seule entraîne une résistance des thymocytes à l'apoptose médiée par un anti-CD3 ainsi qu'un défaut dans la prolifération des cellules matures (Sabapathy et al. 1999). JNK2 joue également un rôle dans l'apoptose induite par le TNF α : il a été montré qu'une inhibition de JNK associée à une activation de NF κ B bloquait la voie des caspases et inhibait l'apoptose induite par le TNF α (Karin et al. 2002; Lin 2003). Or une activation de NF κ B a plusieurs fois été décrite dans les PBMC de patients SNI en poussée (Sahali et al. 2001; Mansour et al. 2005) et est suggérée chez nos patients par l'activation nucléaire observée en immunocytofluorométrie avec le 4G10. Ces observations corrént avec les résultats obtenus dans les lymphocytes T CD8⁺ des patients récidivant après transplantation, suggérant que ces derniers présentent un défaut d'apoptose des thymocytes entraîné par un défaut d'expression ou d'activation de JNK2 associée à une activation de NF κ B.

Les expériences de stimulation in vitro par la PMA/ionomycine sur les PBMC de patients SNI récidivant, non récidivant et protéinuriques non-SNI confirment la présence d'anomalies de réponse chez les patients récidivant. En effet, l'analyse du profil des tyrosines phosphorylation par western blot (4G10) dans les PBMC, à 15 et 30 minutes de stimulation, montre une persistance de la phosphorylation d'une bande à 56 kDa chez les patients récidivant (et à moindre mesure d'une bande à 59/60 kDa) en comparaison avec le profil d'expression obtenu pour les patients contrôles. D'après les protéines phosphorylées sur une tyrosine reconnues par le 4G10 et leur distribution au sein des différentes cellules et tissus (tableaux 5 et 6), nous pouvons émettre l'hypothèse que ces protéines correspondent respectivement à lck (p56) et fyn (p59).

Tableau 5 : Principales phospho-tyrosines kinases reconnues par l'anticorps 4G10

Abl	Bmx	EphB2	Flt3	Insulin R	Met	Rse	TrkB
Arg	BTK	EphB4	Fms	Lck	PDGFR α	Syk	Yes
Axl	Csk	Fes/Fps	Fyn	Lyn	PDGFR β	Src	ZAP-70
Blk	EGFR	FGFR3	IGF R	MAPK2	Ros	Tie2	

Tableau 6 : Récapitulatif des tyrosines kinases avec un poids moléculaire avoisinant les 56 kDa et leur localisation

Tyrosine Kinase	PM (kDa)	Expression
Fyn	59	Ubiquitaire
Lck	56	Cellules T, NK, cerveau
Lyn	56	Cellules B, myéloïdes, cerveau
Src	60	Ubiquitaire, peu dans cellules T
Yes	59-62	Ubiquitaire, peu dans cellules T

Malheureusement, il est impossible de savoir par le simple marquage au 4G10, si la phosphorylation de la tyrosine sur p56 correspond au site activateur (tyr 394) ou inhibiteur (tyr 505) de la protéine. Cependant, une étude a montré qu'une activation constitutive de lck et de fyn dans les lymphocytes T naïfs empêchait leur mort et entraînait leur survie à long terme (Seddon et al. 2002). Il faudrait pour confirmer la présence constitutive de la forme activée de lck chez nos patients récidivant utiliser des anticorps anti-lck spécifiques de la forme active disponibles dans le commerce.

Il est à ce stade de l'étude difficile de savoir la signification physiologique de ces observations et si les anomalies d'apoptose mises en évidence dans les cellules CD8⁺ naïves sont la cause ou une conséquence de la maladie. D'autres analyses sont nécessaires mais vont être limitées par la rareté des patients récidivant et leur retour souvent rapide en dialyse, la qualité (matériel frais) et la quantité de matériel biologique nécessaire.

C-Article 4 : Mise en évidence d'un facteur de perméabilité potentiel chez les patients présentant une récurrence de SNI après transplantation

C-1 Résumé de l'article 4

L'apparition du Syndrome Néphrotique Idiopathique (SNI) semble relié à des anomalies de la réponse immune, mais les mécanismes sont encore obscurs. Après transplantation, la maladie rénale récidive chez 30 à 50% des patients avec un SNI. L'hypothèse avancée pour expliquer cette récurrence immédiate est la présence dans le sérum des patients de facteur(s) circulant(s) ayant des propriétés pathogéniques envers les glomérules.

La concentration de ST2 soluble (sST2) a été mesurée par ELISA dans les sérums de 12 patients présentant une hyalinose segmentaire et focale primitive et de 158 patients traités par dialyse parmi lesquels 32 vont récidiver leur SNI après transplantation, 75 ne récidiveront pas et 51 dont la cause de l'insuffisance rénale n'est pas due à un SNI. En complément, la concentration de ST2 sérique a été mesurée chez 74 patients transplantés dont 20 présentent une récurrence du SNI au moment du prélèvement, 37 ne récidivent pas et 17 patients dont l'origine de la protéinurie n'est pas liée à un SNI. L'effet de ST2 soluble sur le podocyte a été étudié *in vitro* sur des cultures podocytaires immortalisées de souris.

La concentration de ST2 sérique est fortement augmentée après transplantation chez les patients présentant une récurrence de SNI ($p < 0.01$). L'incubation de sérums enrichis en sST2 avec les podocytes induit un décollement sévère *in vitro*, alors que l'immunodéplétion de sST2 des sérums des patients récidivant abolit cet effet. De plus, le degré d'agression podocytaire est corrélé avec la concentration de sST2. L'incubation des podocytes avec du sST2 recombinant induit les mêmes altérations podocytaires, suggérant que le sST2 soit le facteur pathogène contenu dans les sérums de patients récidivants.

La protéine ST2 soluble est surexprimée dans le sérum de patients présentant une récurrence après transplantation et est capable d'induire une altération podocytaire *in vitro*.

ARTICLE 4

The soluble ST2 factor is highly produced in FSGS recurrence and induces podocyte damage

Caroline Hervé, Maud Kamal, Sarah Bruneau, Jeanne Naulet, Shao-Yu Zhang, Jean Paul Soulillou, Georges Guellaen, Philippe Lang, Jacques Dantal and Djillali Sahali

From the Department of Nephrology-Transplantation of Hotel Dieu Hospital, and INSERM U 643, Nantes (CH, JPS, JD); AP-HP, Department of Nephrology-Transplantation of Henri Mondor Hospital and Equipe AVENIR-INSERM U581 (MK, SYZ, GG, PL, DS)

ABSTRACT

Background. The Idiopathic Nephrotic Syndrome (INS) occurs in the context of immune response disturbances, according to unknown mechanisms. Following transplantation, the renal disease recurs in 30-50% of the patients and it was postulated that recurrence results from the presence in the serum of circulating factor(s) endowed with glomerular pathogenic properties.

Method. We measured by ELISA the serum level of soluble ST2 (sST2) in 12 patients with primary FSGS displaying several renal outcomes, 75 patients who were being transplanted of whom, 20 FSGS experienced a recurrence, 37 FSGS were without recurrence and 17 with non-FSGS on native kidney. Thirteen normal subjects were included for analysis. The *in vitro* effects of sST2 were studied on a podocyte cell line.

Results. The sST2 serum level was highly increased in a subset of patients with FSGS recurrence ($p < 0,01$). The sST2-enriched serum induced *in vitro* severe podocyte injuries, whereas serum from recurrent patients and immunodepleted of sST2 had no effect. The degree of podocyte damages correlated with the sST2 serum concentration. The incubation of podocytes with recombinant sST2 induces similar podocyte alterations, suggesting the pathogenic nature of sST2 in the serum of a subset of patients with recurrence.

Conclusion. The sST2 is highly produced in a subset of patients with FSGS recurrence and induced podocyte damage *in vitro*.

INTRODUCTION

Idiopathic Nephrotic Syndrome (INS) is a glomerular disease characterized by a heavy proteinuria without histological evidence of inflammatory injuries or immune complex deposits. INS corresponds primarily to two entities: Minimal Change Nephrotic Syndrome (MCNS), and primary Focal Segmental Glomerular Sclerosis (FSGS). MCNS and FSGS respectively account for 70% and 20 % of INS in children, and each accounts for 25% of INS in adults (1,2).

Whereas steroid sensitive MCNS seems a single entity, FSGS appears as a heterogeneous disease, including immune and non-immune causes. In these latter, recent genetic approaches have elucidated some molecular aspects of FSGS by identifying several podocyte genes mutated in distinct forms of inherited nephrotic syndrome (3-6).

Resistance to therapy will occur in 50% of FSGS and 10% of MCNS despite various immunosuppressive treatments including, high-dose steroids, cyclosporine and cyclophosphamide (7). Such patients, often with heavy proteinuria and renal failure at presentation, progress to renal failure, requiring dialysis and transplantation. FSGS represents the most common acquired cause of chronic kidney failure in children. Recurrent disease in the transplant accounts in 30-50%, of patients with FSGS, often in the first hours or days following engraftment (8). This percentage raises to 80% for the second graft if recurrence caused the lost of the first graft (8). The number of years to achieve end-stage renal failure predicts the risk of recurrence after transplantation: 50% if end-stage renal failure was achieved in less than 3 years and 10-20% if this period was longer. Recurrence of the disease in the graft places medicine in a blind alley with regard to possible therapy.

Given the short delay between kidney transplantation and recurrence, one may exclude the generation of an immune adaptive mechanism against any component of the allogenic glomerular filtration barrier. A circulating factor endowed with pathogenic properties across the glomerular structure has been postulated (9). The extra-renal origin of the factor has been invoked from observations showing that: i) the nephrotic syndrome disappears when a MCNS or a FSGS kidney is engrafted into a INS free-patient (10,11); ii) plasma replacement performed in patients with FSGS who escape to drug therapy was successful (12,13); iii) immediate recurrences after transplantation have been successfully treated by plasma exchanges or plasma immunoadsorption techniques (14-16). Immunochemical analyses of affinity column eluate fractions that induced proteinuria suggested that the molecular weight of the permeability factor is below 150 kDa. The fact that this factor is able

to bind to protein A and to IgG suggests that it has some Ig-like properties. Finally, the inability to induce renal inflammatory lesions may suggest that the permeability factor does not exhibit proinflammatory properties.

Recently, we have shown that INS relapse evolves in the context of non-classical Th2 disease characterized by c-maf activation and a down regulation of IL-4, raising the question about the role of this cell population in the pathophysiology of the disease (17). A subset of CD4⁺ T cells that exhibits a Th2 profile, independently of IL4 production, could correspond to the T cell phenotype defined by the ST2 marker (18). In human, three alternative mRNA are expressed from the ST2 gene. The 4,5 Kb-transcript encodes for a transmembrane protein, the ST2 receptor (ST2L), which possesses an extracellular region with three immunoglobulin domains and a Toll/IL-1R intracellular domain (TIR), which is the signature of Toll-Like receptor (TLR) family. The 2,5 Kb-mRNA encodes only for the extracellular domain of the ST2L and generates a secreted protein (soluble ST2 or sST2). ST2L and sST2 share respectively 29 and 25% of homology with the IL-1R1. The 1,4 Kb-transcript exhibits a broader distribution whereas the ST2L and sST2 are predominantly expressed in the kidney, lung and liver (19). It was recently shown that activated human Th2 cells, but not Th1 cells or B cells, express the ST2 receptor and produce the soluble ST2 (20). In mice models, the ST2 expression has been found independent of the production of IL4, IL5 or IL10 (18). The ST2L is a stable marker of a subset of activated Th2 cells, but it is not an universal marker of this T cell phenotype (21-23). IL4 enhances while IFN γ , the master cytokine of Th1 cells, decreases ST2L expression. The expression of sST2 and ST2L is induced or increased in human monocytes and mouse macrophages stimulated with proinflammatory cytokines TNF, IL1, as well as by LPS (19,24,25).

In the present study, we showed that the sST2 is highly produced by peripheral mononuclear cells in a subset of patients with INS relapse. The most important levels were observed in patients with severe FSGS forms and in patients with recurrence following renal transplantation. We demonstrated that sST2 alters the podocyte function *in vitro* in a dose dependent manner. We demonstrated that depletion of sST2 from the serum of recurrence abrogated its pathogenic effect on podocyte morphology. These data establish for the first time a direct molecular link between immune system disorders and INS recurrence and point out the role of sST2 in podocyte dysfunction.

MATERIALS AND METHODS

Patients.

The clinical characteristics of patients with steroid resistant FSGS on native kidneys, with variable renal function, reported in this study were presented in table 1. The diagnosis of FSGS was proven by renal biopsy. In adults, all patients with FSGS have a proteinuria above 2 g/24 h, and a severe hypoalbuminemia at the time of blood sampling, which was performed before the beginning of steroid treatment. All patients were negative for HIV status. Controls included normal subject studied while undergoing routine analysis.

For this multicentric study, we have also collected sera from patients suffering from primitive biopsy-proven FSGS who had undergone kidney transplantation from July 1980 to July 2004. Pre transplant sera were collected within the 12 hours just before transplant procedure and kept frozen at -20°C . For a clear diagnosis of FSGS recurrence, we have selected patients who have presented an immediate proteinuria after transplantation and persisting above 1g/d at one month with a concordant kidney graft biopsy evidenced only minimal change glomerulonephritis or isolated FSGS lesions. All recurrent patients were treated by high dosage of CNI and/or introduction of ACEI and/or ARB therapy and/or treatment by plasmapheresis or immunoadsorption. But, at the time of the serum harvesting, all presented with a proteinuria above 1.5g/d. In opposition, patients without recurrence displayed variable level of proteinuria during the first week post transplantation but all the proteinuria were above 1g/d after one week and remained below 0.5g/d at any times thereafter. All patients gave informed consent to this study according to French legislative guidelines. The main clinical parameters of FSGS transplanted patients are presented in table II.

No differences were found between the two groups concerning sex distribution, number of transplantations, HLA matching, panel reactive antibodies, type of induction, duration of delayed graft function and maintenance immunosuppressive therapy. Nevertheless, some differences were observed between the two groups due to the clinical specificities of the patients presenting FSGS recurrence. By definition, proteinuria was significantly higher in the group of FSGS recurrent patients compared to “non recurrent” patients ($6\pm 1.3\text{g/d}$ vs. $0.26 \pm 0.1 \text{g/d}$, $p<0.01$). In addition, as patients with FSGS recurrence presented a more severe initial disease and a faster evolution from

diagnosis of initial disease to end stage renal failure than “non recurrent” patients, they were significantly younger at the time of transplantation (26 ± 12 vs. 37 ± 13 years, $p < 0.05$).

Nine patients with FSGS recurrence after kidney transplantation were treated by plasma exchanges. Long-term follow-up revealed graft failure due to FSGS recurrence in 5/9 patients within a median time of 25.5 months (range 12 to 72 months). The remaining 4 patients presented a good renal function with a proteinuria below 3g/d at 38, 48, 80 and 201 months after transplantation. A control group of 17 transplanted patients with non-FSGS related end stage renal failure (diabetes, uropathy, IgA glomerulonephritis, nephroangiosclerosis, chronic interstitial nephropathy, renal polykystosis) were included for comparison of post-transplant values (table II).

Informed consent was obtained from adult patients and normal volunteers.

Purification of PBMC and T cell subsets. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and T cell subsets were purified as previously described (26). The purity of the preparations was of 88-96%, as assessed by flow cytometric analysis, using FITC-conjugated CD2, CD4, CD19, and CD8 antibodies.

Flow cytometry. 2×10^5 cells per sample were centrifuged in 96-well microtiter plates. PBMC were stained with 10 μ M of anti human ST2 monoclonal antibody (MBL, Japan) for 30 min. After washing, cells were incubated with the appropriate PE or FITC-labeled mouse IgG1 for 20 minutes. Antibody combinations that have been associated with cellular function were done with the following phycoerythrin (PE), fluorescein isothiocyanate (FITC), or Phycoerythrin-Cy5 (PC5) –conjugated Mabs: anti-CD4-FITC or anti CD8-FITC + anti CD3-PC5 (T lymphocytes), anti CD19-PE (B cells), anti V α 24-PE (NKT cells) (Beckman Coulter, Marseille, France) , anti CD14 FITC (monocytes), anti CD16-PE + anti CD56-PE (NK cells) (BD Biosciences, Mountain View, CA). PE, PC5 or FITC-labeled mouse IgG1 was used as a negative control. Cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with PBS 1% formaldehyde. Fluorescence was measured by a FACScalibur cytofluorimeter and data were analyzed using CellQuest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Quantification of human soluble ST2 protein. The presence of ST2 in sera of INS patients and controls was determined with a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, R&D Systems, Minneapolis). Briefly, serum samples and standards were incubated in 96 wells microplates

precoated with anti-human ST2 antibody. After washing, biotin- conjugated antibody and streptavidin HRP were subsequently added into the microwells. After another washing, the substrate was added and after stopping the reaction, the optical density was determined at 450 nm. The amount of protein in each sample was calculated according to a standard curve of optical density values for known levels of ST2. The sensitivity of the test is 25pg/mL.

Mouse podocyte cell culture. We have used an immortalized mouse podocyte cell line, MPC5, derived from glomeruli of transgenic H-2K^b-tsA58 mice (27). The podocytes were maintained in RPMI 1640 medium (Sigma, St Louis, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Abcys, France), 100 mg/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin (Sigma, St Louis, USA). To propagate podocytes, the culture medium was supplemented with 10 U/mL mouse recombinant γ -interferon (Sigma, St Louis, USA) to enhance expression of the T antigen, and cells were cultivated at 33°C (permissive conditions) on a type I collagen matrix (R&D Systems, Minneapolis). To induce differentiation, podocytes were cultured at 37°C on type I collagen without γ -interferon (non permissive conditions) for two weeks. Cell passage between 10 and 14 were used in all experiments.

***In vitro* effects of sera on podocyte morphology and function.** In these experiments, serum from patients or normal subjects was added to culture medium at a final concentration of 3%. Podocytes were differentiated on collagen type I-coated glass cover slips and were incubated one hour, at 37°C, with INS serum from recurrence or non-recurrence, as well as non-INS serum. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 20 minutes, washed and incubated 5 minutes with 0.5 μ g/mL DAPI (Molecular probes, USA) to stain the podocytes nuclei. After washing, cells were monted in DABCO and DAPI positive cells were counted. Control wells were composed of podocytes incubated in culture medium. The percentage of podocyte detachment was calculated as follow:

$$\% \text{ of podocyte detachment} = \left(100 - \frac{(\text{mean of remaining podocytes after serum incubation})}{(\text{mean of remaining podocytes in negative wells})} \right) \times 100$$

Cytochemistry. Cover slips were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for twenty minutes. Non specific binding sites were blocked with 10% fetal bovine serum in PBS for 30 minutes. Primary and secondary antibodies were applied at the appropriate dilutions according to standard techniques, for

60 minutes at room temperature: the F actin cytoskeleton was imaged using a directly conjugated TRITC-phalloidin stain and points of contact of the actin cytoskeleton with the extracellular matrix were detected with a monoclonal anti vinculin antibody (SIGMA, St Louis) and a FITC-conjugated secondary antibody. After washing, the cover slips were mounted on glass slides with DABCO (Dakocytomation, Denmark). Images were obtained by using a Axioscop 2 plus photomicroscope attached to a AxioCam Hrc digital camera (Carl Zeiss, Germany) and processed with Axovision software (Carl Zeiss, Germany).

Lysis test. Podocytes were differentiated 14 days in 96 wells microplates precoated with type I collagen and stained with ^{51}Cr during 2 hours at 37°C ($3\mu\text{Ci}/1000$ cells). After washing, podocytes were cultured with the patients serums (5%) for 3 or 6 hours and released ^{51}Cr was measured using a beta counter. The percentage of specific lysis was calculated as $100 \times (\text{cpm experimental release} - \text{spontaneous release}) / \text{cpm (maximal release} - \text{spontaneous release})$. Maximal release: cells incubated with 1% SDS; spontaneous release: cells incubated with medium. Spontaneous release was always $< 10\%$.

Effects of serum immunoadsorption of sST2 on podocyte. Monoclonal anti-human ST2 antibody (50 μg , R&D Systems, Minneapolis) was immobilized onto agarose gel by using sodium cyanoborohydride as directed by the Seize primary immunoprecipitation kit instructions (Pierce, Rockford, IL). The antibody conjugate was washed and stored overnight. Immunoprecipitation was carried out on patients serums under rotation overnight at 4°C . Effluent were save and stored at -20°C . Agarose gel was washed four times with 500 μl of buffer containing 0.025 M Tris, pH 7.2, and 0.15 M NaCl and ST2 protein was eluted three times in 100 μl of Immunopure IgG elution buffer. The eluted fraction was neutralized by adding 15 μl of 1M Tris, pH 9.5 for functional applications. Fractions (effluent and elution) were tested by ELISA. Effluent and eluted fraction activity were tested on podocyte cell culture at 5% final concentration. Their reactivity with sST2 antibody was tested by immunoblotting.

In vitro effects of recombinant sST2 on podocytes. The recombinant sST2 (R et D system, catalog number 1004-MR) was incubated overnight with differentiated podocytes at variable concentration, then the percentage of cell detachment was determined by morphological analyses.

Statistical analyses. A non parametric test (Mann-Whitney) was used for group comparisons; *P* values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

Expression of ST2L and sST2 in patients with FSGS.

Previously, we have reported that patients with active INS display a non-classical Th2 disease in that the IL4 cytokine level is found very low in most patients (17). The possibility that ST2 could represent a marker of this particular Th2 population lead us to analyze the level of soluble ST2 (sST2) in a cohort of patients with FSGS. The clinical characteristics of patients are presented in table 1. We first studied thirteen patients with steroid resistant (SR) FSGS and eight normal subjects. All serum samples have been obtained at the time of diagnosis and frozen. Patients N°1 to 6 developed progressive renal failure within four years following the diagnostic. The patient N°3 presented terminal renal failure, requiring dialysis fifteen months after the onset of the disease. In seven patients with SR FSGS (N°7 to 13), renal failure appears five years after the diagnosis and slowly progressed. Eight normal subjects were included for analysis. The serum level of sST2 was very increased in patients with rapidly progressive FSGS (450-905 pg/mL), whereas in patients with slowly progressive FSGS, sST2 was below 20 pg/mL in four patients, 27, 53 and 165 pg/mL in other patients, respectively (Fig 1). In normal subjects, the level does not exceeded 68 pg/mL. Since patients with rapidly progressive FSGS are considered at high risk for post transplant recurrence, we sought to determine the ST2 profile in patients with recurrence disease versus non-recurrence, as well as in patients with nephrotic syndrome not related to FSGS (non-FSGS group). We first looked whether the distribution of cell population expressing the ST2 receptor (ST2L) was altered, by using FACS analyses. In five patients with FSGS recurrence, the ST2L positive cells (ST2L⁺) were significantly increased in CD4 and CD8 T cell populations but, unexpectedly, the ST2L⁺ cells were mostly found in the monocyte fraction (Fig 2A and 2B). The percentage of ST2L⁺ ranged from 5-18% in monocyte, 2-3.6% in CD4+T cell and 2-4.4% in CD8+ T cell populations. By contrast, the ST2L population was barely detectable in four patients with FSGS non-recurrence, or six non-FSGS patients (p<0,05%). This result suggests that recurrence of FSGS was associated with the recruitment of several immune cell subsets expressing the ST2L receptor, mostly the monocyte fraction. Then, we measured the serum level of sST2, following renal transplantation, in patients with recurrence (n=21) or non-recurrence (n=37) FSGS, as well as in non-FSGS patients (n=17). We found a significant increase of sST2 in 16 out 21 patients with recurrence, whereas the sST2 level was very lower in patients without recurrence and in non-FSGS patients. For ten patients from recurrence

group, sera samples were available before and after transplantation. We found that the sST2 was highly secreted at the time of recurrence (Fig.3B, left panel). In contrast, in thirteen patients from the non-recurrence group, the sST2 level was below the detection limits in most cases (Fig.3B, right panel). Before transplantation, while patients were maintained on dialysis therapy, the sST2 level was increased and not significantly different between the three groups (data not shown). These results suggest that up regulation of sST2 was strongly associated with recurrence in most patients with FSGS, but not in all, thus underlining the heterogeneity of the disease.

Serums from patients with FSGS recurrence induce podocyte injury *in vitro*

A soluble factor has been invoked in pathogenesis of glomerular disease in INS recurrence but the mechanisms by which this one triggers proteinuria is unknown. We used a mouse podocyte cell line (27) to investigate whether serum from recurrence altered morphological and or functional characteristics of podocytes. Incubation of cells in the presence of serum from recurrence caused cell body contraction, nucleus retraction and loss of cell processes, whereas cell morphology was well conserved in podocyte exposed to serum from non-recurrence, as compared with podocyte incubated with normal serum (Fig 4A). We analyzed the distribution of F-actin and vinculin, two cytoskeleton proteins, by dual-labelling immunofluorescence. We found that podocytes incubated with serum from recurrence exhibited profound alterations of staining, characterized by a considerable redistribution of F-actin filaments around the nucleus, with a rarefaction of cortical actin and a scarce expression of vinculin, a focal adhesion protein (Fig 4B). In contrast, podocytes incubated with serum from non-recurrence displayed a normal phenotype. To explore the possibility that dramatic changes might result from cell lysis, we labelled cells with ^{51}Cr , then the human serum was added in the culture medium and the released ^{51}Cr was quantified at the end of experiments. The percentage of ^{51}Cr released by cells co-incubated with serum from recurrence or non-recurrence was not significantly different (Fig 4C). We conclude that cell alterations were not a consequence of lysis phenomenon. Altogether, these results suggest that cell alterations resulted from loss of anchorage of podocytes to the extracellular matrix. Then, we tested whether the serum from recurrence induced consistently a podocyte detachment. We analyzed 14 patients from recurrence and 13 from non-recurrence. Podocytes were exposed to 3% serum for one hour, at 37°C, then analyzed by phase contrast microscopy and two thousand cells by experiment were counted. The percentage of cell detachment was significantly increased ranging from 40 to 65% of cells, in the presence of serum from

recurrence, whereas the cells incubated with serum from non-recurrence remained adherent to collagen (Fig 5A). These findings led us to determine whether the presence of sST2 in the serum was associated with podocyte detachment.

Relationship between sST2 concentration and podocyte detachment

Sera of patients with recurrence containing different sST2 concentrations were tested. A close relationship between the serum concentration of sST2 and the percentage of podocyte detachment was clearly established, whereas no significant detachment was observed in the absence of sST2 (Fig 5B). These results suggest that sST2 may be involved in podocyte dysfunction in a subset of patients with recurrence. Nonetheless, we cannot exclude the possibility that sST2 only reflects an abnormal activation of some immune cell subsets and it is not by itself, directly involved in podocyte damage. To resolve this question, we performed three approaches. First, we incubated sST2-containing recurrence sera with agarose beads pre-complexed with anti-sST2 antibody. The immunopurified fraction (eluates), as well as the non-retained material (effluents) were added in medium culture and morphological aspect of podocytes was studied. We found that podocyte exposed to ST2-depleted recurrence serum exhibited a normal phenotype consisting of a large cell body with elongated cell expansions, whereas podocytes incubated with the eluate lost their adherent phenotype (data not shown). The percentage of cell detachment is significantly increased, as compared with the eluates from non-recurrence sera (Fig 6A). Second, we analyzed the potential consequences of co-culture of podocytes with sST2 recombinant protein. We found that sST2 induced a podocyte detachment in a dose-dependent fashion (Fig 6B). Most importantly, the concentrations of sST2 that altered the phenotype were similar to the ones observed in sera from recurrence. Finally, we analyzed by immunoblotting the reactivity of eluates from recurrence and non-recurrence with anti-ST2 antibody. Three major bands were detected in the eluate from recurrence, corresponding to 100, 52 and 25 kDa, but only the 52 kDa-band appears specific and correspond to molecular weight of sST2 (29).

DISCUSSION

FSGS is a heterogeneous glomerular disease, in which the primary disorder may involve the immune system and /or the podocyte. In this latter, significant advances have unraveled the molecular connection between the cytoskeleton and the slit diaphragm, by identifying several genes mutated in genetic forms of steroid resistant FSGS. On the other hand, little is known about immune mechanisms allowing to podocyte disorder. Since the first report of recurrent FSGS following renal transplantation, the pathophysiology of the disease became a challenge for nephrologists. It was postulated that disease results from alteration of T cell function, leading to a release of a circulating factor responsible of deregulation of glomerular filtration barrier. In this regard, FSGS with recurrence represents the best model in which the immune origin of idiopathic FSGS is highly suggested. We reported here that sST2 might fulfill the characteristics of such factor, in a subset of patients, on the basis of the following findings: i) a close relationship was established between the recurrence and high levels of sST2; ii) the sST2-containing eluates from recurrent sera induced podocyte damage, whereas sST2-depleted sera did not have any effects; iii) the sST2 induced podocyte damage at concentration comparable to the one assayed in serum of patients with recurrence; iv) anti-ST2 antibody detected a ≈ 52 kD-band only in serum from recurrence. Altogether, these findings suggest that sST2 may represent the molecular link between activated immune cells and podocyte dysfunction in a subset of patients with recurrence. The increased production of sST2 was observed in approximately 80% of patients with recurrence (17/21), underlying the pathogenic role of other circulating factors. Candidate factors have been suggested but not yet characterized (30). We observed that high sST2 levels in serum were associated with podocyte damage *in vitro*. Increased production of sST2 has been reported in acute pathological conditions such as myocardial infarction, sepsis, trauma and flares of idiopathic pulmonary fibrosis (31-33). By contrast to these situations, increased sST2 was persistent in INS with recurrence suggesting that sustained activation of sST2-mediated signaling pathway might be directly or indirectly deleterious to podocyte.

Several works reported that INS is associated with depressed cell-mediated immunity and decreased lymphocyte responses to mitogens (34,35). We show here that only patients with FSGS recurrence exhibited an up regulation of ST2 in monocytes cells as well as in CD4 and CD8 T cell subsets. It was recently demonstrated that ST2L inhibits TLR signaling-mediated NF κ B activation through sequestration of the adaptor molecules MyD88 and Mal (36). It is also possible that sST2

acts as a decoy receptor and interferes with TLR signaling (37). Such mechanism has been demonstrated in preeclampsia, in which the soluble VEGF receptor-2 (soluble Flt1), secreted by placental ischemia, binds circulating VEGF, thus inhibiting VEGF signaling in glomerular endothelial cells (38). The inhibition of TLR signaling in macrophage cells may impede the generation of a Th1-mediated adaptive response. Such negative regulatory role could be exerted in ST2-overexpressing T cells. Thus, these data may suggest that altered T cell function in the disease may result from up regulation of ST2. In many instances, upregulation of ST2 occurs in the context of inflammation, which evolves independently of Th2 response development (19,24,25). These data lead to assumption that sST2 could have an anti-inflammatory role and prevents an excessive Th2 response. This hypothesis is supported by experimental findings showing that ST2 represses the production of TNF, IL1 and IL6 in experimental models of LPS-induced lung inflammation, murine collagen-induced arthritis, as well as in rheumatoid patients (39,40). Conversely, inhibition of endogenous ST2 worsened the LPS-induced inflammatory injuries (41). The mechanisms of negative regulation of inflammation by ST2 are not clearly understood. It might involve the inhibition of NF κ B since, in contrast to other members of TLR family, ST2L signals inhibit the activation of Myd 88 and Mal adaptor proteins that play a crucial role in TLR proximal signaling-induced NF κ B (42). Overexpression of ST2L blocks the IL1R, TLR2, TLR4 and TLR9 signaling (43). The fact that ST2 inhibits inflammatory responses may explain why recurrences are not associated with inflammatory injuries in glomerulus (44).

Several teams have worked to identify a circulating factor. On the basis of binding of active serum component to protein A affinity column, Dantal et al suggested that the factor has some Ig-like properties (15). These findings were supported by the Savin's group who showed that the circulating factor bind to protein A and has an apparent molecular mass of about 50 kDa, more larger than common lymphokines (14). The sST2 protein could be the factor of which the identity has been approached in these works since it contains three Immunoglobulin-like domains, it binds with high affinity to protein A and its molecular weight is approximately of 50 kDa. How sST2 induces podocyte damage and cell detachment remains to be clarified. The fact that ST2 positive cells were mainly found in the non-T cell monocyte fraction may explain why the anti-thymoglobulin serum was unable to overcome a recurrence. Indeed, it would be interesting to investigated the potential effect of anti-ST2 antibody in these recurrent patients.

REFERENCES

1. Niaudet P. Nephrotic syndrome in children. *Curr Opin Pediatr* 1993;5(2):174-9.
2. Nakayama M, Katafuchi R, Yanase T, Ikeda K, Tanaka H, Fujimi S. Steroid responsiveness and frequency of relapse in adult-onset minimal change nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis* 2002;39(3):503-12.
3. Reiser J, Polu KR, Moller CC, et al. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet* 2005.
4. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998;1(4):575-82.
5. Boute N, Gribouval O, Roselli S, et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000;24(4):349-54.
6. Kaplan JM, Kim SH, North KN, et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2000;24(3):251-6.
7. Niaudet P. [Lipoid nephrosis in childhood]. *Rev Prat* 2003;53(18):2027-32.
8. Ramos EL. Recurrent diseases in the renal allograft. *J Am Soc Nephrol* 1991;2(2):109-21.
9. Hoyer JR, Vernier RL, Najarian JS, Raij L, Simmons RL, Michael AF. Recurrence of idiopathic nephrotic syndrome after renal transplantation. *Lancet* 1972;2(7773):343-8.
10. Ali AA, Wilson E, Moorhead JF, et al. Minimal-change glomerular nephritis. Normal kidneys in an abnormal environment? *Transplantation* 1994;58(7):849-52.
11. Rea R, Smith C, Sandhu K, Kwan J, Tomson C. Successful transplant of a kidney with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(2):416-7.
12. Feld SM FP, Savin V, Nast CC, Sharma R, Sharma M, Hirschberg R, Adler SG. Plasmapheresis in the treatment of steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis in native kidneys. *Am J Kidney Dis* 1998;32(2):230-7.
13. Ginsburg DS DP. Plasmapheresis in the treatment of steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis. *Clin Nephrol* 1997;48(5):282-7.
14. 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):878-83.

15. Dantal J, Bigot E, Bogers W, et al. Effect of plasma protein adsorption on protein excretion in kidney- transplant recipients with recurrent nephrotic syndrome [see comments]. *N Engl J Med* 1994;330(1):7-14.
16. Dantal J, Baatard R, Hourmant M, Cantarovich D, Buzelin F, Souillou JP. Recurrent nephrotic syndrome following renal transplantation in patients with focal glomerulosclerosis. A one-center study of plasma exchange effects. *Transplantation* 1991;52(5):827-31.
17. 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):688-98.
18. 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):6930-5.
19. Kumar S, Tzimas MN, Griswold DE, Young PR. Expression of ST2, an interleukin-1 receptor homologue, is induced by proinflammatory stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235(3):474-8.
20. Lecart S, Lecointe 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):2979-87.
21. 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.
22. 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):551-9.
23. 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):326-34.
24. Saccani S, Polentarutti N, Penton-Rol G, Sims JE, Mantovani A. Divergent effects of LPS on expression of IL-1 receptor family members in mononuclear phagocytes in vitro and in vivo. *Cytokine* 1998;10(10):773-80.
25. Oshikawa K, Yanagisawa K, Tominaga S, Sugiyama Y. ST2 protein induced by inflammatory stimuli can modulate acute lung inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;299(1):18-24.

26. Sahali D, Pawlak A, Le Gouvello S, et al. Transcriptional and post-transcriptional alterations of IkappaBalpha in active minimal-change nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(8):1648-58.
27. 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):248-58.
28. Thysell H, Brun C, Larsen S, Norlin M. Plasma exchange in two cases of minimal change nephrotic syndrome with acute renal failure. *Int J Artif Organs* 1983;6 Suppl 1:75-8.
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):1104-8.
30. Musante L, Candiano G, Zennaro C, et al. Humoral permeability factors in the nephrotic syndrome: a compendium and prospectus. *J Nephrol* 2001;14 Suppl 4:S48-50.
31. Shimpo 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):2186-90.
32. 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):1468-73.
33. 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):1206-14.
34. Fodor P, Saitua MT, Rodriguez E, Gonzalez B, Schlesinger L. T-cell dysfunction in minimal-change nephrotic syndrome of childhood. *Am J Dis Child* 1982;136(8):713-7.
35. Matsumoto K, Osakabe K, Katayama H, Okano K, Hatano M. Defective cell-mediated immunity in lipoid nephrosis. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1984;73(4):370-2.
36. Brint EK, Xu D, Liu H, et al. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol* 2004;5(4):373-9.
37. Trajkovic V, Sweet MJ, Xu D. T1/ST2--an IL-1 receptor-like modulator of immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15(2-3):87-95.
38. Maynard SE, Min JY, Merchan J, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003;111(5):649-58.

39. Walzl G, Matthews S, Kendall S, et al. Inhibition of T1/ST2 during respiratory syncytial virus infection prevents T helper cell type 2 (Th2)- but not Th1-driven immunopathology. *J Exp Med* 2001;193(7):785-92.
40. Leung BP, Xu D, Culshaw S, McInnes IB, Liew FY. A novel therapy of murine collagen-induced arthritis with soluble T1/ST2. *J Immunol* 2004;173(1):145-50.
41. Sweet MJ, Leung BP, Kang D, et al. A novel pathway regulating lipopolysaccharide-induced shock by ST2/T1 via inhibition of Toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2001;166(11):6633-9.
42. O'Neill LA. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002;270:47-61.
43. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 2005;5(6):446-58.
44. Brint EK, Fitzgerald KA, Smith P, et al. Characterization of signaling pathways activated by the interleukin 1 (IL-1) receptor homologue T1/ST2. A role for Jun N-terminal kinase in IL-4 induction. *J Biol Chem* 2002;277(51):49205-11.

Table 1 : Clinical characteristics of patients with steroid resistant FSGS on native kidneys

Patient N°	Gender	age	Age at onset of proteinuria	Trt	Pu at presentation	Pu after therapy	outcome	Delay (months)between onset Pu and TRF ^a	ST2 (pg/ml)
1				C-Csa			TRF	48	650
2	M	30	25	C-Csa	15	8	TRF	36	470
3	M				40	29	TRF	18	905
4	F	20	11	C-Cph ^c	7	5	TRF	55	450
5	M	20	16	C-Csa	18	12	TRF	48	550
6	F	18	7	C-Csa-Ch ^b	12	9	TRF	45	510
7	M	56	48	C-Csa	6	4	RF ^d (pICr : 200µm/l)	-	53
8	F	56	50	C-Csa	6	3	200	-	0
9	M	25	19	C-Csa	7	2,5	140	-	165
10	F	34	27	C-Csa	5	3	130	-	0
11	F	68	60	C-Csa	8	3,5	150	-	17
12				C-Csa	5	3	180	-	7
13	F	52	43	C-Csa	6	4	230	-	27
14	M	25							35
15	M	24							40
16	F	12							68
17	M	17							15
18	F	23							12
19	F	16							28
20	F	18							9
21	M	24							14

^a Terminal renal failure

^b C :corticoides ; Csa : Ciclosporin ; Ch :Chloraminophen

^c Cph : ciclophosphamid

^d Renal Failure, pICr (plasma creatinine)

Table 2 : Clinical characteristics of FSGS patients with or without recurrence after kidney transplantation (Tx) and proteinuric controls (Non-FSGS).

	AFTER TRANSPLANTATION		
	Recurrence	Non recurrence	Non-FSGS
Gender	12M/8F	25M/12F	13M/4F
Mean age at Tx (years)	26 [9-29]	37 [12-64]	41 [18-64]
Duration of HD (months)	26 [0-60]	36 [0-185]	28 [0-116]
Transplantation rank	G1=16, G2=3, G3=1	G1= 30, G2= 6, G3= 1	G1= 15, G2= 2
[ST2] (pg/mL)	581 [0-1600]	130 [0-587]	47 [30-255]
Median [ST2]	486	25	37
Time after Tx (months)	7 [0-33]	58 [0-249]	121 [30-255]
Serum creatinine (µmol/L)	255 [80-645]	176 [76-631]	330 [150-640]
Proteinuria (g/day)	6 [1.2-17.5]	0,26 [0-0.76]	4.7 [2.2-9.4]
Anti proteinuria treatment	5 IEC or ARB	9 IEC or ARB	12 IEC or ARB
IS treatment	All CNI	All CNI	16CNI, 1CS-AZA

HD: hemodialysis, IEC: angiotensin converting enzyme inhibitors, ARB: angiotensin receptor blocker, CNI: calcineurin inhibitors, CS: corticosteroids, AZA: azathioprin

Figure 1-Hervé et al.

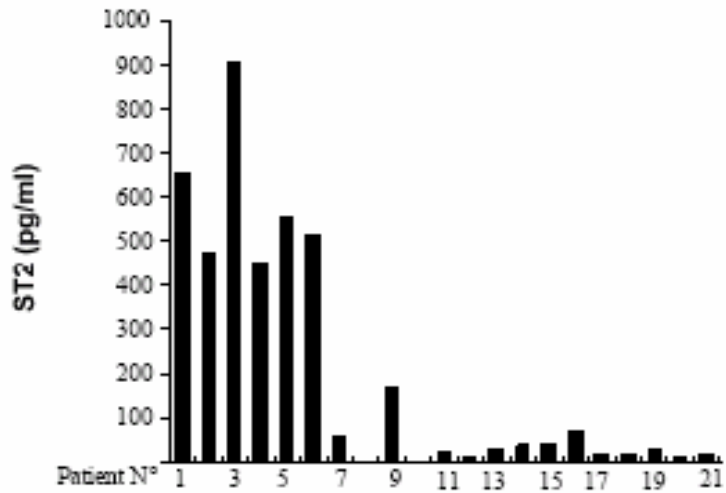


Fig 1: Expression of sST2 in patients with FSGS. The level of sST2 was measured by ELISA in patients with severe (patient N°1-6) or moderate form of FSGS (patient N°7-13), as well as in eight normal subjects

Figure 2-Hervé et al.

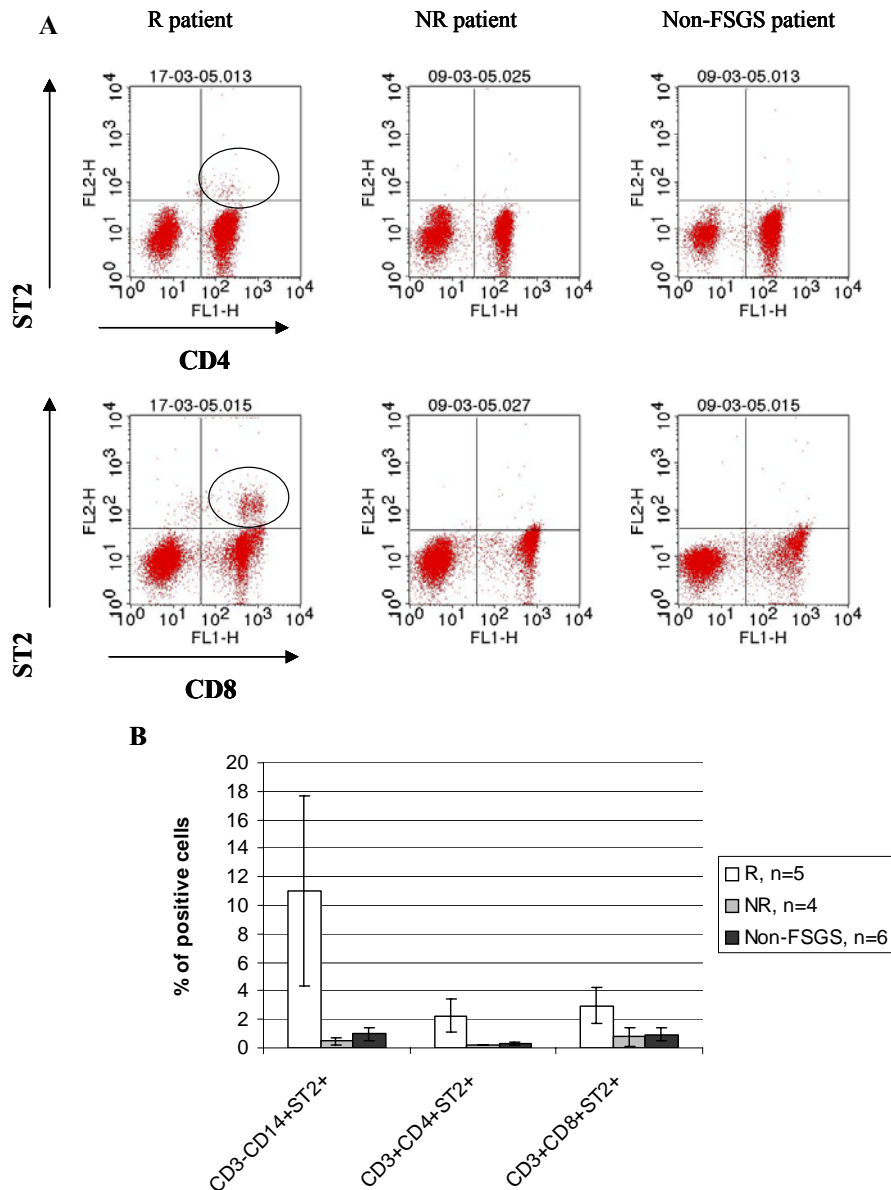


Fig.2: Membranous ST2 is expressed on T lymphocytes of patients with recurrence .(A) PBMC from all the patients were extracted from blood after transplantation. Cells were then stained with CD3-PC5, CD4-FITC, CD8-FITC and ST2 + anti mouse IgG1-PE, and analyzed by FACS. The expression of CD4/CD8 and ST2 surface markers was analyzed after gating on CD3⁺ cells (T lymphocytes). One representative patient for each group is displayed. **(B)** The expression of membranous ST2L has been investigated in different subpopulation of cells such as B lymphocytes, NK cells, monocytes, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in PBMC of INS patients with (R) or without recurrence (NR) and proteinuric controls (non-FSGS). We found an increase of ST2L marker expression on the CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes of recurrent patients, but also on their monocytes. No expression of this membranous protein was found on B lymphocytes and NK cells for all the groups

Figure 3-Hervé et al.

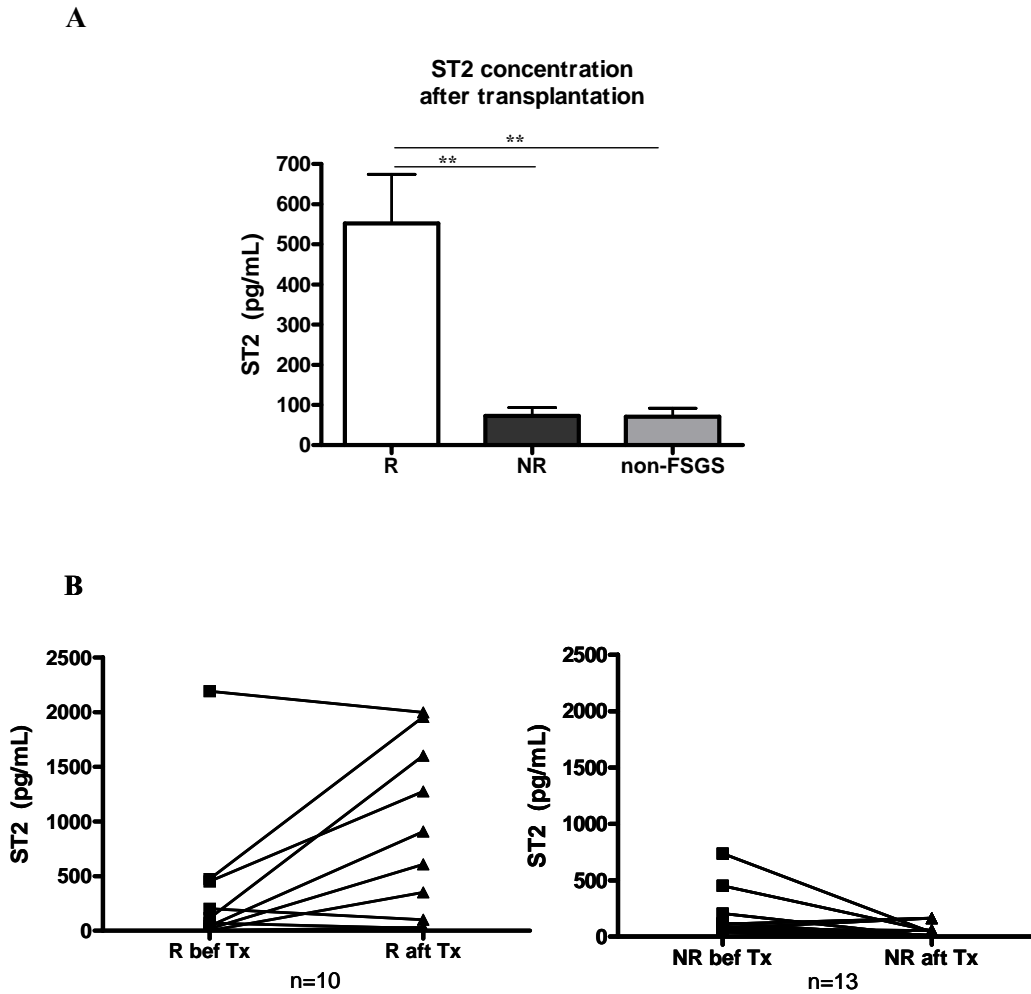
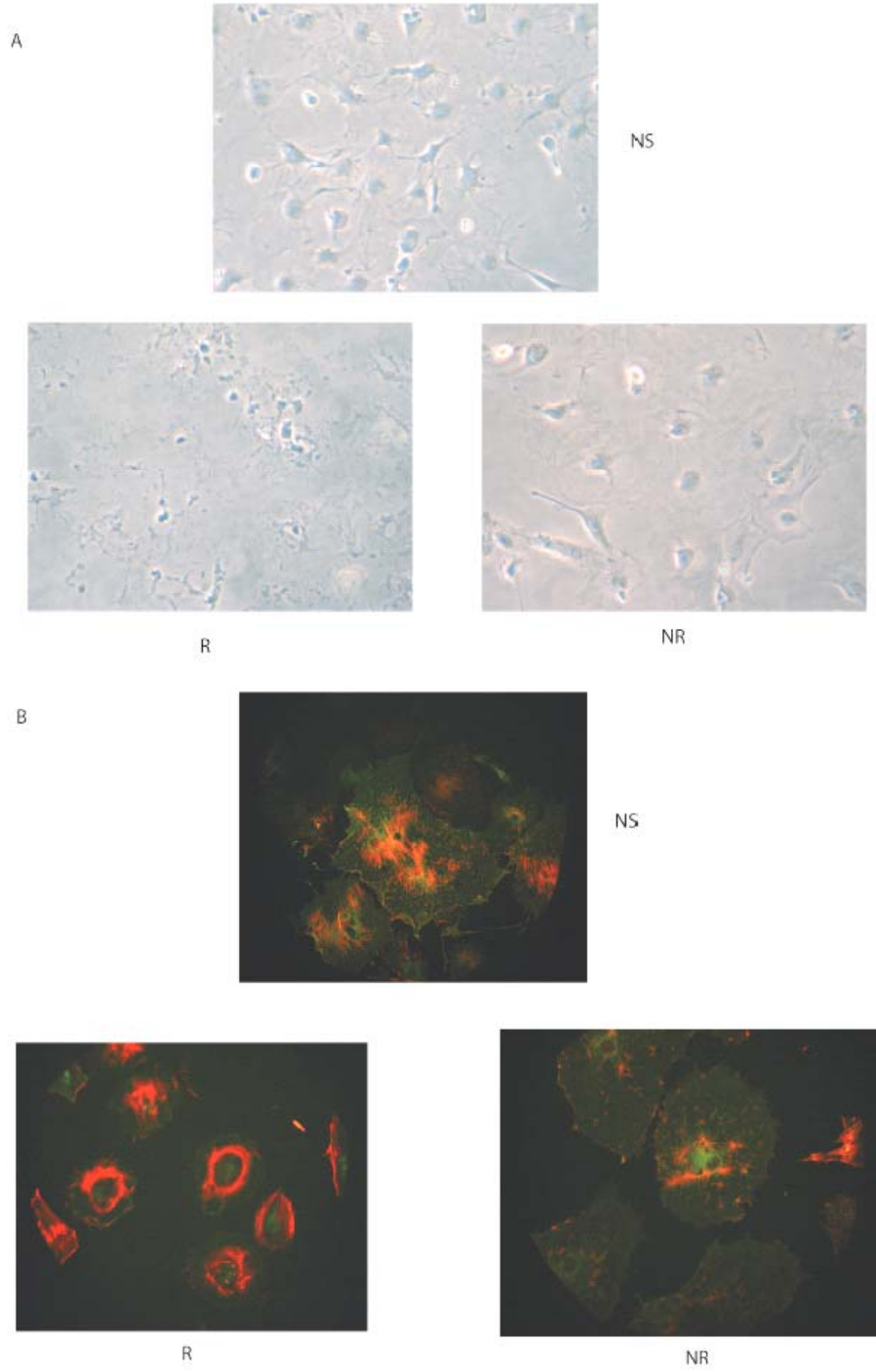


Fig.3: Concentration of soluble ST2 protein. The level of sST2 was measured by ELISA before and after transplantation (A) in the sera of FSGS patients with (n=32 and n=20) or without recurrence (n=75 and n=37) and in the sera of non-FSGS patients (n=51 and n=17). The bars represent the mean values of ST2 (pg/mL). *p<0.05, **p<0.01. (B) ST2 concentration is represented before and after transplantation for a same patient, with (R) or without recurrence (NR).

Figure 4-Hervé et al.



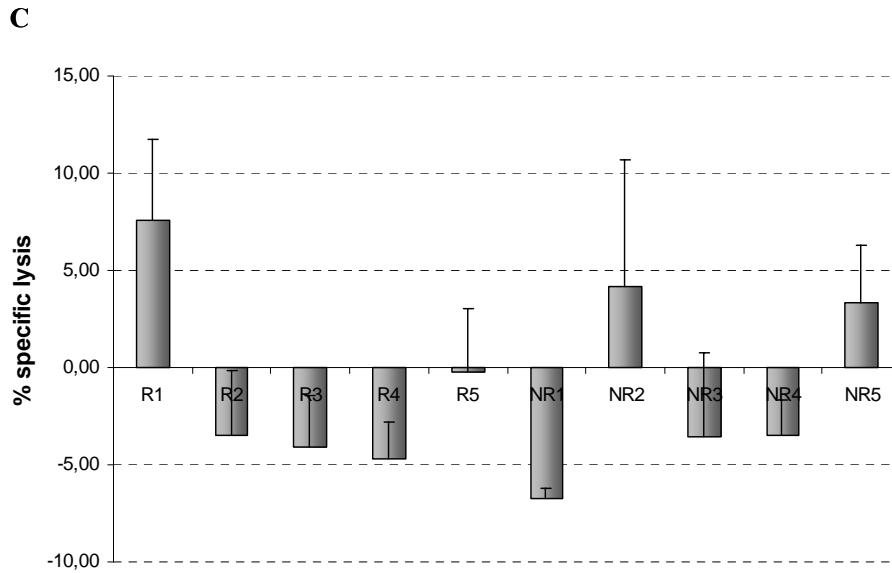


Fig.4: Effect of plasma of FSGS patients with or without recurrence on podocyte. Differentiated podocytes were incubated with different sera samples. A final concentration of 3% of serum was applied to the cells for one hour. Representative panels for each experiment is indicated. Light microscopy analyses (A) and immunofluorescence analysis (B) of podocytes following incubation with normal serum (NS), serum from patient with recurrence (R) and serum from patient without recurrence (NR). Double staining was performed with anti-F actin (red) and anti-vinculin (green) antibodies. (C). Differentiated podocytes were incubated with ^{51}Cr for two hours, then exposed to serum from FSGS (5 recurrent and 5 non recurrent) patients for 3 hours. Results are represented as percentage of specific lysis and the whiskers represent standard deviation.

Figure 5-Hervé et al.

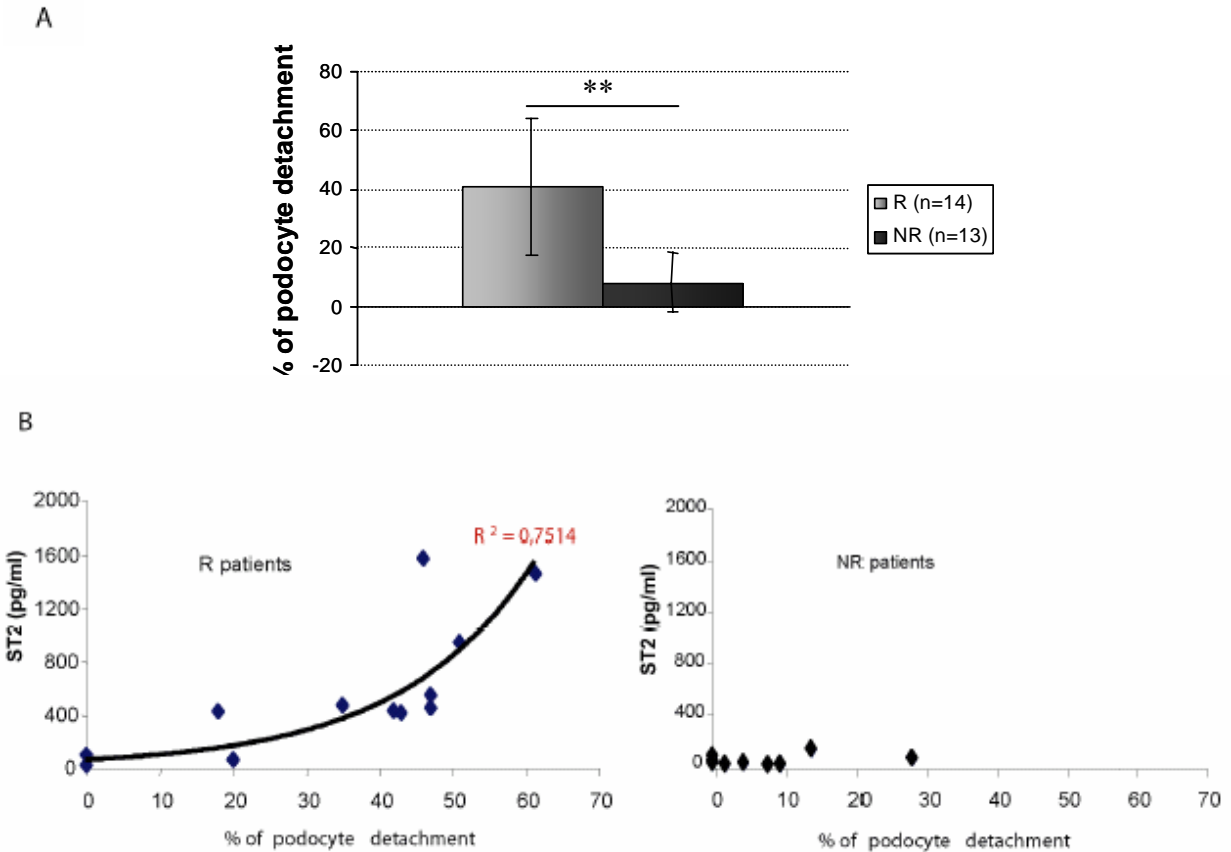


Fig.5: ST2 concentration correlates with the percentage of podocyte detachment in patients with FSGS recurrence but not in patients without recurrence. A. The mean percentage of podocyte detachment after incubation with sera from FSGS recurrent patients (n=14) and FSGS non recurrent patients (n=13) is indicated. The whiskers represent standard deviation. ****p<0.01.** **B.** Correlation between ST2 concentration and the percentage of podocyte detachment following incubation with serum from FSGS patients with recurrence and FSGS patients without recurrence. The coefficient correlation between the two parameters is of 0.86 for recurrent patients.

Figure 6-Hervé et al.

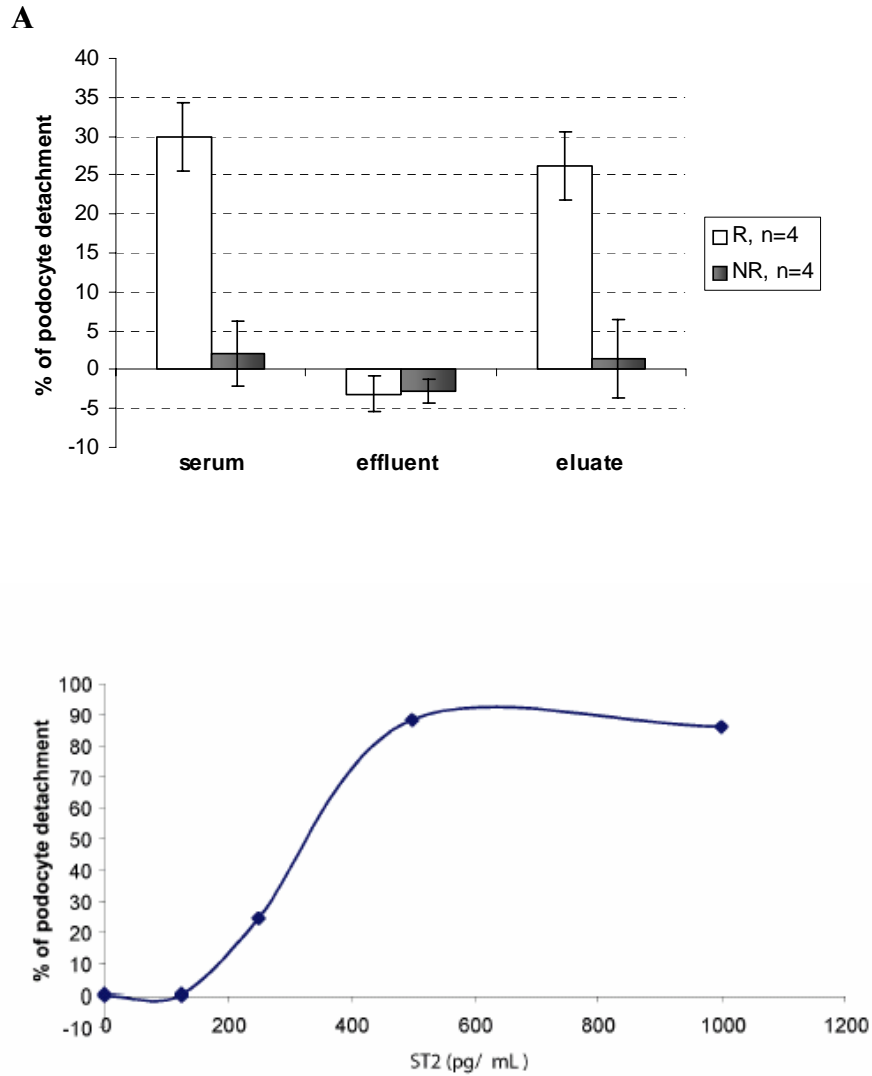
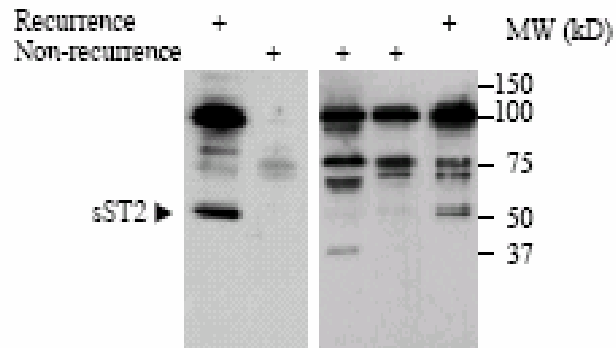


Fig 6: Effect of the different fraction from anti-ST2 column on podocyte detachment. A. Sera from FSGS patients with (R) or without recurrence (NR) were passed through an anti-ST2 column. Effluent fraction (serum without ST2) and eluate (ST2) were kept and their activity was tested on differentiated podocyte. The percentage of podocyte detachment was determined one hour after serum incubation. **B.** effect of recombinant sST2 on podocyte. Four concentrations of sST2 were used: 125, 250, 500, 1000 pg/mL. The experiments were performed in duplicate.

Figure 7-Hervé et al.



Immunoblots of ST2 eluates from recurrence and non-recurrence sera with ST2 antibody

Fig 7: Reactivity of sST2 eluates with ST2 antibody. Serum from recurrence (R) and non-recurrence (NR) was incubated with anti-sST2 antibody-precomplexed with agarose beads. The reactivity of eluted fractions and the unbound materials, with anti-sST2 antibody, was tested by immunoblotting.

C-2 Résultats complémentaires et discussion de l'article 4

Les travaux effectués par l'unité INSERM 581 chez les patients LGM en rechute ont mis en évidence dans les cellules T un profil à prédominance Th2 caractérisé par une activation de c-maf et une sous-régulation de l'IL-4 (Valanciute et al. 2004). Des études récentes effectuées chez la souris ont décrit la présence d'un marqueur spécifique de la sous-population Th2 indépendant de la production d'IL-4, le récepteur 4 à l'IL-1, aussi appelé ST2L (Lohning et al. 1998; Ritz et al. 2002). Une forme soluble de ST2 (sST2), contenant uniquement le domaine extracellulaire de ST2L, est également retrouvée dans le sérum lors des réactions anti-inflammatoires ou allergiques (Lambrecht et al. 2000). Nous avons décidé, afin de déterminer si un profil Th2 similaire était observé chez les patients récidivant, d'étudier l'expression de ST2L sur les différentes sous populations cellulaires ainsi que la concentration sérique de la forme soluble.

Nous avons observé, dans les PBMC des patients récidivant, une plus forte expression de la forme membranaire ST2L sur les lymphocytes T CD4⁺ mais aussi CD8⁺ par rapport à des PBMC de patients ne récidivant pas ou protéinuriques d'une autre origine. Etonnement, une forte proportion de monocytes (CD14⁺) ST2L⁺ a également été observée chez les patients récidivant, suggérant à la fois une activation lymphocytaire et monocyttaire. La présence de ST2L sur les CD8⁺ est également troublante, puisque ST2L est peu voire pas du tout exprimé dans les T CD8⁺ (Lohning et al. 1998), indiquant chez nos patients un profil d'expression de ST2L anormal.

Parallèlement à l'étude de l'expression de ST2L par cytométrie en flux, nous avons étudié l'expression des transcrits de ST2L par PCR semi-quantitative avant et après transplantation dans les PBMC de patients récidivant ou non ainsi que dans leurs lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ purifiés (figure 23-A/B). Dans les PBMC totaux, nous observons une quantité de transcrits de ST2L importante avant et après transplantation, aussi bien chez les patients récidivant que chez les non-récidivant. De façon surprenante, les patients ne récidivant pas semblent exprimer plus d'ARNm de ST2L après transplantation alors que l'expression de la protéine par cytométrie en flux est très faible. L'expression des transcrits de ST2L dans les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ purifiés (pureté>90%) est quasi inexistante, sauf dans les lymphocytes T CD8⁺ des patients récidivant (2/3).

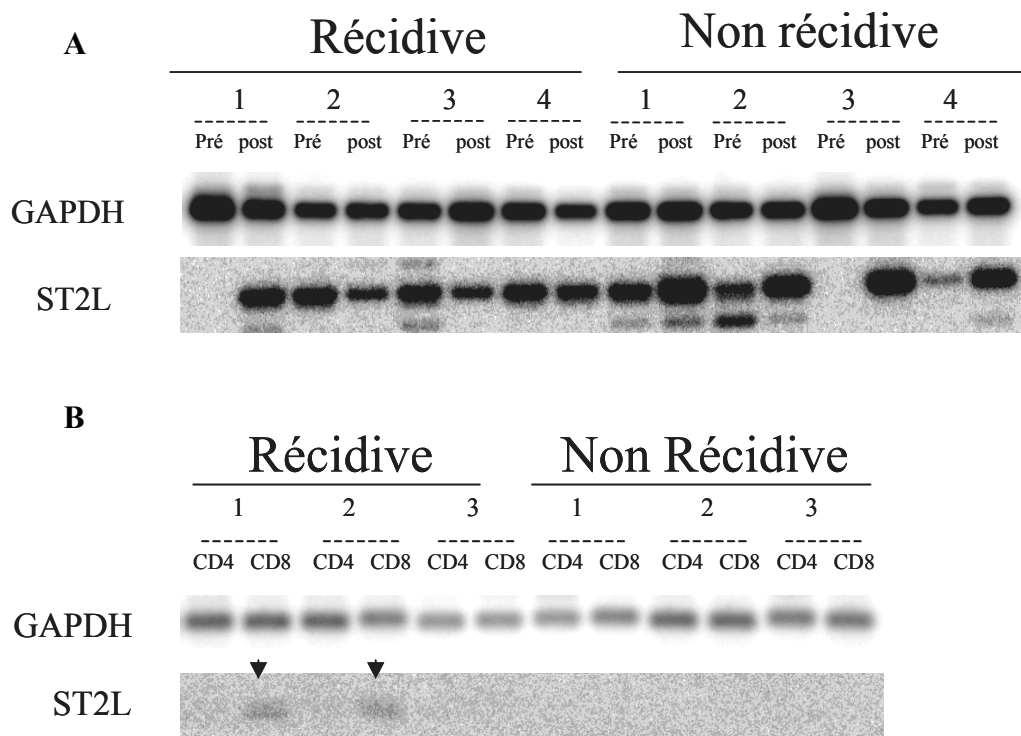


Figure 23 : Détermination par PCR semi-quantitative de l'expression de l'ARNm de ST2L dans les PBMC (A) et les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ purifiés (B) de patients présentant ou non une récurrence de SNI après transplantation rénale.

L'étude des transcrits de ST2L ne reflète pas fidèlement les observations obtenues avec la protéine après transplantation et ne semble donc pas être une bonne méthode pour étudier l'expression de la forme membranaire.

La concentration sérique de ST2 est élevée chez 80% des patients présentant une récurrence contrairement aux patients ne récidivant pas ou protéinuriques d'une autre origine. En revanche, l'étude des taux sériques chez les patients en dialyse, quelle que soit leur maladie initiale, retrouve des taux élevés de ST2. Cette observation suggère que la dialyse perturbe l'expression de ST2 soluble de façon non spécifique, et nous incite à étudier les taux de sST2 en dehors de tout traitement.

Le mécanisme de l'atteinte rénale dans les récurrences reste inconnu. Certaines données cliniques et expérimentales, issues de l'étude des formes génétiques de HSF ou de l'inactivation de gènes qui jouent un rôle clé dans le physiologie du diaphragme de fente, suggèrent que le facteur circulant agit en altérant le fonctionnement du podocyte (pour revue, (Huber et al. 2005)). Nous avons donc testé l'effet de sST2 sur des podocytes en culture, à partir d'une lignée développée par P. Mundel (Mundel et al. 1997). Nous avons incubé les podocytes matures avec différentes

concentrations de sérum et à des temps variables. Nous avons observé un effet optimal pour des concentrations de 3 et 5% et à partir d'une heure d'incubation. Une concentration trop forte de sérum (>10%) entraîne une atteinte podocytaire non spécifique. La qualité des podocytes (aspect, nombre) et des sérums (filtré, jamais décongelé) est très importante pour la bonne marche du test, ainsi que la présence systématique de plusieurs puits négatifs sur la même plaque. Nous avons montré que seuls les sérums de patients récidivant riches en ST2 provoquaient une réorganisation de l'actine, une rarification des points d'ancrage et entraînaient un décollement significatif des podocytes *in vitro*. Des études antérieures ont décrit les mêmes observations après incubation de podocytes immortalisés humains avec du plasma de patients néphrotiques, ainsi qu'une délocalisation de la néphrine, de la podocine et de CD2AP dans le cytoplasme (Coward et al. 2005). Cependant, dans cette étude, aucune quantification de l'atteinte n'a été réalisée, rendant difficile l'interprétation du phénomène. Nous avons estimé, dans notre modèle, un pourcentage de décollement en se basant sur la quantité de podocytes encore adhérents dans les puits incubés avec les différents sérums par rapport à la quantité présente dans les puits contrôles (avec le milieu seul).

Nous avons pu montrer quantitativement que les sérums de patients récidivant entraînaient un décollement podocytaire significativement plus important que ceux de patients ne récidivant pas, mais aussi que ceux de patients protéinuriques d'une autre origine. D'autre part, nous avons trouvé une corrélation entre le taux sérique de sST2 et le pourcentage de décollement. Nous avons reproduit l'effet du sérum avec la forme recombinante de sST2 et montré que des taux de sST2 supérieurs à 250 pg/ml entraînaient des altérations sévères des podocytes (figure 24).

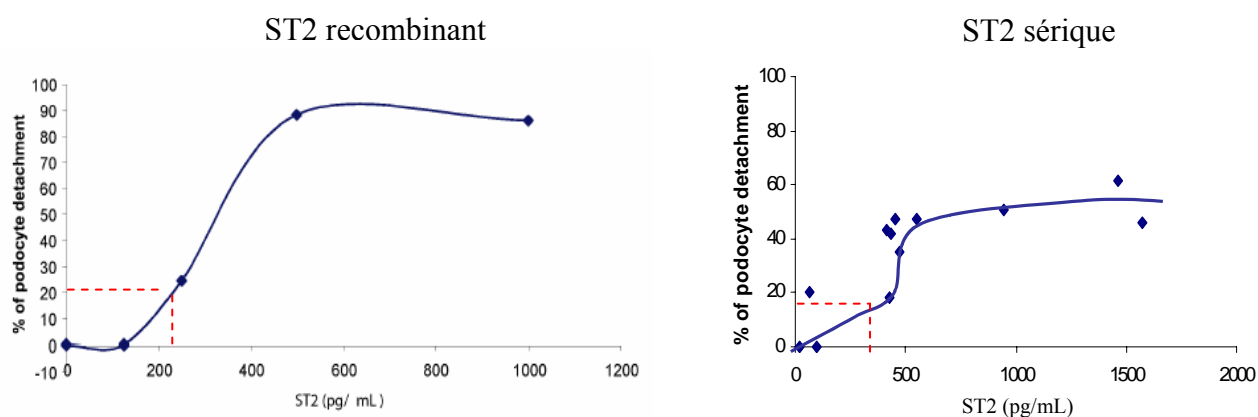


Figure 24 : Détermination de la concentration seuil de sST2 entraînant un décollement podocytaire supérieur à 20%.

Cette valeur seuil pourrait expliquer pourquoi les sérums de patients non récidivant et protéinuriques, ayant des moyennes de sST2 respectivement de 130 et 47 pg/mL, n'ont pas d'effet sur la culture podocytaire. D'autre part, le fait que le ST2 recombinant et le sérum de patients récidivant provoquent les mêmes pourcentage d'altération podocytaires pour les mêmes concentrations de sST2 suggèrent que le facteur sérique responsable de l'atteinte est bien sST2. De plus, les sérums de patients récidivant privés de sST2 après passage sur colonne d'immunoaffinité n'ont plus d'effet sur les podocytes *in vitro*.

Cependant, des concentrations importantes de ST2 sériques ont été décrites dans d'autres pathologies telles que le sepsis (Brunner et al. 2004) et dans des modèles animaux d'inflammation pulmonaire (Walzl et al. 2001) et d'arthrite (Leung et al. 2004). Ces fortes concentrations sont majoritairement transitoires et rapidement réprimées alors que dans les formes sévères de HSF conduisant majoritairement à la récurrence, les taux sériques de ST2 restent élevés dans le temps (figure 25).

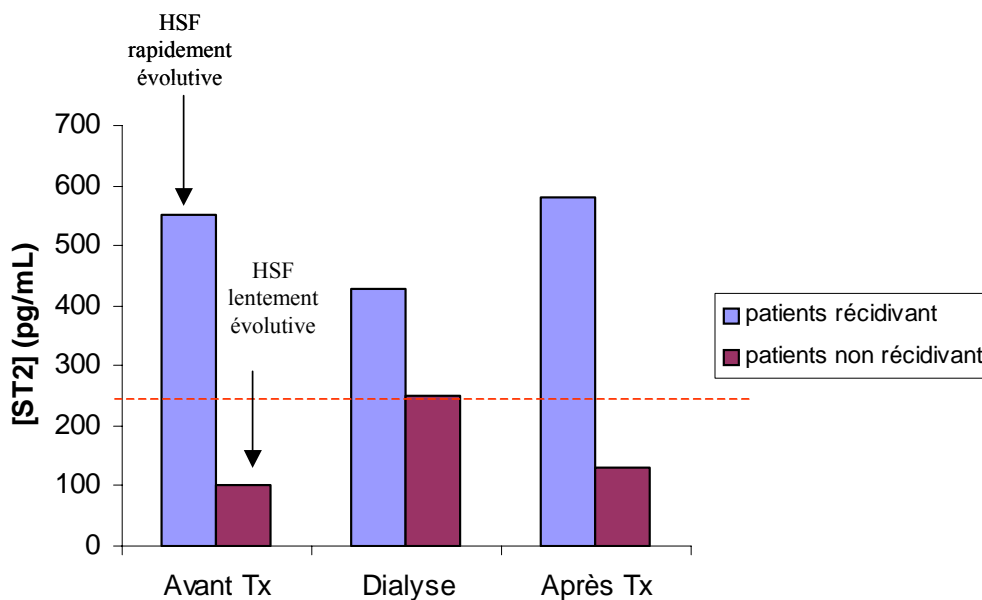


Figure 25 : Récapitulatif de la moyenne des taux de ST2 soluble mesurés dans le sérum de patients récidivant et non récidivant, avant transplantation (Tx), au cours de la dialyse et après transplantation.

Les patients présentant une HSF rapidement évolutive sont considérés comme étant plus à risque de récurrence alors que ceux présentant une évolution lente ont plus de chance de ne pas récurrence. La ligne rouge en pointillée représente la valeur seuil de ST2 estimée précédemment.

Il semble donc que l'expression continue d'une forte concentration de sST2 soit liée à certaines récurrences de SNI, suggérant une anomalie dans les mécanismes de régulation négative ou positive de ST2 (soluble et membranaire).

Les mécanismes conduisant à l'expression de ST2 membranaire ou de ST2 soluble ne sont pas très bien déterminés. Chez l'homme, il a été montré que ST2 soluble était produit par les lymphocytes Th2 activés mais pas par les Th1 suite à une stimulation par la PHA ou par un anticorps anti-CD3 (Lecart et al. 2002), par les macrophages et les monocytes activés par le LPS ou des cytokines pro-inflammatoires. Un rôle possible de ST2 soluble serait de réguler négativement l'inflammation dépendante des macrophages, comme suggéré par les études chez la souris (Sweet et al. 2001). La présence de fortes concentrations de sST2 dans le sérum de nos patients récidivant pourrait refléter une tentative de sous-réguler une réponse Th2 ou macrophagique excessive. Le ou les récepteurs de sST2 n'ont pas encore été identifiés, mais nos résultats suggèrent indirectement que les podocytes en possèdent.

Les travaux concernant la forme membranaire sont un peu plus précis : l'expression de ST2L est induite sur les lymphocytes Th2 activés par un anti-CD3 par une voie dépendante des MAP kinases (Brint et al. 2002). ST2L est également exprimé sur les monocytes et les macrophages suite à l'expression d'IL-4 et d'IL-5 par les lymphocytes Th2, et est réprimé suite à la sécrétion autocrine d'IL-6, de TNF α et d'IL-1 par les macrophages (Meisel et al. 2001). Le signal délivré par ST2L aboutit à la séquestration de MyD88, inhibant ainsi l'activation des macrophages induite par le LPS (Brint et al. 2004). ST2L, tout comme sST2, participe ainsi à la régulation de l'inflammation dépendante des macrophages mais également au développement des réponses Th2. La forte présence des deux formes de ST2 chez les patients récidivant corrèle avec le fait qu'aucune inflammation n'est retrouvée dans les glomérules lésés.

Afin de mieux comprendre d'où proviennent les fortes concentrations de ST2 soluble, nous avons essayé de déterminer quels types cellulaires étaient capables de produire cette protéine. Nous avons tout d'abord tenté de marquer des PBMC de patients HSF grâce à un anticorps anti-ST2, après perméabilisation. Malheureusement, sur quatre anticorps testés selon plusieurs conditions, aucun n'a donné de signal spécifique. Nous avons alors stimulé *in vitro* des PBMC de patients (anti-CD3+anti-CD28, PMA/ionomycine) à différents temps (7h, 24h, 48h) puis nous avons mesuré l'expression de ST2 soluble dans les surnageants par ELISA. Aucune expression n'a pu être mise en évidence dans les surnageants quelles que soient les conditions appliquées et l'origine des PBMC (récidivant, non

récidivant). Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce résultat négatif : nous n'avons peut être pas utilisé la bonne voie de stimulation et/ou la bonne concentration, bien que nous ayons utilisé le même protocole que celui décrit par Lecart et al. (Lecart et al. 2002). D'autre part, les PBMC proviennent de patients traités et immunosupprimés, ce qui peut interférer avec le signal d'activation.

Bien que d'autres travaux soient nécessaires à la validation de sST2 comme facteur de perméabilité dans la récurrence de SNI, cette protéine semble être un bon candidat. D'autres arguments en faveur de ST2 viennent des observations cliniques. En effet, notre équipe a précédemment montré que le traitement du plasma sur colonnes d'immunoabsorption entraînait une amélioration significative de la protéinurie, suggérant que le ou les facteur(s), retenu(s) sur la colonne, partage(nt) des propriétés avec les Ig. Dans d'autres études, le poids de ce facteur a été estimé inférieur à 100 kDa (Dantal et al. 1994), puis entre 30 et 50 kDa (Savin et al. 1996). La protéine ST2 pourrait correspondre à l'un de ces facteurs puisqu'elle possède trois domaines Ig-like et qu'elle possède une masse moléculaire proche des 50 kDa. Nous avons vérifié et confirmé sa présence dans les éluats d'immunoabsorption, ce qui prouve que sST2 est retenue par la protéine A. L'action de ST2 *in vivo* ainsi que les mécanismes conduisant à l'agression et au décollement podocytaire restent à déterminer.

IV CONCLUSION GENERALE/PERSPECTIVES

Nous avons choisi d'aborder les mécanismes du syndrome néphrotique idiopathique corticorésistant grâce à l'étude d'une population homogène de patients présentant une récurrence immédiate après transplantation rénale. Cette population caricaturale est 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 surtout après transplantation et probablement avant. La population de patients corticorésistants ne récidivant pas après transplantation semble être un bon groupe contrôle, puisqu'elle présente une forme de SNI similaire avant transplantation mais une «rémission» après transplantation. Peu d'études ont été réalisées sur les formes corticorésistantes de SNI et la majorité des avancées scientifiques concernent les formes corticosensibles. Plusieurs travaux ont décrit ces dernières années la présence d'anomalies du système immunitaire au cours des rechutes dans la LGM et ont émis l'hypothèse qu'une réponse anormale T pouvait être à l'origine de la synthèse d'un facteur de perméabilité (pour revue, (van den Berg et al. 2004)). Les arguments en faveur d'un rôle du lymphocyte T reposent essentiellement sur des observations et des arguments indirects et la présence d'un facteur soluble toxique pour le podocyte *in vitro*.

L'hypothèse d'un rôle du lymphocyte T dans le phénomène de récurrence ne semble pas la plus probable étant donné que le traitement par sérum anti lymphocytaire n'évite pas la récurrence et que les patients ont été résistants aux corticostéroïdes et à d'autres immunosuppresseurs. Pour ces patients, la résistance aux traitements peut traduire l'implication de mécanismes non lymphocytaires mais aussi refléter des mécanismes impliquant les lymphocytes T non modulables par ces traitements. Il faut rappeler ici que le mécanisme d'action de la ciclosporine A a été suggéré par Savin et ne serait pas dépendant de l'inhibition d'un facteur lymphocytaire mais agirait en protégeant les glomérules. Ainsi, en se basant sur cette hypothèse, et bien que les deux formes de SNI soient distinctes, nous avons voulu étudier les phénotypes et les anomalies lymphocytaires T dans la récurrence immédiate de HSF après transplantation.

Contrairement à l'analyse des formes corticosensibles en poussée et en rémission, nous nous sommes heurtés à plusieurs inconvénients majeurs pour une étude portant sur le système immunitaire. En effet les prélèvements pré-greffe ont été réalisés alors que les patients étaient en dialyse, et la dialyse est connue pour activer le système immunitaire (Amore et al. 2002). Après transplantation, les conflits allogéniques dus à la transplantation, la présence de traitements immunosuppresseurs vont également influencer les réponses immunes. De plus, la population de patients récidivant est une population rare

et souvent lymphopénique à cause des traitements immunosuppresseurs rendant le matériel biologique précieux. L'utilisation de bons groupes contrôles, appariés pour l'âge, le traitement, et les principales constantes biologiques est donc indispensable à l'interprétation des résultats. Nous avons par conséquent étudié en parallèle des patients HSF ne présentant pas de récurrence après transplantation et des patients protéinuriques dont l'atteinte rénale n'est pas liée à un SNI.

L'étude de la réponse immunitaire des patients présentant une récurrence de SNI après transplantation rénale nous a permis de mettre en évidence plusieurs observations. Contrairement à l'hypothèse de départ où l'implication de lymphocytes T activés était plutôt évoquée, l'étude des anomalies du TCR dans les PBMC des différents groupes de patients avant et après transplantation a révélé la présence d'un répertoire T peu altéré chez les patients récidivant, représentatif d'une population plutôt naïve. Nous avons observé chez ces mêmes patients après transplantation, grâce à une analyse par cytométrie en flux, la prédominance d'une population CD8⁺ naïve, probablement due à une anomalie d'apoptose. En effet, la baisse de transcrits de MAPK9 observée dans les T CD8⁺ après transplantation, associée à des anomalies de régulation de kinases cytoplasmiques après stimulation et à une activation nucléaire constitutive vont dans le sens d'une telle hypothèse.

Parallèlement aux travaux effectués sur les cellules immunitaires, et en collaboration avec l'unité INSERM 581 de Créteil, nous avons mis en évidence spécifiquement dans le sérum des patients transplantés avec une récurrence une concentration plus élevée d'une protéine anti-inflammatoire, sST2. A partir de tests *in vitro* sur des podocytes immortalisés en culture, nous avons montré que seule l'incubation des podocytes avec les sérums de patients récidivant entraînait leur décollement de la matrice, et que l'intensité du décollement podocytaire corrélait avec la concentration de ST2 sérique. L'incubation des podocytes avec du ST2 sérique isolé à partir de colonnes d'immunoaffinité ou de ST2 recombinant provoque également leur décollement. A l'inverse, l'activité des sérums de patients récidivant sur les podocytes est perdue lorsque ST2 est préalablement absorbé sur une colonne d'immunoaffinité. La forme membranaire de ST2 (ST2L) est également exprimée de façon plus importante sur les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et surtout sur les monocytes/macrophages périphériques des patients récidivant.

En partant de deux analyses différentes, l'une portant sur une analyse directe des populations immunitaires et l'autre portant sur l'étude d'un facteur plasmatique potentiel, nous ne mettons pas en évidence les mêmes populations. L'analyse phénotypique et fonctionnelle révèle plutôt une

population CD8⁺ naïve alors que l'étude du facteur soluble évoque plutôt l'implication des monocytes/macrophages. Il faut cependant rappeler que toute l'analyse phénotypique a été effectuée sur les populations lymphocytaires triées, rendant impossible une identification des macrophages. L'observation de la localisation des tyrosines phosphorylées par immunofluorescence à quant à elle été réalisée sur des PBMC totaux, et n'exclut pas que certains profils d'activation observés puissent concerner des monocytes/macrophages.

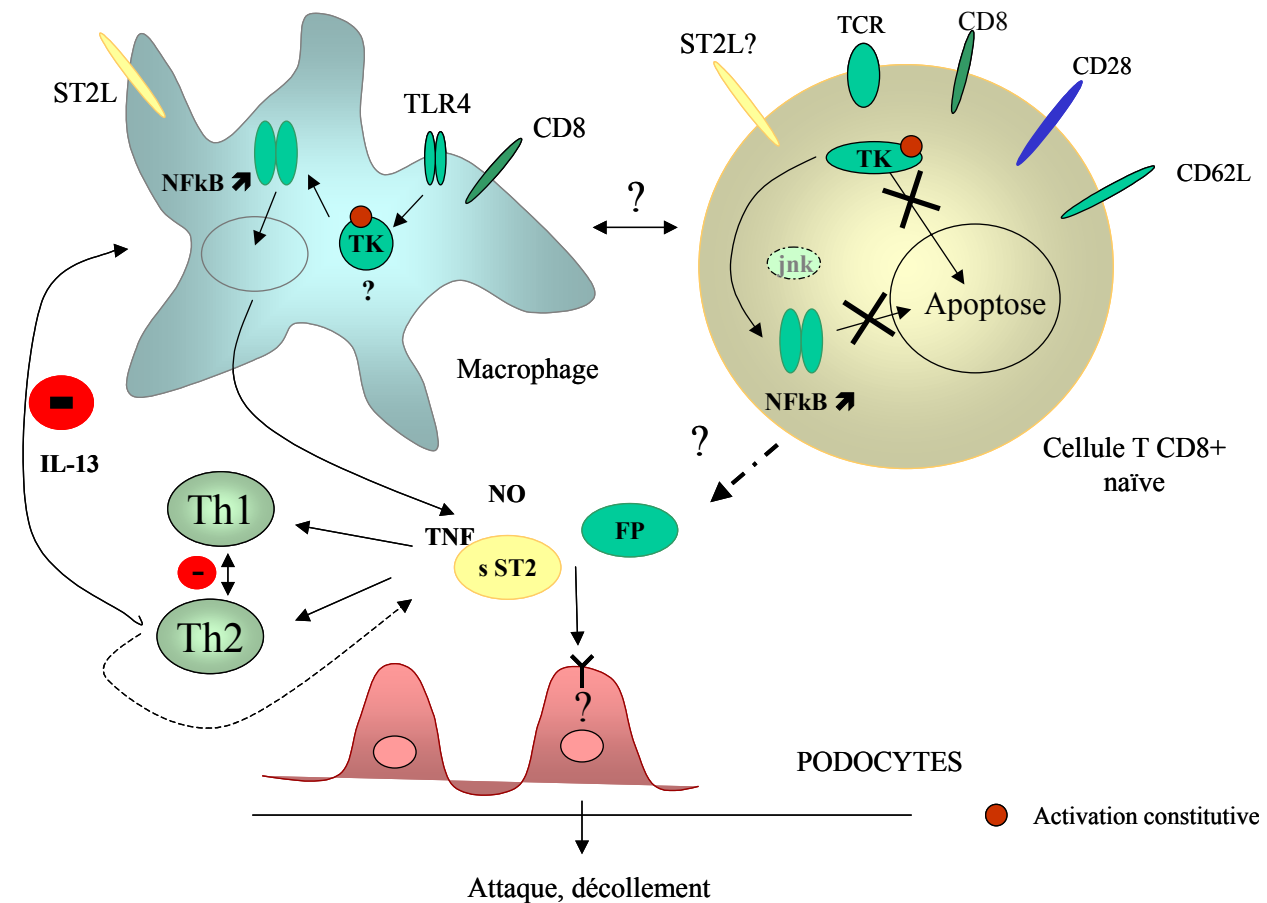


Figure 26 : Hypothèse reprenant les résultats obtenus dans les différents articles ainsi que les principales observations de la littérature concernant les anomalies immunitaires dans la récurrence SNI après transplantation.

L'activation constitutive de certaines tyrosines kinases (TK) va entraîner, chez les patients présentant une récurrence de SNI après transplantation, une inhibition de l'apoptose des cellules T CD8⁺ naïves exprimant les marqueurs CD62L et CD28. La survie de ces cellules va peut être conduire à la sécrétion de facteurs plasmatiques (FP) toxiques pour le podocytes. La même anomalie de phosphorylation dans les macrophages va entraîner une boucle d'activation de la réponse inflammatoire (TNF, IL-1, IL-6) et de régulation de l'inflammation par les lymphocytes Th2 (IL-10, IL-13). Les lymphocytes Th2 vont également produire du sST2 en grande quantité et d'autres facteurs de perméabilité qui vont conduire à une atteinte podocytaire et au décollement de ces cellules de leur matrice.

En tenant compte de nos résultats et de ceux de la littérature, nous avons essayé d'émettre une hypothèse (figure 26) basée sur un défaut de régulation de tyrosines kinases et en particulier celles de la famille des Src kinases dans les cellules T CD8⁺ naïves et dans les macrophages.

Cellules T naïves

Un défaut de déphosphorylation de tyrosines kinases telles que lck ou fyn (famille Src) va provoquer la survie de lymphocytes T CD8⁺ naïfs exprimant les marqueurs CD62L et CD28. L'activation constitutive des tyrosines kinases va également entraîner une activation du facteur NFκB, ce qui peut conduire à la production anormale de facteurs tels que le(s) facteur(s) de perméabilité et/ou ST2 soluble. La prédominance de cellules T CD8⁺ naïves peut être aussi uniquement le reflet d'anomalies de régulation au niveau d'une kinase ubiquitaire, sans effets délétères sur le glomérule.

Macrophages

La présence de macrophages CD4⁺/CD8⁺, représentant 1 à 17 % des macrophages totaux d'un individu normal, a récemment été décrite (Baba et al. 2005). Supposons que les macrophages qui expriment le marqueur CD8 présentent, comme chez les T CD8⁺ naïfs, une anomalie de régulation d'une tyrosine kinase impliquée dans la voie d'activation du LPS (TLR-4) (Stefanova et al. 1993). L'activation constitutive de la voie du TLR-4 va conduire à une augmentation de l'activité du facteur de transcription NFκB et à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (TNFα par exemple, augmenté dans le SNI) mais aussi de molécules inhibitrices de cette activation comme ST2L ou sST2. Le TNFα ainsi sécrété va conduire à une différenciation des Th0 en un profil plutôt Th1. Cette production anormale de Th1, associée à l'activation macrophagique et à l'expression de ST2 soluble va entraîner une expression de type Th2. Les lymphocytes Th2 vont alors produire des cytokines anti-inflammatoires en particulier de l'IL-10, de l'IL-13 et du ST2 soluble pour tenter de contenir l'activation macrophagique exacerbée. Cependant, du fait de l'activation constitutive des macrophages, l'inhibition par les cytokines Th2 ne va pas être complètement efficace, ce qui va entraîner une production encore plus forte de ces cytokines.

Cette boucle d'activation/régulation va produire des molécules ou cytokines qui peuvent avoir un effet néfaste sur le podocyte, en particulier le NO, le TNF (macrophages) et le ST2 soluble (Th2/macrophages). D'autres facteurs de perméabilité non déterminés peuvent également intervenir.

Notre hypothèse est donc que la présence de fortes quantités de ST2 soluble dans le sérum des patients récidivant ainsi que du marqueur ST2L sur leurs macrophages peut traduire une réponse Th2 exacerbée pour contenir une suractivation macrophagique.

Perspectives

∅ Etude de l'effet de ST2 *in vivo*

Une expression transitoire de sST2 a déjà été induite chez l'animal par injection en i.p d'une forte quantité de protéine ST2 soluble recombinante (Sweet et al. 2001). Aucune protéinurie, même transitoire, n'a été relatée chez ces souris, mais il n'est pas certain que cette dernière ait été mesurée. L'hypothèse est que, chez nos patients, une forte expression de ST2 soluble (> 400 pg/mL) mais surtout continue est responsable de la protéinurie. La production d'un AAV (Adeno Associated Virus) codant pour la protéine sST2 recombinante est en cours. L'AAV est un vecteur dont la transduction est efficace pour une grande majorité des cellules, il permet des expressions durables *in vivo* et il possède un faible pouvoir immunogène. Il faudra dans un premier temps déterminer la voie d'injection la plus efficace (i.v, intramusculaire) et quantifier la production de sST2 sérique par ELISA. Si l'expression de sST2 est suffisante, un suivi quotidien de la protéinurie sera réalisé ainsi qu'un phénotypage des cellules immunes périphériques. La réponse anti-virale sera également vérifiée.

Nous souhaitons ainsi déterminer si la forte production de sST2 est capable, à elle seule, d'induire une protéinurie chez l'animal.

∅ Identification des cellules productrices de sST2

Nous avons montré que les patients récidivant possédaient des taux sériques de sST2 élevés. L'identification des cellules produisant cette protéine pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le phénomène de récurrence, et de pouvoir cibler plus spécifiquement ces cellules. Deux méthodes peuvent être envisagées :

Par immunocytofluorométrie : des cytopspins ont été réalisées à partir de PBMC de patients HSF au fur et à mesure de l'étude et conservées à -20°C . Un double marquage avec un anticorps spécifique d'un type cellulaire (CD8, CD4, CD14, CD3, CD56) puis d'un anticorps anti-ST2 après perméabilisation pourra être réalisé. Cette technique a l'avantage de permettre une localisation visuelle de sST2 et de s'affranchir du marquage de la forme membranaire.

Par cytométrie en flux (FACS intracellulaire): Cette technique permet un phénotypage plus précis grâce à l'utilisation simultanée de plusieurs anticorps. La protéine sST2 sera marquée avec un

anticorps anti-ST2 après perméabilisation des cellules. L'inconvénient est que la forme membranaire ST2L sera comptabilisée. Un contrôle avec le marquage membranaire seul est nécessaire.

∅ Localisation et identification du récepteur de sST2

Le récepteur de sST2 n'a pas encore été identifié à ce jour mais plusieurs études ont montré que la protéine soluble était capable de se lier aux lymphocytes B, aux cellules du myélome (Yanagisawa et al. 1997) et aux macrophages (Takezako et al. 2006). Nos résultats suggèrent que sST2 est également capable de se lier aux podocytes en culture.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous pouvons incuber les podocytes immortalisés matures avec du sST2 recombinant à des temps précédant le décollement (10 min, 20 min, 40 min), fixer les cellules et réaliser un marquage avec un anticorps anti IgG-humaine pour détecter la partie recombinante. Le marquage des podocytes seuls avec l'anticorps anti-ST2 va également nous permettre de déterminer la présence de la forme membranaire ST2L. Or, il n'est pas exclu que les podocytes possèdent ST2L en surface puisque la présence de son ARNm a été mise en évidence dans le rein (Kumar et al. 1997). Si sST2 se lie effectivement aux podocytes, nous pouvons essayer d'identifier le récepteur par immunoprécipitation à partir de lysats podocytaires. Si la quantité de protéine obtenue est suffisante, elle pourra être séquencée ou bien injectée chez l'animal afin de produire un immun-sérum spécifique.

∅ Voie de signalisation de sST2 induite dans les podocytes

En parallèle de la détermination du récepteur de sST2, la voie induite par sST2 ainsi que les mécanismes conduisant au décollement podocytaire seront étudiés. Les podocytes matures seront incubés avec des concentrations différentes de sST2 (150-500 pg/mL) à des temps précoces (5 min, 10 min, 15 min) dans un premier temps. A partir des lysats, l'expression et le profil d'activation de protéines appartenant à la voie du TLR-4 (IRAK, JNK1, p38, NFκB), à la voie d'apoptose décrite dans les podocytes (caspase 3, p38, NFκB) et aux différentes protéines de structure podocytaire (néphrine, podocine, CD2AP, β-intégrines) sera analysée par western blot. En collaboration avec l'INSERM 581, l'expression de c-maf et de c-mip/Tc-mip podocytaire pourra également être effectuée, ainsi que la mesure de l'activité de la caspase 3 par ELISA.

Nous espérons montrer que ST2 induit dans les podocytes une voie pro-apoptotique, conduisant au décollement.

⌘ **Meilleure caractérisation des cellules naïves**

La prédominance d'une population de lymphocytes T CD8⁺ naïfs chez les patients présentant une récurrence est assez troublante et pourrait refléter, comme nous l'avons suggéré, une anomalie au niveau de la régulation de tyrosines kinases.

Nous souhaitons dans un premier temps mieux caractériser le phénotype de ces cellules naïves par cytométrie en flux, en regardant l'expression de CD8, CD34, ST2L, CD28 et CD62L par marquage 6 couleurs (FACS Aria). Comme une anomalie d'apoptose est supposée, un test TUNEL sera réalisé sur les cytopins réalisées à partir de PBMC de patients HSF afin de déterminer si les cellules des patients ne récidivant pas possèdent plus d'apoptose que celles de patients récidivant.

La présence d'une anomalie de phosphorylation de lck (56 kDa) et de fyn (59 kDa) devra être confirmée grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques de la forme active et de la forme inactive. Une étude de l'activation des phosphatases associées, SHP-1 et CD45-PTP pourra également être envisagée afin de mieux caractériser l'anomalie observée.

Enfin, comme une augmentation de cette population est associée à la présence de fortes concentrations de sST2, nous vérifierons si les lymphocytes T CD8⁺ naïfs sont capables de produire du sST2, par cytométrie en flux comme précédemment évoqué.

⌘ **Rôle des macrophages**

Notre étude a mis en évidence un rôle possible des macrophages dans les mécanismes de la récurrence. Tout comme pour les cellules T CD8⁺ naïves, nous souhaitons dans un premier temps réaliser un phénotypage précis des macrophages, par cytométrie en flux, chez les différents groupes de patients. Plusieurs marqueurs peuvent être envisagés : CD8, CD4, CD14, ST2L dans un premier temps puis des marqueurs plus spécifiques comme CD163 (phase tardive d'inflammation) ou l'anticorps 25F9 (macrophages matures).

Les monocytes/macrophages des patients pourront être triés négativement grâce à un kit spécifique. Le tri négatif a l'avantage de réduire l'activation cellulaire non spécifique. Des tests de stimulation au

LPS pourront être réalisés in vitro sur les cellules triées, puis les profils d'activation observés en western blot. La présence de sST2 dans les surnageants sera également évaluée par ELISA, ainsi que la production de cytokines telles que le TNF α , l'IL-1 et l'IL-6.

⌘ **Traitement grâce à un anticorps anti-ST2**

Si l'expression continue de sST2 chez les rats ayant reçu l'AAV donne des résultats encourageants, nous pourrions alors envisager un traitement avec un anticorps monoclonal anti-ST2 humain, comme cela a préalablement été décrit chez un modèle murin d'inflammation (Walzl et al. 2001). Chez l'homme, l'utilisation d'un anticorps anti-ST2 dans le traitement de la récurrence semble peu adapté. En effet, les anticorps actuellement disponibles reconnaissent aussi bien la forme soluble que la forme membranaire, ce qui risquerait d'entraîner des effets secondaires délétères. Il serait préférable d'utiliser un anticorps qui bloquerait le récepteur de sST2, encore non déterminé, sauf si ce récepteur est ubiquitaire. Une autre solution serait d'épurer sST2 de façon spécifique grâce à une colonne d'immunoabsorption. Des travaux sont encore nécessaires, mais une telle perspective ouvre de grands espoirs dans le traitement des formes récurrentes de SNI.

⌘ **Apport du rat Buffalo**

Nous avons vu dans le premier article que l'apparition de la maladie du rat Buffalo était associée à la présence intra-rénale de macrophages et de lymphocytes Th2. Il serait intéressant de vérifier chez ce modèle animal la présence de sST2, ainsi que l'effet de son sérum sur des podocytes en culture, afin d'en faire un modèle d'étude parallèle. L'un des problèmes majeurs pour cette étude chez le rat est qu'il n'existe pas à ce jour d'anticorps anti-rat ST2. Nous avons essayé de doser le sST2 du rat avec le kit ELISA humain mais nous n'avons obtenu aucun résultat, suggérant que l'anticorps humain ne réagit pas avec le sST2 de rat.

V-BIBLIOGRAPHIE

- Abbas, A. K., K. M. Murphy, et al. (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." Nature **383**(6603): 787-93.
- Abbas, A. K. and A. H. Sharpe (1999). "T-cell stimulation: an abundance of B7s." Nat Med **5**(12): 1345-6.
- Adler, S. (1992). "Characterization of glomerular epithelial cell matrix receptors." Am J Pathol **141**(3): 571-8.
- Adler, S., R. Sharma, et al. (1996). "Alteration of glomerular permeability to macromolecules induced by cross-linking of beta 1 integrin receptors." Am J Pathol **149**(3): 987-96.
- Ahmad, H. and A. Tejani (2000). "Predictive value of repeat renal biopsies in children with nephrotic syndrome." Nephron **84**(4): 342-6.
- Ahola, H., S. X. Wang, et al. (1999). "Cloning and expression of the rat nephrin homolog." Am J Pathol **155**(3): 907-13.
- Ali, A. A., E. Wilson, et al. (1994). "Minimal-change glomerular nephritis. Normal kidneys in an abnormal environment?" Transplantation **58**(7): 849-52.
- Almawi, W. Y. and O. K. Melemedjian (2002). "Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids." J Mol Endocrinol **28**(2): 69-78.
- Amore, A. and R. Coppo (2002). "Immunological basis of inflammation in dialysis." Nephrol Dial Transplant **17 Suppl 8**: 16-24.
- Anderson, S., J. R. Diamond, et al. (1988). "Mechanisms underlying transition from acute glomerular injury to late glomerular sclerosis in a rat model of nephrotic syndrome." J Clin Invest **82**(5): 1757-68.
- Andresdottir, M. B., N. Ajubi, et al. (1999). "Recurrent focal glomerulosclerosis: natural course and treatment with plasma exchange." Nephrol Dial Transplant **14**(11): 2650-6.
- Arakawa, M. (1970). "A scanning electron microscopy of the glomerulus of normal and nephrotic rats." Lab Invest **23**(5): 489-96.
- Arbour, N., D. Nanche, et al. (2002). "c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 signaling pathways have divergent roles in CD8(+) T cell-mediated antiviral immunity." J Exp Med **195**(7): 801-10.
- Arneil, G. C. (1961). "164 children with nephrosis." Lancet **2**: 1103-10.
- Aro, M. and J. Hardwicke (1984). "IgG subclass composition of monomeric and polymeric IgG in the serum of patients with nephrotic syndrome." Clin Nephrol **22**(5): 244-52.
- Arstila, T. P., A. Casrouge, et al. (1999). "A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity." Science **286**(5441): 958-61.
- Artero, M., C. Biava, et al. (1992). "Recurrent focal glomerulosclerosis: natural history and response to therapy." Am J Med **92**(4): 375-83.
- Artero, M. L., R. Sharma, et al. (1994). "Plasmapheresis reduces proteinuria and serum capacity to injure glomeruli in patients with recurrent focal glomerulosclerosis." Am J Kidney Dis **23**(4): 574-81.
- Aten, J., A. Roos, et al. (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.
- Aucella, F., P. De Bonis, et al. (2005). "Molecular analysis of NPHS2 and ACTN4 genes in a series of 33 Italian patients affected by adult-onset nonfamilial focal segmental glomerulosclerosis." Nephron Clin Pract **99**(2): c31-6.

- Baba, T., A. Ishizu, et al. (2005). "CD4/CD8 double-positive macrophages infiltrating at inflammatory sites: a population of monocytes/macrophages with a cytotoxic phenotype." Blood.
- Baboolal, K. and T. W. Meyer (1995). "Tubulointerstitial injury and impaired renal function after recovery from acute puromycin nephrosis." Am J Physiol **269**(3 Pt 2): F331-8.
- Baecher-Allan, C., J. A. Brown, et al. (2001). "CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood." J Immunol **167**(3): 1245-53.
- Bagga, A. and P. Hari (2000). "Levamisole-induced vasculitis." Pediatr Nephrol **14**(10-11): 1057-8.
- Bagga, A., P. Hari, et al. (2003). "Mycophenolate mofetil and prednisolone therapy in children with steroid-dependent nephrotic syndrome." Am J Kidney Dis **42**(6): 1114-20.
- Bagga, A., A. Sharma, et al. (1997). "Levamisole therapy in corticosteroid-dependent nephrotic syndrome." Pediatr Nephrol **11**(4): 415-7.
- Bailey, E., M. J. Bottomley, et al. (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.
- Bakir, A. A., N. G. Bazilinski, et al. (1989). "Focal segmental glomerulosclerosis. A common entity in nephrotic black adults." Arch Intern Med **149**(8): 1802-4.
- Bakker, W. W., J. F. Baller, et al. (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., J. R. Beukhof, et al. (1982). "Vascular permeability increasing factor (VPF) in IgA nephropathy." Clin Nephrol **18**(4): 165-7.
- Bakker, W. W., T. Borghuis, et al. (2005). "Protease activity of plasma hemopexin." Kidney Int **68**(2): 603-10.
- Bakker, W. W., C. M. van Dael, et al. (2005). "Altered activity of plasma hemopexin in patients with minimal change disease in relapse." Pediatr Nephrol **20**(10): 1410-5.
- Bakker, W. W., S. M. van der Laan, et al. (1982). "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., W. H. van Luijk, et al. (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.
- Banfi, G., C. Colturi, et al. (1990). "The recurrence of focal segmental glomerulosclerosis in kidney transplant patients treated with cyclosporine." Transplantation **50**(4): 594-6.
- Banfi, G., M. Moriggi, et al. (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.
- Baqi, N., A. Singh, et al. (1998). "The paucity of minimal change disease in adolescents with primary nephrotic syndrome." Pediatr Nephrol **12**(2): 105-7.
- Barboux, S., P. Niaudet, et al. (1997). "Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome." Nat Genet **17**(4): 467-70.
- Bariety, J., P. Bruneval, et al. (2001). "Posttransplantation relapse of FSGS is characterized by glomerular epithelial cell transdifferentiation." J Am Soc Nephrol **12**(2): 261-74.
- Belson, A., P. D. Yorgin, et al. (2001). "Long-term plasmapheresis and protein A column treatment of recurrent FSGS." Pediatr Nephrol **16**(12): 985-9.

- Bertani, T., M. Abbate, et al. (1989). "Tumor necrosis factor induces glomerular damage in the rabbit." Am J Pathol **134**(2): 419-30.
- Blantz, R. C., F. B. Gabbai, et al. (1994). "Water and protein permeability is regulated by the glomerular epithelial slit diaphragm." J Am Soc Nephrol **4**(12): 1957-64.
- Boerkoel, C. F., H. Takashima, et al. (2002). "Mutant chromatin remodeling protein SMARCAL1 causes Schimke immuno-osseous dysplasia." Nat Genet **30**(2): 215-20.
- Bogue, M. and D. B. Roth (1996). "Mechanism of V(D)J recombination." Curr Opin Immunol **8**(2): 175-80.
- Bonilla-Felix, M., C. Parra, et al. (1999). "Changing patterns in the histopathology of idiopathic nephrotic syndrome in children." Kidney Int **55**(5): 1885-90.
- Bottomley, M. J., N. J. Webb, et al. (1999). "Peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis spontaneously secrete vascular endothelial growth factor (VEGF): specific up-regulation by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in synovial fluid." Clin Exp Immunol **117**(1): 171-6.
- Boulton Jones, J. M., I. Tulloch, et al. (1983). "Changes in the glomerular capillary wall induced by lymphocyte products and serum of nephrotic patients." Clin Nephrol **20**(2): 72-7.
- Boute, N., O. Gribouval, et al. (2000). "NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome." Nat Genet **24**(4): 349-54.
- Breiteneder-Geleff, S., K. Matsui, et al. (1997). "Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis." Am J Pathol **151**(4): 1141-52.
- Brenner, B. M., T. H. Hostetter, et al. (1978). "Molecular basis of proteinuria of glomerular origin." N Engl J Med **298**(15): 826-33.
- Bridgewater, D. J., J. Ho, et al. (2005). "Insulin-like growth factors inhibit podocyte apoptosis through the PI3 kinase pathway." Kidney Int **67**(4): 1308-14.
- Brint, E. K., K. A. Fitzgerald, et al. (2002). "Characterization of signaling pathways activated by the interleukin 1 (IL-1) receptor homologue T1/ST2. A role for Jun N-terminal kinase in IL-4 induction." J Biol Chem **277**(51): 49205-11.
- Brint, E. K., D. Xu, et al. (2004). "ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance." Nat Immunol **5**(4): 373-9.
- Brodehl, J. (1991). "The treatment of minimal change nephrotic syndrome: lessons learned from multicentre co-operative studies." Eur J Pediatr **150**(6): 380-7.
- Brown, C. B., J. S. Cameron, et al. (1978). "Focal segmental glomerulosclerosis with rapid decline in renal function ("malignant FSGS")." Clin Nephrol **10**(2): 51-61.
- Broyer, M., A. Meziane, et al. (1985). "Nitrogen mustard therapy in idiopathic nephrotic syndrome of childhood." Int J Pediatr Nephrol **6**(1): 29-34.
- Bruijn, J. A., A. Roos, et al. (1994). "Transforming growth factor-beta and the glomerular extracellular matrix in renal pathology." J Lab Clin Med **123**(1): 34-47.
- Brunner, M., C. Krenn, et al. (2004). "Increased levels of soluble ST2 protein and IgG1 production in patients with sepsis and trauma." Intensive Care Med **30**(7): 1468-73.
- Burstein, D. M. and R. A. Rodby (1993). "Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection." J Am Soc Nephrol **4**(6): 1288-93.
- Busiek, D. F., V. Baragi, et al. (1995). "Matrilysin expression by human mononuclear phagocytes and its regulation by cytokines and hormones." J Immunol **154**(12): 6484-91.
- Bussemaker, E., J. Passauer, et al. (2001). "Tryptophan immunoabsorption strongly reduces proteinuria in recurrent nephrotic syndrome." Nephrol Dial Transplant **16**(6): 1270-2.

- Bustos, C., E. Gonzalez, et al. (1994). "Increase of tumour necrosis factor alpha synthesis and gene expression in peripheral blood mononuclear cells of children with idiopathic nephrotic syndrome." Eur J Clin Invest **24**(12): 799-805.
- Cameron, J. S. (1991). "Recurrent primary disease and de novo nephritis following renal transplantation." Pediatr Nephrol **5**(4): 412-21.
- Cameron, J. S. (1993). "Recurrent disease in renal allografts." Kidney Int Suppl **43**: S91-4.
- Cameron, J. S. (1996). "The enigma of focal segmental glomerulosclerosis." Kidney Int Suppl **57**: S119-31.
- Cameron, J. S., P. Senguttuvan, et al. (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., D. R. Turner, et al. (1978). "The long-term prognosis of patients with focal segmental glomerulosclerosis." Clin Nephrol **10**(6): 213-8.
- Cameron, J. S., D. R. Turner, et al. (1974). "The nephrotic syndrome in adults with 'minimal change' glomerular lesions." Q J Med **43**(171): 461-88.
- Candiano, G., L. Musante, et al. (2001). "Apolipoproteins prevent glomerular albumin permeability induced in vitro by serum from patients with focal segmental glomerulosclerosis." J Am Soc Nephrol **12**(1): 143-50.
- Carraro, M., G. Caridi, et al. (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., C. Zennaro, et al. (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.
- Carroll, N., G. W. Crock, et al. (1973). "Scanning electron microscopy of aminonucleoside nephrosis." J Pathol **111**(1): 37-42.
- Cattran, D., T. Neogi, et al. (2003). "Serial estimates of serum permeability activity and clinical correlates in patients with native kidney focal segmental glomerulosclerosis." J Am Soc Nephrol **14**(2): 448-53.
- Cattran, D. C., G. B. Appel, et al. (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.
- Caulfield, J. P. and M. G. Farquhar (1978). "Loss of anionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis." Lab Invest **39**(5): 505-12.
- Chambers, C. A. and J. P. Allison (1999). "Costimulatory regulation of T cell function." Curr Opin Cell Biol **11**(2): 203-10.
- Chan, M. K., K. W. Chan, et al. (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., L. L. Munn, et al. (2000). "Effect of vascular endothelial growth factor on cultured endothelial cell monolayer transport properties." Microvasc Res **59**(2): 265-77.
- Chanutin, A. (1932). "Experimental renal insufficiency produced by partial nephrectomy." Arch Intern Med **49**: 767-787.
- Cheigh, J. S., J. Mouradian, et al. (1983). "Focal segmental glomerulosclerosis in renal transplants." Am J Kidney Dis **2**(4): 449-55.

- Chen, A., L. F. Sheu, et al. (1998). "Experimental focal segmental glomerulosclerosis in mice." Nephron **78**(4): 440-52.
- Chen, A., C. H. Wei, et al. (1995). "Induction of proteinuria by adriamycin or bovine serum albumin in the mouse." Nephron **69**(3): 293-300.
- Cheng, I. K., B. M. Jones, et al. (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.
- Cheong, H. I., H. W. Han, et al. (2000). "Early recurrent nephrotic syndrome after renal transplantation in children with focal segmental glomerulosclerosis." Nephrol Dial Transplant **15**(1): 78-81.
- Cheung, P. K., J. F. Baller, et al. (1996). "Impairment of endothelial and subendothelial sites by a circulating plasma factor associated with minimal change disease." Nephrol Dial Transplant **11**(11): 2185-91.
- Cheung, P. K., P. A. Klok, et al. (1996). "Minimal change-like glomerular alterations induced by a human plasma factor." Nephron **74**(3): 586-93.
- Cheung, P. K., P. A. Klok, et al. (2000). "Induction of experimental proteinuria in vivo following infusion of human plasma hemopexin." Kidney Int **57**(4): 1512-20.
- Cheung, P. K., B. Stulp, et al. (1999). "Is 100KF an isoform of hemopexin? Immunochemical characterization of the vasoactive plasma factor 100KF." J Am Soc Nephrol **10**(8): 1700-8.
- Chien, Y. H., N. R. Gascoigne, et al. (1984). "Somatic recombination in a murine T-cell receptor gene." Nature **309**(5966): 322-6.
- Cho, B. S., S. R. Yoon, et al. (1999). "Up-regulation of interleukin-4 and CD23/FcepsilonRII in minimal change nephrotic syndrome." Pediatr Nephrol **13**(3): 199-204.
- Cho, M. H., H. S. Lee, et al. (2003). "Interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha are increased in minimal change disease but do not alter albumin permeability." Am J Nephrol **23**(4): 260-6.
- Choi, K. H., S. I. Kim, et al. (2001). "Long-term outcome of kidney transplantation in adult recipients with focal segmental glomerulosclerosis." Yonsei Med J **42**(2): 209-14.
- Churg, J. and E. Grishman (1975). "Ultrastructure of glomerular disease: a review." Kidney Int **7**(4): 254-61.
- Churg, J., R. Habib, et al. (1970). "Pathology of the nephrotic syndrome in children: a report for the International Study of Kidney Disease in Children." Lancet **760**(1): 1299-302.
- Ciani, L., A. Patel, et al. (2003). "Mice lacking the giant protocadherin mFAT1 exhibit renal slit junction abnormalities and a partially penetrant cyclopia and anophthalmia phenotype." Mol Cell Biol **23**(10): 3575-82.
- Cochat, P., A. Kassir, et al. (1993). "Recurrent nephrotic syndrome after transplantation: early treatment with plasmapheresis and cyclophosphamide." Pediatr Nephrol **7**(1): 50-4.
- Cochat, P., M. Schell, et al. (1996). "Management of recurrent nephrotic syndrome after kidney transplantation in children." Clin Nephrol **46**(1): 17-20.
- Coleman, M. A., J. A. Eisen, et al. (2000). "Cloning and characterization of HARP/SMARCAL1: a prokaryotic HepA-related SNF2 helicase protein from human and mouse." Genomics **65**(3): 274-82.
- Conlon, P. J., K. Lynn, et al. (1999). "Spectrum of disease in familial focal and segmental glomerulosclerosis." Kidney Int **56**(5): 1863-71.
- Conze, D., T. Krahl, et al. (2002). "c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 have distinct roles in CD8(+) T cell activation." J Exp Med **195**(7): 811-23.

- Cortes-Hernandez, J., L. Fossati-Jimack, et al. (2002). "Murine glomerular mesangial cell uptake of apoptotic cells is inefficient and involves serum-mediated but complement-independent mechanisms." Clin Exp Immunol **130**(3): 459-66.
- Cosio, F. G., W. L. Frankel, et al. (1999). "Focal segmental glomerulosclerosis in renal allografts with chronic nephropathy: implications for graft survival." Am J Kidney Dis **34**(4): 731-8.
- Couser, W., A. Badger, et al. (1977). "Hodgkin's disease and lipoid nephrosis." Lancet **1**(8017): 912-3.
- Coward, R. J., R. R. Foster, et al. (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.
- Cui, S., C. Li, et al. (2005). "Rapid isolation of glomeruli coupled with gene expression profiling identifies downstream targets in Pod1 knockout mice." J Am Soc Nephrol **16**(11): 3247-55.
- Cuoghi, D., P. Venturi, et al. (1988). "Bee sting and relapse of nephrotic syndrome." Child Nephrol Urol **9**(1-2): 82-3.
- D'Agati, V. (1994). "The many masks of focal segmental glomerulosclerosis." Kidney Int **46**(4): 1223-41.
- Dall'Amico, R., G. Ghiggeri, et al. (1999). "Prediction and treatment of recurrent focal segmental glomerulosclerosis after renal transplantation in children." Am J Kidney Dis **34**(6): 1048-55.
- Daniel, V., Y. Trautmann, et al. (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., R. Baatard, et al. (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., E. Bigot, et al. (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., Y. Godfrin, et al. (1998). "Antihuman immunoglobulin affinity immunoadsorption strongly decreases proteinuria in patients with relapsing nephrotic syndrome." J Am Soc Nephrol **9**(9): 1709-15.
- Dantal, J. and J. P. Soulillou (1996). "Relapse of focal segmental glomerulosclerosis after kidney transplantation." Adv Nephrol Necker Hosp **25**: 91-106.
- Davin, J. C. and M. P. Merkus (2005). "Levamisole in steroid-sensitive nephrotic syndrome of childhood: the lost paradise?" Pediatr Nephrol **20**(1): 10-4.
- Day, C. J., P. Cockwell, et al. (2002). "Mycophenolate mofetil in the treatment of resistant idiopathic nephrotic syndrome." Nephrol Dial Transplant **17**(11): 2011-3.
- Deen, W. M., M. J. Lazzara, et al. (2001). "Structural determinants of glomerular permeability." Am J Physiol Renal Physiol **281**(4): F579-96.
- Detwiler, R. K., R. J. Falk, et al. (1994). "Collapsing glomerulopathy: a clinically and pathologically distinct variant of focal segmental glomerulosclerosis." Kidney Int **45**(5): 1416-24.
- Diamond, J. R., J. V. Bonventre, et al. (1986). "A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis." Kidney Int **29**(2): 478-83.
- Diamond, J. R. and M. J. Karnovsky (1986). "Focal and segmental glomerulosclerosis following a single intravenous dose of puromycin aminonucleoside." Am J Pathol **122**(3): 481-7.
- Diaz-Cazorla, M., D. Perez-Sala, et al. (1999). "Dual effect of nitric oxide donors on cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells." J Am Soc Nephrol **10**(5): 943-52.

- Dileepan, K. N., R. Sharma, et al. (1993). "Effect of superoxide exposure on albumin permeability of isolated rat glomeruli." *J Lab Clin Med* **121**(6): 797-804.
- Ding, G., I. Pesek-Diamond, et al. (1993). "Cholesterol, macrophages, and gene expression of TGF-beta 1 and fibronectin during nephrosis." *Am J Physiol* **264**(4 Pt 2): F577-84.
- Donoviel, D. B., D. D. Freed, et al. (2001). "Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN." *Mol Cell Biol* **21**(14): 4829-36.
- Doyonnas, R., D. B. Kershaw, et al. (2001). "Anuria, omphalocele, and perinatal lethality in mice lacking the CD34-related protein podocalyxin." *J Exp Med* **194**(1): 13-27.
- Drenckhahn, D. and R. P. Franke (1988). "Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man." *Lab Invest* **59**(5): 673-82.
- Dressler, G. R., J. E. Wilkinson, et al. (1993). "Deregulation of Pax-2 expression in transgenic mice generates severe kidney abnormalities." *Nature* **362**(6415): 65-7.
- Durkan, A. M., E. M. Hodson, et al. (2001). "Immunosuppressive agents in childhood nephrotic syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials." *Kidney Int* **59**(5): 1919-27.
- Dustin, M. L., M. W. Olszowy, et al. (1998). "A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts." *Cell* **94**(5): 667-77.
- Dvorak, H. F., J. A. Nagy, et al. (1999). "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis." *Curr Top Microbiol Immunol* **237**: 97-132.
- Eddy, A. A. and J. M. Symons (2003). "Nephrotic syndrome in childhood." *Lancet* **362**(9384): 629-39.
- Erb, K. J., B. Ruger, et al. (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., D. Besnier, et al. (1999). "Effect of protein A immunoadsorption in nephrotic syndrome of various etiologies." *J Am Soc Nephrol* **10**(9): 2014-7.
- Esser, S., K. Wolburg, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro." *J Cell Biol* **140**(4): 947-59.
- Ezaki, T., R. Kawatsu, et al. (1990). "Characterization of intrathymic and extrathymic T cell development in spontaneous thymoma Buffalo/Mna rats." *Thymus* **16**(2): 67-87.
- Fakhouri, F., N. Bocquet, et al. (2003). "Steroid-sensitive nephrotic syndrome: from childhood to adulthood." *Am J Kidney Dis* **41**(3): 550-7.
- Fan, L., T. Wakayama, et al. (2002). "Downregulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in the kidney in rats with puromycin aminonucleoside nephrosis." *Nephron* **90**(1): 95-102.
- Farquhar, M. G., R. L. Vernier, et al. (1957). "An electron microscope study of the glomerulus in nephrosis, glomerulonephritis, and lupus erythematosus." *J Exp Med* **106**(5): 649-60.
- Feehally, J., N. P. Kendell, et al. (1985). "High incidence of minimal change nephrotic syndrome in Asians." *Arch Dis Child* **60**(11): 1018-20.
- Filler, G., E. Young, et al. (2003). "Is there really an increase in non-minimal change nephrotic syndrome in children?" *Am J Kidney Dis* **42**(6): 1107-13.
- Fishman, J. A. and M. J. Karnovsky (1985). "Effects of the aminonucleoside of puromycin on glomerular epithelial cells in vitro." *Am J Pathol* **118**(3): 398-407.
- Florida, J. F., J. M. Diaz Pena, et al. (1992). "Nephrotic syndrome and respiratory allergy in childhood." *J Investig Allergol Clin Immunol* **2**(3): 136-40.
- Fodor, P., M. T. Saitua, et al. (1982). "T-cell dysfunction in minimal-change nephrotic syndrome of childhood." *Am J Dis Child* **136**(8): 713-7.

- Fogo, A., Y. Yoshida, et al. (1988). "Serial micropuncture analysis of glomerular function in two rat models of glomerular sclerosis." J Clin Invest **82**(1): 322-30.
- Fogo, A. B. (1999). "Mesangial matrix modulation and glomerulosclerosis." Exp Nephrol **7**(2): 147-59.
- Fogo, A. B. (2000). "The role of angiotensin II and plasminogen activator inhibitor-1 in progressive glomerulosclerosis." Am J Kidney Dis **35**(2): 179-88.
- Foster, R. R., M. A. Saleem, et al. (2005). "Vascular endothelial growth factor and nephrin interact and reduce apoptosis in human podocytes." Am J Physiol Renal Physiol **288**(1): F48-57.
- Franco, A., R. Peres, et al. (1987). "Spontaneous remission of proteinuria in recurrent focal glomerulosclerosis. Reappraisal of plasma exchange treatment." Clin Nephrol **28**(3): 158.
- Frank, C., M. Herrmann, et al. (2000). "Dominant T cells in idiopathic nephrotic syndrome of childhood." Kidney Int **57**(2): 510-7.
- Freichel, M., R. Vennekens, et al. (2004). "Functional role of TRPC proteins in vivo: lessons from TRPC-deficient mouse models." Biochem Biophys Res Commun **322**(4): 1352-8.
- Frisch, S. M. and H. Francis (1994). "Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis." J Cell Biol **124**(4): 619-26.
- Fuchshuber, A., O. Gribouval, et al. (2001). "Clinical and genetic evaluation of familial steroid-responsive nephrotic syndrome in childhood." J Am Soc Nephrol **12**(2): 374-8.
- Fuchshuber, A., G. Jean, et al. (1995). "Mapping a gene (SRN1) to chromosome 1q25-q31 in idiopathic nephrotic syndrome confirms a distinct entity of autosomal recessive nephrosis." Hum Mol Genet **4**(11): 2155-8.
- Genova, R., M. Sanfilippo, et al. (1987). "Food allergy in steroid-resistant nephrotic syndrome." Lancet **1**(8545): 1315-6.
- Gerber, M. A. and F. Paronetto (1971). "IgE in glomeruli of patients with nephrotic syndrome." Lancet **1**(7709): 1097-9.
- Giangiaco, J., T. G. Cleary, et al. (1975). "Serum immunoglobulins in the nephrotic syndrome. A possible cause of minimal-change nephrotic syndrome." N Engl J Med **293**(1): 8-12.
- Glasser, R. J., J. A. Velosa, et al. (1977). "Experimental model of focal sclerosis. I. Relationship to protein excretion in aminonucleoside nephrosis." Lab Invest **36**(5): 519-26.
- Godfrin, Y., J. Dantal, et al. (1996). "A new method of measuring albumin permeability in isolated glomeruli." Kidney Int **50**(4): 1352-7.
- Godfrin, Y., J. Dantal, et al. (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.
- Gorocho, G., A. U. Neumann, et al. (1998). "Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy." Nat Med **4**(2): 215-21.
- Grevska, L. and M. Polenakovik (1999). "Collapsing glomerulopathy: clinical characteristics and follow-up." Am J Kidney Dis **33**(4): 652-7.
- Green, A., Y. O'Meara, et al. (1990). "Successful treatment with cyclosporin of nephrotic syndrome due to focal segmental glomerulosclerosis recurring in a renal transplant." Nephrol Dial Transplant **5**(4): 321-2.
- Grimbert, P., V. Audard, et al. (2005). "Abnormal RNA processing and altered expression of serin-rich proteins in minimal-change nephrotic syndrome." Pediatr Res **57**(1): 133-7.
- Gross, P. L. and W. C. Aird (2000). "The endothelium and thrombosis." Semin Thromb Hemost **26**(5): 463-78.

- Grunkemeyer, J. A., C. Kwok, et al. (2005). "CD2-associated protein (CD2AP) expression in podocytes rescues lethality of CD2AP deficiency." J Biol Chem **280**(33): 29677-81.
- Guasch, A., W. M. Deen, et al. (1993). "Charge selectivity of the glomerular filtration barrier in healthy and nephrotic humans." J Clin Invest **92**(5): 2274-82.
- Guo, J. K., A. L. Menke, et al. (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., S. M. Meehan, et al. (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.
- Habib, R., C. Antignac, et al. (1987). "Glomerular lesions in the transplanted kidney in children." Am J Kidney Dis **10**(3): 198-207.
- Habib, R., M. F. Gagnadoux, et al. (1987). "Recurrent glomerulonephritis in transplanted children." Contrib Nephrol **55**: 123-35.
- Habib, R. and M. C. Gubler (1971). "[Focal glomerular lesions in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. Observations of 49 cases]." Nephron **8**(4): 382-401.
- Habib, R. and C. Kleinknecht (1971). "The primary nephrotic syndrome of childhood. Classification and clinicopathologic study of 406 cases." Pathol Annu **6**: 417-74.
- Hamano, Y., J. A. Grunkemeyer, et al. (2002). "Determinants of vascular permeability in the kidney glomerulus." J Biol Chem **277**(34): 31154-62.
- Hardwicke, J., J. F. Soothill, et al. (1959). "Nephrotic syndrome with pollen hypersensitivity." Lancet **1**(7071): 500-2.
- Hariharan, S., V. R. Peddi, et al. (1998). "Recurrent and de novo renal diseases after renal transplantation: a report from the renal allograft disease registry." Am J Kidney Dis **31**(6): 928-31.
- Hartner, A., H. Schocklmann, et al. (1999). "Alpha8 integrin in glomerular mesangial cells and in experimental glomerulonephritis." Kidney Int **56**(4): 1468-80.
- Hayslett, J. P., L. S. Krassner, et al. (1969). "Progression of "lipoid nephrosis" to renal insufficiency." N Engl J Med **281**(4): 181-7.
- Hebbar, M., P. Jeannin, et al. (2004). "Detection of circulating soluble CD28 in patients with systemic lupus erythematosus, primary Sjogren's syndrome and systemic sclerosis." Clin Exp Immunol **136**(2): 388-92.
- Herve, C. and J. Dantal (2005). "Possible new perspectives for our understanding of nephrotic syndrome recurrence." Nephrol Dial Transplant.
- Heslan, J. M., A. Branellec, et al. (1986). "The vascular permeability factor is a T lymphocyte product." Nephron **42**(2): 187-8.
- Heslan, J. M., A. I. Branellec, et al. (1991). "Differentiation between vascular permeability factor and IL-2 in lymphocyte supernatants from patients with minimal-change nephrotic syndrome." Clin Exp Immunol **86**(1): 157-62.
- Hewitt, I. K., A. K. House, et al. (1992). "Altered in vitro lymphocyte response in childhood nephrotic syndrome." Pediatr Nephrol **6**(5): 464-6.
- Hippenstiel, S., M. Krull, et al. (1998). "VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells." Am J Physiol **274**(5 Pt 1): L678-84.
- Hirokawa, K., M. Utsuyama, et al. (1990). "Age-related hyperplasia of the thymus and T-cell system in the Buffalo rat. Immunological and immunohistological studies." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol **59**(1): 38-47.

- Holt, R. C., N. J. Webb, et al. (2005). "Heparanase activity is dysregulated in children with steroid-sensitive nephrotic syndrome." *Kidney Int* **67**(1): 122-9.
- Horita, Y., M. Miyazaki, et al. (1998). "Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rats with protein-overload nephrosis." *Nephrol Dial Transplant* **13**(10): 2519-28.
- Hosenpud, J., W. F. Piering, et al. (1985). "Successful second kidney transplantation in a patient with focal glomerulosclerosis. A case report." *Am J Nephrol* **5**(4): 299-304.
- Hostetter, T. H., J. L. Olson, et al. (1981). "Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation." *Am J Physiol* **241**(1): F85-93.
- Howanietz, H. and G. Lubec (1985). "Idiopathic nephrotic syndrome, treated with steroids for five years, found to be allergic reaction to pork." *Lancet* **2**(8452): 450.
- Hoyer, J. R., R. L. Vernier, et al. (1972). "Recurrence of idiopathic nephrotic syndrome after renal transplantation." *Lancet* **2**(7773): 343-8.
- Huber, T. B. and T. Benzing (2005). "The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function." *Curr Opin Nephrol Hypertens* **14**(3): 211-6.
- Huber, T. B., M. Simons, et al. (2003). "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.
- Hudson, B. G., S. T. Reeders, et al. (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.
- Hulett, M. D., C. Freeman, et al. (1999). "Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis." *Nat Med* **5**(7): 803-9.
- Hulton, S. A., T. J. Neuhaus, et al. (1994). "Long-term cyclosporin A treatment of minimal-change nephrotic syndrome of childhood." *Pediatr Nephrol* **8**(4): 401-3.
- Huwiler, A., S. Ren, et al. (2003). "Inflammatory cytokines upregulate nephrin expression in human embryonic kidney epithelial cells and podocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **305**(1): 136-42.
- Hyman, L. R. and P. M. Burkholder (1973). "Focal sclerosing glomerulonephropathy with segmental hyalinosis. A clinicopathologic analysis." *Lab Invest* **28**(5): 533-44.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." *Cell* **110**(6): 673-87.
- Ingulli, E. and A. Tejani (1991). "Incidence, treatment, and outcome of recurrent focal segmental glomerulosclerosis posttransplantation in 42 allografts in children--a single-center experience." *Transplantation* **51**(2): 401-5.
- Ingulli, E. and A. Tejani (1991). "Racial differences in the incidence and renal outcome of idiopathic focal segmental glomerulosclerosis in children." *Pediatr Nephrol* **5**(4): 393-7.
- Iwasa, K., K. Komai, et al. (1998). "Spontaneous thymoma rat as a model for myasthenic weakness caused by anti-ryanodine receptor antibodies." *Muscle Nerve* **21**(12): 1655-60.
- Jao, W., V. E. Pollak, et al. (1973). "Lipoid nephrosis: an approach to the clinicopathologic analysis and dismemberment of idiopathic nephrotic syndrome with minimal glomerular changes." *Medicine (Baltimore)* **52**(5): 445-68.
- Jennette, J. C. and C. G. Hippi (1985). "C1q nephropathy: a distinct pathologic entity usually causing nephrotic syndrome." *Am J Kidney Dis* **6**(2): 103-10.
- Jorgensen, J. L., U. Esser, et al. (1992). "Mapping T-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics." *Nature* **355**(6357): 224-30.
- Kanwar, Y. S. and M. G. Farquhar (1979). "Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(3): 1303-7.

- Kanwar, Y. S., Z. Z. Liu, et al. (1991). "Current status of the structural and functional basis of glomerular filtration and proteinuria." Semin Nephrol **11**(4): 390-413.
- Kaplan, J. M., S. H. Kim, et al. (2000). "Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis." Nat Genet **24**(3): 251-6.
- Kapojos, J. J., A. van den Berg, et al. (2003). "Production of hemopexin by TNF-alpha stimulated human mesangial cells." Kidney Int **63**(5): 1681-6.
- Karin, M. and A. Lin (2002). "NF-kappaB at the crossroads of life and death." Nat Immunol **3**(3): 221-7.
- Karle, S. M., B. Uetz, et al. (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. and S. K. Ainsworth (1972). "The structural basis of glomerular filtration." Adv Nephrol Necker Hosp **2**: 35-60.
- Karras, A., V. de Montpreville, et al. (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.
- Kato, F. and M. Watanabe (1982). "Motor dysfunction in spontaneous thymoma rats, Buffalo/Mna." J Pharmacobiodyn **5**(9): 727-33.
- Kato, F. and M. Watanabe (1982). "Motor dysfunction in thymoma rats: comparison between fast and slow muscles." J Pharmacobiodyn **5**(12): 1005-11.
- Kato, F. and M. Watanabe (1983). "Biochemical study on spontaneous thymoma rats with motor dysfunction." J Pharmacobiodyn **6**(4): 275-9.
- Kawachi, H., D. R. Abrahamson, et al. (1995). "Developmental expression of the nephritogenic antigen of monoclonal antibody 5-1-6." Am J Pathol **147**(3): 823-33.
- Kawaguchi, M., M. Yamada, et al. (1992). "Roles of active oxygen species in glomerular epithelial cell injury in vitro caused by puromycin aminonucleoside." Toxicology **72**(3): 329-40.
- Kawano, K., J. Wenzl, et al. (1971). "Lipoid nephrosis. A multifold blind study, including quantitation." Lab Invest **24**(6): 499-503.
- Kees-Folts, D. and J. R. Diamond (1993). "Relationship between hyperlipidemia, lipid mediators, and progressive glomerulosclerosis in the nephrotic syndrome." Am J Nephrol **13**(5): 365-75.
- Kemper, M. J., G. Wolf, et al. (2001). "Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child." N Engl J Med **344**(5): 386-7.
- Kerjaschki, D., D. J. Sharkey, et al. (1984). "Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell." J Cell Biol **98**(4): 1591-6.
- Kershaw, D. B., P. E. Thomas, et al. (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.
- Kessler, M., J. Champigneulle, et al. (1999). "A renal allograft recipient with late recurrence of focal and segmental glomerulosclerosis after switching from cyclosporine to tacrolimus." Transplantation **67**(4): 641-3.
- Kestila, M., U. Lenkkeri, et al. (1998). "Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome." Mol Cell **1**(4): 575-82.
- Kim, E. M., J. Striegel, et al. (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., H. Wu, et al. (2003). "CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility." Science **300**(5623): 1298-300.

- Kimata, H., M. Fujimoto, et al. (1995). "Involvement of interleukin (IL)-13, but not IL-4, in spontaneous IgE and IgG4 production in nephrotic syndrome." Eur J Immunol **25**(6): 1497-501.
- King, A. J. and B. M. Brenner (1991). "Endothelium-derived vasoactive factors and the renal vasculature." Am J Physiol **260**(4 Pt 2): R653-62.
- Kitahara, T., K. Hiromura, et al. (2005). "Mesangial cells stimulate differentiation of endothelial cells to form capillary-like networks in a three-dimensional culture system." Nephrol Dial Transplant **20**(1): 42-9.
- Klanke, B., M. Simon, et al. (1998). "Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF) on haemodynamics and permselectivity of the isolated perfused rat kidney." Nephrol Dial Transplant **13**(4): 875-85.
- Klinger, M., S. Kramarz, et al. (1997). "Different erythrocyte and platelet surface electric charge in various types of glomerulonephritis." Nephrol Dial Transplant **12**(4): 707-12.
- Kobayashi, K., N. Yoshikawa, et al. (1994). "T-cell subpopulations in childhood nephrotic syndrome." Clin Nephrol **41**(5): 253-8.
- Kojima, K., A. Davidovits, et al. (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.
- Kojima, K., K. Matsui, et al. (2000). "Protection of alpha(3) integrin-mediated podocyte shape by superoxide dismutase in the puromycin aminonucleoside nephrosis rat." Am J Kidney Dis **35**(6): 1175-85.
- Kondo, S., N. Yoshizawa, et al. (1999). "Studies of glomerular permeability factor (GPF) in focal segmental glomerular sclerosis and the relationship between GPF and vascular permeability factor (VPF)." Clin Nephrol **52**(5): 278-84.
- Kooijmans-Coutinho, M. F., A. M. Tegzess, et al. (1993). "Indomethacin treatment of recurrent nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis after renal transplantation." Nephrol Dial Transplant **8**(5): 469-73.
- Korbet, S. M., R. M. Genchi, et al. (1996). "The racial prevalence of glomerular lesions in nephrotic adults." Am J Kidney Dis **27**(5): 647-51.
- Korbet, S. M., M. M. Schwartz, et al. (1986). "The prognosis of focal segmental glomerular sclerosis of adulthood." Medicine (Baltimore) **65**(5): 304-11.
- Korbet, S. M., M. M. Schwartz, et al. (1988). "Recurrent nephrotic syndrome in renal allografts." Am J Kidney Dis **11**(3): 270-6.
- Korbet, S. M., M. M. Schwartz, et al. (1994). "Primary focal segmental glomerulosclerosis: clinical course and response to therapy." Am J Kidney Dis **23**(6): 773-83.
- Kos, C. H., T. C. Le, et al. (2003). "Mice deficient in alpha-actinin-4 have severe glomerular disease." J Clin Invest **111**(11): 1683-90.
- Koshikawa, M., M. Mukoyama, et al. (2005). "Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation in podocyte injury and proteinuria in experimental nephrotic syndrome." J Am Soc Nephrol **16**(9): 2690-701.
- Koukouritaki, S. B., E. A. Vardaki, et al. (1999). "TNF-alpha induces actin cytoskeleton reorganization in glomerular epithelial cells involving tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase." Mol Med **5**(6): 382-92.
- Koyama, A., M. Fujisaki, et al. (1991). "A glomerular permeability factor produced by human T cell hybridomas." Kidney Int **40**(3): 453-60.

- Koziell, A., V. Grech, et al. (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.
- Kreidberg, J. A., M. J. Donovan, et al. (1996). "Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis." Development **122**(11): 3537-47.
- Kreisberg, J. I. and M. J. Karnovsky (1978). "Focal glomerular sclerosis in the fawn-hooded rat." Am J Pathol **92**(3): 637-52.
- Kretzler, M., V. P. Teixeira, et al. (2001). "Integrin-linked kinase as a candidate downstream effector in proteinuria." Faseb J **15**(10): 1843-5.
- Kriz, W., M. Elger, et al. (1990). "Structure of the glomerular mesangium: a biomechanical interpretation." Kidney Int Suppl **30**: S2-9.
- Kuijpers, M. H. and E. Gruys (1984). "Spontaneous hypertension and hypertensive renal disease in the fawn-hooded rat." Br J Exp Pathol **65**(2): 181-90.
- Kujubu, D. A., J. T. Norman, et al. (1991). "Primary response gene expression in renal hypertrophy and hyperplasia: evidence for different growth initiation processes." Am J Physiol **260**(6 Pt 2): F823-7.
- Kumar, S., M. N. Tzimas, et al. (1997). "Expression of ST2, an interleukin-1 receptor homologue, is induced by proinflammatory stimuli." Biochem Biophys Res Commun **235**(3): 474-8.
- Kurihara, H., J. M. Anderson, et al. (1992). "The altered glomerular filtration slits seen in puromycin aminonucleoside nephrosis and protamine sulfate-treated rats contain the tight junction protein ZO-1." Am J Pathol **141**(4): 805-16.
- Kuzemko, J. A. (1972). "Measles vaccination and the nephrotic syndrome." Br Med J **4**(841): 665-6.
- Lagrué, G., A. Branellec, et al. (1975). "A vascular permeability factor in lymphocyte culture supernants from patients with nephrotic syndrome. II. Pharmacological and physicochemical properties." Biomedicine **23**(2): 73-5.
- Lagrué, G., A. Branellec, et al. (1991). "[Transmission of nephrotic syndrome to two neonates. Spontaneous regression]." Presse Med **20**(6): 255-7.
- Lagrué, G., J. Laurent, et al. (1984). "Serum IgE in primary glomerular diseases." Nephron **36**(1): 5-9.
- Lagrué, G., J. Laurent, et al. (1989). "Food allergy and idiopathic nephrotic syndrome." Kidney Int Suppl **27**: S147-51.
- Lagrué, G., S. Xheneumont, et al. (1975). "A vascular permeability factor elaborated from lymphocytes. I. Demonstration in patients with nephrotic syndrome." Biomedicine **23**(1): 37-40.
- Lambrecht, B. N., M. De Veerman, et al. (2000). "Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation." J Clin Invest **106**(4): 551-9.
- 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., C. von Schnakenburg, et al. (2001). "A meta-analysis of cytotoxic treatment for frequently relapsing nephrotic syndrome in children." Pediatr Nephrol **16**(3): 271-82.
- Laufer, J., R. B. Ettenger, et al. (1988). "Plasma exchange for recurrent nephrotic syndrome following renal transplantation." Transplantation **46**(4): 540-2.
- Laurent, J., G. Rostoker, et al. (1989). "Idiopathic nephrotic syndrome: the prognosis is not linked to the total serum IgE level." Nephron **52**(3): 283-4.
- Laurinavicius, A., S. Hurwitz, et al. (1999). "Collapsing glomerulopathy in HIV and non-HIV patients: a clinicopathological and follow-up study." Kidney Int **56**(6): 2203-13.

- Law-Chin-Yung, L. and D. L. Freed (1977). "Nephrotic syndrome due to milk allergy." Lancet **1**(8020): 1056.
- Lax, D. S., J. A. Benstein, et al. (1992). "Effects of salt restriction on renal growth and glomerular injury in rats with remnant kidneys." Kidney Int **41**(6): 1527-34.
- Le Berre, L., Y. Godfrin, et al. (2000). "Effect of plasma fractions from patients with focal and segmental glomerulosclerosis on rat proteinuria." Kidney Int **58**(6): 2502-11.
- Le Berre, L., Y. Godfrin, et al. (2001). "The Buffalo/Mna rat, an animal model of FSGS recurrence after renal transplantation." Transplant Proc **33**(7-8): 3338-40.
- Lecart, S., N. Lecoite, et al. (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, G. S., C. C. Nast, et al. (1998). "Differential response of glomerular epithelial and mesangial cells after subtotal nephrectomy." Kidney Int **53**(5): 1389-98.
- Lemley, K. V., M. Elger, et al. (1992). "The glomerular mesangium: capillary support function and its failure under experimental conditions." Clin Investig **70**(9): 843-56.
- Leumann, E. P., J. Briner, et al. (1980). "Recurrence of focal segmental glomerulosclerosis in the transplanted kidney." Nephron **25**(2): 65-71.
- Leung, B. P., D. Xu, et al. (2004). "A novel therapy of murine collagen-induced arthritis with soluble T1/ST2." J Immunol **173**(1): 145-50.
- Levidiotis, V., J. Kanellis, et al. (2001). "Increased expression of heparanase in puromycin aminonucleoside nephrosis." Kidney Int **60**(4): 1287-96.
- Levin, M., P. Gascoine, et al. (1989). "A highly cationic protein in plasma and urine of children with steroid-responsive nephrotic syndrome." Kidney Int **36**(5): 867-77.
- Levin, M., C. Smith, et al. (1985). "Steroid-responsive nephrotic syndrome: a generalised disorder of membrane negative charge." Lancet **2**(8449): 239-42.
- Lewis, E. J. (1982). "Recurrent focal sclerosis after renal transplantation." Kidney Int **22**(3): 315-23.
- Lewis, E. J. and R. J. Kallen (1973). "Glomerular localisation of IgE in lipoid nephrosis." Lancet **1**(7816): 1395.
- Li, B., J. Yao, et al. (2001). "Nitric oxide increases albumin permeability of isolated rat glomeruli via a phosphorylation-dependent mechanism." J Am Soc Nephrol **12**(12): 2616-24.
- Li, C., V. Ruotsalainen, et al. (2000). "CD2AP is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere." Am J Physiol Renal Physiol **279**(4): F785-92.
- Li, J. Z., R. Sharma, et al. (1994). "Polymorphonuclear leukocytes increase glomerular albumin permeability via hypohalous acid." Kidney Int **46**(4): 1025-30.
- Lin, A. (2003). "Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis." Bioessays **25**(1): 17-24.
- Lin, C. Y. and H. C. Hsu (1986). "Histopathological and immunological studies in spontaneous remission of nephrotic syndrome after intercurrent measles infection." Nephron **42**(2): 110-5.
- Liu, H., M. Baliga, et al. (2003). "Role of cytochrome P450 2B1 in puromycin aminonucleoside-induced cytotoxicity to glomerular epithelial cells." Nephron Exp Nephrol **94**(1): e17-24.
- Liu, L., S. C. Done, et al. (2001). "Defective nephrin trafficking caused by missense mutations in the NPHS1 gene: insight into the mechanisms of congenital nephrotic syndrome." Hum Mol Genet **10**(23): 2637-44.
- Liu, X. L., S. C. Done, et al. (2004). "Defective trafficking of nephrin missense mutants rescued by a chemical chaperone." J Am Soc Nephrol **15**(7): 1731-8.

- Loeffler, K., M. Gowrishankar, et al. (2004). "Tacrolimus therapy in pediatric patients with treatment-resistant nephrotic syndrome." Pediatr Nephrol **19**(3): 281-7.
- Lohning, M., A. Stroehmann, et al. (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.
- Macario, F., L. Freitas, et al. (1995). "Nephrotic syndrome after recombinant hepatitis B vaccine." Clin Nephrol **43**(5): 349.
- Magil, A. B. and A. H. Cohen (1989). "Monocytes and focal glomerulosclerosis." Lab Invest **61**(4): 404-9.
- Magil, A. B., R. H. Pichler, et al. (1997). "Osteopontin in chronic puromycin aminonucleoside nephrosis." J Am Soc Nephrol **8**(9): 1383-90.
- Maizel, S. E., R. K. Sibley, et al. (1981). "Incidence and significance of recurrent focal segmental glomerulosclerosis in renal allograft recipients." Transplantation **32**(6): 512-6.
- Mallick, N. P. (1991). "Epidemiology and natural course of idiopathic nephrotic syndrome." Clin Nephrol **35 Suppl 1**: S3-7.
- Mansour, H., L. Cheval, et al. (2005). "T-cell transcriptome analysis points up a thymic disorder in idiopathic nephrotic syndrome." Kidney Int **67**(6): 2168-77.
- Markowitz, G. S., J. A. Schwimmer, et al. (2003). "C1q nephropathy: a variant of focal segmental glomerulosclerosis." Kidney Int **64**(4): 1232-40.
- Maruyama, K., K. Iijima, et al. (2003). "NPHS2 mutations in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome in Japanese children." Pediatr Nephrol **18**(5): 412-6.
- Maruyama, K., S. Tomizawa, et al. (1992). "Inhibition of vascular permeability factor production by cyclosporin in minimal change nephrotic syndrome." Nephron **62**(1): 27-30.
- Maruyama, K., S. Tomizawa, et al. (1989). "Effect of supernatants derived from T lymphocyte culture in minimal change nephrotic syndrome on rat kidney capillaries." Nephron **51**(1): 73-6.
- Masuda, A., H. Amo, et al. (1984). "Cytological characteristics of cultured epithelial cells from thymomas in BUF/Mna rats." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol **46**(4): 283-96.
- Matsui, K., S. Breiteneder-Geleff, et al. (1998). "Epitope-specific antibodies to the 43-kD glomerular membrane protein podoplanin cause proteinuria and rapid flattening of podocytes." J Am Soc Nephrol **9**(11): 2013-26.
- Matsumoto, K. (1997). "Interleukin 10 inhibits vascular permeability factor release by peripheral blood mononuclear cells in patients with lipoid nephrosis." Nephron **75**(2): 154-9.
- Matsumoto, K., H. Ohi, et al. (1997). "Interleukin 10 and interleukin 13 synergize to inhibit vascular permeability factor release by peripheral blood mononuclear cells from patients with lipoid nephrosis." Nephron **77**(2): 212-8.
- Matsumoto, K., H. Ohi, et al. (1998). "Interleukin 12 upregulates the release of vascular permeability factor by peripheral blood mononuclear cells from patients with lipoid nephrosis." Nephron **78**(4): 403-9.
- Matsumoto, K., H. Ohi, et al. (1999). "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.
- Matsumoto, K., H. Ohi, et al. (1999). "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., K. Osakabe, et al. (1984). "Defective cell-mediated immunity in lipoid nephrosis." Int Arch Allergy Appl Immunol **73**(4): 370-2.
- Matsuyama, M., Amo, H, Takayanagi, T, Lida, M (1981). Motor dysfunction and muscular abnormalities in rats of the high thymoma Buffalo/Mna strain, Satoyoshi, E.
- Matsuyama, M., T. Ogiu, et al. (1990). "Genetic regulation of the development of glomerular sclerotic lesions in the BUF/Mna rat." Nephron **54**(4): 334-7.
- Matsuyama, M., H. Suzuki, et al. (1972). "Strain difference in carcinogenesis by urethan administration to suckling rats." Gann **63**(2): 209-15.
- Matsuyama, M., H. Suzuki, et al. (1975). "Ultrastructure of spontaneous and urethan-induced thymomas in buffalo rats." Cancer Res **35**(10): 2771-9.
- Matsuyama, M., C. Yamada, et al. (1987). "Possible single dosage effects of the nude gene: suppression of spontaneous development of thymoma and nephropathy in BUF/Mna-rnu/+ rats." Jpn J Cancer Res **78**(1): 40-4.
- Mauer, S. M., S. Hellerstein, et al. (1979). "Recurrence of steroid-responsive nephrotic syndrome after renal transplantation." J Pediatr **95**(2): 261-4.
- McCarthy, E. T. and M. Sharma (2002). "Indomethacin protects permeability barrier from focal segmental glomerulosclerosis serum." Kidney Int **61**(2): 534-41.
- McCarthy, E. T., R. Sharma, et al. (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., R. Shapiro, et al. (1993). "FK 506 in the management of nephrotic syndrome after renal transplantation." Transplant Proc **25**(1 Pt 2): 1351-4.
- McDonald, P., P. A. Kalra, et al. (1992). "Thymoma and minimal-change glomerulonephritis." Nephrol Dial Transplant **7**(4): 357-9.
- Megyesi, J., P. M. Price, et al. (1999). "The lack of a functional p21(WAF1/CIP1) gene ameliorates progression to chronic renal failure." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(19): 10830-5.
- Meisel, C., K. Bonhagen, et al. (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.
- Mendrick, D. L. and H. G. Rennke (1988). "Induction of proteinuria in the rat by a monoclonal antibody against SGP-115/107." Kidney Int **33**(4): 818-30.
- Michaud, J. L., L. I. Lemieux, et al. (2003). "Focal and segmental glomerulosclerosis in mice with podocyte-specific expression of mutant alpha-actinin-4." J Am Soc Nephrol **14**(5): 1200-11.
- Milner, L. S., S. H. Wei, et al. (1991). "Amelioration of glomerular injury in doxorubicin hydrochloride nephrosis by dimethylthiourea." J Lab Clin Med **118**(5): 427-34.
- Miner, J. H., R. Morello, et al. (2002). "Transcriptional induction of slit diaphragm genes by Lmx1b is required in podocyte differentiation." J Clin Invest **109**(8): 1065-72.
- Mishra, O. P., R. Garg, et al. (1997). "Immunoglobulins and circulating immune complexes in nephrotic syndrome." J Trop Pediatr **43**(2): 93-7.
- Mishra, O. P., N. Ibrahim, et al. (2004). "Serum immunoglobulin E in idiopathic nephrotic syndrome." J Trop Pediatr **50**(3): 149-52.
- Morales, J. M., A. Andres, et al. (1988). "Clinical and histological sequence of recurrent focal segmental glomerulosclerosis." Nephron **48**(3): 241-2.
- Morales, J. M., A. Andres, et al. (1989). "Ciclosporin-induced partial and transient improvement of nephrotic syndrome in recurrent focal segmental glomerulosclerosis." Nephron **53**(3): 283-4.

- Morello, R. and B. Lee (2002). "Insight into podocyte differentiation from the study of human genetic disease: nail-patella syndrome and transcriptional regulation in podocytes." *Pediatr Res* **51**(5): 551-8.
- Morrison, A. B. and R. M. Howard (1966). "The functional capacity of hypertrophied nephrons. Effect of partial nephrectomy on the clearance of inulin and PAH in the rat." *J Exp Med* **123**(5): 829-44.
- Moulin, B., P. M. Ronco, et al. (1992). "Glomerulonephritis in chronic lymphocytic leukemia and related B-cell lymphomas." *Kidney Int* **42**(1): 127-35.
- Mowry, J., J. Marik, et al. (1993). "Treatment of recurrent focal segmental glomerulosclerosis with high-dose cyclosporine A and plasmapheresis." *Transplant Proc* **25**(1 Pt 2): 1345-6.
- Mundel, P. and W. Kriz (1995). "Structure and function of podocytes: an update." *Anat Embryol (Berl)* **192**(5): 385-97.
- Mundel, P., J. Reiser, et al. (1997). "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.
- Murayama, S., S. Yagyu, et al. (1998). "A genetic locus susceptible to the overt proteinuria in BUF/Mna rat." *Mamm Genome* **9**(11): 886-8.
- Murugasu, B., H. K. Yap, et al. (1990). "The red cell charge in steroid--responsive nephrotic syndrome." *J Singapore Paediatr Soc* **32**(3-4): 129-31.
- Musante, L., G. Candiano, et al. (2002). "Characterization of plasma factors that alter the permeability to albumin within isolated glomeruli." *Proteomics* **2**(2): 197-205.
- Nagi, A. H., F. Alexander, et al. (1971). "Light and electron microscopical studies of focal glomerular sclerosis." *J Clin Pathol* **24**(9): 846-50.
- Nakamura, T., M. Matsuyama, et al. (1988). "The effect of thymectomy on the development of nephropathy in spontaneous thymoma rats of the BUF/Mna strain." *Clin Exp Immunol* **71**(2): 350-2.
- Nakamura, T., T. Oite, et al. (1986). "Sclerotic lesions in the glomeruli of Buffalo/Mna rats." *Nephron* **43**(1): 50-5.
- Neuhaus, T. J., V. Shah, et al. (1995). "T-lymphocyte activation in steroid-sensitive nephrotic syndrome in childhood." *Nephrol Dial Transplant* **10**(8): 1348-52.
- Neuhaus, T. J., M. Wadhwa, et al. (1995). "Increased IL-2, IL-4 and interferon-gamma (IFN-gamma) in steroid-sensitive nephrotic syndrome." *Clin Exp Immunol* **100**(3): 475-9.
- Niaudet, P., R. Drachman, et al. (1984). "Treatment of idiopathic nephrotic syndrome with levamisole." *Acta Paediatr Scand* **73**(5): 637-41.
- Niaudet, P. and R. Habib (1994). "Cyclosporine in the treatment of idiopathic nephrosis." *J Am Soc Nephrol* **5**(4): 1049-56.
- Nishibori, Y., L. Liu, et al. (2004). "Disease-causing missense mutations in NPHS2 gene alter normal nephrin trafficking to the plasma membrane." *Kidney Int* **66**(5): 1755-65.
- No-authors (1991). "Levamisole for corticosteroid-dependent nephrotic syndrome in childhood. British Association for Paediatric Nephrology." *Lancet* **337**(8757): 1555-7.
- Okuda, S., Y. Oh, et al. (1986). "Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease." *Kidney Int* **29**(2): 502-10.
- Oosterwegel, M. A., R. J. Greenwald, et al. (1999). "CTLA-4 and T cell activation." *Curr Opin Immunol* **11**(3): 294-300.
- Orikasa, M., K. Matsui, et al. (1988). "Massive proteinuria induced in rats by a single intravenous injection of a monoclonal antibody." *J Immunol* **141**(3): 807-14.

- Orloff, M. S., S. K. Iyengar, et al. (2005). "Variants in the Wilms' tumor gene are associated with focal segmental glomerulosclerosis in the African American population." Physiol Genomics **21**(2): 212-21.
- Ortiz, A. and J. Egido (1995). "Is there a role for specific anti-TNF strategies in glomerular diseases?" Nephrol Dial Transplant **10**(3): 309-11.
- Ou, Z. L. and Y. Natori (2000). "Transient and sequential expression of chemokine mRNA in glomeruli in puromycin aminonucleoside nephrosis." Nephron **85**(3): 254-7.
- Pannetier, C., J. Even, et al. (1995). "T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples." Immunol Today **16**(4): 176-81.
- Parry, R. G., K. M. Gillespie, et al. (2001). "Effects of type 2 cytokines on glomerular epithelial cells." Exp Nephrol **9**(4): 275-83.
- Patek, C. E., S. Fleming, et al. (2003). "Murine Denys-Drash syndrome: evidence of podocyte de-differentiation and systemic mediation of glomerulosclerosis." Hum Mol Genet **12**(18): 2379-94.
- Patrakka, J., V. Ruotsalainen, et al. (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., L. Sanchez, et al. (1991). "Minimal change nephrotic syndrome associated with Hodgkin's lymphoma." Nephrol Dial Transplant **6**(3): 155-8.
- Pei, Y., D. Cattran, et al. (1987). "Evidence suggesting under-treatment in adults with idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. Regional Glomerulonephritis Registry Study." Am J Med **82**(5): 938-44.
- Pelletier, J., W. Bruening, et al. (1991). "Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome." Cell **67**(2): 437-47.
- Pick, E., J. Krejci, et al. (1969). "Interaction between 'sensitized lymphocytes' and antigen in vitro. I. The release of a skin reactive factor." Immunology **17**(5): 741-67.
- Pinto, J., G. Lacerda, et al. (1981). "Recurrence of focal segmental glomerulosclerosis in renal allografts." Transplantation **32**(2): 83-9.
- Pirson, Y., J. P. Squifflet, et al. (1986). "Recurrence of focal glomerulosclerosis despite cyclosporin treatment after renal transplantation." Br Med J (Clin Res Ed) **292**(6531): 1336.
- Pontier, P. J. and T. G. Patel (1994). "Racial differences in the prevalence and presentation of glomerular disease in adults." Clin Nephrol **42**(2): 79-84.
- Powell, H. R. (1976). "Relationship between proteinuria and epithelial cell changes in minimal lesion glomerulopathy." Nephron **16**(4): 310-7.
- Quaggin, S. E. (2002). "Transcriptional regulation of podocyte specification and differentiation." Microsc Res Tech **57**(4): 208-11.
- Quaggin, S. E., L. Schwartz, et al. (1999). "The basic-helix-loop-helix protein pod1 is critically important for kidney and lung organogenesis." Development **126**(24): 5771-83.
- Raafat, R. H., A. Kalia, et al. (2004). "High-dose oral cyclosporin therapy for recurrent focal segmental glomerulosclerosis in children." Am J Kidney Dis **44**(1): 50-6.
- Raats, C. J., J. van den Born, et al. (2000). "Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies." Am J Pathol **156**(5): 1749-65.
- Ramjee, G., H. M. Coovadia, et al. (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. and C. C. Tisher (1994). "Recurrent diseases in the kidney transplant." Am J Kidney Dis **24**(1): 142-54.
- Ranchin, B., M. F. Gagnadoux, et al. (1996). "[Value of cyclosporine in the treatment of the recurrence of nephrosis after renal transplantation]." Nephrologie **17**(8): 441-5.
- Rea, R., C. Smith, et al. (2001). "Successful transplant of a kidney with focal segmental glomerulosclerosis." Nephrol Dial Transplant **16**(2): 416-7.
- Reeves, W. G., J. S. Cameron, et al. (1975). "Seasonal nephrotic syndrome. Description and immunological findings." Clin Allergy **5**(2): 121-37.
- Regele, H. M., E. Fillipovic, et al. (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., F. J. Pixley, et al. (2000). "Regulation of mouse podocyte process dynamics by protein tyrosine phosphatases rapid communication." Kidney Int **57**(5): 2035-42.
- Reiser, J., K. R. Polu, et al. (2005). "TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function." Nat Genet **37**(7): 739-44.
- Reiser, J., G. von Gersdorff, et al. (2004). "Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome." J Clin Invest **113**(10): 1390-7.
- Rich, A. R. (1957). "A hitherto undescribed vulnerability of the juxtamedullary glomeruli in lipid nephrosis." Bull Johns Hopkins Hosp **100**(4): 173-86.
- Ritz, S. A., M. J. Cundall, et al. (2002). "Granulocyte macrophage colony-stimulating factor-driven respiratory mucosal sensitization induces Th2 differentiation and function independently of interleukin-4." Am J Respir Cell Mol Biol **27**(4): 428-35.
- Roberts, W. G. and G. E. Palade (1995). "Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor." J Cell Sci **108** (Pt 6): 2369-79.
- Roberts, W. G. and G. E. Palade (1997). "Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated." Cancer Res **57**(4): 765-72.
- Rodewald, R. and M. J. Karnovsky (1974). "Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse." J Cell Biol **60**(2): 423-33.
- Rodicio, J. L., J. M. Alcazar, et al. (1990). "Influence of converting enzyme inhibition on glomerular filtration rate and proteinuria." Kidney Int **38**(4): 590-4.
- Rodriguez-Iturbe, B., Y. Quiroz, et al. (2005). "Mycophenolate mofetil ameliorates nephropathy in the obese Zucker rat." Kidney Int **68**(3): 1041-7.
- Rohr, C., J. Prestel, et al. (2002). "The LIM-homeodomain transcription factor Lmx1b plays a crucial role in podocytes." J Clin Invest **109**(8): 1073-82.
- Romagnani, S., P. Parronchi, et al. (1997). "An update on human Th1 and Th2 cells." Int Arch Allergy Immunol **113**(1-3): 153-6.
- Rops, A. L., J. van der Vlag, et al. (2004). "Isolation and characterization of conditionally immortalized mouse glomerular endothelial cell lines." Kidney Int **66**(6): 2193-201.
- Roselli, S., O. Gribouval, et al. (2002). "Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area." Am J Pathol **160**(1): 131-9.
- Roselli, S., L. Heidet, et al. (2004). "Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice." Mol Cell Biol **24**(2): 550-60.
- Rostgaard, J. and K. Qvortrup (1997). "Electron microscopic demonstrations of filamentous molecular sieve plugs in capillary fenestrae." Microvasc Res **53**(1): 1-13.

- Rovin, B. H., L. Lu, et al. (2001). "Lymphocytes induce monocyte chemoattractant protein-1 production by renal cells after Fc gamma receptor cross-linking: role of IL-1beta." J Leukoc Biol **69**(3): 435-9.
- Row, P. G., J. S. Cameron, et al. (1975). "Membranous nephropathy. Long-term follow-up and association with neoplasia." Q J Med **44**(174): 207-39.
- Ruckebusch, M. and T. E. Weekes (1976). "Insulin resistance and related electrical activity of the small intestine." Experientia **32**(9): 1163-5.
- Ruf, R. G., A. Lichtenberger, et al. (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., K. J. Erb, et al. (2000). "Interleukin-4 transgenic mice develop glomerulosclerosis independent of immunoglobulin deposition." Eur J Immunol **30**(9): 2698-703.
- Ruotsalainen, V., P. Ljungberg, et al. (1999). "Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 7962-7.
- Rupprecht, H. D., H. O. Schocklmann, et al. (1996). "Cell-matrix interactions in the glomerular mesangium." Kidney Int **49**(6): 1575-82.
- Rydel, J. J., S. M. Korbet, et al. (1995). "Focal segmental glomerular sclerosis in adults: presentation, course, and response to treatment." Am J Kidney Dis **25**(4): 534-42.
- Sabapathy, K., Y. Hu, et al. (1999). "JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development." Curr Biol **9**(3): 116-25.
- Sadl, V., F. Jin, et al. (2002). "The mouse Kreisler (Krm11/MafB) segmentation gene is required for differentiation of glomerular visceral epithelial cells." Dev Biol **249**(1): 16-29.
- Saeki, T., T. Morioka, et al. (1991). "Modulation of mesangial cell proliferation by endothelial cells in coculture." Am J Pathol **139**(4): 949-57.
- Sahali, D., A. Pawlak, et al. (2001). "Transcriptional and post-transcriptional alterations of IkappaBalpha in active minimal-change nephrotic syndrome." J Am Soc Nephrol **12**(8): 1648-58.
- Sahali, D., A. Pawlak, et al. (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., M. D. Ayli, et al. (2004). "Membranous nephropathy associated with acute myeloid leukemia." Transplant Proc **36**(9): 2618-9.
- Sakai, T. and W. Kriz (1987). "The structural relationship between mesangial cells and basement membrane of the renal glomerulus." Anat Embryol (Berl) **176**(3): 373-86.
- Sako, M., K. Nakanishi, et al. (2005). "Analysis of NPHS1, NPHS2, ACTN4, and WT1 in Japanese patients with congenital nephrotic syndrome." Kidney Int **67**(4): 1248-55.
- Saleem, M. A., M. J. O'Hare, et al. (2002). "A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression." J Am Soc Nephrol **13**(3): 630-8.
- Salomon, R., M. F. Gagnadoux, et al. (2003). "Intravenous cyclosporine therapy in recurrent nephrotic syndrome after renal transplantation in children." Transplantation **75**(6): 810-4.
- Sandberg, D. H., C. W. Bernstein, et al. (1977). "Severe steroid-responsive nephrosis associated with hypersensitivity." Lancet **1**(8008): 388-91.
- Savage, C. O. (1994). "The biology of the glomerulus: endothelial cells." Kidney Int **45**(2): 314-9.
- Savin, V. J., R. J. Johnson, et al. (1994). "C5b-9 increases albumin permeability of isolated glomeruli in vitro." Kidney Int **46**(2): 382-7.

- Savin, V. J., R. Sharma, et al. (1992). "Measurement of albumin reflection coefficient with isolated rat glomeruli." J Am Soc Nephrol **3**(6): 1260-9.
- Savin, V. J., R. Sharma, et al. (1996). "Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis." N Engl J Med **334**(14): 878-83.
- Schachter, A. D., J. Strehlau, et al. (2000). "Increased nuclear factor-kappaB and angiotensinogen gene expression in posttransplant recurrent focal segmental glomerulosclerosis." Transplantation **70**(7): 1107-10.
- Schena, F. P. (1999). "Cytokine network and resident renal cells in glomerular diseases." Nephrol Dial Transplant **14 Suppl 1**: 22-6.
- Schiwek, D., N. Endlich, et al. (2004). "Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines." Kidney Int **66**(1): 91-101.
- Schlesinger, E. R., H. A. Sultz, et al. (1968). "The nephrotic syndrome. Its incidence and implications for the community." Am J Dis Child **116**(6): 623-32.
- Schlondorff, D. and T. Mori (1990). "Contributions of mesangial cells to glomerular immune functions." Klin Wochenschr **68**(22): 1138-44.
- Schnaper, H. W. (1990). "A regulatory system for soluble immune response suppressor production in steroid-responsive nephrotic syndrome." Kidney Int **38**(1): 151-9.
- Schnaper, H. W. and T. M. Aune (1985). "Identification of the lymphokine soluble immune response suppressor in urine of nephrotic children." J Clin Invest **76**(1): 341-9.
- Schulte-Wissermann, H., W. Gortz, et al. (1979). "IgE in patients with glomerulonephritis and minimal-change nephrotic syndrome." Eur J Pediatr **131**(2): 105-11.
- Schwartz, M. M. and S. M. Korbet (1993). "Primary focal segmental glomerulosclerosis: pathology, histological variants, and pathogenesis." Am J Kidney Dis **22**(6): 874-83.
- Schwartz, M. M., S. M. Korbet, et al. (1995). "Primary focal segmental glomerular sclerosis in adults: prognostic value of histologic variants." Am J Kidney Dis **25**(6): 845-52.
- Schwarz, A., P. H. Krause, et al. (1991). "Recurrent and de novo renal disease after kidney transplantation with or without cyclosporine A." Am J Kidney Dis **17**(5): 524-31.
- Seddon, B. and R. Zamoyska (2002). "TCR signals mediated by Src family kinases are essential for the survival of naive T cells." J Immunol **169**(6): 2997-3005.
- Sellin, L., T. B. Huber, et al. (2003). "NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins." Faseb J **17**(1): 115-7.
- Senggutuvan, P., J. S. Cameron, et al. (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., P. E. Brenchley, et al. (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.
- Shalhoub, R. J. (1974). "Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function." Lancet **2**(7880): 556-60.
- Shankland, S. J. (1999). "Cell cycle regulatory proteins in glomerular disease." Kidney Int **56**(4): 1208-15.
- Sharma, M., R. Sharma, et al. (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., R. Sharma, et al. (2002). "Proteinuria after injection of human focal segmental glomerulosclerosis factor." Transplantation **73**(3): 366-72.

- Sharma, R., A. Khanna, et al. (2000). "Transforming growth factor-beta1 increases albumin permeability of isolated rat glomeruli via hydroxyl radicals." *Kidney Int* **58**(1): 131-6.
- Sharma, R. and V. J. Savin (1996). "Cyclosporine prevents the increase in glomerular albumin permeability caused by serum from patients with focal segmental glomerular sclerosis." *Transplantation* **61**(3): 381-3.
- Sharma, R., M. Sharma, et al. (1996). "Cyclosporine protects glomeruli from FSGS factor via an increase in glomerular cAMP." *Transplantation* **62**(12): 1916-20.
- Sharma, R., M. Sharma, et al. (2000). "Components of normal serum block the focal segmental glomerulosclerosis factor activity in vitro." *Kidney Int* **58**(5): 1973-9.
- Sharples, P. M., J. Poulton, et al. (1985). "Steroid responsive nephrotic syndrome is more common in Asians." *Arch Dis Child* **60**(11): 1014-7.
- Shih, N. Y., J. Li, et al. (1999). "Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein." *Science* **286**(5438): 312-5.
- Shimamura, T. (1983). "Focal glomerulosclerosis in obese Zucker rats and prevention of its development." *Kidney Int Suppl* **16**: S259-62.
- Shimamura, T. and A. B. Morrison (1975). "A progressive glomerulosclerosis occurring in partial five-sixths nephrectomized rats." *Am J Pathol* **79**(1): 95-106.
- Shu, K. H., J. D. Lian, et al. (1988). "Serum IgE in primary glomerular diseases and its clinical significance." *Nephron* **49**(1): 24-8.
- Smoyer, W. E., P. Mundel, et al. (1997). "Podocyte alpha-actinin induction precedes foot process effacement in experimental nephrotic syndrome." *Am J Physiol* **273**(1 Pt 2): F150-7.
- Sobel, A. T., A. I. Branellec, et al. (1977). "Physicochemical characterization of a vascular permeability factor produced by con A-stimulated human lymphocytes." *J Immunol* **119**(4): 1230-4.
- Somlo, S. and P. Mundel (2000). "Getting a foothold in nephrotic syndrome." *Nat Genet* **24**(4): 333-5.
- Srivastava, R. N., A. Kalia, et al. (1994). "Prompt remission of post-renal transplant nephrotic syndrome with high-dose cyclosporine." *Pediatr Nephrol* **8**(1): 94-5.
- Stefanova, I., M. L. Corcoran, et al. (1993). "Lipopolysaccharide induces activation of CD14-associated protein tyrosine kinase p53/56lyn." *J Biol Chem* **268**(28): 20725-8.
- Steinmann, G. G., B. Klaus, et al. (1985). "The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study." *Scand J Immunol* **22**(5): 563-75.
- Stephan, J. L., G. Deschenes, et al. (1997). "Nephrotic syndrome and Hodgkin disease in children: a report of five cases." *Eur J Pediatr* **156**(3): 239-42.
- Stephanian, E., A. J. Matas, et al. (1992). "Recurrence of disease in patients retransplanted for focal segmental glomerulosclerosis." *Transplantation* **53**(4): 755-7.
- Stevenson, F. T. and G. A. Kaysen (1999). "Hyperlipidemia and renal disease: the use of animal models in understanding pathophysiology and approaches to treatment." *Wien Klin Wochenschr* **111**(8): 307-14.
- Stokes, M. B., G. S. Markowitz, et al. (2004). "Glomerular tip lesion: a distinct entity within the minimal change disease/focal segmental glomerulosclerosis spectrum." *Kidney Int* **65**(5): 1690-702.
- Striegel, J. E., R. K. Sibley, et al. (1986). "Recurrence of focal segmental sclerosis in children following renal transplantation." *Kidney Int Suppl* **19**: S44-50.
- Suranyi, M. G., A. Guasch, et al. (1993). "Elevated levels of tumor necrosis factor-alpha in the nephrotic syndrome in humans." *Am J Kidney Dis* **21**(3): 251-9.

- Sweet, M. J., B. P. Leung, et al. (2001). "A novel pathway regulating lipopolysaccharide-induced shock by ST2/T1 via inhibition of Toll-like receptor 4 expression." J Immunol **166**(11): 6633-9.
- Takano, T. and K. A. Williams (1995). "Mechanism of corneal endothelial destruction in rejecting rat corneal allografts and xenografts: a role for CD4+ cells." Transplant Proc **27**(1): 260-1.
- Takezako, N., M. Hayakawa, et al. (2006). "ST2 suppresses IL-6 production via the inhibition of IkappaB degradation induced by the LPS signal in THP-1 cells." Biochem Biophys Res Commun **341**(2): 425-32.
- Tanaka, H., S. Waga, et al. (2000). "Focal segmental glomerulosclerosis: unremitting proteinuria of long duration as a possible etiology?" Tohoku J Exp Med **192**(2): 157-63.
- Tanaka, R., N. Yoshikawa, et al. (1992). "Infusion of peripheral blood mononuclear cell products from nephrotic children increases albuminuria in rats." Nephron **60**(1): 35-41.
- Tanawattanacharoen, S., R. J. Falk, et al. (2000). "Parvovirus B19 DNA in kidney tissue of patients with focal segmental glomerulosclerosis." Am J Kidney Dis **35**(6): 1166-74.
- Tareyeva, I. E., A. J. Nikolaev, et al. (1982). "Nephrotic syndrome induced by insect sting." Lancet **2**(8302): 825.
- Teixeira Vde, P., S. M. Blattner, et al. (2005). "Functional consequences of integrin-linked kinase activation in podocyte damage." Kidney Int **67**(2): 514-23.
- Tejani, A. T., K. Butt, et al. (1988). "Cyclosporine A induced remission of relapsing nephrotic syndrome in children." Kidney Int **33**(3): 729-34.
- Thomas, P. E., B. L. Wharram, et al. (1994). "GLEPP1, a renal glomerular epithelial cell (podocyte) membrane protein-tyrosine phosphatase. Identification, molecular cloning, and characterization in rabbit." J Biol Chem **269**(31): 19953-62.
- Thomas, S., J. Vanuystel, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factor receptors in human mesangium in vitro and in glomerular disease." J Am Soc Nephrol **11**(7): 1236-43.
- Thomson, P. D., C. R. Stokes, et al. (1976). "HLA antigens and atopic features in steroid-responsive nephrotic syndrome of childhood." Lancet **2**(7989): 765-8.
- Tomizawa, S., K. Maruyama, et al. (1985). "Studies of vascular permeability factor derived from T lymphocytes and inhibitory effect of plasma on its production in minimal change nephrotic syndrome." Nephron **41**(2): 157-60.
- Tomizawa, S., N. Nagasawa, et al. (1990). "Release of the vascular permeability factor in minimal change nephrotic syndrome is related to CD4+ lymphocytes." Nephron **56**(3): 341-2.
- Tomlanovich, S., F. Vincenti, et al. (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., U. Saatci, et al. (1994). "T-cell subsets, interleukin-2 receptor expression and production of interleukin-2 in minimal change nephrotic syndrome." Pediatr Nephrol **8**(6): 649-52.
- Topham, P. S., H. Kawachi, et al. (1999). "Nephritogenic mAb 5-1-6 is directed at the extracellular domain of rat nephrin." J Clin Invest **104**(11): 1559-66.
- Torres, V. E., J. A. Velosa, et al. (1984). "Meclofenamate treatment of recurrent idiopathic nephrotic syndrome with focal segmental glomerulosclerosis after renal transplantation." Mayo Clin Proc **59**(3): 146-52.
- Torretta, L., C. Perotti, et al. (1995). "Usefulness of plasma exchange in recurrent nephrotic syndrome following renal transplant." Artif Organs **19**(1): 96-8.

- Toyokawa, T., F. Hato, et al. (1987). "Remarkable changes in mitogen responsiveness and rosette-forming capacity of thymocytes with aging due to possible disorders of thymic hormone secretion from thymus epithelial cells of spontaneous thymoma Buffalo/Mna rats." Cell Mol Biol **33**(3): 363-74.
- Trachtman, H., R. Del Pizzo, et al. (1992). "Taurine attenuates renal disease in chronic puromycin aminonucleoside nephropathy." Am J Physiol **262**(1 Pt 2): F117-23.
- Trachtman, H., L. A. Greenbaum, et al. (2004). "Glomerular permeability activity: prevalence and prognostic value in pediatric patients with idiopathic nephrotic syndrome." Am J Kidney Dis **44**(4): 604-10.
- Tschopp, B. and H. J. Weiss (1974). "Decreased ATP, ADP and serotonin in young platelets of fawn-hooded rats with storage pool disease." Thromb Diath Haemorrh **32**(2-3): 670-7.
- Tsugawa, K., H. Tanaka, et al. (2004). "Effective therapy of a child case of refractory nephrotic syndrome with tacrolimus." Tohoku J Exp Med **204**(3): 237-41.
- Tsukaguchi, H., A. Sudhakar, et al. (2002). "NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele." J Clin Invest **110**(11): 1659-66.
- Valanciute, A., S. le Gouvello, et al. (2004). "NF-kappa B p65 antagonizes IL-4 induction by c-maf in minimal change nephrotic syndrome." J Immunol **172**(1): 688-98.
- Van Den Berg, J. G., J. Aten, et al. (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., J. Aten, et al. (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., M. A. van den Bergh Weerman, et al. (2004). "Podocyte foot process effacement is not correlated with the level of proteinuria in human glomerulopathies." Kidney Int **66**(5): 1901-6.
- van den Berg, J. G. and J. J. Weening (2004). "Role of the immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome." Clin Sci (Lond) **107**(2): 125-36.
- Varsano, S., I. Bruderman, et al. (1980). "Minimal-change nephropathy and malignant thymoma." Chest **77**(5): 695-7.
- Vasmant, D., M. Maurice, et al. (1984). "Cytoskeleton ultrastructure of podocytes and glomerular endothelial cells in man and in the rat." Anat Rec **210**(1): 17-24.
- Velosa, J. A., J. V. Donadio, Jr., et al. (1975). "Focal sclerosing glomerulonephropathy: a clinicopathologic study." Mayo Clin Proc **50**(3): 121-33.
- Velosa, J. A., K. E. Holley, et al. (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. and E. P. Hawkins (1986). "Recurrent focal segmental glomerulosclerosis. A pathological study of the early lesion." Am J Nephrol **6**(4): 263-70.
- Verseput, G. H., A. P. Provoost, et al. (1997). "Angiotensin-converting enzyme inhibition in the prevention and treatment of chronic renal damage in the hypertensive fawn-hooded rat." J Am Soc Nephrol **8**(2): 249-59.
- Vincenti, F., C. Biava, et al. (1989). "Inability of cyclosporine to completely prevent the recurrence of focal glomerulosclerosis after kidney transplantation." Transplantation **47**(4): 595-8.
- Vlodavsky, I., Y. Friedmann, et al. (1999). "Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis." Nat Med **5**(7): 793-802.

- Voets, A. J., A. J. Hoitsma, et al. (1986). "Recurrence of nephrotic syndrome during cyclosporin treatment after renal transplantation." *Lancet* **1**(8475): 266-7.
- Wada, T., J. W. Pippin, et al. (2005). "The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is required for TGF-beta1-induced podocyte apoptosis." *Kidney Int* **68**(4): 1618-29.
- Wagner, N., K. D. Wagner, et al. (2004). "The major podocyte protein nephrin is transcriptionally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1." *J Am Soc Nephrol* **15**(12): 3044-51.
- Walzl, G., S. Matthews, et al. (2001). "Inhibition of T1/ST2 during respiratory syncytial virus infection prevents T helper cell type 2 (Th2)- but not Th1-driven immunopathology." *J Exp Med* **193**(7): 785-92.
- Wang, S. X., H. Ahola, et al. (2001). "Recurrence of nephrotic syndrome after transplantation in CNF is due to autoantibodies to nephrin." *Exp Nephrol* **9**(5): 327-31.
- Wang, Y., Y. P. Wang, et al. (2000). "Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events." *Kidney Int* **58**(4): 1797-804.
- Wang, Y., Y. P. Wang, et al. (2001). "Role of CD8(+) cells in the progression of murine adriamycin nephropathy." *Kidney Int* **59**(3): 941-9.
- Webb, N. J., M. A. Lewis, et al. (1996). "Childhood steroid-sensitive nephrotic syndrome: does the histology matter?" *Am J Kidney Dis* **27**(4): 484-8.
- Webb, N. J., C. J. Watson, et al. (1999). "Circulating vascular endothelial growth factor is not increased during relapses of steroid-sensitive nephrotic syndrome." *Kidney Int* **55**(3): 1063-71.
- Weber, S., O. Gribouval, et al. (2004). "NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence." *Kidney Int* **66**(2): 571-9.
- Wehrmann, M., A. Bohle, et al. (1990). "Long-term prognosis of focal sclerosing glomerulonephritis. An analysis of 250 cases with particular regard to tubulointerstitial changes." *Clin Nephrol* **33**(3): 115-22.
- Weiss, M. A., E. Daquiao, et al. (1986). "Nephrotic syndrome, progressive irreversible renal failure, and glomerular "collapse": a new clinicopathologic entity?" *Am J Kidney Dis* **7**(1): 20-8.
- Wharram, B. L., M. Goyal, et al. (2000). "Altered podocyte structure in GLEPP1 (Ptpro)-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate." *J Clin Invest* **106**(10): 1281-90.
- White, R. H., E. F. Glasgow, et al. (1970). "Clinicopathological study of nephrotic syndrome in childhood." *Lancet* **1**(7661): 1353-9.
- Williamson, D. A. (1970). "Nephrotic syndrome associated with inhaled allergens." *Lancet* **1**(7650): 778.
- Wittig, H. J. and A. S. Goldman (1970). "Nephrotic syndrome associated with inhaled allergens." *Lancet* **1**(7646): 542-3.
- Wu, D. T., M. Bitzer, et al. (2005). "TGF-beta concentration specifies differential signaling profiles of growth arrest/differentiation and apoptosis in podocytes." *J Am Soc Nephrol* **16**(11): 3211-21.
- Wuhl, E., J. Fydyk, et al. (1998). "Impact of recurrent nephrotic syndrome after renal transplantation in young patients." *Pediatr Nephrol* **12**(7): 529-33.
- Yahata, N., Y. Kawanishi, et al. (2000). "Membranous glomerulonephritis with nephrotic syndrome associated with chronic lymphocytic leukemia." *Am J Nephrol* **20**(5): 402-7.
- Yakupoglu, U., E. Baranowska-Daca, et al. (2004). "Post-transplant nephrotic syndrome: A comprehensive clinicopathologic study." *Kidney Int* **65**(6): 2360-70.

- Yan, K., K. Nakahara, et al. (1998). "The increase of memory T cell subsets in children with idiopathic nephrotic syndrome." Nephron **79**(3): 274-8.
- Yanagisawa, K., Y. Naito, et al. (1997). "The expression of ST2 gene in helper T cells and the binding of ST2 protein to myeloma-derived RPMI8226 cells." J Biochem (Tokyo) **121**(1): 95-103.
- Yap, H. K., W. Cheung, et al. (1999). "Th1 and Th2 cytokine mRNA profiles in childhood nephrotic syndrome: evidence for increased IL-13 mRNA expression in relapse." J Am Soc Nephrol **10**(3): 529-37.
- Yap, H. K., W. C. Yip, et al. (1983). "The incidence of atopy in steroid-responsive nephrotic syndrome: clinical and immunological parameters." Ann Allergy **51**(6): 590-4.
- Ye, C., Y. Murakumo, et al. (2000). "Fine mapping of thymus enlargement gene 1 (Ten1) in BUF/Mna rats." Pathol Int **50**(3): 185-90.
- Yoshida, Y., A. Fogo, et al. (1988). "Serial micropuncture analysis of single nephron function in subtotal renal ablation." Kidney Int **33**(4): 855-67.
- Yoshioka, T., I. Ichikawa, et al. (1991). "Reactive oxygen metabolites cause massive, reversible proteinuria and glomerular sieving defect without apparent ultrastructural abnormality." J Am Soc Nephrol **2**(4): 902-12.
- Yoshizawa, N., Y. Kusumi, et al. (1989). "Studies of a glomerular permeability factor in patients with minimal-change nephrotic syndrome." Nephron **51**(3): 370-6.
- Yu, Z., J. Ding, et al. (2005). "Mutations in NPHS2 in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome in Chinese children." Nephrol Dial Transplant **20**(5): 902-8.
- 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.

Nephrol Dial Transplant (2006) 21: 10–13
doi:10.1093/ndt/gfi250
Advance Access publication 8 November 2005

Possible new perspectives for our understanding of nephrotic syndrome recurrence

Caroline Hervé¹ and Jacques Dantal²

¹INSERM U643, ITERT and ²Service de Néphrologie, Immunologie Clinique, 30 Bd Jean Monnet, CHU Nantes, 44093 Nantes, France

Keywords: nephrotic syndrome; permeability factors; podocyte; recurrence

The identification and characterization of circulating factors that alter glomerular permeability in idiopathic nephrotic syndrome (INS) remain the subject of intensive research in nephrology. The existence of such factors was initially evoked by Shalhoub in 1974 [1] and, although they are thought to be of T-cell origin, their precise nature remains elusive. INS recurs immediately after kidney transplantation in 30% of patients with corticosteroid- or cyclosporin A-resistant INS [2]. The rapidity of this recurrence and the beneficial effects of plasmapheresis [2] and/or immunoadsorptions [3], together with several cases of materno-fetal transmission of glomerular abnormalities [4], lend credence to the involvement of plasmatic factors. In addition, the beneficial effects of corticosteroids and/or immunosuppressive therapies on the initial disease and the T-cell abnormalities recently reported in steroid-sensitive INS [5] indirectly support a T-cell origin.

Hypothetical plasmatic factors

Major discrepancies have been revealed in the results of studies on the putative plasmatic factor(s) performed

Correspondence and offprint requests to: Jacques Dantal, Service de néphrologie, immunologie clinique, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex, France. Email: jacques.dantal@chu-nantes.fr

in vitro or *in vivo* in rodents. These discrepancies could be related to the origin of the biological fraction tested [i.e. cortico-sensitive disease, recurrence after transplantation, genetic variant of focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS)] and/or to the sensitivity or specificity of the experiments in question. Studies of patients with steroid-sensitive minimal change disease using stimulated cultured T cells, T-cell hybridomas or serum have described hypothetical plasmatic factors. Nevertheless, the specificity of these factors is poor and no firm conclusions could be drawn. Currently, the best characterized candidate in these steroid-sensitive patients is haemopexin [6]. The activity of this 100 kDa haem-binding protein correlated tightly with INS evolution (remission/relapse). Moreover, haemopexin has been shown to reduce the anionic charges of the filtration barrier [7] and to have protease activity [8].

Other groups have studied the putative FSGS factor following INS recurrence post-kidney transplantation. The first reported approach consisted of injecting different plasmas or plasma fractions into rats (intravenously and/or intraperitoneally). These reports were encouraging as they demonstrated the transfer of (an) albuminuric factor(s) *in vivo* [3,9]. Nevertheless, the results were difficult to reproduce and a clear lack of specificity was demonstrated [10]. These negative results could have been due to a low final concentration of a putative factor, species specificity and/or the presence of an antagonist/neutralizing factor in normal rat serum. The second approach consisted of using isolated rat glomeruli *in vitro*. Using this technique,

pre-transplantation plasma or fractions from INS patients were shown to increase the albumin permeability of normal glomeruli but did not seem to be specific to the disease (i.e. 30% of membranous glomerulonephritis patients) [11]. Greater risk of recurrence was reported for patients in whom pre-transplant sera induced a high albumin permeability [12], but the predictive value of this particular test was not a consistent finding [11]. This bioassay was used in an attempt to detect and identify the plasmatic factor but, despite the use of various samples, no biochemical characterization was performed.

Genetic contribution

More recently, major progress in our knowledge concerning the mechanisms of INS has come from the identification of some key proteins of the podocyte slit diaphragm. These proteins, which are inter-related, are critical for congenital and early childhood onset nephrotic syndrome [13,14]. Their role is to maintain the integrity of the slit diaphragm and thus its permselectivity [15]. Late recurrence of INS reported in transplanted children with congenital nephrotic syndrome of the Finnish type was elegantly demonstrated to be related to an immunization against nephrin inherent to normal kidney grafts [16]. However, the difference between the intrinsic 'genetic' form and the extrinsic 'immunological' form due to an extra-renal factor of nephrotic syndrome is not clear-cut. Recurrence of nephrotic syndrome after kidney transplantation is observed in 35% of patients with the 'immunological' form, but also in 8% of patients with podocin mutation [17]. Moreover, the involvement of plasmatic factors in the recurrence of congenital nephrotic syndrome cannot be totally excluded, as an increase in albumin permeability was detected with the serum of these patients, both before and after transplantation [18]. The pathophysiological mechanisms underlying INS and its recurrence after kidney transplantation are more complex than the simple hypothesis of an albuminuric factor. They probably involve disequilibria between permeability-inducing as well as protective factors, rendering their identification more difficult.

Podocyte culture techniques

The successful transfection of primary cultures of human or mouse podocytes with a temperature-sensitive gene construct represents a new and practical tool to study podocyte biology [19,20]. Differentiated podocytes express the typical markers of *in vivo* podocytes, including key proteins of the slit diaphragm such as synaptopodin, P-cadherin, nephrin, podocin and CD2AP. This cell line can thus be used as a new tool to examine the effect of nephrotic plasma directly, with a particular focus on the organization of the slit diaphragm complex.

First, it has been reported that incubation of this immortalized podocyte cell line with normal or non-nephrotic plasma is associated with the development of long foot processes and the localization of nephrin, podocin and CD2AP at the cell surface [19]. Recently, Coward *et al.* [21] published significant data using these cells. They showed an abnormal distribution of slit diaphragm proteins after 48 h exposure to nephrotic plasma, with nephrin, podocin and CD2AP being retained within the cytosol. Previously, two key findings have come from human and animal models of nephrosis: it was shown that nephrin and podocin are localized away from the slit diaphragm in nephrotic patients and that there was a change in slit diaphragm proteins from a linear capillary loop pattern in normal glomerulus to a granular intracellular translocation in conditions of heavy proteinuria [22–24]. The experiments on podocyte culture are therefore able to reproduce *in vitro* what is thought to occur *in vivo* during nephrotic syndrome.

Immortalized podocytes are also unique tools for the analysis of intracellular mechanisms of podocyte differentiation and dedifferentiation. The maintenance of the differentiated form, observed with sera from patients in remission, is mediated within minutes through the suppression of calcium flow, via a kinase pathway. Moreover, recent studies showed that blockade of integrin-linked kinase prevented podocyte detachment [25] and that activation of a mitogen-activated protein kinase (MAPK) such as p38 was necessary for podocyte injury [26]. Thus, podocyte activation by kinases seems to play a crucial role in the dedifferentiation process. Another interesting observation made by Coward and colleagues [21] was that normal serum could reverse the delocalization of nephrin, strongly supporting the possibility of a defective or missing protective factor in nephrotic plasma.

The nephrotic stage: a critical balance

The hypothesis that nephrotic patients lack plasmatic factors essential for the maintenance of glomerular permeability was initially evoked by studies based on isolated glomerular experiments as well as the results obtained using immortalized podocyte cell lines. This hypothesis agrees with the failure to transfer albuminuria to animals using sera, plasma or immunoadsorption eluates and with the inability to reproduce these experiments due to the presence of natural factors that could reverse the effect of the transferred material. Further evidence for the loss of factor(s) necessary for the maintenance of glomerular permeability comes from the description of increased glomerular permeability in the isolated glomerular test using sera from FSGS patients bearing the NPHS2 gene mutation [18]. In the latter case, urine from nephrotic patients, but not from normal controls, blocks *in vitro* the induction

of glomerular abnormalities, strongly suggesting the loss of a protective factor in the urine of nephrotic patients.

Finally, is this hypothesis plausible with clinical observations? The mechanisms of action of plasma treatment are not clear: to our knowledge, ~60% of adult patients with FSGS recurrence present an initial complete or partial remission after such treatment, but no differences can be found with respect to the substitution fluids used (albumin vs fresh frozen plasma). Moreover, immunoabsorption onto protein A or Ig-Therasorb columns can give equivalent results without any protein substitution [2,28]. In addition, this effect is not specific for FSGS recurrence and was also reported in nephrotic syndrome of other origins [29]. Thus, these observations do not support a decrease of a protective factor and suggest that if these treatments could modify the balance between circulating factors, they act mainly by the removal of proteinuric factors. In the recurrent patients, the only widely accepted concept is the immediate recurrence of albuminuria, suggesting that the presence of a pre-formed factor is able to affect glomerular permeability of the kidney graft. The discrepancies concerning the predictive value of the effect of pre-transplantation sera on isolated glomeruli also need to be reconsidered. The defect of a protective factor is difficult to explain by a urinary loss process as these pre-transplanted patients are generally anuric and non-nephrotic. In addition, the high doses of cyclosporin delivered as the first-line therapy for patients with immediate FSGS recurrence could also protect the glomerulus from an extra-renal aggression [27] rather than only block the production of an albuminuric factor of T-cell origin. The non-specific finding reported recently by the loss of a protective factor(s) seems to be more related to the consequences of FSGS that could lead to an amplification loop of the glomerulonephritis, rather than to the cause of the initial disease. In addition, circulating factors have to be considered as well as factors that could be of autocrine origin.

Conclusion

The balance between different factors able to alter or protect the glomerulus leads us to a new and stimulating field of research certainly more complex than the simple search for a proteinuric factor. The immortalized podocyte model will provide an additional *in vitro* test for a more precise analysis of the factors involved in the maintenance of podocyte differentiation and will provide new insights into the puzzling mechanisms of nephrotic syndrome.

Acknowledgements. We thank Joanna Ashton for editing the manuscript and D. Sahali (Cr eteil, France) for critical reading of this manuscript.

Conflict of interest statement. None declared.

References

- Shalhoub RJ. Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function. *Lancet* 1974; 2: 556–560
- Dantal J, Baatard R, Hourmant M *et al*. Recurrent nephrotic syndrome following renal transplantation in patients with focal glomerulosclerosis. A one-center study of plasma exchange effects. *Transplantation* 1991; 52: 827–831
- 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: 7–14
- Kemper MJ, Wolf G, Muller-Wiefel DE. Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child. *N Engl J Med* 2001; 344: 386–387
- Grimbert 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: 797–807
- Cheung PK, Klok PA, Baller JF, Bakker WW. Induction of experimental proteinuria *in vivo* following infusion of human plasma hemopexin. *Kidney Int* 2000; 57: 1512–1520
- Cheung PK, Klok PA, Bakker WW. Minimal change-like glomerular alterations induced by a human plasma factor. *Nephron* 1996; 74: 586–593
- Bakker WW, Borghuis T, Harmsen MC *et al*. Protease activity of plasma hemopexin. *Kidney Int* 2005; 68: 603–610
- 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* 1984; 22: 32–38
- Le Berre L, Godfrin Y, Lafond-Puyet L *et al*. Effect of plasma fractions from patients with focal and segmental glomerulosclerosis on rat proteinuria. *Kidney Int* 2000; 58: 2502
- Godfrin Y, Dantal J, Perretto S *et al*. Study of the *in vitro* effect on glomerular albumin permeability of serum before and after renal transplantation in focal segmental glomerulosclerosis. *Transplantation* 1997; 64: 1711–1715
- 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: 878–883
- Ly J, Alexander M, Quaggin SE. A podocentric view of nephrology. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004; 13: 299–305
- Reiser J, Polu KR, Moller CC *et al*. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet* 2005; 37: 739–744
- Saleem MA, Ni L, Witherden I *et al*. Co-localization of nephrin, podocin, and the actin cytoskeleton: evidence for a role in podocyte foot process formation. *Am J Pathol* 2002; 161: 1459–1466
- Wang SX, Ahola H, Palmien T *et al*. Recurrence of nephrotic syndrome after transplantation in CNF is due to autoantibodies to nephrin. *Exp Nephrol* 2001; 9: 327–331
- Ruf RG, Lichtenberger A, Karle SM *et al*. Patients with mutations in NPHS2 (podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 722–732
- Carraro M, Caridi G, Bruschi M *et al*. Serum glomerular permeability activity in patients with podocin mutations (NPHS2) and steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1946–1952
- 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: 248–258
- Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J *et al*. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 630–638

21. 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: 629–637
22. Hingorani SR, Finn LS, Kowalewska J, McDonald RA, Eddy AA. Expression of nephrin in acquired forms of nephrotic syndrome in childhood. *Pediatr Nephrol* 2004; 19: 300–305
23. Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G *et al.* Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol* 2001; 158: 1723–1731
24. Saran AM, Yuan H, Takeuchi E, McLaughlin M, Salant DJ. Complement mediates nephrin redistribution and actin dissociation in experimental membranous nephropathy. *Kidney Int* 2003; 64: 2072–2078
25. Teixeira Vde P, Blattner SM, Li M *et al.* Functional consequences of integrin-linked kinase activation in podocyte damage. *Kidney Int* 2005; 67: 514–523
26. Koshikawa M, Mukoyama M, Mori K *et al.* Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation in podocyte injury and proteinuria in experimental nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 2690–2701
27. Sharma R, Sharma M, Ge X, McCarthy ET, Savin VJ. Cyclosporine protects glomeruli from FSGS factor via an increase in glomerular cAMP. *Transplantation* 1996; 62: 1916–1920
28. Dantal J, Godfrin Y, Koll R *et al.* Antihuman immunoglobulin affinity immunoadsorption strongly decreases proteinuria in patients with relapsing nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1709–1715
29. Esnault VL, Besnier D, Testa A *et al.* Effect of protein A immunoadsorption in nephrotic syndrome of various etiologies. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2014–2017

Received for publication: 5.9.05

Accepted in revised form: 7.10.05

B-Annexe 2

LF15-0195, an analogue of deoxyspergualin, induces a remission of idiopathic nephrotic syndrome in a rat model.

Ludmilla Le Berre¹ Ph.D, Caroline Herve¹, Yann Godfrin¹ Ph.D, Karine Renaudin² MD, Françoise Buzelin² MD, Claire Usal¹, Sabine Peretto¹, Jean-Paul Soulillou¹ MD and Jacques Dantal¹MD PhD.

¹ Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité 437 “Immunointervention dans les Allo et Xenotransplantations” and Institut de Transplantation et Recherche en Transplantation (ITERT). 44093 Nantes. France.

² Service d' Anatomopathologie, CHU Hôtel Dieu, 44093 Nantes. France.

Short title: DSG analogue in rat nephrotic syndrome.

Correspondance:

Pr. Jean Paul Soulillou

INSERM U437

30 Bd Jean Monnet

44093 Nantes

France

Tel: 33- 2 40 08 74 10, Fax: 33- 2 40 08 74 11

E-Mail: jps@nantes.inserm.fr

Acknowledgements: This work was supported by the Fondation Transvie. We thank Dr Cristina Cuturi for discussion and advice, Dr Patrick Dutartre of Fournier Laboratories for supplying the LF15-0195 and the LF15-0296 and Joanna Ashton for editing the manuscript.

Abstract

Buffalo/Mna rats spontaneously develop a nephrotic syndrome with focal segmental glomerulosclerosis. We showed that this rat nephropathy recurs after renal transplantation suggesting, as suspected in human, the presence of a circulating factor. We now reported on this strain of rats the anti-proteinuric effect of Corticosteroids and/or cyclosporin A, of anti-T or B-cell specific treatments (T cell receptor monoclonal antibody, Mitoxantrone) and of an analogue of deoxyspergualin (LF15-0195). CS, CsA, CS-CsA combination and anti-T cell treatments lead to a transient and partial reduction of proteinuria (48%, 65%, 68% and 65%, respectively) while Mitoxantrone showed no effect. In contrast, LF15-0195 treatment led to a rapid and complete remission of the proteinuria (<0.17 g/mmol; $p<0.05$) and restored normal histology of the kidneys. Finally, a Facs analysis of blood samples revealed that a population of lymphocytes T CD25⁺ is significantly increased in LF15-0195 treated rats but not in non-immunosuppressive isomer treated rats (LF15-0296). The mechanism of action of LF15-0195 in the Buffalo/Mna glomerulonephritis remains to be determined but these results provide a promising therapeutic approach in human. A clinical trial of LF15-0195 (or analogue) for relapsing FSGS patients after kidney transplantation is now necessary.

Medline key words: FSGS, Animal model, Buffalo/Mna rats, Glomerulonephritis and Deoxyspergualin.

Introduction

Idiopathic nephrotic syndrome (INS) with primary focal segmental glomerular sclerosis (FSGS) lesions is a disease of unknown etiology, defined by a selective proteinuria, hypoalbuminemia and non-specific lesions with a glomerular sclerosis following synechia between the flocculus and the Bowman's capsule. Treatments such as corticoids (CS), cyclosporin A (CsA) and cyclophosphamide (Cy) remain its key treatments (for review see (1)) but at least 20% of affected patients ultimately require hemodialysis and/or kidney transplantation for end stage renal failure (ESRF). In 25 to 40% of transplanted patients, the initial disease immediately relapses on the renal transplant (2). This immediate (and iterative) recurrence and the beneficial effect of plasmatic exchanges (3) or immunoadsorptions (4, 5) strongly strengthened the presence of a yet uncharacterized circulating factor. The treatment of FSGS recurrence is still discussed and we consider that 50% of these transplants were lost from recurrence (2). In addition, a rapid loss due to a recurrence of the initial disease is considered as a contraindication to a further transplantation, leading to accumulation of these patients in dialysis.

Animal models of FSGS have been described but are mainly more related to secondary forms of FSGS (6-8) and do not supply a causal model in which a putative permeability factor could be involved (9). The Buffalo/Mna rat strain develops a spontaneous glomerulonephritis from 2-3 months of age, in a normotensive and non-uremic animal (10). At that time, only minimal change glomerulonephritis could be observed, FSGS lesions appear later after 4 to 6 months of age (11). Despite having a genetic background suggesting a potential biochemical podocyte abnormality (the knowledge of such mechanisms is currently growing in humans, 12), we have recently suggested the potential involvement of a circulating factor in this model, through transplantation experiments. Indeed, we have demonstrated the recurrence of the initial disease after transplantation of normal rat kidneys into Buffalo/Mna recipients and its remission when albuminuric Buffalo/Mna kidneys were grafted into a normal environment (13).

In this study, we have used the Buffalo/Mna strain to test the antiproteinuric effect of various immunosuppressive drugs. We found a marginal effect of CS and/or CsA and of anti-T cell therapy while the use of an anti-B cell treatment remains without effect. In contrast, a deoxyspergualin (DSG)

analogue, LF15-0195 (14), specifically triggers a complete but transient remission of the Buffalo/Mna kidney disease on the proteinuria as well as on the histological presentation. In addition, this treatment induces an increase of a CD25⁺ T cell population, suggestive of a peripheral immune regulatory population as recently demonstrated in different models of allotransplantation and autoimmune diseases. These findings will provide new insights into the mechanisms of proteinuria in this model and could have important clinical applications.

Materials and Methods

Animals: The Buffalo/Mna rat strain maintained in our lab was originally kindly provided by Dr Saito (Central Experimental Institute, Nokawa, Kawasaki, Japan). The animals were born from a unique couple and bred for at least 10 generations. The animal care involved in this study was in strict accordance with our institutional guidelines.

Proteinuria measurement: The animals were placed in metabolic cages for 24h before measurement with free access to drink but without food pellets, to avoid contamination of urinary samples. The total urinary protein concentration (g/L) was measured by a colorimetric method using a Hitachi autoanalyser (Behringer). Urinary creatinine (mmol/L) was measured by the Jaffé method. Proteinuria was expressed according to: $\text{Proteinuria (g/mmol)} = \text{urinary proteins (g/L)} / \text{urinary creatinine (mmol/L)}$ and was considered as abnormal when greater than 0.17 g/mmol.

Treatments: Five to six-month-old male proteinuric Buffalo/Mna rats were allocated to groups of five animals. The treatments used were Methylprednisolone (Cox-Qualimed, France), Cyclosporin A (Sandimmun®, Novartis, France), Mitoxantrone (Novantrone®, Wyeth-Lederlé, Paris-La Defense, France) and LF15-0195 (an analogue of the 15-deoxyspergualin, and its control isomer, the LF15-0296, Fournier, Daix, France). The R7.3 Ab, a purified mouse monoclonal antibody recognizing a constant determinant of the rat T-cell receptor β chain and its isotypic control (3G8, an Ig G₁) were obtained from European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK). For clarity, all the treatment groups are presented in Table 1. The dosage and duration of the treatment period were defined according to the references of the literature, in the absence of remission the maximal duration was of 60 days. Proteinuria and serum creatinine were measured before treatment initiation and at regular intervals thereafter. Animals of group 7 and 8 were sacrificed during the remission period (proteinuria < 0.17 g/mmol) for histological examination.

5/6 nephrectomy on Wistar rats: We realized the 5/6 nephrectomy by an uninephrectomy of left kidney followed by a ligation of 2 of 3 branches of renal artery of the right kidney (n= 8). Proteinuria of these rats was observed and when this became around 0.5 g/mmol, we treated rats either by LF15-0195 (1mg/kg/d) or by LF15-0296 (10mg/kg/d) during 30 days.

Flow cytometry: Cells were prepared from 2ml blood samples. All antibody dilutions and washes were performed in PBS 0.2% bovine serum albumin and 0.1% NaN₃. After lysis of erythrocytes with hypotonic solution (NH₄Cl-KHCO₃-Na₂EDTA, pH 7.2), cells were saturated with rat serum diluted 1/2 in PBS-BSA-NaN₃ for 30 min and incubated for 30min at 4°C with a saturating concentration of a specific anti-rat mAb (Ox1+Ox30: anti-CD45; R7.3: anti-TCR β ; Ox8: anti-CD8; W3/25: anti-CD4; Ox33: anti-CD45RA; ED3: anti-macrophagic sialoadhesin; 3.2.3: NKR). Cell were washed, stained with FITC-labeled donkey anti-mouse IgG (Jackson Laboratories, Immunotech, Marseille), washed and analyzed. For double staining, cells were simultaneously incubated with a saturating concentration of FITC labeled mAbs (Ox19: anti-CD5; anti-CD3; ED3 and 3.2.3) and biotinylated-mAbs (Ox1+Ox30; Ox8; W3/25; Ox 33; Ox26: Transferin Receptor; Ox 39: anti-CD25 or IL2 Receptor α chain) for 30min at 4°C. All mAbs were obtained from the ECACC, purified and labeled in our laboratory. For negative controls, cells were first incubated with isotype-matched, irrelevant mAbs (mouse anti-human Abs). After two washes, cells were incubated for 30min at 4°C with streptavidin-phycoerythrin (Jackson, Immunotech, France), then washed and analyzed. Cytofluorometric analysis was performed on a FACScan (Becton-Dickinson) using CellQuest Software. 10000 events were acquired for each sample.

Light-microscopy examination: Kidney samples were fixed for 20 min in Carnoy solution and then in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. 4 μ m-sections were stained with hematoxylin and phloxin (HP), periodic acid Schiff (PAS), Masson trichrome and periodic acid-silver methenamine (PAM). Slides were analyzed by an independent pathologist. Lesions were estimated and counted on five fields at a 100X magnification. For electron-microscopic examination, kidney biopsies were fixed in 2.5% glutaraldehyde, post-fixed in a mixture of 2% osmium tetroxide in 200mM 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 2000KeV.

Statistical analysis: The Wilcoxon test was used to compare the proteinuria level before and after treatment. $p < 0.05$ was considered as significant. The Student t test was used to compare histological data in Table II and in Facs analysis to compare different cells populations before and after treatment.

Results

Corticosteroids, Cyclosporin A and R7.3 partially and transiently reduce proteinuria in Buffalo/Mna rats while Mitoxantrone had no effect.

CS treatment significantly reduced urinary protein excretion, which reached a minimum value of 51% of the initial level after 10 days. This level was maintained until the end of the treatment period (Fig.1a, $p < 0.05$). CsA treatment was also associated with a significant 68% decrease in proteinuria, which was maximal on Day 30 (Fig.1b, $p < 0.05$). These reductions of proteinuria were statistically significant in comparison with Day 0, however, the lowest average value obtained after these two treatments did not reach the normal range for healthy rats (< 0.17 g/mmol). Furthermore, the proteinuria slowly increased thereafter, reverting to pre-treatment levels. During these treatments, serum creatinine remained stable and within the normal range (26.2 ± 3.5 μmol at Day 0 vs. 29 ± 2.9 μmol at Day 60, for the CS group and 29.4 ± 4 μmol at Day 0 vs. 29 ± 3.3 μmol at Day 60 for the CsA group, $p = \text{ns}$). Control animals receiving daily vehicles (olive oil or NaCl) maintained a steady state level of excreted proteins without any statistical significant change in their proteinuria (data not shown). The combination of CS and CsA resulted in a significant decrease in proteinuria (68% at Day 63, Fig.1c, $p < 0.05$), more stable than that observed when the drugs were given individually, but again without reverting to normal values, and reverted to the pre-treatment range after withdrawal of treatment. Histological kidney examination of CS or/and CsA treated rats failed to evidence any ultrastructural change compared with untreated age-matched rats.

The administration of R7.3 Ab for 9 days rapidly decreased both T cells ($75.6 \pm 2.6\%$ of WBC at Day 0 vs. $54.7 \pm 4.2\%$ at Day 4) and proteinuria (1.95 ± 1.1 at Day 0 vs. 0.99 ± 0.7 g/mmol at Day 4, a 50% reduction), although these decreases were transient and were not statistically significant. Using an anti-rat Ig Elisa technique, we detected an immunization against the R7.3 Ab at Day 9 (data not shown) and we hypothesize the effect of blocking Ab. To slow down the effect of such an immunization and to enable the treatment of rats for a longer time with this Ab, the R7.3 Ab was combined with CsA. This combination significantly decreased up to 65% but did not normalize the proteinuria in Buffalo/Mna rats (Fig.2, $p < 0.05$). The effect of this treatment was not lasting and proteinuria slowly increased after treatment withdrawal. The evolution of proteinuria seemed to correlate with the activity of R7.3 Ab on the peripheral leukocyte population. Facs analysis showed a maximal decrease in total lymphocytes at Day 26 ($90.5 \pm 3.6\%$ of WBC at Day 0 vs. $22.3 \pm 3.3\%$ at

day 26, a 4.5 fold decrease) when the proteinuria reached its lowest value and a progressive return to normal values at the same time as the recurrence of proteinuria. The mean effect on proteinuria could not be attributed entirely to CsA activity because the administration of R7.3 Ab alone also affected the Buffalo/Mna proteinuria and the kinetics of their effects was very different: R7.3 affected the proteinuria rapidly (from 4 days) while CsA decreased the proteinuria slowly (on 30 days).

Mitoxantrone treatment effectively diminished peripheral B cell counts ($26.3 \pm 2.5\%$ of white blood cells (WBC) at Day 0 to $7.2 \pm 1.4 \%$ at Day 14, a 3.6 fold decrease) without affecting the number of T cells ($84.9 \pm 8.5 \%$ of WBC at Day 0 vs. $86.2 \pm 5.6 \%$ at Day 14 and $74.1 \pm 15.1 \%$ at the end of the treatment). However, this treatment did not decrease proteinuria in Buffalo/Mna rats: proteinuria was 0.51 ± 0.3 g/mmol at Day 0, 1 ± 0.5 g/mmol at Day 7, 0.84 ± 0.7 g/mmol at Day 14, 0.84 ± 0.2 g/mmol at Day 24 .

LF15-0195 leads to a complete remission of proteinuria in the Buffalo/Mna rat.

We firstly showed that LF15-0195 treatment prevented the development of nephrotic range proteinuria in 2-month old Buffalo/Mna rats when administered at the onset of proteinuria (0.2g/mmol) (Fig.3a). The control of the naturally occurring proteinuria in these animals was efficient for one month after treatment withdrawal, after which time proteinuria increased progressively to the values observed in untreated aged matched Buffalo/Mna rats. At a later stage of the disease, when the animals had substantial proteinuria (Day 100; 0.5g/mmol), treatment or re-treatment by LF15-0195 promptly reduced proteinuria, which reached normal range values at Day 120 (Fig 3a, $p < 0.05$). Normalized values could then be stabilized with a half treatment dosage (0.5mg/kg/d). The same normalization of proteinuria was obtained 20-30 days after LF15-0195 treatment of overtly proteinuric Buffalo/Mna rats (Fig 3b). Moreover, LF15-195 administration did not have any effect on the serum creatinine of these rats (28 ± 5.2 μmol at Day 0 vs. 21 ± 1.6 μmol Day 30/130, when the proteinuria was normalized, $p = \text{ns}$). We have planned to administer, as advised by the Fournier Laboratories, a long-term treatment (similar to CS and/or CsA ones) but, according to this profound effect, we have stopped the treatment to avoid potential overimmunosuppression and to obtain a histological sample of kidneys in complete remission. In comparison, the control isomer (LF15-0296) of the LF15-0195 had no effect on proteinuria (Fig.3b). This suggests that LF15-0195 did not reduce the proteinuria through an electrostatic effect, the isomer having the same strongly

positive charges. In the same way, in order to eliminate a potential non-immune effect of LF15-0195 treatment, we realized 5/6 nephrectomy on Wistar rats, and when these became proteinuric, we treated them either with LF15-0195 or LF15-0296 (data not shown). In the two cases, we did not find any improvement of proteinuria during or after treatment, but a continuation of the increase in proteinuria (0.55 ± 0.03 and 0.54 ± 0.08 respectively at Day 0 of treatment; 0.64 ± 0.07 and 0.65 ± 0.07 at Day 10, 0.67 ± 0.16 and 0.98 ± 0.27 at the end of the treatment; 1.42 ± 0.38 and 1.53 ± 0.27 at Day 40)

Facs analysis of blood from LF15-0195-treated Buffalo/Mna animals (n=5) showed a significant increase in CD5⁺CD25⁺ cells ($6 \pm 2.6\%$ of WBC at Day 0 vs. $17.6 \pm 4.6\%$ at Day 15, $p < 0.02$, a 3 fold rise) while the proportion of T, B, NK cells and monocytes remained unchanged. In contrast, LF15-0296 treated control rats did not show any increase in their CD25⁺ population (data not shown).

Light microscopy examination (Table II) of LF15-0195 treated rat kidneys (6 months old) obtained during complete proteinuria remission (n=6; Fig 3a) showed a subnormal renal histology (Fig.4a). As compared to lesions usually seen in 6-7 month-old Buffalo/Mna (Fig.4b), treated rats had only few glomerular lesions ($3.3 \pm 1.8\%$ vs. $10.9 \pm 1.5\%$, $p < 0.001$) and no tubular dilatation ($0.83 \pm 1.1\%$ vs. $19.5 \pm 13.1\%$, $p < 0.01$) demonstrating the reversibility of the lesions and the beneficial effect of LF15-0195 at the histological level. Electron-microscopic examination of LF15-0195 treated Buffalo/Mna rat kidneys did not show any foot process fusion or cytoplasmic vacuolization and the foot processes were well organized and distributed (Fig.5a). In contrast, the untreated 6-7 month old Buffalo/Mna kidneys showed focal and moderate podocyte lesions with some foot process flattening and fusion (Fig.5b).

Discussion

In this study the effect of various immunosuppressive drugs were tested on the naturally occurring glomerulonephritis of Buffalo/Mna rats. First, we show that conventional treatments of human nephrotic syndrome (CS and/or CsA, 10, 15) induced some partial and transient decrease in the proteinuria of Buffalo/Mna rats and that the B cell depleting therapy, by Mitoxantrone (16, 17), had no effect. On the other hand, the anti-T cell R7.3 mAb (18), reduced proteinuria but this effect remained partial and very limited in time. In contrast, we show that LF15-0195, a derivate of DSG (19, 20), was able to prevent proteinuria in young Buffalo/Mna rats or to induce a complete and more durable remission of the proteinuria than the other treatments. Moreover, LF15-0195 led to the recovery of a subnormal histological and ultra structural aspect in proteinuric kidneys.

Treatment with CS has previously been reported as being unsuccessful in decreasing proteinuria in Buffalo/Mna rats treated with 2mg/kg/day of subcutaneous prednisolone for 1 month (10). We used a longer but less aggressive treatment injected intraperitoneally (60 days, 1mg/kg/d) and showed a relative efficacy but without normalization of the proteinuria. The CsA and the combination CS-CsA induced similar results without reaching the threshold of complete remission. The reduction in proteinuria observed with the use of these drugs was not related to a reduction in the glomerular filtration rate. Indeed, serum creatinine of the Buffalo/Mna rats remained unmodified irrespective of the treatment used.

These observations with classical treatments reinforce the findings of our previous study which showed that Buffalo/Mna might be a relevant model of human FSGS (10). In addition to the similarities between the lesions observed here and those in the human disease, we showed that the disease could recur after renal transplantation, also suggesting the involvement of a circulating factor (13).

Mitoxantrone, which is a drug known for its anti-proliferative properties by intercalating DNA, acts as an immunosuppressor, earlier on B cells (16) and then later on T cells (21). We took advantage of this functional duality to test the role of B cells in the Buffalo/Mna nephropathy. The treatment duration was chosen to obtain a strong depletion of B cells without affecting T cells (Facs analysis, data not shown). Thus, in our *in vivo* experiments, only a mild and transient decrease in T cells was

observed at the end of Mitoxantrone treatment and this was not sufficient to modify the proteinuria in these animals. These results suggest that B cells may not be the most relevant targets in this disease

To our knowledge, anti-TCR MoAb therapy has not been tested on initial human NS because it is associated with severe side effects (22). In addition, it is well known that NS can recur immediately after renal transplantation despite anti-T cell therapies. The fact that such treatment only partially and transiently decreased proteinuria in the Buffalo/Mna model suggests that the disease is multifactorial and that T cells are only one of the components involved. However, the use of an antibody can not be compared with the use of a drug, since the therapeutic use of monoclonal antibody is limited in time, because of the immunization of recipient against this Ab, and we cannot exclude the possibility that long-term T cell depletion is necessary to obtain a prolonged effect.

Our main observation is the first demonstration of a complete remission of proteinuria following LF15-0195 treatment, an analogue of 15-deoxyspergualin (DSG) (23, 24). More interesting and important is that this complete remission of proteinuria is following by a near complete resolution of ultra structural glomerular abnormalities suggesting a direct impact on the, yet unknown, mechanism of this spontaneous rats nephropathy. The LF15-0195 is a stabilized form of a most known drug called DSG. DSG is a potent immunosuppressive drug known to block T and B lymphocyte differentiation (19) as well as macrophage function and activation (inhibition of release of cytotoxic mediators (20), down regulation of MHC class I and II expression (25), interference with Ag processing and presentation (26) and modulation of IL1 production (25)). DSG has been shown to bind a constitutive member of the heat shock protein 70 family and to interfere with Ag processing (26) and nuclear translocation of NF- κ B (27) and to block the cellular cycle in the transition phase Go/G1 to S/G2-M (28), blocking thus T and B cell differentiation. More recently, LF08-0299 (or Tresperimus), an other analogue of DSG has been shown to induce tolerance in a rat transplantation model by the induction of a suppressive CD4⁺T cell population, in the absence of cell depletion (29). In the same model, LF15-0195 has been shown to induce tolerance and an increase in CD25⁺ T cells (30). These findings correlate with our cytometric results that also show an increase in a CD25⁺ T cell subset. On the contrary, LF15-0296, the control isomer of LF15-0195, neither increased the CD25⁺ T cell subset nor normalized the Buffalo/Mna proteinuria. One could hypothesize that LF15-0195 regulates a peripheral immune regulatory population (31) involved in maintaining self-tolerance

(32), the alteration of such a mechanism being responsible for autoimmune diseases (33,34). This increase of CD25⁺ T cell subset was not found in the model of proteinuria and glomerulosclerosis, induced by nephron reduction (5/6 nephrectomy), in which we did not see any improvement of rat proteinuria following LF15-0195 treatment. At the same time, the treatment of Buffalo/Mna with LF15-0296, an isomer of LF15-0195 with similar positive charges but a very weak immunosuppressive effect, did not trigger any change of Buffalo/Mna proteinuria, demonstrating so that the effect of LF15-0195 do not pass by an electrostatic property of the LF15-0195 molecule restoring the glomerular permeability. So, we hypothesized first that LF15-0195 could contribute to the control of an unknown immune process leading to albuminuria in Buffalo/Mna rats by the establishment of a suppressive activity. An alternative hypothesis could be a direct inhibition of NF- κ B activation by the LF15-0195 in glomerular epithelial cells, modifying the signaling pathway of a putative nephrotoxic factor. This hypothesis is supported by the recent observation of an increase in NF- κ B pathway activation in kidney biopsies of patients with post-transplantation INS recurrence (35).

In summary we have shown that LF15-0195 has a unique effect in a model of experimental idiopathic nephrotic syndrome. Despite an unknown mechanism but according to human similitude's the data obtained in this model of kidney disease suggest that LF15-0195 could have great potential in the treatment of human steroid resistant nephrotic patients or post transplant relapsing nephrotic syndrome which do not respond to current treatment strategies.

References:

- 1- Korbet SM: Management of idiopathic nephrosis in adults, including steroid-resistant nephrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 4: 169-176, 1995
- 2- Dantal J, Giral M, Hourmant M, Soulillou JP: Glomerulonephritis recurrences after kidney transplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 4: 146-154, 1995
- 3- 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
- 4- Dantal J, Bigot E, Bogers W, Testa A, Kriaa F, Jacques Y, et al.: Effect of plasma protein adsorption on protein excretion in kidney-transplant recipients with recurrent nephrotic syndrome. *N Engl J Med* 330: 7-14, 1994
- 5- Dantal J, Godfrin Y, Koll R, Perretto S, Naulet J, Bouhours JF, et al.: Antihuman immunoglobulin affinity immunoabsorption strongly decreases proteinuria in patients with relapsing nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 9: 1709-1715, 1998
- 6- Olivier J, Simons J, Troy J, Provoost P, Brenner B, Deen W: Proteinuria and impaired glomerular permselectivity in uninephrectomized fawn-hooded rats. *Am J Physiol* 267: F917-F925, 1994
- 7- Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, Delaini F, Sacchi G, Thoua Y, et al.: Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest* 46: 16-23, 1982
- 8- Kuijpers 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
- 9- Savin VJ, Sharma R, Sharma M, McCarthy ET, Swan SK, Ellis E, et al.: Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med* 334: 878-883, 1996
- 10- Kato F, Watanabe M, Matsuyama M: Nephrotic syndrome in spontaneous thymoma rats, Buffalo/Mna. *Biomedical Research* 4: 105-110, 1983
- 11- Nakamura T, Oite T, Shimizu F, Matsuyama M, Kazama T, Koda Y, et al.: Sclerotic lesions in the glomeruli of Buffalo/Mna rats. *Nephron* 43: 50-55, 1986
- 12- Pollak MR. The genetic basis of FSGS and steroid-resistant nephrosis. *Semin Nephrol*. 23: 141-6, 2003

- 13- Le Berre L, Godfrin Y, Gunther E, Buzelin F, Perretto S, Smit H et al.: Extrarenal effects on the pathogenesis and relapse of idiopathic nephrotic syndrome in Buffalo/Mna rats. *J Clin Inves* 109 (4): 491-98, 2002
- 14- Lebreton L, Jost E, Carboni B, Annat J, Vaultier M, Dutartre P, Renaut P. Structure-immunosuppressive activity relationship of new analogues of 15-deoxyspergualin. II. Structural modifications of the spermidine moiety. *J Med Chem* 42: 4749-4763, 1999
- 15- Bouchot O, Anegon I, Romaniuk A, Jacques Y, Paineau J, Soulillou J-P: Interleukin 2 Receptor in rat heart allograft rejection. *Transplantation* 48 (6): 918-22, 1989
- 16- Fidler JM, DeJoy SQ, Gibbons JJ, Jr.: Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. I. Suppression of B lymphocyte function. *J Immunol* 137: 727-732, 1986
17. Sloboda AE, Oronsky AC, Kerwar SS. Studies of the effect of Mitoxantrone on adjuvant induced arthritis in rats. *Clin Immunol Immunopathol* 40 (2): 236, 1986
- 18- 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: 256-262, 1994
- 19- Kerr PG, Atkins RC: The effects of deoxyspergualin on lymphocytes and monocytes in vivo and in vitro. *Transplantation* 48: 1048-1052, 1989
- 20- Dickneite 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
- 21- Fidler JM, DeJoy SQ, Smith FR, 3rd, Gibbons JJ, Jr.: Selective immunomodulation by the antineoplastic agent mitoxantrone. II. Nonspecific adherent suppressor cells derived from mitoxantrone-treated mice. *J Immunol* 136: 2747-2754, 1986
- 22- Swinnen LJ, Fisher RI: OKT3 monoclonal antibodies induce interleukin-6 and interleukin- 10: a possible cause of lymphoproliferative disorders associated with transplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2: 670-678, 1993
- 23- Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Soulillou JP, Cuturi C. Induction of donor specific allograft tolerance by short term treatment with LF15-0195 after transplantation: evidence for a direct effect on T cell differentiation. *Am J Transplant* 2 (8): 745-57, 2002

- 24- Duplan V, Dutartre P, Mars LT, Liblau RS, Druet P, Saoudi A. LF15-0195 inhibits the development of rat central nervous system autoimmunity by inducing long-lasting tolerance in autoreactive CD4 T cells. *J Immunol* 170; :2179-2185. 2003
- 25- Waaga AM, Krzymanski M, Ulrichs K, Treumer J, Oko A, Muller-Ruchholtz W: In vitro analysis of the mode of action of the immuno-suppressive drug 15-deoxyspergualin. *Arch Immunol Ther Exp* 44: 155-163, 1996
- 26- Hoeger PH, Tepper MA, Faith A, Higgins JA, Lamb JR, Geha RS: Immunosuppressant deoxyspergualin inhibits antigen processing in monocytes. *J Immunol* 153: 3908-3916, 1994
- 27- Tepper MA, Nadler SG, Esselstyn JM, Sterbenz KG: Deoxyspergualin inhibits kappa light chain expression in 70Z/3 pre-B cells by blocking lipopolysaccharide-induced NF-kappa B activation. *J Immunol* 155: 2427-2436, 1995
- 28- 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
- 29- Andoins C, de Fornel D, Annat J, Dutartre P: Tolerance in a rat cardiac allograft model after short-term treatment with LF08-0299. Absence of clonal deletion and evidence of CD4+ suppressor cells. *Transplantation* 62: 1543-1549, 1996
- 30- Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Souillou J-P and 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* 168:5058-69, 2002
- 31- Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM: CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 160: 1212-1218, 1998
- 32- Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, et al.: Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 162: 5317-5326, 1999
- 33- Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al.: Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10: 1969-1980, 1998
- 34- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M: Immunologic self-tolerance

maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155: 1151-1164, 1995

35- Schachter AD, Strehlau J, Zurakowski D, Vasconcellos L, Kim YS, Zheng XX, et al. Increased nuclear factor-kappaB and angiotensinogen gene expression in posttransplant recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *Transplantation* 70: 1107-1110, 2000

Legends:

Figure 1: Effect of CS (a), CsA (b), the CS-CsA combination (c) on proteinuria in Buffalo/Mna rats. Each treatment was administered for 60 days. Each group consisted of 5 animals. Proteinuria is expressed as the ratio of the urinary proteins (g/L) to urinary creatinine concentration (mmol/L). All values are expressed as mean \pm SD (scale bar). * indicates a significant decrease in proteinuria (vs Day 0).

Figure 2: Effect of anti-T lymphocyte treatment using R7.3 Ab on proteinuria in Buffalo/Mna rats. R7.3 Ab was injected IP for 20 days and CsA *per os* simultaneously. The 3G8 Ab associated with olive oil was administered to the R7.3/CsA control group rats. Each group consisted of 7 animals. Proteinuria is expressed as the ratio of the urinary proteins (g/L) to urinary creatinine concentration (mmol/L). All values are expressed as mean \pm SD (scale bar). * indicates a significant decrease in proteinuria (vs Day 0).

Figure 3: a) Effect of an analogue of 15-deoxyspergualin, LF15-0195, on the onset of proteinuria in young Buffalo/Mna rats. The first treatment was administered for 30 days and the second for 25 days at the initial dose (1 mg/kg/d) and then for 25 days at half of the initial dose (0.5 mg/kg/d). This group consisted of 5 animals. The control group were age-matched untreated Buffalo/Mna rats. b) Effect of LF15-0195 compared to LF15-0296, an isomer without immunosuppressive effect, on the proteinuria of 6-month-old Buffalo/Mna rats. The two treatments were administered for 30 days. Each group comprised 5 animals. Proteinuria is expressed as the ratio of the urinary proteins (g/L) to urinary creatinine concentration (mmol/L). All values are expressed as mean \pm SD (scale bar). * indicates a significant decrease in proteinuria (vs Day 0).

Figure 4: Light microscopic examination of LF15-0195-treated Buffalo/Mna kidneys showing a subnormal renal feature (panel a) and of native kidneys from 6 month old Buffalo/Mna rats showing major tubular alterations and FSGS lesions (panel b) (PAS staining, x 200).

Figure 5: Electron microscopic examination of LF15-0195-treated Buffalo/Mna kidneys (panel a) showing a normal ultrastructural feature with foot process well differentiated and organized in slit

diaphragm, compared with age-matched kidneys (6 months) of native Buffalo/Mna rats showing some flattening and foot processes fusion (panel b) (x 15,000).

Group	Treatment	Dose	Route of administration	Lenght	Number of rats	Initial Proteinuria	Control group	Reference
1	CorticoSteroids	1 mg/kg/d	Intraperitoneal	60 days	5	0.56 g/mmol	0.9% Nacl (n = 5)	Kato F, 1983 (8)
2	Cyclosporin A	10 mg/kg/d	Per Os	60 days	5	0.55 g/mmol	Olive oil (n = 5)	Bouchot O, 1989 (17)
3	CorticoSteroid + Cyclosporin A	1 mg/kg/d + 10 mg/kg/d	Intraperitoneal + <i>Per Os</i>	60 days	5	0.49 g/mmol	Olive oil and 0.9% Nacl (n = 5)	/
4	Mitoxantrone	0.5 mg/kg/d	Intraperitoneal	14 days + 14 to ½ days	5	0.51 g/mmol	0.9% Nacl (n = 5)	Fidler JM, 1986 (9)
5	Anti-TCR Ab	50µg/d	Intraperitoneal	9 days	5	1.1 g/mmol		Tsuchida M, 1994 (18)
6	Anti-TCR Ab + Cyclosporin A	50 µg/d + 10 mg/kg/d	Intraperitoneal + <i>Per Os</i>	20 days	7	0.76 g/mmol	3G8 (IgG1) and olive oil (n = 7)	Tsuchida M, 1994 (18)
7	LF15-0195	1 mg/kg/d	Intraperitoneal	30 days	5	0.2 g/mmol	Group 9: LF15-0296 10 mg/kg/d by IP	Chiffolleau E, 2002 (15)
8					5	0.58g/mmol	(n= 5)	

Table I: Summary of the treatments used in the Buffalo/Mna rats, with dose and route of administration, length of treatment, number of rats, initial proteinuria average for each group, control group and a bibliographic reference for each treatment.

Rats	% of damaged glomeruli	Tubular dilatation	Interstitial Fibrosis	Infiltrate
Age-matched untreated 1	12.6	13	-	+
Age-matched untreated 2	10.1	39	-	+/-
Age-matched untreated 3	9.3	11	-	+/-
Age-matched untreated 4	11.6	15	-	-
10.9 ± 1.5		19.5 ± 13.1		
LF 15-0195 treated 1	2.6	1	-	-
LF 15-0195 treated 2	6.4	1	-	-
LF 15-0195 treated 3	4.4	0	-	-
LF 15-0195 treated 4	2	3	-	-
LF 15-0195 treated 5	1.9	0	-	-
LF 15-0195 treated 6	2.2	0	-	-
3.3 ± 1.8 p = 0.0001		0.83 ± 1.1 p = 0.007		

Table II : Summary of the histological examination of untreated age-matched Buffalo/Mna kidneys (presentated in the Figure 3a) versus LF15-0195 treated Buffalo/Mna kidney sections (rats 1-3 presentated in Fig.3a and rats 4-6 presentated in Fig.3b). Slides were examined by a pathologist in a blinded fashion. Lesions were estimated and counted on five fields at a 100X magnification. $p < 0.05$ was considered as significant.

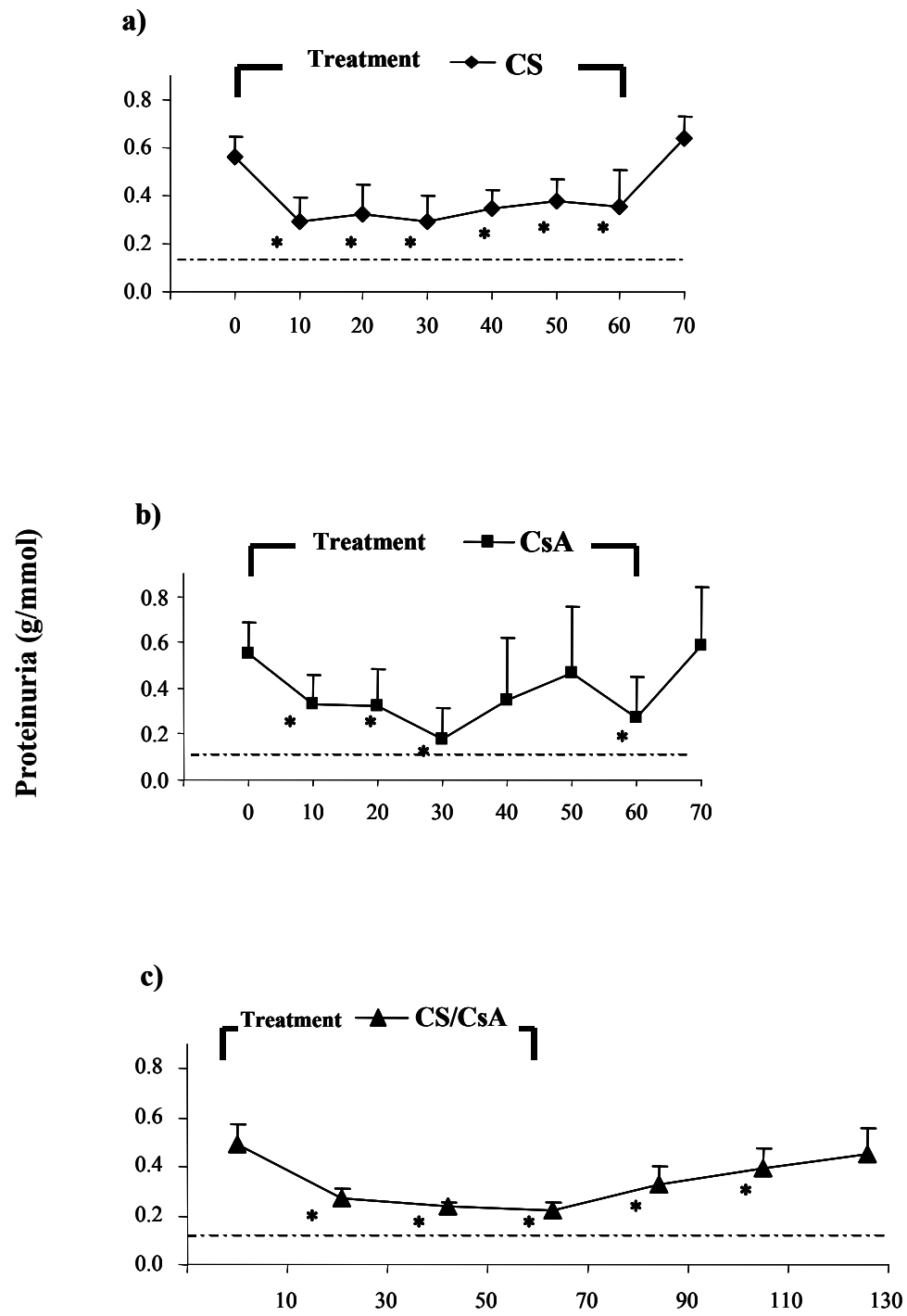


Figure 1

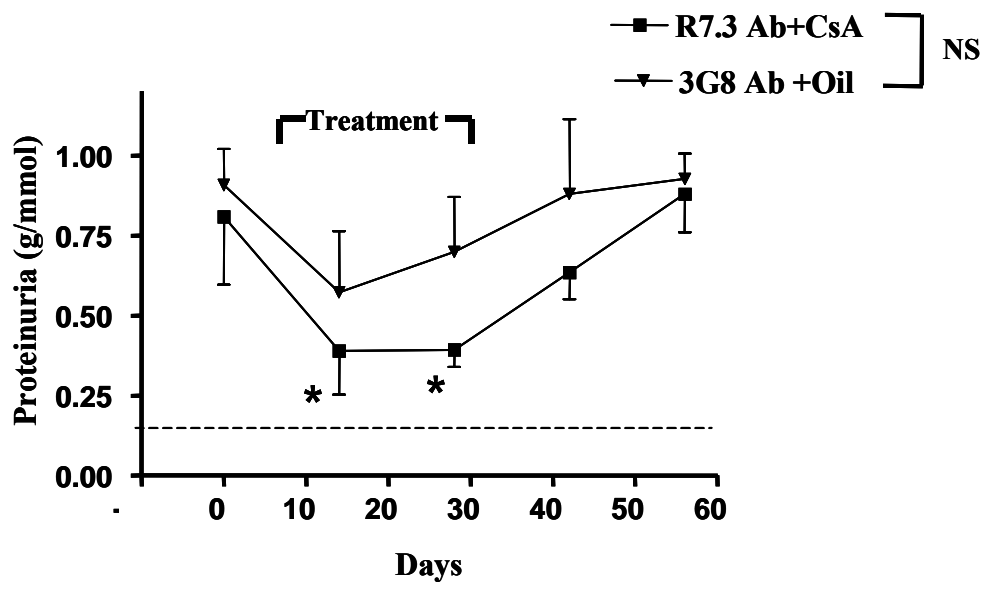


Figure 2

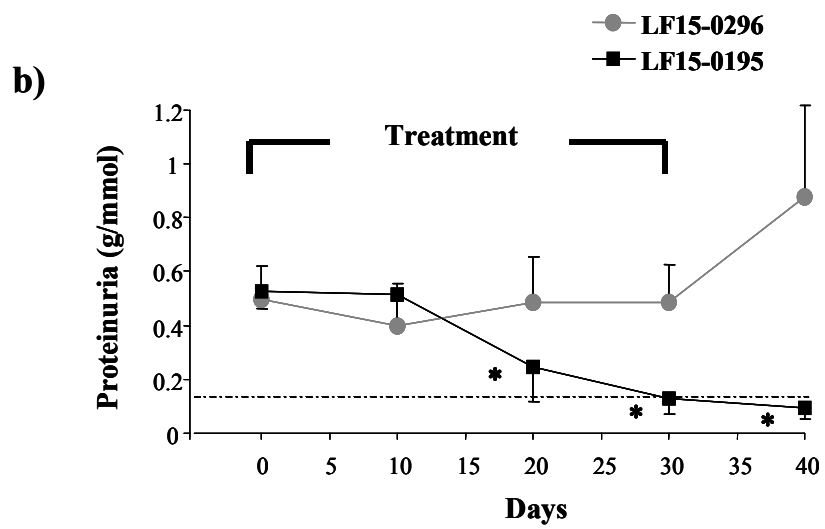
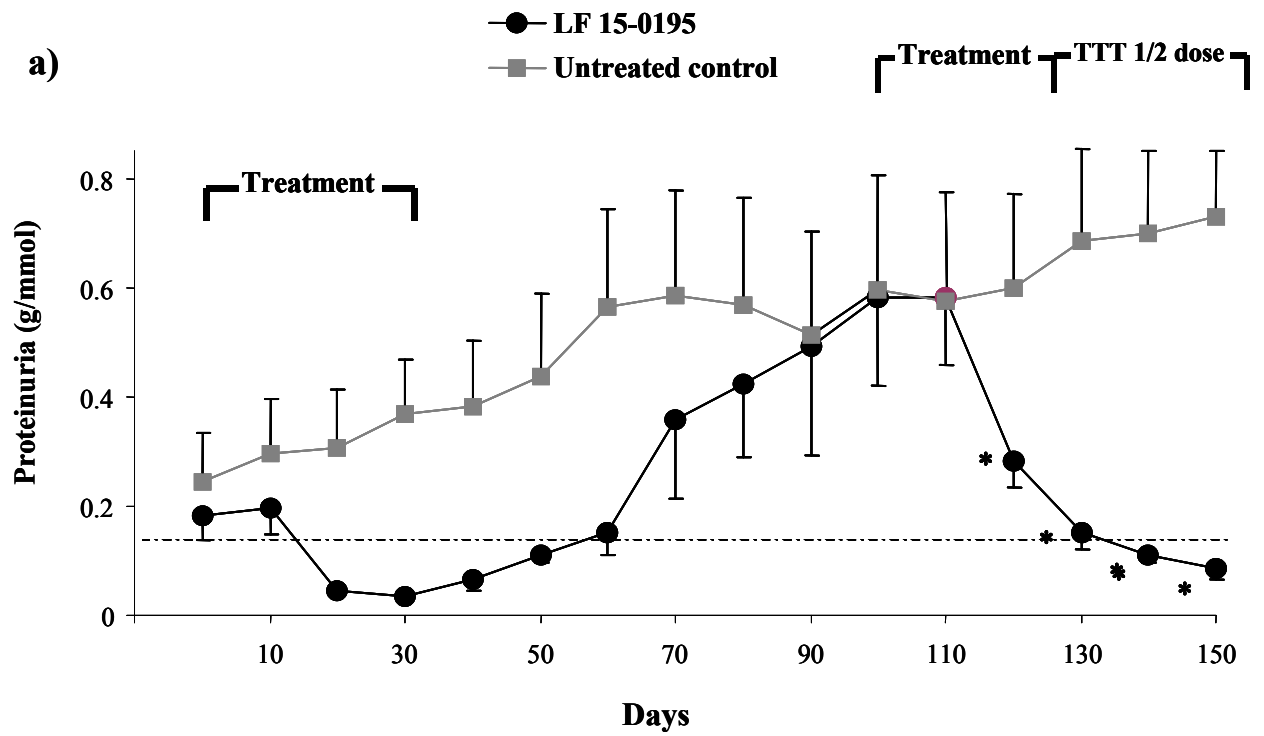


Figure 3

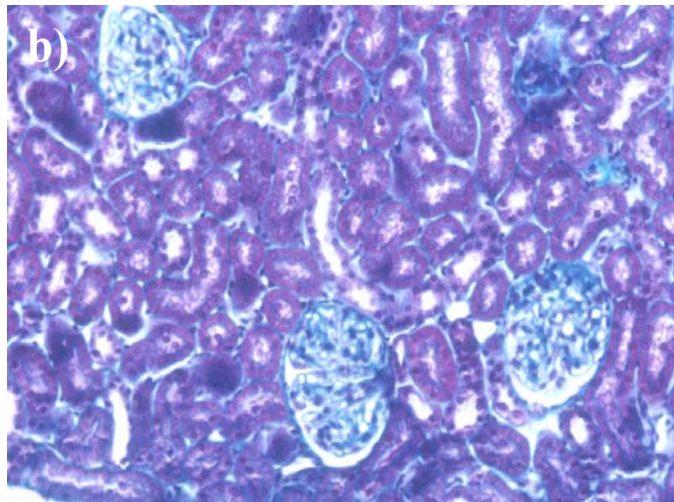
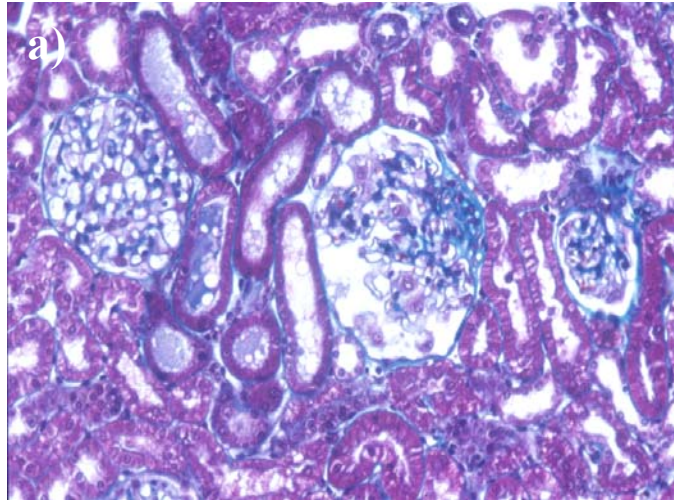


Figure 4

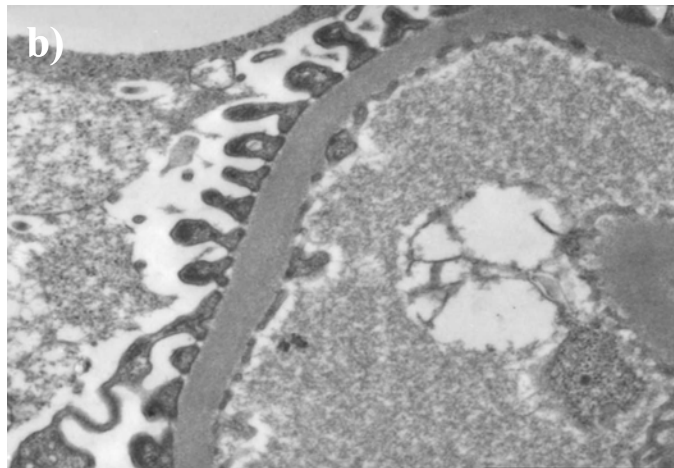
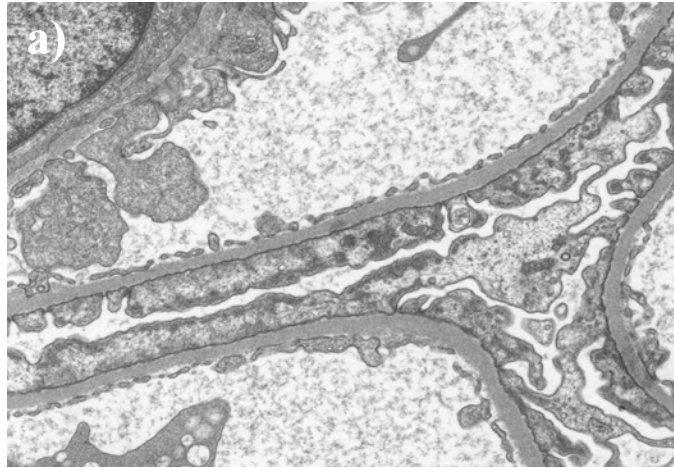


Figure 5

ETUDE DES DESORDRES IMMUNITAIRES DANS LE SYNDROME NEPHROTIQUE IDIOPATHIQUE ET SA RECIDIVE APRES TRANSPLANTATION RENALE

Le syndrome néphrotique idiopathique (SNI) est une glomérulopathie qui évolue dans 5 à 10% vers une insuffisance rénale terminale, nécessitant alors une transplantation. Malheureusement, la maladie initiale récidive chez 30 à 50% des patients transplantés, suggérant l'implication d'un facteur circulant peut être produit par les lymphocytes T.

Dans cette étude, nous avons cherché à mieux caractériser l'implication des lymphocytes T dans le SNI et sa récurrence. Nous avons montré que l'apparition des lésions chez un modèle animal spontané de SNI, était précédée d'une infiltration rénale de macrophages et de lymphocytes Th2, suggérant un rôle de ces populations dans la maladie initiale. L'étude des lymphocytes T chez des patients récidivant leur SNI après transplantation a montré que la récurrence était associée à un phénotype lymphocytaire naïf et à des anomalies de régulation. Un facteur circulant potentiel surexprimé dans le sérum de ces patients et toxique pour les podocytes *in vitro* a également pu être mis en évidence, ouvrant de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Mots clés : syndrome néphrotique idiopathique, récurrence, lymphocytes T, transplantation

STUDY OF IMMUNE DISORDERS IN IDIOPATHIC NEPHROTIC SYNDROME AND ITS RECURRENCE AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION

Idiopathic nephrotic syndrome (INS) is a glomerulopathy that leads in 5 to 10% of cases to end stage renal failure, requiring renal transplantation. Unfortunately, 30 to 50% of patients recur their initial disease after transplantation, suggesting the involvement of a circulating permeability factor probably produced by T lymphocytes.

In this study, we want to better characterize the involvement of T lymphocytes in INS and its recurrence. We showed that a macrophagic and Th2 infiltrate precede the apparition of initial lesions in a spontaneous animal model of INS, suggesting a role for this population in the onset of initial disease. The study of patients with INS recurrence T lymphocytes after transplantation showed that recurrence was associated with a naive phenotype and regulation abnormalities. Moreover, a potential circulating factor over-expressed in recurrent patients serum and toxic for podocytes *in vitro* was identified, opening new insight in the treatment of INS recurrence.

Key words: idiopathic nephrotic syndrome, recurrence, T lymphocytes, transplantation

HERVE Caroline

INSERM U643

30 Bd Jean Monnet

44093 Nantes Cedex

C-Annexe 3

HERVE Caroline

Formation universitaire

Depuis 2002	Doctorat d'Immunologie section Biologie Cellulaire à l'Université de Nantes, Laboratoire d'accueil : INSERM U643 (ex-437) à Nantes Bénéficiaire d'une allocation de recherche du ministère (bourse MESR)
2001-2002	DEA Biologie et Pathologie des Epithéliums à l'Université Paris VII - Denis Diderot, 3 ^{ème} scientifique, mention AB
2000-2001	Maîtrise de Biochimie Analytique , mention virologie à l'Université de Poitiers, mention AB

Expérience Professionnelle

Depuis 2003	Attaché Vacataire d'enseignement à la Faculté de Médecine de Nantes
Depuis 2002	Thèse de sciences à l'INSERM U643 (Nantes - directeur : Pr J.P. SOULILLOU), sous la direction du Pr Jacques Dantal. " <i>Etude de la récurrence après transplantation rénale du Syndrome Néphrotique Idiopathique chez l'homme</i> ".
2001-2002	Stage de DEA à l'INSERM U437 à Nantes (Nantes - directeur : Pr J.P. SOULILLOU), sous la direction du Pr Jacques Dantal « <i>Etude des anomalies lymphocytaires T dans la récurrence du Syndrome Néphrotique Idiopathique</i> ».

Publications

Ludmilla Le Berre, **Caroline Hervé** et al Renal macrophage activation and Th2 polarization precedes the development of nephrotic syndrome in Buffalo/Mna rats. *Kidney Int.* 2005 Nov;68(5):2079-90.

Caroline Hervé, Jacques Dantal. Possible new perspectives for our understanding of nephrotic syndrome recurrence. *Nephrol Dial Transplant.* 2006 Jan;21(1):10-3.

Caroline Hervé et al. Blood T cell repertoire in Idiopathic Nephrotic Syndrome recurrence following kidney transplantation (accepté, *Am J Transplant*).

Caroline Hervé et al. The recurrence of idiopathic nephrotic syndrome after kidney transplantation correlates with T lymphocyte abnormalities (soumis, *AJKD*, 2006)

Ludmilla Le Berre, **Caroline Hervé** et al. LF 15-0195, an analogue of deoxyspergualin, induces a remission of idiopathic nephrotic syndrome in a rat model. (en préparation)

Caroline Hervé et al. The soluble ST2 factor is highly produced in FSGS recurrence and induces podocyte damage (en préparation)