

Glomérulopathie extramembraneuse par immunisation materno-foetale

MOTS CLES : ALLO-IMMUNISATION MATERNO-FOETALE, CD10, ENDOPEPTIDASE NEUTRE, ALLO-EPITOPE, GLOMERULOPATHIE EXTRAMEMBRANEUSE, TOLERANCE SPECIFIQUE.

Anti-CD10 maternal-fetal allo-immunisation

KEY WORDS : MATERNO-FETAL ALLOIMMUNISATION, CD10, NEUTRAL ENDOPEPTIDASE, ALLO-EPITOPE, MEMBRANOUS GLOMERULOPATHY, SPECIFIC TOLERANCE

Pierre Ronco^{1,2,3} and Hanna Debiec^{1,2,3}

¹Unité INSERM UMR S 702

²UPMC Univ Paris 06

³Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Tenon, Paris, France

Caractères : 21262 , figures : 4.

Tirés à part : Pierre Ronco, Service de Néphrologie et Dialyses, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine – 75020 Paris ; Tél. : 01.56.01.66.39 ; Fax : 01.56.01.69.99 ; pierreronco@yahoo.fr

RESUME

Les glomérulopathies extra-membraneuses (GEM) anténatales par allo-immunisation materno-fœtale sont une nouvelle entité due au passage transplacentaire d'anticorps maternels qui se fixent sur les podocytes des glomérules fœtaux et induisent une maladie rénale. Les anticorps pathogènes sont dirigés contre l'endopeptidase neutre (EPN)/CD10. Les mères, apparemment bien portantes, sont génétiquement déficientes en EPN et s'immunisent dès la première grossesse contre l'EPN/CD10 présente sur les cellules placentaires. Cette maladie que nous avons identifiée maintenant dans 5 familles représente la première cause prouvée de pathologie d'organe induite par allo-immunisation materno-fœtale. Les futures grossesses chez les mères immunisées étant à haut risque pour le fœtus, il est impératif de mettre au point des stratégies thérapeutiques visant à éliminer les anticorps pathogènes, ce qui nécessite au préalable l'identification des épitopes reconnus.

SUMMARY

Maternal-fetal alloimmunisation with antenatal glomerulopathies (FMAIG) is a recently described allo-immune disorder, which results from the production of maternal antibodies that cross the placenta, bind to fetal glomerular podocytes, and mediate renal disease. The pathogenic antibodies are directed against CD10/neutral endopeptidase (NEP). The infant's mothers who are apparently healthy are genetically NEP-deficient and thus they become immunized during the first pregnancy against CD10/NEP expressed by placental cells. This disease that we have now identified in 5 families, is the first described organ pathology caused by maternal-fetal allo-immunisation. Because future pregnancies in CD10/NEP-immunized mothers are at high risk for the fetus, antigen-driven therapies aiming at the elimination of pathogenic antibodies are urgently needed, which requires identification of the pathogenic epitopes born by the antigen.

INTRODUCTION

Les mécanismes physiologiques qui permettent à une mère d'être tolérante vis-à-vis de son fœtus semi-allogénique restent mal expliqués. La tolérance n'est que partielle. La production d'anticorps anti-HLA et dirigés contre les antigènes de groupes sanguins est souvent observée en cas de grossesses répétées. Celle-ci est la conséquence d'un processus allo-immun dirigé contre des antigènes paternels.

Pendant la grossesse, l'allo-immunisation peut induire une maladie périnatale. Pendant longtemps, on a considéré que les maladies materno-foetales par allo-immunisation se résument à l'anémie hémolytique, principalement par incompatibilité Rhésus, et à la thrombopénie néonatale, principalement par incompatibilité dans le système HPA-1. Nous avons découvert un nouveau mécanisme de maladie rénale par allo-immunisation materno-foetale contre l'antigène CD10 [endopeptidase neutre (EPN)], [1, 2]. La maladie rénale est une glomérulopathie extramembraneuse (GEM), caractérisée par l'accumulation de dépôts immuns sur le versant externe de la membrane basale glomérulaire (MBG) qui devient épaisse. Ces dépôts sont composés d'IgG, principalement IgG4 et IgG1, d'antigènes qui sont restés longtemps inconnus, et du complexe d'attaque membranaire du complément C5b-9. La formation de dépôts immuns sous-épithéliaux et l'activation du complément sont responsables de l'augmentation de perméabilité du capillaire glomérulaire à l'origine de la protéinurie [3-5]. L'EPN a été le premier antigène identifié comme étant la cible des anticorps néphritogènes chez l'homme grâce à l'étude des GEM anténatales par allo-immunisation materno-foetale.

L'alloimmunisation materno-foetale : un nouveau mécanisme de maladie rénale

Nous avons caractérisé à partir de l'étude de 5 familles et 17 enfants un groupe de glomérulopathies anténatales par allo-immunisation materno-foetale. Dans ces maladies dont

l'acronyme est FMAIG (*Feto-maternal alloimmune antenatal glomerulopathies*), il existe une anomalie du gène *MME* localisé sur le chromosome 3 codant pour la protéine CD10/EPN, qui induit une maladie rénale chez le nouveau-né. Les mères qui ont un défaut d'expression de cette protéine s'immunisent pendant leur grossesse contre l'antigène CD10 hérité du père qui est exprimé par les syncytiotrophoblastes et par les cellules fœtales [6, 7].

Les exons 3 à 24 du gène *MME* codent pour une protéine membranaire constituée de 748 acides aminés, avec un court segment intracytoplasmique N-terminal, un seul domaine transmembranaire, et un large domaine extracellulaire C-terminal, qui porte le site actif. Dans les 5 familles originaires des Pays-Bas, du Portugal, du Maroc, d'Allemagne et d'Italie que nous avons étudiées, nous avons identifié deux mutations tronquantes : l'une localisée dans l'exon 7 du gène (466delC) est détectée dans les 5 familles témoignant d'un probable effet fondateur, l'autre dans l'exon 15 (R448X) n'a été identifiée que dans la famille portugaise (Figure 1). Les mères déficientes sont soit homozygotes pour la mutation 466delC, soient hétérozygotes composites (mère portugaise). Le gène muté est non fonctionnel, en raison d'une instabilité de l'ARN messager ou d'une destruction prématurée de la protéine [2, données personnelles].

Les anticorps anti-EPN induisent la maladie rénale anténatale

Les anticorps anti-EPN produits par les mères déficientes et transférés au fœtus sont responsables de la GEM observée chez les nouveau-nés (Figure 2). Les GEM sont des maladies immunologiques dans lesquelles des anticorps sont produits contre une cible antigénique qui peut être présente à la surface des podocytes glomérulaires. L'EPN apparaît à un stade initial de développement du glomérule, le corps en S, préalable à la formation des capillaires et continue à être exprimée dans les podocytes matures [8, 9]. Elle peut être la cible des anticorps maternels circulants ~~dès le stade post-capillaire quand~~ dès que les glomérules

commencent à être perfusés au stade post-capillaire du développement rénal (Figure 2, partie droite). Les biopsies rénales des patients atteints de GEM anténatale montrent la présence de dépôts volumineux au contact des podocytes dans lesquels l'examen au microscope confocal révèle la présence de l'antigène EPN, d'anticorps de classe IgG, et du complexe d'attaque membranaire du complément C5b-9 (Figure 3).

Les membres des familles portant les mutations du gène *MME* n'ont aucune manifestation rénale à l'exception des enfants nés de mères immunisées [2]. D'autre part, il est possible de transférer la maladie rénale en injectant, à des lapines gestantes, les immunoglobulines de la mère qui induisent une GEM chez les lapereaux, alors que les immunoglobulines du père n'ont aucun effet pathogène. Ces deux observations ~~et le fait que des lapins injectés avec les immunoglobulines maternelles anti-EPN développent une GEM [1]~~, confirment que la maladie observée est due au passage transplacentaire des anticorps, et non pas directement aux altérations génétiques.

La sévérité de la maladie rénale dépend de la réponse allo-immune

Bien que les mutations du gène *MME* aient été détectées chez toutes les mères immunisées, l'expression de la maladie rénale est variable chez les enfants dans les 5 familles analysées. Sa sévérité est déterminée par le taux des anticorps maternels, et aussi par leurs sous-classes. Le développement de la maladie semble nécessiter la production d'anticorps maternels de sous-classe IgG1. Si seulement des IgG4 anti-EPN sont produites, aucune protéinurie n'est observée chez les nouveau-nés [2]. L'absence de manifestations rénales ne peut pas être expliquée par un défaut de passage transplacentaire des IgG4, car à la naissance, les concentrations fœtales et maternelles d'IgG4 et d'IgG3 sont équivalentes, alors que celles d'IgG1 sont plus élevées chez le fœtus et celles d'IgG2 plus importantes chez la mère [10]. Dans la famille italienne, l'atteinte rénale particulièrement sévère avec une anurie prolongée

est à rapprocher de taux très élevés d'IgG1 contrastant avec des taux très faibles d'IgG4 (données personnelles). Les sous-classes d'IgG interagissent de façon différente avec le complément. Les IgG1 et les IgG3 sont capables de fixer le C1q et d'activer la voie classique du complément, alors que les IgG4 qui n'ont pas d'effet sur cette voie, seraient susceptibles d'activer une autre voie d'activation du complément, la voie des lectines, mais les preuves expérimentales manquent encore ~~fixant le mannose~~ [11, 12].

L'allo-immunisation materno-foetale : une cause méconnue de néphropathie à l'adolescence ?

Après la naissance, l'insuffisance rénale et le syndrome néphrotique se sont rapidement amendés chez tous les enfants. Cependant, le patient le plus âgé, a développé de façon retardée à l'âge adulte, une insuffisance rénale chronique sévère nécessitant le recours à la transplantation. Cette insuffisance rénale est probablement la conséquence des lésions de GEM combinées à une réduction anténatale du nombre de néphrons liée au conflit immunologique. A titre d'hypothèse, on peut également évoquer la production par les enfants d'anticorps dirigés contre les idiotypes ou allotypes portés par les IgG maternelles, qui pourrait ~~a pu~~ contribuer à la progression de la maladie rénale. Cette observation suggère qu'une maladie rénale anténatale liée à l'allo-immunisation anti-EPN, peut se manifester sous la forme d'une GEM ou d'une insuffisance rénale inexplicée à l'adolescence ou éventuellement plus tard.

Les sujets déficients en EPN n'ont pas de phénotype : des hommes différents des souris !

L'EPN (*peptidase M13 family*) appartient à une famille de métallopeptidases à zinc qui comporte 7 membres dans le génome humain. Les huit adultes totalement déficients en EPN que nous avons pu explorer dans les 5 familles actuellement identifiées ~~individus déficients~~

en EPN jusque là identifiés sont apparemment en bonne santé. L'absence de phénotype apparent était inattendue, car l'EPN est une ectoenzyme largement distribuée dans l'organisme, qui dégrade des hormones ou médiateurs locaux peptidiques ayant un rôle important comme le glucagon, les enképhalines, la substance P, la neurotensine, l'ocytocine, la bradykinine, les peptides natriurétiques, l'endothéline, ainsi que le peptide β -amyloïde qui est l'agent pathogène de la maladie d'Alzheimer [13]. L'absence de conséquences apparentes du déficit en EPN peut probablement être expliquée par une redondance fonctionnelle avec d'autres enzymes [14, 15]. Les souris déficientes en EPN ont un comportement différent, manifestant entre autres une hypotension, une sensibilité accrue au choc infectieux, une forme précoce de maladie d'Alzheimer, des tumeurs prostatiques, et un goût prononcé pour l'alcool [16].

Reconnaitre et diagnostiquer la déficience en EPN et la glomérulopathie par immunisation materno-foetale

Le diagnostic de glomérulopathie allo-immune materno-foetale doit être évoqué dans les familles où un ou plusieurs enfants naissent avec une insuffisance rénale aigüe ou un syndrome néphrotique inexpliqué, surtout si la symptomatologie néonatale s'aggrave au cours des grossesses successives. Un autre élément d'orientation est la régression rapide des signes rénaux dans le premier mois parallèlement à la disparition des anticorps maternels de la circulation du nourrisson en moins de 6 semaines.

La mise en évidence des anticorps peut être faite aisément par un examen en immunofluorescence indirecte du sérum de la mère sur des sections au cryostat de rein humain normal. La spécificité des anticorps dirigés contre l'EPN peut ensuite être fortement suspectée en comparant les aspects obtenus sur des reins humains, de lapin et de rat. En effet l'EPN n'est pas présente sur les podocytes des murins chez lesquels on la trouve sur les

cellules pariétales de la capsule de Bowman et dans la *pars recta* (segment S3 du tube proximal). En revanche chez le lapin comme chez l'homme, l'antigène est fortement exprimé à la surface des podocytes et dans la bordure en brosse des tubes contournés proximaux [1] (Figure 4A). La confirmation de la nature de la cible antigénique peut ensuite être apportée par l'étude en Western blot utilisant l'EPN recombinante.

La première étape du diagnostic de la déficience génétique chez les mères repose sur une analyse en Western blot des urines ou d'extraits des polynucléaires dans lesquels l'enzyme est normalement présente en abondance (Figure 4B). Le séquençage peut ensuite être limité dans un premier temps aux exons 7 et 15.

Surveillance des femmes allo-immunisées contre l'endopeptidase neutre

La GEM anténatale allo-immune est une maladie sévère qui menace le pronostic vital et rénal du nouveau-né. Les nouveau-nés issus d'une seconde grossesse sont plus sévèrement affectés, présentant à la naissance un syndrome néphrotique majeur, un défaut de fonctionnement du tubule proximal et une ostéopénie de mécanisme inexpliqué. L'aggravation des manifestations cliniques après une seconde grossesse n'est pas inattendue, étant annoncée par une augmentation majeure du titre des anticorps maternels anti-EPN résultant d'une nouvelle exposition à l'EPN placentaire. Contrairement à l'allo-immunisation materno-foetale anti-Rhésus, l'immunisation anti-EPN survient lors de la première grossesse quand le système immunitaire maternel reconnaît comme étrangère l'EPN du placenta, et les grossesses ultérieures représentent des « rappels » d'immunisation [17].

La surveillance des grossesses chez les mères déficientes en EPN repose sur le dosage par ELISA des anticorps anti-EPN des sous-classes IgG1 et IgG4. Ces dosages peuvent utiliser l'EPN recombinante ou les allo-épitopes de l'EPN contre lesquels les anticorps sont produits. En utilisant une librairie de peptides aléatoires, nous avons identifié deux épitopes

conformationnels que nous avons localisés sur les modèles tridimensionnels de la molécule EPN. Toutes les femmes testées ont des anticorps contre ces peptides qui dans des expériences d'inhibition, bloquent une grande partie de l'activité anticorps anti-EPN circulante.

Vers des traitements immunosuppresseurs spécifiques de l'antigène

L'objectif du traitement est de réduire le titre des allo-anticorps maternels le plus tôt possible pendant la grossesse. Jusqu'à présent, nous avons utilisé seulement des méthodes non spécifiques pour diminuer le titre des anticorps anti-EPN. Un traitement hebdomadaire avec de fortes doses d'immunoglobuline intraveineuse (IgIv) commencé dès la 18^{ème} semaine de gestation et associé à des glucocorticoïdes, a effectivement diminué la réponse immune humorale [17]. Les Igiv permettent également, en théorie, de réduire le passage transplacentaire des anticorps en saturant le récepteur Fc néonatal qui joue un rôle important dans le passage des Ig de la mère au fœtus. Dans d'autres affections dans lesquelles un processus d'allo-immunisation materno-foetale est prouvé ou envisagé, le traitement par les Igiv et les plasmaphèreses a été utilisé avec succès : c'est le cas dans les anémies fœtales sévères par alloimmunisation [18] et dans l'hémochromatose néonatale récurrente [19]. Cependant, les dérivés des produits sanguins exposent au risque de contamination infectieuse. D'autres options thérapeutiques ciblant les cellules B, comme le Rituximab (anticorps anti-CD20), ont été utilisées dans les maladies auto-immunes, y compris dans les GEM [20], mais sont contre-indiquées pendant la grossesse.

Un traitement plus spécifique visant à éliminer les anticorps produits ou à empêcher leur production est indispensable. La caractérisation fine d'épitopes pathogéniques sur la protéine EPN aura un impact majeur sur le diagnostic et la thérapie de la GEM néonatale allo-immune.

L'élimination ou la neutralisation des anticorps anti-EPN maternels circulants, en début de grossesse, est nécessaire afin de prévenir le développement de GEM néonatale.

CONCLUSION

Nos observations ont remis en cause le dogme selon lequel les maladies dues à une allo-immunisation materno-foetale seraient restreintes aux éléments figurés du sang. La maladie rénale que nous avons décrite nous a permis d'identifier le premier antigène cible de la surface des podocytes impliqué dans les GEM. La cartographie des épitopes de l'EPN peut permettre des dosages spécifiques des anticorps néphritogènes et une immunodéplétion ciblée des anticorps pathogènes.

REMERCIEMENTS

La recherche des auteurs est financée par de l'ANR-07-Physio-016-01 et FP7 de la Communauté Européenne Theme 1 EUNEFRON.

REFERENCES

1. DEBIEC H., GUIGONIS V., MOUGENOT B., *et al.* Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral endopeptidase antibodies. *N Engl J Med.* 2002, 346, 2053-2060.
2. DEBIEC H., NAUTA J., COULET F., *et al.* Role of Truncating mutations in MME gene in feto-maternal allo-immunization and neonatal glomerulopathies. *Lancet.* 2004, 364, 1252-1259.
3. HÖRL W.H., KERJASCHKI D. Membranous glomerulonephritis (MGN) *J Nephrol.* 2000, 13, 291-316.

4. GLASSOCK R.J. The pathogenesis of idiopathic membranous nephropathy: a 50-year odyssey. *Am J Kidney Dis.* 2010, *56*, 157-167.
5. CUNNINGHAM P.N., QUIGG R.J. Contrasting roles of complement activation and its regulation in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2005, *16*, 1214-1222.
6. METZGAR R.S., BOROWITZ M.J., JONES N.H., *et al.* Distribution of common acute lymphoblastic leukemia antigen in nonhematopoietic tissues. *J Exp Med.* 1981, *154*, 1249-1254.
7. JOHNSON A.R., SKIDGEL R.A., GAFFORD J.T., *et al.* Enzymes in placental microvilli: angiotensin I converting enzyme, angiotensinase A, carboxypeptidase, and neutral endopeptidase ("enkephalinase"). *Peptides.* 1984, *5*, 789-796.
8. PLATT J.L., LEBIEN T.W., MICHAEL A.F. Stages of renal ontogenesis identified by monoclonal antibodies reactive with lymphohemopoietic differentiation antigens. *J Exp Med.* 1983, *157*, 155-172.
9. TAUC M., CHATELET F., VERRAUST P., *et al.* Characterization of monoclonal antibodies specific for rabbit renal brush-border hydrolases: application to immunohistological localization. *J Histochem Cytochem.* 1988, *36*, 523-532.
10. SIMISTER N.E. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine.* 2003, *21*, 3365-3369.
11. CLARK M.R. IgG effect or mechanisms. *Chem Immunol.* 1997, *65*, 88-110.
12. MA H., BECK L.H., SALANT D.J. Membranous nephropathy-associated anti-phospholipase A2 receptor IgG4 autoantibodies activate the lectin complement pathway. *J Am Soc Nephrology.* 2011, *22*, 62A.
13. TURNER A.J., BROWN C.D., CARSON J.A., BARNES K. The neprilysin family in health and disease. *Adv Exp Med Biol.* 2000, *477*, 229-240.

14. IKEDA K., EMOTO N., RAHARJO S.B., *et al.* Molecular identification and characterization of novel membrane-bound metalloprotease, the soluble secreted form of which hydrolyzes a variety of vasoactive peptides. *J Biol Chem.* 1999, 274, 32469-32477.
15. BONVOULOIR N., LEMIEUX N., CRINE P., *et al.* Molecular cloning, tissue distribution, and chromosomal localization of MMEL2, a gene coding for a novel human member of the neutral endopeptidase-24.11 family. *DNA Cell Biol.* 2001, 20, 493-498.
16. RONCO P., DEBIEC H. Molecular pathomechanisms of membranous nephropathy: from Heymann nephritis to alloimmunization. *J Am Soc Nephrol.* 2005, 16, 1205-1213.
17. NORTIER J.L., DEBIEC H., TOURNAY Y., *et al.* Neonatal disease in neutral endopeptidase alloimmunization: lessons for immunological monitoring. *Pediatr Nephrol.* 2006, 1, 1399-1405.
18. COLLINET P., SUBTIL D., PUECH F., VAAST P. Successful treatment of extremely severe fetal anemia due to Kell alloimmunization. *Obstet Gynecol.* 2002, 100, 1102-1105.
19. WHITINGTON P.F., KELLY S. Outcome of pregnancies at risk for neonatal hemochromatosis is improved by treatment with high-dose intravenous immunoglobulin. *Pediatrics.* 2008, 121, e1615-e1621.
20. RUGGENENTI P., CHIURCHIU C., BRUSEGAN V., *et al.* Rituximab in idiopathic membranous nephropathy: a one-year prospective study. *J Am Soc Nephrol.* 2003, 14, 1851-1857.

Déclaration de conflit d'intérêts

Nous déclarons ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec le contenu de cet article.

"Glomérulopathie extramembraneuse par immunisation materno-foetale" communication pour la séance du mardi 20 novembre 2012.

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : Schéma du gène *MME* et des mutations identifiées dans les cinq familles. Le gène comporte 24 exons. Deux mutations ont été détectées dans les exons 7 et 15. La mutation dans l'exon 7 est une délétion d'un nucléotide qui entraîne un décalage du cadre de lecture et l'apparition prématurée d'un codon stop. La mutation dans l'exon 15 introduit un codon stop. Les mutations dans les exons 7 et 15 prédisent une protéine tronquée, qui est rapidement dégradée dans le protéasome.

Figure 2. Mécanisme d'allo-immunisation materno-fœtale et de formation des dépôts extramembraneux. La mère, déficiente génétiquement en EPN, s'immunise pendant la grossesse contre l'EPN exprimée par les cellules placentaires. Les IgG maternelles anti-EPN sont transférées au fœtus à travers le placenta. Puis, les anticorps anti-EPN traversent l'endothélium fenestré (rouge) et la membrane basale glomérulaire (MBG), et atteignent leur cible antigénique, l'EPN (ronds bleus), à la surface des podocytes. La fixation de l'anticorps entraîne une redistribution de l'antigène (« clustering ») suivie du relargage des complexes immuns qui adhèrent à des composants de la MBG. Les complexes immuns augmentent en taille et activent le complément, induisant une cascade d'évènements qui augmentent la perméabilité de la paroi capillaire aux protéines et provoquent l'apparition d'un syndrome néphrotique.

Figure 3. Biopsie rénale de l'enfant, né avec une forme sévère de syndrome néphrotique dû à une GEM caractérisée par des dépôts denses aux électrons (flèches) contenant des IgG et le complexe d'attaque membranaire du complément C5b-9.

Figure 4. Tests diagnostiques de dépistage. A) Détection des anticorps anti-EPN dans le sérum maternel : examen en immunofluorescence indirecte du sérum de la mère sur des sections au cryostat de rein humain normal, de lapin et de rat. B) Diagnostic de la déficience en EPN chez les mères. Western blot des urines et d'extraits des polynucléaires dans lesquels l'enzyme est normalement présente en abondance (père [P] et enfants [E]) et absente chez les mères (M).