



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
جامعة البليدة 1
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologies & Agro-Ecologie

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

*Intérêt du dosage des Auto-anticorps anti phospholipase A2
Récepteur dans le suivi des patients avec la glomérulonéphrite
extra-membraneuse.*

Présenté par

KENFOUD HANANE & MESSIOURI NOUR ELHOUDA

Devant le Jury :

Mme CHELGHOUM H	MCB	SNV, Blida1	Présidente
Mme GUESSAIBIA N	MCA	SNV, Blida1	Examinatrice
Mme ARBAOUI I	MCA	CHU NAFISSA HAMOUD	Promotrice
Mme BENAOUZ F	MAA	SNV, Blida1	Co-Promotrice
Mme SLIMANI M	MAA	CHU NAFISSA HAMOUD	Invitée

Session 2021 / 2022

Remerciements

*Tout d'abord nous remercions **ALLAH**, le tout puissant pour nous avoir guidé vers le chemin du savoir et de la lumière et nous avoir donné le courage, la force et la santé nécessaires de mener à bien ce travail.*

On souhaite adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide pour l'élaboration de ce mémoire.

*Au Président du jury : **Dr CHELGHOUH H.** Docteur à Université Saad Dahleb Blida 01*

*A notre examinatrice : **Dr GUESSAIBIA N.** Docteur à Université Saad Dahleb Blida 01*

*Sans oublier notre Co-promotrice **Dr BENAZOUZ F.** Docteur à Université Saad Dahleb Blida 01*

*A notre promotrice : **Pr Arbaoui Ibtissame.** Néphrologue CHU NAFISSA HAMOUDex : parnet et MCA a la faculté de médecine d'Alger*

C'est avec un grand plaisir que nous nous sommes adressés à vous dans le but de bénéficier de votre encadrement et nous avons été très touchés par l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de nous confier ce travail. Merci pour nous avoir guidés tout au long de ce travail. Merci pour l'accueil aimable et bienveillant que vous nous avez réservés à chaque fois. Veuillez accepter, cher maître, dans ce travail l'assurance de notre estime et de notre profond respect. Vos qualités humaines et professionnelles jointes à votre compétence et votre dévouement pour votre profession seront pour nous un exemple à suivre dans l'exercice de cette honorable mission.

*A tout le service de néphrologie CHU NAFISSA HAMOUD, en particulier **Dr SLIMANI M.** et l'infirmière **Fadhila.***

*A tout le service d'immunologie de l'EPH ROUIBA, en particulier **Dr IGUERGUESDAOUINE H,** la biologiste **ZAIDI N** et **DJANATI A.***

*Notre sincère reconnaissance à nos enseignants du département de biotechnologies
Enfin, nous souhaiterons exprimer nos plus sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail*

Hanane et Nour el houda

Dédicace

*Tout d'abord Je remercie **Allah** pour la force qu'il m'a accordé*

*Je dédie ce modeste travail à **mes parents** que j'aime et qui m'ont toujours soutenu dans n'importe quelle situation.*

*A ma mère **Houria**, Les mots n'expriment pas mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices consentis pour mon instruction et mon bien être. Tu as toujours été mon exemple, la sœur, la conseillère. Tes prières ont été pour moi d'un grand soutien au cours de ce long parcours. En ce jour j'espère réaliser un de tes rêves, sachant que tout ce que je pourrais faire ou dire ne pourrait égaler ce que tu m'as donné et fait pour moi. Puisse Dieu, tout puissant, te préserver du mal, te combler de santé, de bonheur et te procurer longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.*

*A mon père **Abdelhakim**, symbole de bonté, de soutien. Qui a m'encouragé, tu as été et tuseras toujours un exemple pour moi par ta qualité humaine, Ta persévérance et perfectionnisme.*

*Mon frère **Islem** qui malgré la distance reste dans mon cœur et qui me soutient.*

*Mon frère **Aymen** pour tout son soutien et son amour, ainsi qu'à **sa femme** et mes nièces*

Dania et Ania

*Ma sœur **Djamila** et son mari, ainsi qu'à mes neveux **Mimo** et **Racim**.*

*Je n'oublie pas également mes tantes et mon oncle et mes cousines, mes meilleures amies **Zahra**, **Safo** qui étaient toujours présentes à mes côtés.*

*Et bien sur mon binôme **Nour el houda***

À tous mes collègues de la promotion de Master II BPM, je leur souhaite beaucoup de réussite.

À tous qui me connaît de près ou de loin.

Hanane

Dédicace

A MES CHERS PARENTS Meriem et Mohamed

Je vous dois ce que je suis. Vos prières votre amour et vos sacrifices m'ont comblé tout au long de mon existence.

Je vous dédie ce travail qui est le résultat de vos efforts et des lourds sacrifices que vous avez consentis, et que vous continuez à faire.

Quoi que nous fassions, nous n'égalons jamais la tendresse et le dévouement que vous nous avez consacré. J'ai une chance inestimable d'être née dans une famille si aimante et si généreuse.

Chaque ligne de cette étude, chaque mot et chaque lettre vous exprime la reconnaissance, le respect, l'estime et le merci d'être mes parents. Que ce travail vous apporte l'estime, et le respect que je porte à votre égard, et soit la preuve du désir que j'avais depuis toujours pour vous honorer.

*Je voulais rendre hommage à mon cher grand père, son décès m'a laissé un vide horrible dans ma vie, mais cet amour est toujours présent et aussi fort. Chaque souvenir est ancré au plus profond de moi, et sa voix, gravée à jamais. Merci grand-père de m'avoir donné cette force et ce courage dont tu nous parlais tant. Tu nous manques toujours cher grand papa
اللهم أبدله داراً خيراً من داره، وأهلاً خيراً من أهله، وأدخله الجنة، وأعذه من عذاب القبر، ومن عذاب النار.*

A MON CHER FRÈRE SID AHMED

Tu as été depuis ma plus tendre enfance, l'exemple à suivre. Ton soutien moral, tes encouragements m'ont poussé d'être ce que je suis. Je te dédie ce travail en témoignage de mon amour, mon respect et ma reconnaissance.

A MA CHERE SOEUR MAROUA

Je suis plus que chanceuse d'avoir une sœur comme toi. Tu m'as toujours soutenu, compris et réconforté. Merci pour ta tendresse, ton attention, ta patience et tes encouragements. Tu es pour moi l'exemple de persévérance, de courage et de générosité. Puisse ALLAH te préserver du mal, te combler de santé, de bonheur et te procurer une longue vie pour son service. Je t'aime ma belle et je te dédie ce travail en souvenir des meilleurs et des plus agréables moments passés ensemble.

A MES AMIS ZINEB, KHAOULA

Et tous les personnes qui, d'une quelconque manière, m'ont apporté, Merci pour notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.

*Et bien sur mon binôme **HANANE***

Nour el houda

TABLE DES MATIERES

Remerciements	II
Dédicace	III
Liste des figures	VII
Liste des tableaux.....	IX
Liste des abréviations.....	X
Résumé	XII
Summary	XIII
ملخص.....	XIV
Introduction	1
Chapitre I: Rappels bibliographiques	
I. Rappels bibliographiques.....	3
I.1. Rappel anatomo-histologique du rein.....	3
I.1.1. Parenchyme rénal.....	3
I.1.1.1. Néphron.....	3
I.1.1.2. Glomérule.....	4
I.1.1.3. Tubule rénal.....	5
I.1.1.4. Interstitium	6
I.1.1.5. Appareil juxta glomérulaire.....	6
I.1.1.6. Vascularisation rénal.....	6
I.2. Physiologie Rénale	7
I.2.1. Fonction d'épuration et d'excrétion.....	7
I.2.2. Fonction régulatrice	8
I.2.3. Fonction endocrine	9
I.3. Syndrome néphrotique.....	9
I.3.1. Glomérulonéphrite extra membraneuse	9
I.3.1.1. Manifestations Histopathologiques.....	10
I.3.1.2. Physiopathologie de la glomérulonéphrite extra membraneuse	12
I.3.1.3. La physiopathologie de la glomérulonéphrite extra-membraneuse primitive....	13
I.4. Phospholipase A2 récepteur.....	18
I.4.1. Ligands	19
I.4.2. Voies de signalisations	20
I.4.3. Auto-anticorps Anti-PLA2R.....	22
I.5. Intérêt de la recherche des anticorps anti-PLA2R.....	23
I.5.1. Intérêt de dosage des Auto-Anticorps Anti-PLA2R dans le suivi de la GEM primitive :	23
I.5.2. Intérêt pronostique des anticorps anti-PLA2R dans les glomérulonéphrites extra-membraneuses primitives.....	24

Table des matières

Chapitre 2: Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes	26
II.1. Matériel	26
II.1.1. Matériel biologique.....	26
II.1.2. Matériel non biologique	27
II.2. Méthode.....	27
II.2.1. Dosage des auto- Anticorps ANTI PHOSPHOLIPASE A2 Récepteur (anti-PLA2R)	27

Chapitre 3: Résultats et discussion

III. Résultats	32
III.1. Répartition des patients selon le sexe	32
III.2. Répartition des patients selon l'âge	33
III.3. Répartition des patients selon les paramètres biologiques	33
III.3.1. Premier dosage	34
III.3.1.1. Répartition des patients selon le taux de la créatinine.....	34
III.3.1.2. Répartition des patients selon le taux de l'albuminémie	35
III.3.1.3. Répartition des patients selon le taux de la protéinurie de 24h.....	36
III.3.1.4. Répartition des patients selon le dosage d'anti PLA2R.....	36
III.3.2. Deuxième dosage	37
III.3.2.1. Répartition des patients selon le taux de la créatinine.....	37
III.3.2.2. Répartition des patients selon le taux de l'albumine	38
III.3.2.3. Répartition des patients selon le taux de la protéinurie de 24h.....	38
III.3.2.4. Répartition des patients selon le dosage d'anti PLA2R	39
Conclusion.....	43
Références bibliographiques	44
Annexes	49

Liste des figures

Figure 1: Anatomie de rein.....	3
Figure 2: Anatomie détaillé des néphrons et de leurs vaisseaux sanguins.....	4
Figure 3: Glomérule.....	5
Figure 4: Coupe frontale du rein montrant ses artères interlobaires.....	7
Figure 5: Notions de filtration, sécrétion, réabsorption et excrétion.....	8
Figure 6: Classification histologique de la GEM primitive.....	11
Figure 7: Examen d'un glomérule en immunofluorescence à l'aide d'un anticorps Dirigé contre la chaîne gamma des immunoglobulines permettant mettre en évidence des dépôts granuleux d'IgG sur le versant externe de la MBG.....	12
Figure 8: Les trois mécanismes supposés impliqués dans la formation des complexes immuns sub-épithéliaux à l'origine de la GEM d'après.....	13
Figure 9: les voies d'activation du complément.....	15
Figure 10: Auto-immunité dans la néphropathie membraneuse.....	17
Figure 11: Caractérisation des domaines contenant les épitopes reconnus par les anticorps anti- récepteur des phospholipase A2 (PLA2R).....	18
Figure 12: Structure schématique et fonction moléculaire possible de PLA2R1.....	18
Figure 13: Les voies de signalisation du PLA2R.....	22
Figure 14: Colocalisation de PLA2R et des IgG4 sur le versant externe de la membrane basale glomérulaire.....	23
Figure 15: Répartition des patients selon le sexe (%)......	32
Figure 16: Répartition des patients selon l'âge (%)......	33
Figure 17: Répartition des patients selon le taux de la créatinine.....	34
Figure 18: Répartition des patients selon le taux de l'albuminémie.....	35
Figure 19: Répartition des patients selon le taux de la protéinurie de 24h.....	36
Figure 20: Répartition des patients selon le taux de la créatinine.....	37
Figure 21: Répartition des patients selon le taux de l'albumine.....	38
Figure 22: Répartition des patients selon le taux de la protéinurie de 24h.....	39
Figure 23: Centrifugeuse ROTOFIX 32 A.....	52
Figure 24: Incubateur de microplaques IPS.....	53
Figure 25: Laveur de microplaques PW40.....	55
Figure 26: Lecture de microplaques d'absorbance PR 4100 TSC.....	57
Figure 27: Vortex Mixer assistant reamix 278.....	58
Figure 28: Calibrateur 1 (1 ml).....	59
Figure 29: Calibrateur 2 (2 ml).....	59
Figure 30: Calibrateur 3 (1 ml).....	59
Figure 31: Calibrateur 4(1 ml).....	59
Figure 32: Calibrateur 5 (1 ml).....	59
Figure 33: Contrôle positive (2 ml).....	59
Figure 34: Contrôle négative (2 ml).....	60
Figure 35: Conjugué enzymatique (12 ml).....	60
Figure 36: Tampon d'échantillonnage (100 ml).....	60
Figure 37: Solution de lavage (100 ml).....	60
Figure 38: Substrat (12 ml).....	60
Figure 39: solution stop (12 ml).....	60

Liste des tableaux

Tableau 1: Répartition des patients selon le dosage d'anti PLA2R 1^{er} dosage 36

Tableau 2: Répartition des patients selon le dosage d'anti PLA2R 2eme dosage 39

Liste des abréviations

AKT : Sérine/thréonine kinase

APC : Cellule présentatrice d'antigène

C3 : complexe 3

CBSA : Bovine sérum albumine

CI : Complexe immune

CTLD : Domaine lectine de type C

EPO : Erythropoïétine

ERK : Extra-cellular signal-regulated kinase

FNII : Fibronectine de type II

GEM : Glomérulonéphrite extra-membraneuse

GNMP : Glomérulonéphrite membranoproliférative

HSF : Hyalinose segmentaire et focale

IF : Immunofluorescence

IgG : Immunoglobuline de type G

JAK : Janus kinase

LGM : Lésions glomérulaire minimes

LPS : lipopolysaccharide

MAC : Complexe d'attaque membranaire

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MASP : Mamman-associated serine protease

MBG : Membrane basale glomérulaire

MBL : Mamman-binding lectine

Liste des abréviations

MHC : Complexe majeur d'histocompatibilité

MO : Microscopie optique

NF : Facteur nucléaire

PBR : Ponction biopsie rénale

SPLA2R : Phospholipase A2 sécrétoire

PI3 : Phosphatidylinositol-3

PLA2R : Récepteur phospholipase A2

SRAA : Système rénine-angiotensine-aldostérone

STAT : Signal transducer and activator of transcription

TG : Trichrome de Glodner

TGF : Transforming growth factor

THSD7A : Thrombospondine-1 domaine 7A

Résumé

Le rein est un organe clé du maintien de l'équilibre du corps humain, son rôle est de filtrer les déchets toxiques tels que l'urée et la créatinine.

La Glomérulonéphrite extra-membraneuse est une maladie auto-immune rare mais grave qui conduit dans 30% des cas à une insuffisance rénale chronique terminale nécessitant le recours à la dialyse ou la greffe rénale.

L'apport de la ponction biopsie rénale dans la glomérulonéphrite extra-membraneuse (GEM) reste considérable à la fois en matière de diagnostic, de pronostic et aussi dans le choix thérapeutique.

L'identification en 2009 du récepteur de la phospholipase A2 (PLA2R), première cible antigénique podocytaire responsable du développement d'auto-anticorps, a permis de démontrer l'origine auto-immune des GEM dites idiopathiques. On estime que 70% à 80% des patients souffrant de GEM primitive présentent des anticorps anti-PLA2R.

Nous avons observé de manière prospective une série monocentrique réalisée au service de Néphrologie CHU NAFISSA HAMOUD en collaboration avec service d'immunologie de l'EPH ROUIBA, sur une période de 5 mois du 15 janvier au 15 juin, incluant 23 cas de GEM confirmées par la ponction biopsie rénale. L'objectif de notre travail était de valider un test quantitatif (ELISA) permettant de suivre le taux des anticorps anti-PLA2R, pour confirmer leur intérêt dans l'activité de la maladie et l'amélioration de la prise en charge des patients.

Nos résultats sur une importante cohorte de patients sont en accord avec ceux de la littérature les AC anti-PLA2R apparaissent comme d'excellents marqueurs diagnostique, thérapeutique et pronostique de la GEM primitive, leur présence semble corrélée à l'activité de la maladie.

Mots clés : Rein, Ponction biopsie rénale, Glomérulonéphrite extra-membraneuse, PLA2R, Elisa.

Summary

The kidney is a key organ in maintaining the balance of the human body, its role is to filter toxic waste such as urea and creatinine.

Extra-membranous glomerulonephritis is a rare but serious autoimmune disease that leads in 30% of cases to chronic end-stage renal failure requiring dialysis or renal transplantation.

The contribution of renal needle biopsy in extra-membranous glomerulonephritis (EMG) remains considerable in terms of diagnosis, prognosis and also in the choice of treatment.

The identification in 2009 of the phospholipase A2 receptor (PLA2R), the first podocyte antigenic target responsible for the development of auto antibodies, has demonstrated the autoimmune origin of so-called idiopathic GEM. It is estimated that 70% to 80% of patients suffering from primary GEM have anti-PLA2R antibodies.

We have prospectively observed a mono centric series carried out in the Nephrology Department of CHU NAFISSA HAMOUD in collaboration with the Immunology Department of EPH ROUIBA, over a period of 5 months from 15 January to 15 June, including 23 cases of GEM confirmed by renal biopsy. The objective of our work was to validate a quantitative test (ELISA) allowing to follow the rate of anti-PLA2R antibodies, to confirm their interest in the activity of the disease and the improvement of the patients' management.

Our results on a large cohort of patients are in agreement with those of the literature. Anti- PLA2R CAs appear to be excellent diagnostic, therapeutic and prognostic markers of primary GEM, their presence seemsto correlate with the activity of the disease.

Key words: Kidney, renal needle biopsy, Extramembranous Glomerulonephritis, PLA2R, Elisa.

ملخص

الكلى هي عضو رئيسي في الحفاظ على توازن جسم الانسان، ودورها هو تصفية النفايات السامة مثل اليوريا والكرياتينين

التهاب كبيبات الكلى الغشائي هو مرض مناعي ذاتي نادر ولكنه خطير يؤدي في 30% من الحالات إلى فشل كلوي مزمن يتطلب غسيل الكلى أو زرع الكلى.

لا تزال مساهمة ثقب الخزعة الكلوية في التهاب كبيبات الكلى الغشائي كبيرة من حيث التشخيص وأيضاً في الاختيار العلاجي.

أظهر التعرف في عام 2009 على مستقبل الفوسفوليبياز A2 ، وهو الهدف الأول لمستضد الخلية مسؤول عن تطوير الأجسام المضادة الذاتية، أصل المناعة الذاتية .

تشير التقديرات إلى أن 70% إلى 80% من المرضى الذين يعانون من هذا المرض الأولي لديهم أجسام مضادة ضد الفوسفوليبياز A2 .

لاحظنا مستقبلاً سلسلة أحادية المركز تم تنفيذها في خدمة أمراض الكلى نفيسة حمود بالتعاون مع قسم المناعة في مستشفى رويبة، على مدى 5 أشهر من 15 جانفي إلى 15 جوان، بما في ذلك 23 حالة من التهاب كبيبات الكلى الغشائي مؤكدة عن طريق ثقب الخزعة الكلوية. كان الهدف من عملنا هو التحقق من صحة الاختبار الكمي للمقاييس الامتصاصية المناعية للإنزيم المرتبط (ELISA)، لمراقبة مستوى الأجسام المضادة ضد الفوسفوليبياز A2 ، لتأكيد اهتمامهم بنشاط المرض وتحسين إدارة المرضى.

تتفق نتائجنا على مجموعة كبيرة من المرضى مع نتائج الأدبيات تظهر الاجسام المضادة ضد الفوسفوليبياز A2 كعلامات تشخيصية، علاجية و تقييمية ممتازة لالتهاب كبيبات الكلى الغشائي البدائي، ويبدو أن وجودها مرتبط بنشاط المرض.

الكلمات المفتاحية: الكلى، ثقب الخزعة الكلوية، التهاب كبيبات الكلى الغشائي، الأجسام المضادة ضد الفوسفوليبياز A2 ، المقاييس الامتصاصية المناعية للإنزيم المرتبط (ELISA).



Introduction

Introduction

La glomérulonéphrite extra membraneuse (GEM) est une maladie auto-immune rare il est estimé à 1,3 pour 100 000 adultes. Réalisé pour la première fois chez l'homme en 1929, sur la base d'une analyse histologique d'autopsies reins de patients atteints de syndrome néphrotique.

La première étape importante dans le diagnostic de GEM est l'apparition d'une ponction biopsie rénale. Le rein est l'un des derniers organes solides trouvés sur une biopsie à l'aiguille Percutanée, depuis 1955. Depuis, la technologie a bénéficié de nombreuses améliorations elle est liée à l'identification des reins par imagerie.

Les techniques de microscopie électronique et optique quasi synchronisées en 1956 ont permis l'analyse des lésions morphologiques rénales et glomérulaires normales.

En 2009, le diagnostic du GEM a fait des progrès significatifs. PLA2R est caractérisée comme la cible antigénique primaire de la forme idiopathique. Depuis, de nombreuses études ont permis de comparer le titre d'anticorps anti-PLA2R avec l'activité de la maladie et confirmé le rôle majeur des anticorps anti-PLA2R dans la physiopathologie du GEM. **(Seitz - polski,2014)**.

Le suivi de titre des anticorps anti-PLA2R chez les patients atteints de la glomérulonéphrite extra-membraneuse a-t-il un intérêt diagnostique, pronostique ou bien thérapeutique ?

L'objectif de notre travail est de connaître l'intérêt de suivi le titre des anticorps anti-PLA2R chez les patients atteints de la glomérulonéphrite extra-membraneuse.

- Suivant le taux d'albumine, créatinine et la protéinurie des 24 h.
- Déterminant le titre des anticorps anti-PLA2R et les poursuivre.

Chapitre I
Rappels bibliographiques

I. Rappels bibliographiques

I.1. Rappel anatomo-histologique du rein

Les reins localisés au sein du rétropéritoine, dans la partie postérieure de la cavité abdominale, de part et d'autre de la colonne vertébrale. Le rein gauche se positionne plus haut que le rein droit. Chez l'adulte, ils mesurent environ 12 cm de hauteur, 6 cm de largeur et 4 cm d'épaisseur. Chaque rein est surmonté d'une glande surrénale présentant une activité endocrine fondamentale permettant notamment la synthèse d'adrénaline ou l'aldostérone. Le bord interne situé face à la colonne vertébrale présente une cavité appelés sinus rénal dans laquelle passent les vaisseaux sanguins, les nerfs et l'uretère (**Bessaguet et Desmolière, 2020**). Ces différents éléments sortent du rein par le hile rénal (**Figure 1**).

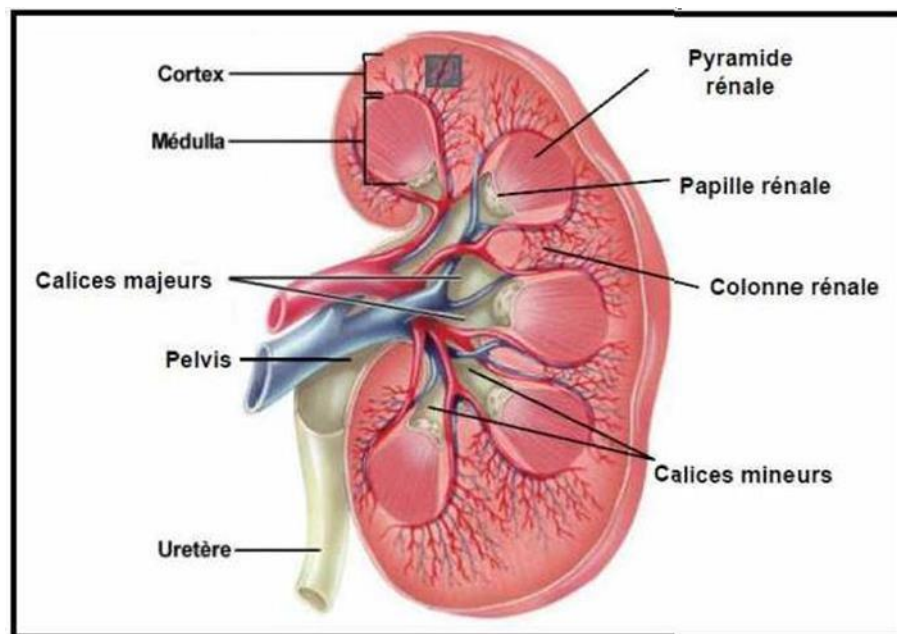


Figure 1: Anatomie de rein (**Chaouchi et Haouas, 2018**)

I.1.1. Parenchyme rénal

I.1.1.1. Néphron

Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein qui élabore l'urine évacuée dans les voies urinaires. Chaque néphron est composé de deux parties : le corpuscule et le tubule urinaire. Chaque rein contient 1 à 1,5 million de néphrons qui ne sont pas strictement identiques (**Figure 02**). Il existe donc une hétérogénéité néphrotique (**Zeller, 2016**).

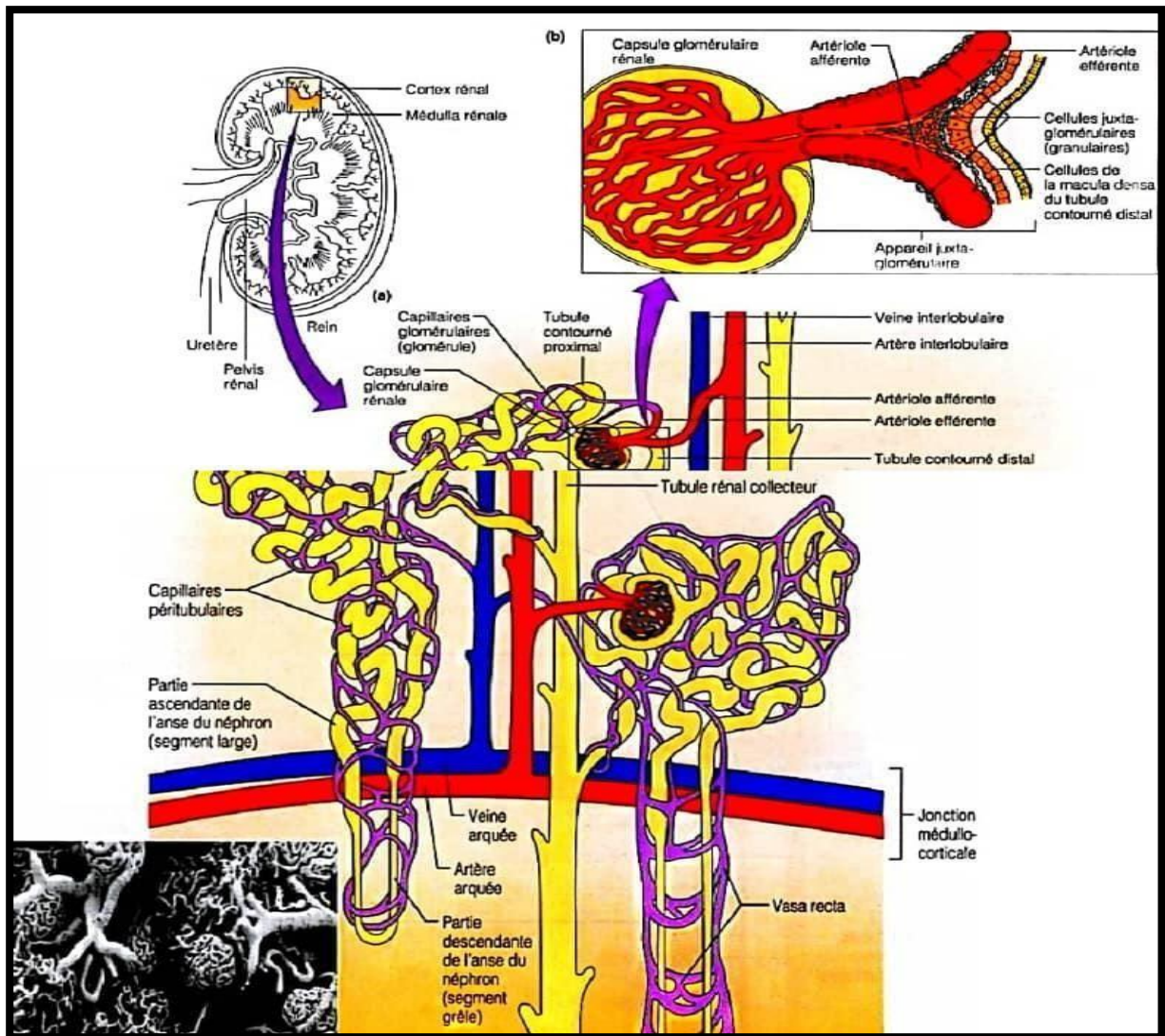


Figure 2: Anatomie détaillée des néphrons et de leurs vaisseaux sanguins (Zeller, 2016)

I.1.1.2. Glomérule

Il est le siège de la filtration initiale du sang arrivant des artéριοles afférentes. L'artéριοle afférente pénètre au pôle vasculaire du glomérule et se divise généralement en cinq branches principales qui, elles-mêmes, se divisent en réseaux capillaires autonomes en s'appuyant sur leur propre tissu mésangial (Daniel, 2008).

Les réseaux glomérulaires sont ensuite drainés par l'artéριοle afférente commune. La division du réseau indépendant donne au peloton glomérulaire une segmentation fonctionnelle, certes peu visibles microscopiquement, mais évidente dans certaines pathologies glomérulaires (hypertrophie et/ou prolifération mésangiale ; glomérulonéphrites segmentaires).

L'ensemble est recouvert ou, plus exactement et plus précisément au feuillet interne de la capsule de Bowman (**Figure 03**).

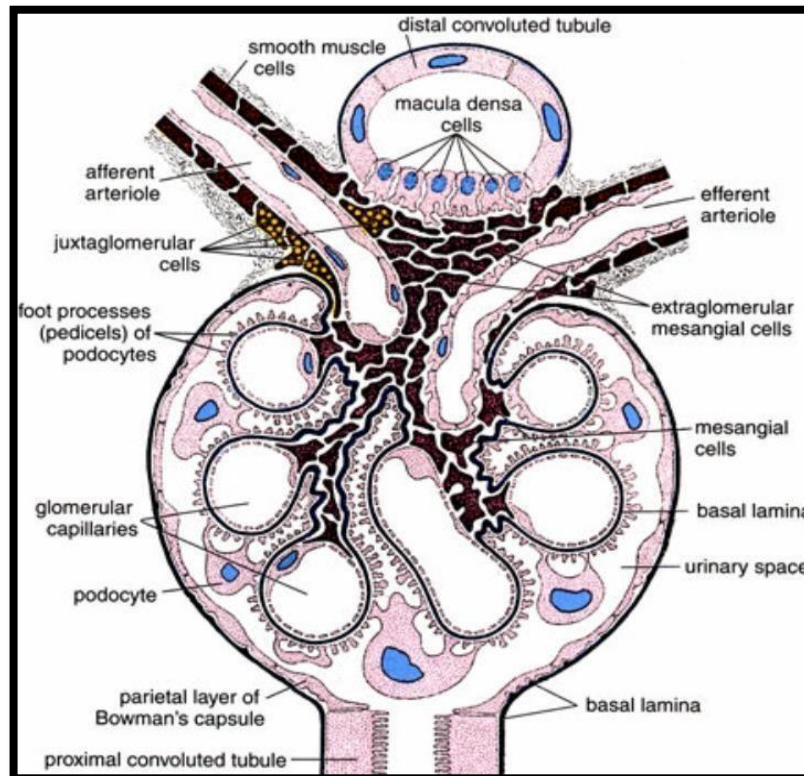


Figure 3: Glomérule (Ross et al, 2008)

I.1.1.3. Tubule rénal

➤ Tube rénal proximal

C'est la portion la plus longue du néphron, et il comprend une portion initiale, le tube contourné proximal ou pars convoluta, situé dans le cortex, et une portion droite ou pars recta, qui se termine dans la médullaire. Les cellules du tube proximal sont aisément reconnaissables en microscopie optique du fait de la bordure en brosse de leur partie luminale.

Cette bordure spécialisée est faite de microvillosités, qui contiennent un riche équipement enzymatique.

➤ ANSE DE HENLE

La portion fine de l'anse de Henlé est constituée de cellules aplaties (1 à 2 microns d'épaisseur), et qui sont peu visibles en microscopie optique (**Callard, 2016**). La branche ascendante large est constituée de cellules cubiques riches en mitochondries, et se poursuit par le tube contourné distal.

➤ **Tube connecteur**

Il relie le tube distal au tube collecteur. Il est difficile à distinguer chez l'homme, et ses cellules sont un mélange de cellules distales et de cellules du tube collecteur. (**Callard, 2016**)

➤ **Tube collecteur**

Les cellules du tube collecteur sont de deux types : les cellules principales et les cellules intercalaires. Les cellules principales constituent le type le plus représenté. Dérivées du bourgeon urétéral, elles ont un aspect clair, car leur cytoplasme est assez pauvre en organites, notamment en mitochondries. Elles sont impliquées dans les transports trans-épithéliaux d'eau, de sodium et de potassium. Les cellules intercalaires transportent les ions H⁺, HCO₃⁻ et le chlore (**Callard, 2016**).

➤ **Tube contourné distal**

Dans le cortex, le tubule redevient tordu, en raison de la distance le séparent de son point d'origine dans la capsule de Bowman, cette partie est appelée tube contourné distal (**Tortora et Angnostakos, 1988**).

I.1.1.4. Interstitium

L'interstitium rénal est constitué par des cellules et une matrice dont la répartition est très différente entre cortex et médullaire. Le volume occupé par l'interstitium dans le cortex est quasiment virtuel, et plus important dans la médullaire. (**Callard, 2016**)

I.1.1.5. Appareil juxta glomérulaire

Il est localisé au pôle vasculaire du glomérule. Il est constitué par la terminaison de l'artériole afférente dont les cellules myoépithéliales contiennent des granules sécrétoires de pro-rénine,

La partie initiale de l'artériole efférente, le mésangial extra glomérulaire avec les cellules du lacis, et la macula densa. (**Callard, 2016**).

I.1.1.6. Vascularisation rénale

Le rein est irrigué par l'artère rénale qui pénètre le hile rénal par un trajet oblique en bas et en arrière. Elle se divise en branches et donne les artères interlobaires, qui pénètrent dans le parenchyme en passant entre les pyramides de Malpighi.

Ces artères, lorsqu'elles arrivent aux bases des pyramides et vont devenir obliques à 90 degré et prennent le nom des vaisseaux arqués. (Chaffajon, 2010)

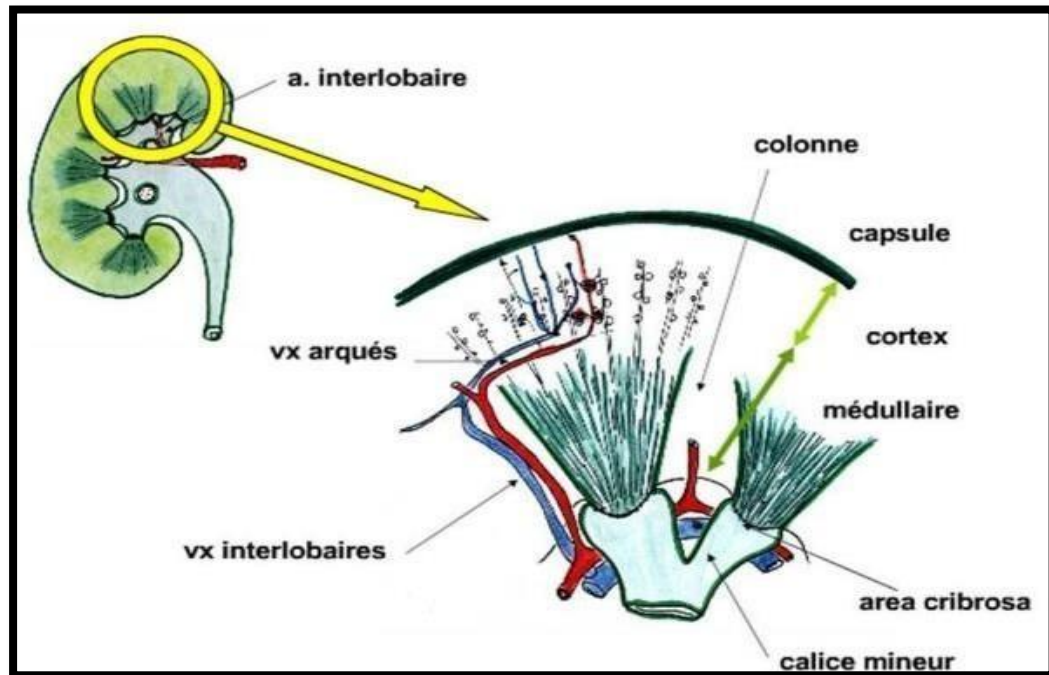


Figure 4: Coupe frontale du rein montrant ses artères interlobaires (Chaffajon, 2010)

I.2. Physiologie Rénale

Si l'on se réfère à l'appareil urinaire, le rôle le plus connu des deux reins consiste en la production de l'urine. Les bassinets et les uretères la drainent vers la vessie, où elle s'accumule jusqu'à son évacuation par l'urètre. Ce ne sont donc que des éléments évacuateurs. Le rein n'exerce pas uniquement une fonction d'épuration et d'excrétion.

Il s'agit également d'un organe régulateur qui assure un équilibre hydrique, électrolytique et acido- basique (pH) du sang.

Enfin, il possède une fonction endocrine qui joue un rôle considérable dans la régulation des métabolismes de l'organisme.

I.2.1. Fonction d'épuration et d'excrétion

Le processus d'épuration a trois étapes : la filtration glomérulaire, la réabsorption tubulaire, et la sécrétion tubulaire.

- 1- Filtration est le mouvement du liquide du sang vers la lumière du néphron. Elle a lieu uniquement dans le corpuscule rénal, où les parois des capillaires glomérulaires et de la capsule de Bowman sont agencées de manière à permettre le flux net de liquide. Le liquide

filtré est appelé filtrat ou urine primitive. Cette dernière qui provient de la capsule de Bowman va être modifiée par réabsorption et sécrétion.

2- Réabsorption est le retour vers le sang des substances contenue dans l'urine primitive.

3- Sécrétion est au contraire le passage des molécules contenue dans le sang vers l'urine primitive, bien que la sécrétion soit comme la filtration glomérulaire, c'est-à-dire le passage des substances du sang vers les tubules (**figure 05**) (**Silverthorn et al., 2007**).

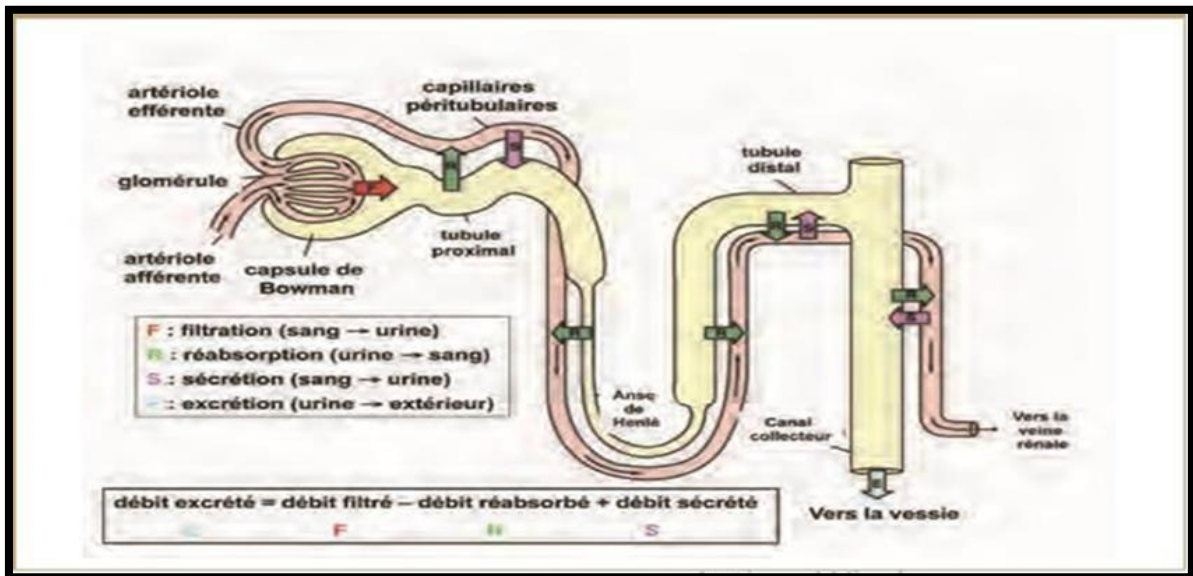


Figure 5: Notions de filtration, sécrétion, réabsorption et excrétion (**Lacour, 2013**)

I.2.2. Fonction régulatrice

La vie des cellules n'est possible que si le milieu intérieur garde une composition constante. C'est le rein qui assure cette constance en contrôlant :

- L'équilibre hydrique : le rein a un rôle fondamental dans l'élimination de l'eau en maintenant le capital hydrique stable dans l'organisme.
- L'équilibre électrolytique : le rein contrôle l'élimination de toutes les substances minérales (sodium ; calcium ; potassium ; chlore) et maintient constante la composition du plasma en ions.
- L'équilibre acido-basique : le métabolisme cellulaire aboutit à la formation continue d'acides. Le rôle du rein est d'éliminer ces excès. (**Ramé et Thérond, 2007 ; Cosserat et al., 2015**).

I.2.3. Fonction endocrine

Les reins produisent des hormones et des vitamines. Les reins fabriquent des hormones comme l'érythropoïétine (EPO). Ceux-ci sont chargés du transport de l'oxygène dans le sang (**Hanba, 2019**). Ils interviennent également dans la synthèse de la vitamine D sous forme active (calcitriol), cette vitamine lipophile intervient dans la régulation de l'homéostasie phosphocalcique. Elle stimule l'absorption de calcium et de phosphore au niveau digestif, leur réabsorption au niveau rénal et favorise l'accrétion osseuse (**Bessaguet et Desmoulière 2020**). Le rein sécrète la rénine, hormone fait partie du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), qui régule finement le volume extracellulaire et la pression artérielle. C'est une enzyme qui permet le clivage de l'angiotensinogène hépatique en angiotensine I. L'angiotensine II est ensuite formée par clivage de l'angiotensine I par l'enzyme de conversion. (**Hanba 2019 ; Anthony et Killeen 2017 ; Bessaguet et desmoulière, 2020**).

I.3. Syndrome néphrotique

Le syndrome néphrotique (SN) est défini par une protéinurie supérieure à 3 g/j s'accompagnant d'une hypo albuminémie inférieure à 30 g/l. Pour beaucoup d'auteurs, le SN est mieux défini par une protéinurie abondante supérieure à 3 g/j, sans mention de valeurs seuils d'albuminémie et de protidémie qui sont arbitraires, ce d'autant que les complications ou conséquences de ce syndrome sont pour la plupart liées à la protéinurie. La physiopathologie de ces complications est complexe et encore incomplètement décrite malgré des progrès importants ces dernières années (**ducloux , 2011**) ; ils peut s'observer dans le cadre de plusieurs entités histologiques de mécanismes physiopathologiques distincts : Lésions glomérulaires minimes (LGM), Hyalinose segmentaire et focale (HSF) , Glomérulonéphrite membranoproliférative (GNMP) , Néphropathie à immunoglobulines A (N-Ig A) , Glomérulonéphrite extra membraneuse (GEM) .

I.3.1. Glomérulonéphrite extra membraneuse

La GEM est une maladie auto-immune rénale rare qui représente la première cause de syndrome néphrotique de l'adulte.

Le diagnostic de GEM repose exclusivement sur la biopsie rénale. Les signes histologiques de la GEM sont caractéristiques : il existe un épaissement diffus de la membrane basale glomérulaire sans prolifération. La coloration argentique de Jones montre des expansions, ou spicules, qui se projettent à partir de la membrane basale glomérulaire pour

s'étendre autour de dépôts immuns. L'expansion de la membrane basale glomérulaire est mieux vue en microscopie électronique où l'on retrouve des dépôts denses à localisation sous-épithéliale pathognomoniques, un effacement extensif des pédicelles du podocyte recouvrant la membrane basale avec un effondrement du cytosquelette d'actine et la rupture des fentes de filtration entre les pédicelles. L'immunofluorescence montre des dépôts granulaires dans la paroi des capillaires glomérulaires contenant des IgG et du C3.

La GEM peut être idiopathique ou secondaire à différentes pathologies. Actuellement le diagnostic de GEM primaire se pose après avoir éliminé l'ensemble des causes de GEM secondaires. (Seitz Polski, 2014).

I.3.1.1. Manifestations Histopathologiques

L'interprétation diagnostique, étiologique et pronostic d'une PBR repose sur l'analyse des lésions glomérulaires et de l'architecture globale du tissu. Elle se fait en trois temps, avec une lecture en microscopie optique (MO) à divers grossissements et différentes colorations, une étude des dépôts de complexes immuns en immunofluorescence (IF) et une analyse en microscopie électronique (ME). (Bourquin et al, 2013)

a- Examen en microscopie optique :

En MO, la paroi capillaire apparaît épaissie et rigide et des dépôts immuns extra membraneux peuvent être visible grâce à des colorations spéciales (trichrome, argentation).

Classification histologique :

- **Stade 1** : il y'a pas d'anomalie de la membrane basale glomérulaire visualisée ; néanmoins, les parois capillaires sont plus rigides en imprégnation argentique. (Pozdzik et al, 2015)
- **Stade 2** : tous les glomérules ont un épaississement diffus et régulier des membranes basales glomérulaires du fait de la présence de dépôts immuns qui se colorent en rouge orange au trichrome de Goldner (TG). Une caractéristique typique de ce stade est la formation d'excroissances de la MBG dénommées spicules sur son versant externe, autour des dépôts immuns ; elles sont mises en évidence en imprégnation argentique. Ces excroissances confèrent à la MBG un aspect typiquement hérissé et témoignent de l'accumulation d'un nouveau matériel membranaire produit par les podocytes. (Figure 06)
- **Stade 3** : les dépôts extra membraneux sont entièrement recouverts par le matériel membranaire et se trouvent au sein d'une nouvelle MBG nettement épaissie.

- **Stade 4** : les glomérules ont des parois capillaires épaissies qui sont associées fréquemment à des lésions fibreuses segmentaires. Les dépôts immuns ne sont plus discernables même en IF.

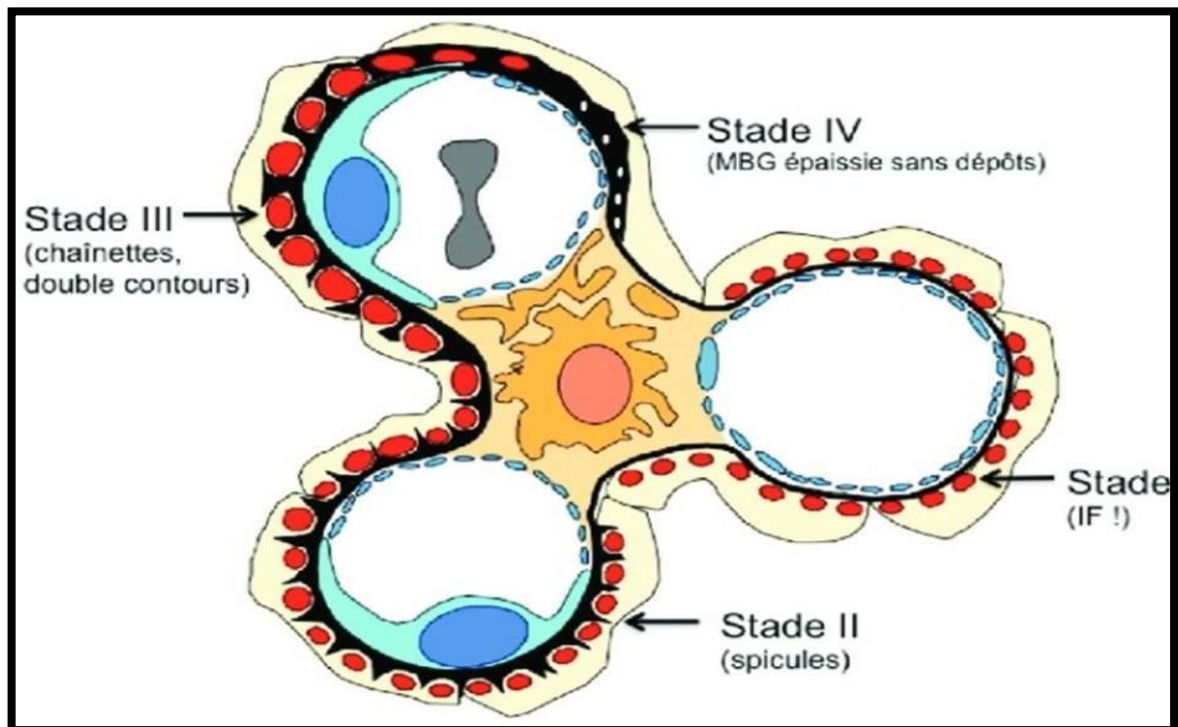


Figure 6: Classification histologique de la GEM primitive (Pozdzik et al, 2015)

b-Examen en immunofluorescence :

Celle-ci montre des dépôts extra membraneux (sur le versant externe de la MBG, aux pieds des podocytes). Ces dépôts sont constitués de complexes immuns d'IgG-antigène cible. L'examen met aussi fréquemment en évidence des dépôts de fraction C3 du complément. (Anglicheau et al, 2016).

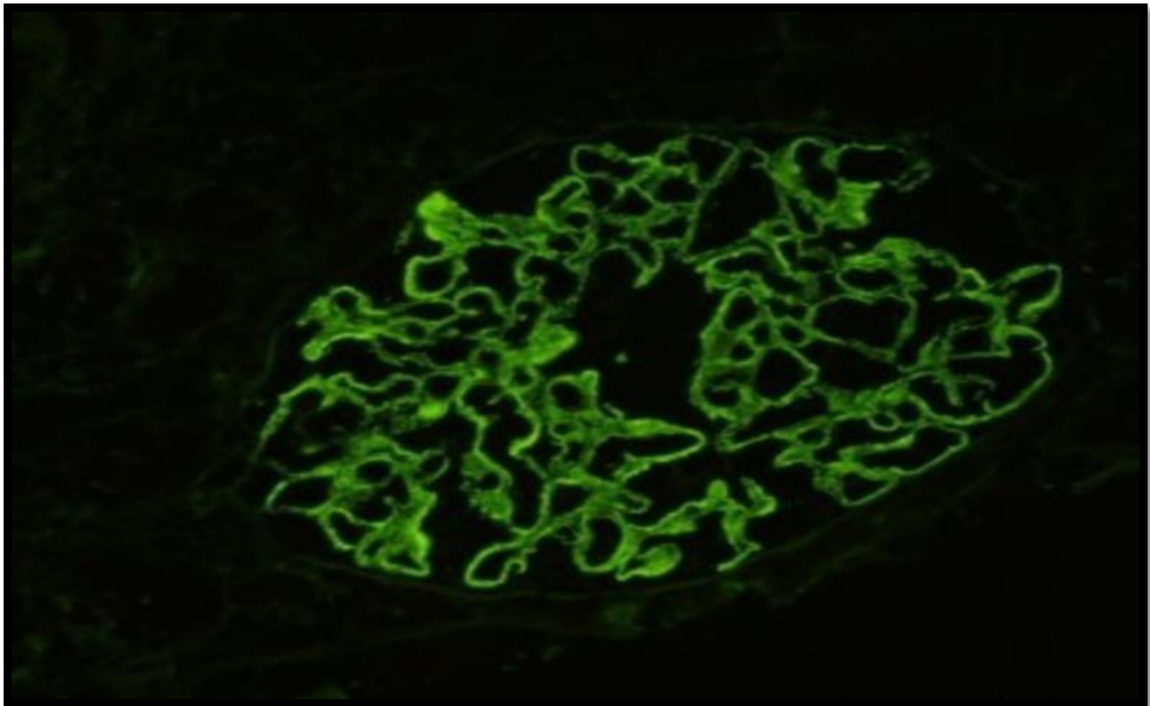


Figure 7: Examen d'un glomérule en immunofluorescence à l'aide d'un anticorps Dirigé contre la chaîne gamma des immunoglobulines permettant mettre en évidence des dépôts granuleux d'IgG sur le versant externe de la MBG. (Anglicheau *et al*, 2016)

I.3.1.2. Physiopathologie de la glomérulonéphrite extra membraneuse

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la formation des dépôts d'IgG le long de la membrane basale glomérulaire :

-Des complexes immuns circulants formés en amont viendraient se déposer dans la membrane basale glomérulaire du fait de sa fonction de filtre (Panel A).

-Des anticorps pré-formés viendraient se fixer in situ sur des protéines podocytaires (Panel B).

-Un antigène viendrait se « planter » dans la membrane basale glomérulaire avec formation des complexes immuns in situ Panel (C). (Seitz-Polski, 2017)

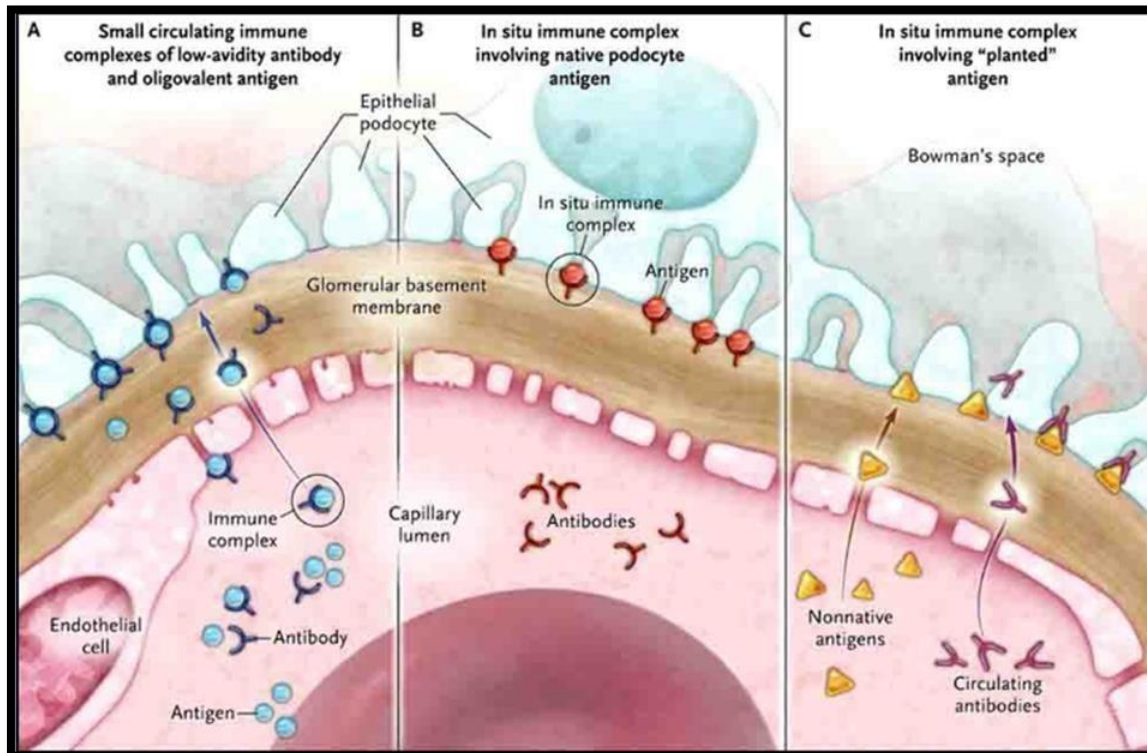


Figure 8: Les trois mécanismes supposés impliqués dans la formation des complexes immuns sub-épithéliaux à l'origine de la GEM d'après (Glasscock, 2009).

- **Antigène glomérulaire intrinsèque, la mégaline** : dans la Néphrite de Heymann (Seitz- Polski et al, 2017)

- Endopeptidase neutre** : dans la GEM néonatale a été décrit en 2002, consécutif à une immunisation materno-fœtale dirigée contre l'endopeptidase neutre présente à la surface des podocytes, la mère de l'enfant présentait un déficit constitutionnel en endopeptidase neutre. (Dahan, 2016).

- Pla2r** : dans la GEM primitive

- **Thrombospondine-1 domaine 7A (THSD7A)** : le second antigène podocytaire impliqué dans les GEM auto-immunes de l'adulte. (Tomas et al, 2014).

I.3.1.3. La physiopathologie de la glomérulonéphrite extra-membraneuse primitive

La GEM est caractérisée par la présence de dépôts de CI in situ au niveau de la MBG dirigé contre des antigènes.

I.3.1.3.1. À l'échelle cellulaire

➤ Réponse immune innée

Cascade de complément sérique, une partie de l'immunité innée nécessaire à la protection de l'hôte contre les agents pathogènes envahissants, est également un médiateur de diverses formes des maladies et de blessures. Il est activé par des voies classiques, lectines et alternatives. (Cybulsky et al, 2005)

• Voie classique

L'activation de la voie classique est initiée à la suite de la fixation à une cible du complexe C1 constitué d'une molécule de reconnaissance, le C1q, et deux sérines protéases, C1r et C1s1. Le C1q peut se lier à une grande variété de cibles, dont les complexes immuns, par les régions constantes des immunoglobulines de classe M ou G, mais également des ligands endogènes comme les pentraxines et d'autres molécules qui sont exposées à la surface des cellules apoptotiques. (Daugan et al, 2017)

• Voie des lectines

La voie des lectines présente des similitudes avec la voie classique. La protéine de reconnaissance est ici une protéine MBL (mannan-binding lectin) ou une ficoline, qui vont initier cette voie par leur liaison à certains carbohydrates des micro-organismes et des immunoglobulines à leur niveau de glycosylation (Couser et al, 2012) parmi ces immunoglobulines figurent les IgG4 qui ont, chez les patients de GEM primitive. MBL et ficolines ont une structure proche de celle du C1q et peuvent s'associer à des protéases à sérine, dénommées MASP-1, -2 et -3 (mannan-associated serine protéase) qui, elles-mêmes, présentent de fortes homologies avec les protéines C1s et C1r11.

Les complexes MBL/MASP-2 ou ficoline/MASP-2, dont les interactions sont également calcium-dépendantes, sont capables d'activer le complément. En effet, MASP-2 possède une activité catalytique similaire à celle de C1s, lui permettant de cliver les protéines C4 et C2 et

Donc de former une C3 convertase identique à celle issue d'une activation par la voie classique. (Frimat, 2013)

- **Voie alterne**

La voie alterne est activée par des éléments constitutifs de la paroi des agents microbiens :

Lipopolysaccharides (LPS), le zymosan (levures) et les endotoxines bactériennes, des virus ou des cellules infectées ou transformées. Les interactions des protéines de la voie alterne aboutissent à la formation de la C3 convertase alterne. (Miloudi, 2016)

Les trois voies d'activation du complément, distinctes au niveau de leur initiation, mais convergeant vers un point commun : le clivage de C3 et la formation du complexe d'attaque membranaire.

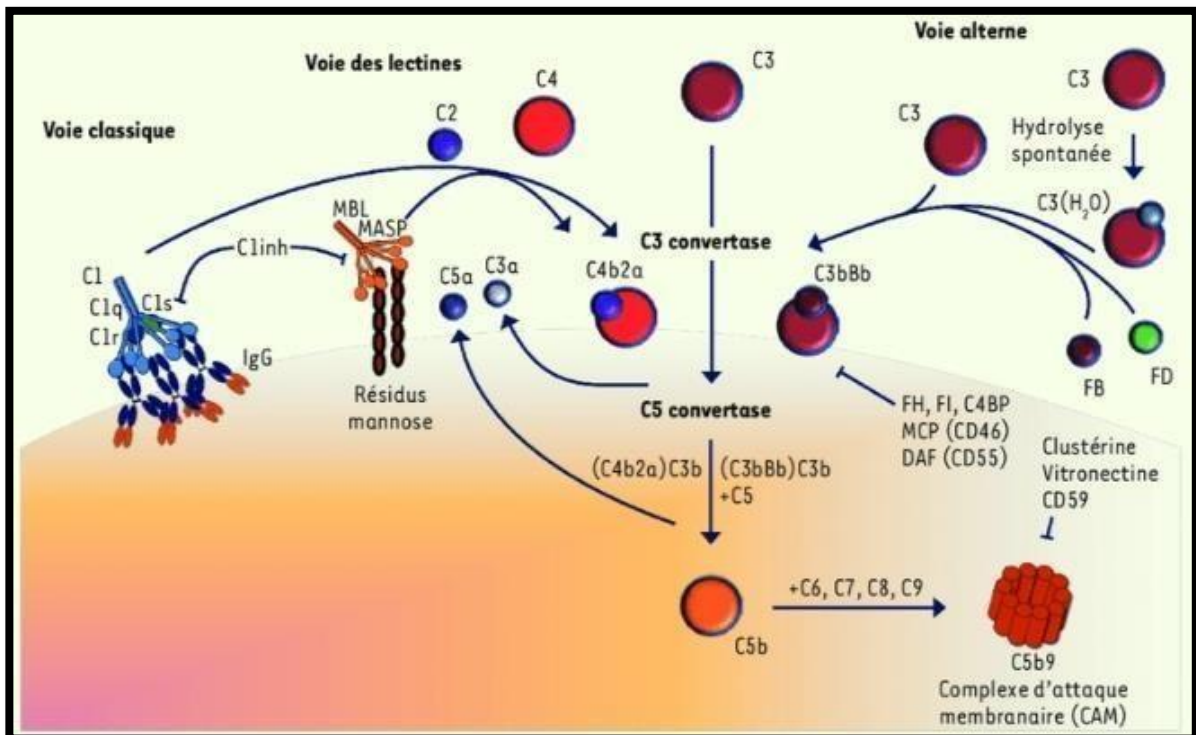


Figure 9: Les voies d'activation du complément (Daugan et al,2017)

- MAC C5b-9 s'insère dans la membrane plasmatique à la base du pied du podocyte. Ceci entraîne une cascade d'évènement mal-adaptés causant un influx de calcium, une augmentation de la génération des métabolites d'acide arachidonique et la production de radicaux libres oxygénés.

Mécanismes de défense contre l'infection

- Lyse des agents infectieux (composants C5 à C9 formant les complexes d'attaque de la membrane : activité cytolytique)
- Opsonisation (dépôts de C3b sur la surface activatrice)
- Activation cellulaire menant à la réaction inflammatoire : production de nombreux fragments de clivage au cours des premières étapes de l'activation (anaphylatoxines : C3a

et C5a) transport et élimination des complexes immuns

- Permet le maintien des complexes Ag-Ac en solution

Modulation de la réponse immune : interface entre l'immunité innée et acquise via les récepteurs membranaires. (**Dragon-Durey, 2009**)

➤ **Réponse immune adaptative :**

Deux voies potentielles menant à l'expansion clonale des cellules B en cellules plasmiques sécrétant des anticorps contre le récepteur de phospholipase A2 de type M (PLA2R) et générant des cellules B mémoire.

-Tout d'abord, antigène PLA2R se lie aux cellules B auto-réactives, est internalisé et fragmenté, puis présenté aux cellules T helper par le biais de l'histocompatibilité majeure complexe (MHC) récepteur de classe II. Les cellules T stimulées libèrent des cytokines alimentant les cellules B pour stimuler la division et la différenciation à cellules plasmiques et la production d'anticorps et les cellules B de mémoire. Ces signaux de cytokine peuvent également diriger la recombinaison de classe à l'IgG distinct sous-classes entraînant des anticorps IgG4.

- Deuxièmement, les cellules présentant des antigènes (APC) reconnaissent l'antigène PLA2R ou l'agent microbien (via moléculaire mimétisme), puis traiter et présenter des fragments PLA2R / microbes sur les molécules de classe II MHC sur leur surface. Lorsque les APC présentent PLA2R dans la présence de co-stimulateurs, les lymphocytes T auto-actifs sont activés plutôt que rendus tolérants. Les lymphocytes B sont activés en dehors des follicules par la combinaison de cellules antigéniques et de cellules T. Après la migration vers les centres germinaux, les cellules B interagissent avec les cellules T auxiliaires, conduisant à la prolifération et à la survie. Certaines des cellules B subissent la différenciation des cellules B de mémoire ou des cellules plasmiques et quittent le centre germinale. Si les cellules T régulatrices (Tregs) rencontrer leur auto-antigène sur un APC, ils sécrètent des cytokines inhibitrices telles que l'interleukine (IL)-10 et transformant le facteur de croissance (TGF)- β , qui inhibent les cellules T auto-réactives environnantes. (**Van de logt et al, 2019**)

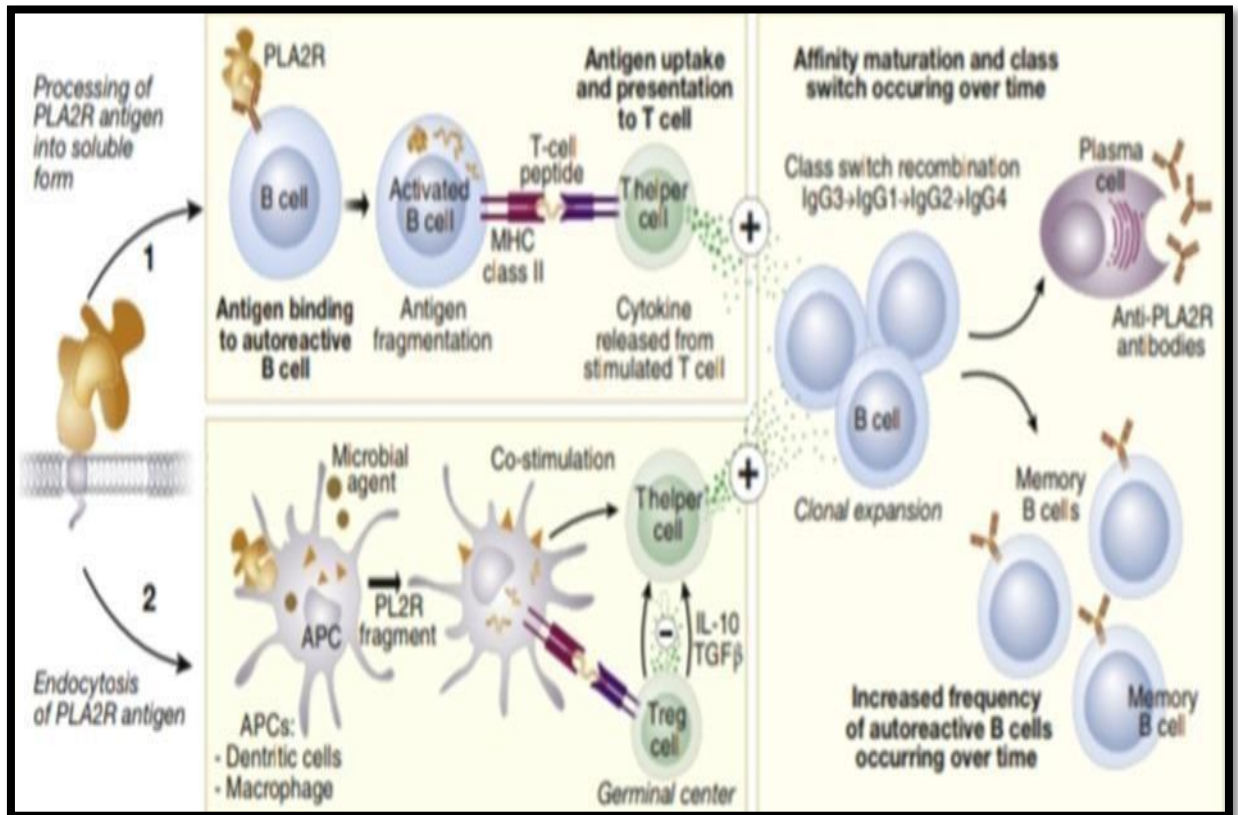


Figure 10: Auto-immunité dans la néphropathie membraneuse (Van de logt *et al*, 2019)

I.3.1.3.2. A l'échelle moléculaire :

Le nouveau concept physiopathologique de GEM allo-immune a stimulé la recherche d'autres antigènes humains podocytaires susceptibles de servir de cibles à des anticorps pathogènes circulants chez l'homme, ouvrant ainsi la voie à l'identification en 2009 du premier antigène (PLA2R) responsable de la GEM primitive chez l'adulte. Cette publication est importante car elle apporte la preuve que la GEM primitive chez l'adulte est, en fait, une maladie auto-immune associée à la production d'anticorps anti-PLA2R. (Pozdzik *et al*, 2015).

Il réagit au PLA2R dénaturé et non réduit sur Western blot, indiquant que l'épitope réactif est conformationnel. Des études antérieures (Hong Tang *et al*, 2022) ont déterminé que l'épitope conformationnel dominant se trouve à l'extrémité N-terminal de PLA2R englobant la région Cysr-CTLD1. Il a également été rapporté que quatre épitopes à domaine unique (CysR, CTLD1, CTLD7 et CTLD8) existent dans la grande région extracellulaire de PLA2R, et que la propagation d'épitopes se produit parmi ces épitopes associés à la progression de la maladie.

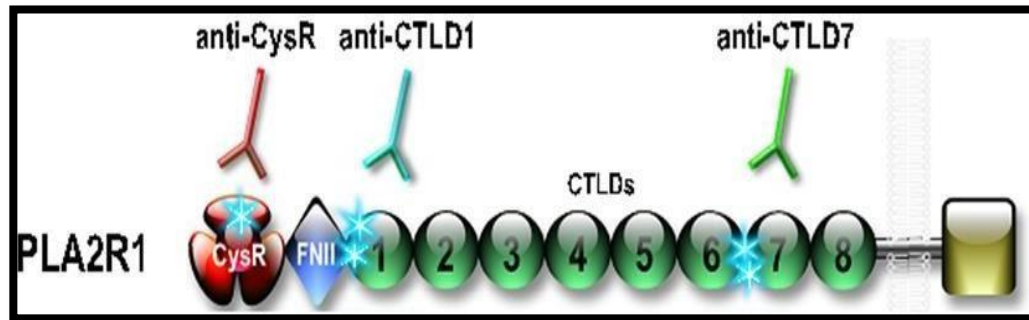


Figure 11: Caractérisation des domaines contenant les épitopes reconnus par les anticorps anti- récepteur des phospholipase A2 (PLA2R) (Seitz-Polski et al,2017)

I.4. Phospholipase A2 récepteur

En 2009, Beck et al ont identifié le PLA2R comme cible auto-antigénique dans une étude portant sur une cohorte de 37 patients avec 70 % de positifs (Miot et al, 2017).

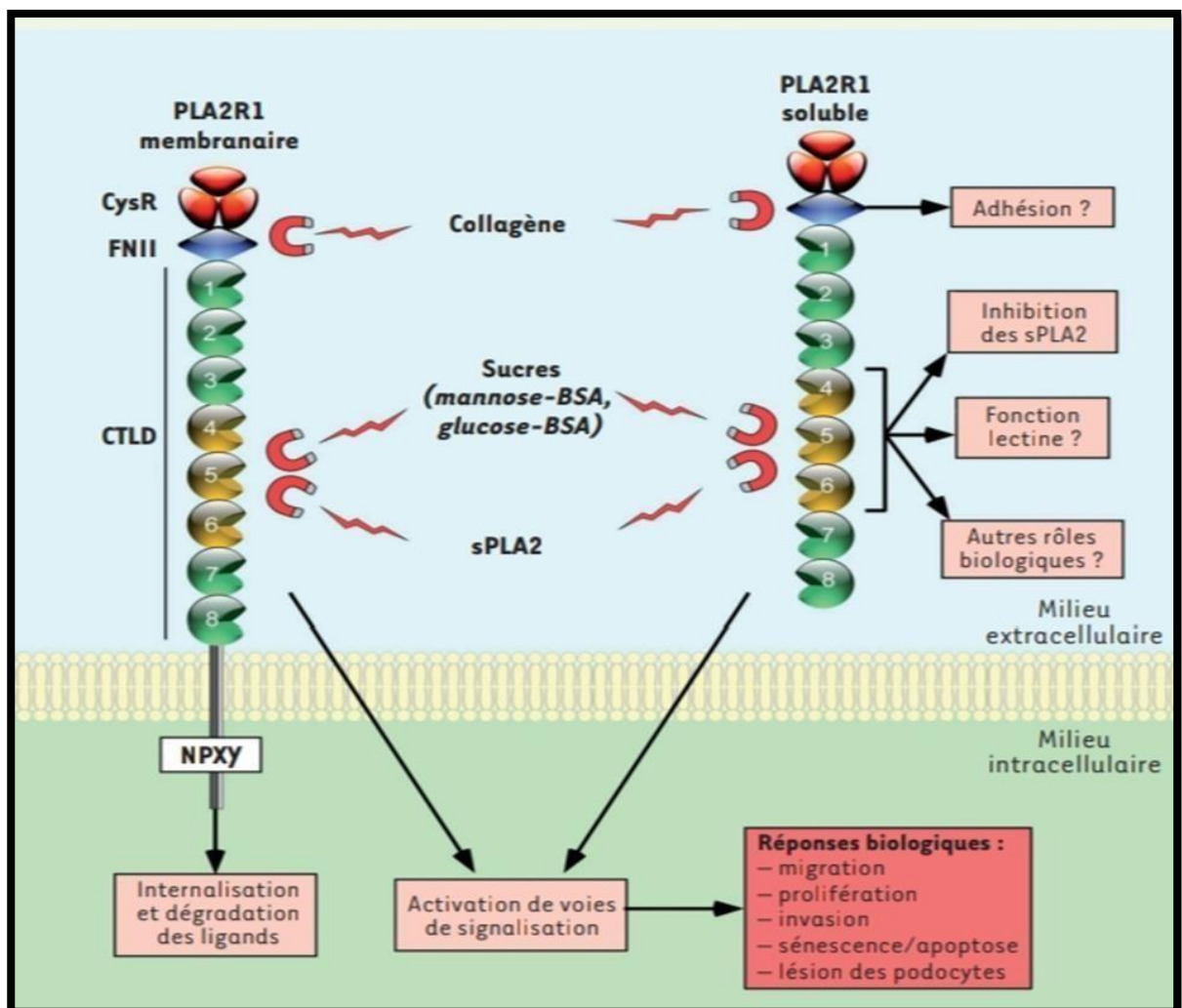


Figure 12: Structure schématique et fonction moléculaire possible de PLA2R1.(Miot et al,2017)

PLA2R (phospholipase A2 receptor) est une glycoprotéine transmembranaire de 180-kDa appartenant à la superfamille des lectines de type C (**Figure 12**). Il présente une structure complexe composée de 10 domaines extracellulaires (représentant 95 % de la protéine), d'un seul segment transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique d'une quarantaine d'acides aminés contenant un motif consensus d'endocytose NPXY. Depuis son extrémité amino-terminale extracellulaire, on distingue une région riche en cystéine (CysR), un domaine fibronectine de type II (FNII) et huit domaines lectine de type C distincts (CTLD). Trois autres récepteurs ont la même structure et forment un sous-groupe au sein de la superfamille des lectines de type C : le récepteur mannose du macrophage (MRC1), le récepteur Endo-180 (MRC2) et le récepteur des cellules dendritiques (DEC-205, LY75). Les séquences en acides aminés de ces quatre récepteurs présentent cependant moins de 30 % d'identité, suggérant des fonctions distinctes. Par ailleurs, PLA2R1 existe sous deux formes, transmembranaire et soluble. La forme soluble est clivée après le CTLD8, et est dépourvue de segment transmembranaire et de domaine cytoplasmique. Elle peut être générée par épissage alternatif ou par protéolyse de la forme membranaire. Chez l'homme, PLA2R1 est constitutivement exprimé dans le rein, le poumon, la rate et le côlon, et dans certaines cellules fibroblastiques, épithéliales et immunitaires. Cette distribution tissulaire varie cependant d'une espèce l'autre. (**Girard et al, 2014**).

PLA2R1 est composé d'une large région extracellulaire, d'un seul segment transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique contenant un motif d'internalisation (NPXY). La région extracellulaire comprend : un domaine riche en cystéine (CysR), un domaine fibronectine de type II (CTLD), dont les domaines CTLD4 à-6 (en jaune) qui lient les sPLA2 et certains sucres. PLA2R1 peut exister sous forme membranaire ou soluble. En liant certaines sPLA2, PLA2R1 pourrait, via l'activation de diverses voies de signalisation, relayer la transduction de certains de leurs effets biologiques ou, inversement, inhiber leur action via leur internalisation et leur dégradation. En liant d'autres ligands, PLA2R1 pourrait aussi agir indépendamment des sPLA2. BSA : bovine serum albumin. (**Girard et al, 2014**).

I.4.1. Ligands

➤ **Collagène**

La présente étude a montré que CTLD1-2 ainsi que le domaine FNII de PLA2R étaient responsables de la liaison au collagène I et de la migration dépendante du collagène chez les

souris et les humains.

CTLD3-5 peut avoir une faible contribution à la liaison et à la migration. Sur la base de l'absence de preuve que les CTLD de PLA2R ont une activité de liaison directe au collagène, les CTLD de PLA2R peuvent moduler l'activité de liaison de la FNII, expliquant ainsi leur implication dans la liaison au collagène de PLA2R. A l'appui de ce concept, des rapports précédents ont montré que l'activité de liaison au collagène du domaine FNII était modulée par la proximité de CLTD1-2 dans le récepteur du mannose et Endo180. Il est suggéré que le domaine FNII est en contact étroit avec les domaines voisins pour stabiliser l'interaction avec le collagène. (Takahashi *et al*, 2015)

➤ **sPLA2**

L'équipe de Lambeau a découvert PLA2R1 (initialement appelé récepteur de type M) en 1990 à l'aide d'une phospholipase A2 sécrétée (sPLA2) de venin de serpent (donc exogène) appelée OS2. Les sPLA2 IB et IIA se lient à PLA2R1 avec une haute affinité de l'ordre du nM. Cependant, les résultats apparaissent différents chez le rat et l'homme, suggérant des propriétés de liaison de PLA2R1 dépendantes de l'espèce. On sait maintenant qu'il existe une douzaine de sPLA2 humaines ou de souris (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA, XIIB et otoconin-95). Sept de ces 12 sPLA2 se lient à PLA2R1, ce qui renforce l'idée que ces dernières sont bien des ligands naturels de PLA2R1. La liaison des sPLA2 sur les domaines CTLD4-6 de PLA2R1 se fait cependant par interaction protéine-protéine.

L'interaction sPLA2-PLA2R1 pourrait avoir des rôles opposés. Les sPLA2 sont de petites enzymes très stables de 13- à 18-kDa qui hydrolysent les phospholipides pour libérer des acides gras et des lysophospholipides, deux précurseurs de la synthèse de nombreux médiateurs lipidiques. Cette propriété est à la base d'un grand nombre de leurs fonctions biologiques. La liaison sPLA2-PLA2R1 pourrait donc être un moyen efficace de stopper leur activité biologique, en inhibant leur activité enzymatique et en favorisant leur élimination du milieu extracellulaire. (Girard *et al*, 2014).

I.4.2. Voies de signalisations

➤ **MAPK** : Il a été suggéré que la régulation de la prolifération cellulaire par la sPLA2 est médiée par la PLA2R1 qui, à son tour, peut hypothétiquement activer la protéine kinase activée par l'action mitogène (MAPK). (sukocheva *et al*, 2017). Il a été signalé que la liaison

de sPLA2-IB à PLA2R1 a activé la signalisation MAPK p38 avec une stimulation ultérieure de la libération d'élastase et de l'adhésion cellulaire dans les neutrophiles polymorphonucléaires.

- **PI3k/Akt** : La même isoenzyme sPLA2-1B a augmenté la capacité de survie des mastocytes par l'activation des voies de signalisation anti-apoptotiques PI3K/Akt et facteur nucléaire- κ B (NF- κ B), ce qui suggère l'utilisation des produits catalytiques de PLA2R1 plutôt que de sPLA2. Les effets dépendants des récepteurs de sPLA2-IB sur la signalisation PI3K/Akt et la promotion de la migration cellulaire ont été observés dans des fibrosarcomes humains. (**sukocheva et al, 2017**).
- **ERK1/2** : sPLA2-1B a également stimulé la phosphorylation de cPLA2 α en utilisant la voie ERK1/2, suivie par la génération d'acide arachidonique et l'induction de cascades en aval de la signalisation pro-apoptotique. (**sukocheva et al, 2017**)
- **JAK** : Il a été suggéré que PLA2R1 agit comme un co récepteur et se lie à un récepteur hypothétique non identifié (Figure 13). Ce qui entraîne l'activation de la voie JAK2/STAT, amorcée pour ses activités de suppression des tumeurs. Le récepteur du mannose Endo180 C type 2 (MRC2) a été considéré comme un candidat possible pour une telle interaction fonctionnelle. MRC2 appartient à la même famille de récepteurs que PLA2R1 avec des domaines et une organisation similaire. Il a été démontré que MRC2 se lie en tant que corécepteur au récepteur de l'urokinase et à la pro-urokinase en se trimérisant. (**sukocheva et al, 2017**)

Bien qu'elle n'ait été que partiellement explorée, l'implication de JAK comme médiateur de la signalisation intracellulaire de PLA2R1 est un mécanisme prometteur qui relie hypothétiquement les voies de signalisation du récepteur et des cytokines.

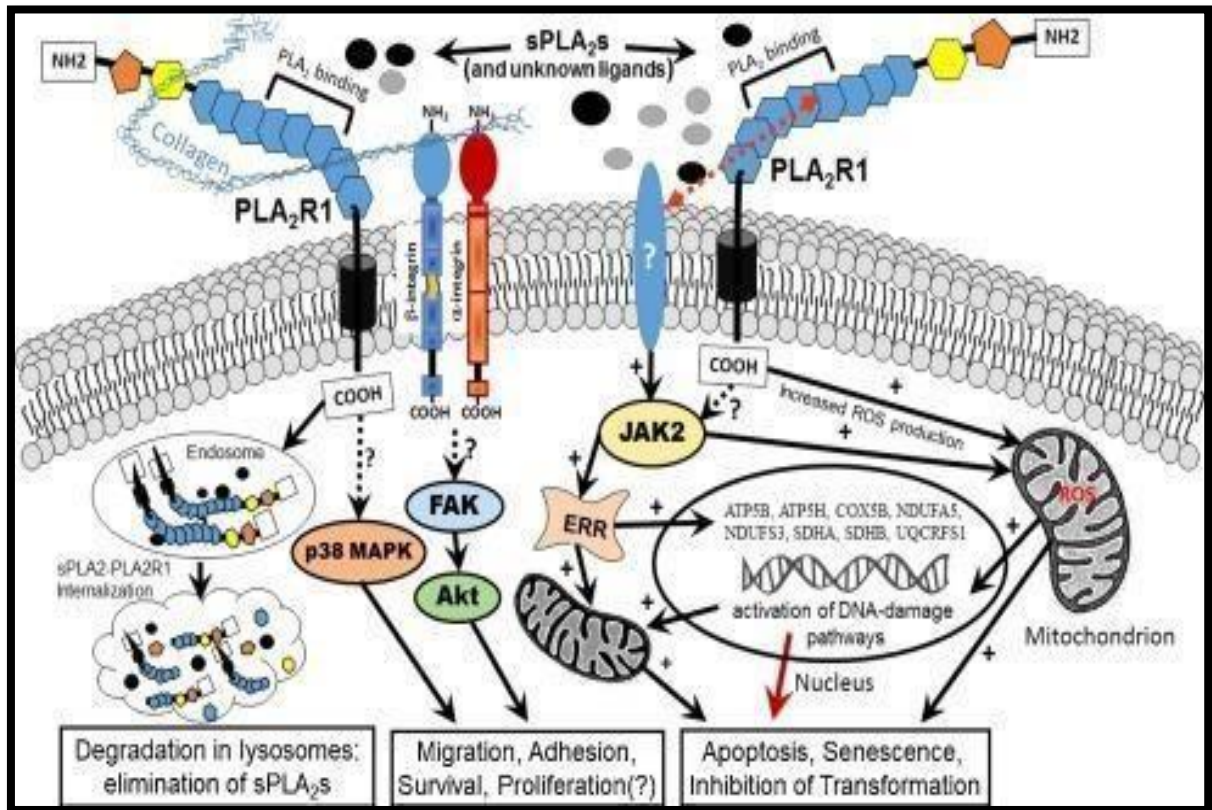


Figure 13: Les voies de signalisation du PLA2R (Sukocheva et al,2017)

I.4.3. Auto-anticorps Anti-PLA2R

La découverte d'anticorps circulants anti-récepteur de la phospholipase A2 de type M (PLA2R) chez la majorité des patients ayant une GEM primitive.

Au moins 70% des patients avec une GEM primitive présentent ces auto-anticorps quand ils sont initialement néphrotiques, contrairement aux formes secondaires, aux autres glomérulopathies et aux sujets sains.

Ces auto-anticorps sont de la sous-classe IgG4 témoignant de l'activation des cellules T helpers de types 2 et ont été retrouvés dans la plupart des ethnicités à travers le monde.

Le rôle pathogénique des anticorps anti-PLA2R a été suspecté par la forte association entre la présence de ces anticorps et l'activité de la maladie. En effet, la disparition de ces anticorps s'associe à la rémission spontanée ou sous traitement de la GEM avec la possibilité de rechute en cas de leur réapparition. (Beck et al, 2002)

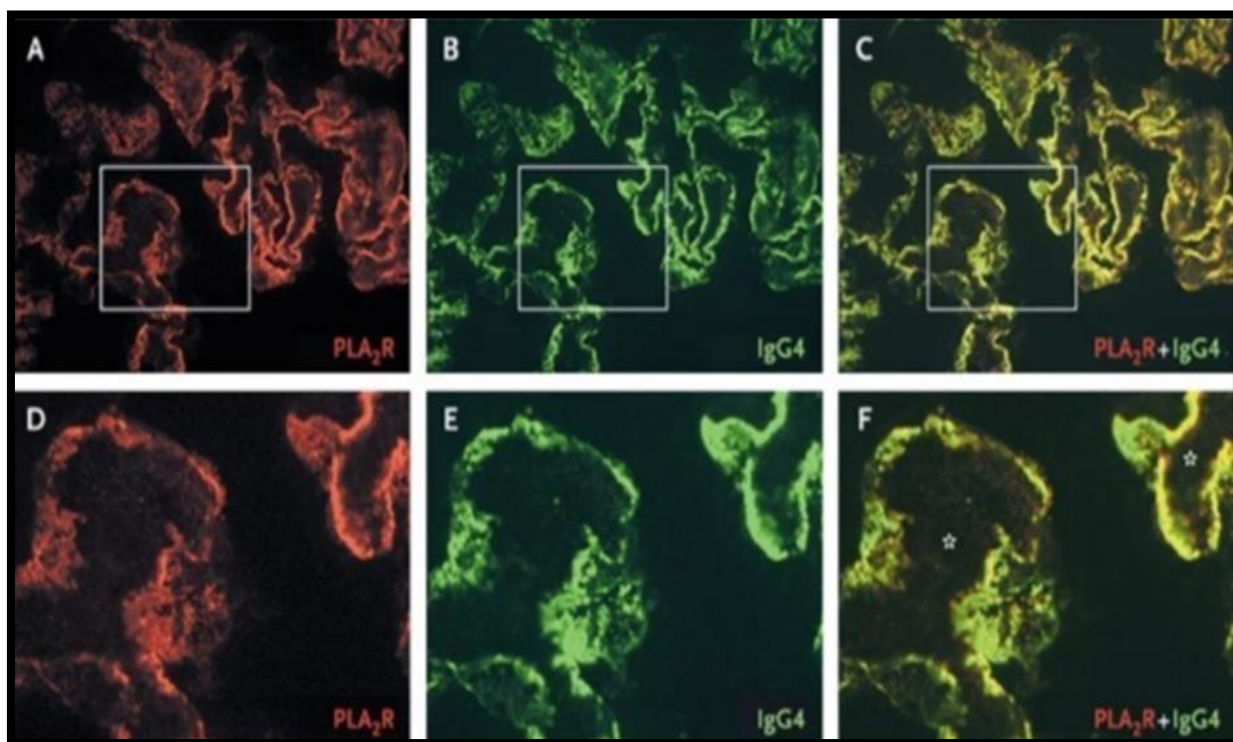


Figure 14: Colocalisation de PLA2R et des IgG4 sur le versant externe de la membrane basale glomérulaire (Dahan, 2016)

I.5. Intérêt de la recherche des anticorps anti-PLA2R

I.5.1. Intérêt de dosage des Auto-Anticorps Anti-PLA2R dans le suivi de la GEM primitive :

Ces AC constituent, également, des marqueurs d'activité de la GEM primitive. En effet, Beck et al ont mis en évidence une corrélation effective entre la production des AC anti-PLA2R et la maladie cliniquement active avec protéinurie et hypo-albuminémie. En outre, chez les patients qui sont cliniquement en rémission, ces AC diminuent voire disparaissent avant même que la protéinurie ne soit complètement résolue (Beck et al. 2009 ; Beck et al. 2010).

Par ailleurs, Hofstra et al ont suivi douze patients atteints de GEM primitive aux différentes phases de la maladie (phase initiale, rémission puis rechute) et ont également démontré une diminution du taux des AC anti-PLA2R pendant la rémission et leur ré-ascension, en cas de récurrence (Hofstra et al. 2011).

Enfin, en 2011, Beck et al montrent que les AC anti-PLA2R disparaissent chez 68 % des patients après un an de traitement immunosuppresseur. Parmi ceux-ci, 59 % ont une rémission complète et 88 % une rémission partielle dans le groupe de patients présentant un taux d'AC

stable (**Beck et al. 2011**). Ces données suggèrent, la possibilité d'utiliser ces AC pour prédire la réponse au traitement immunosuppresseur (**Beck et al. 2011 ; Cravedi et al. 2011**).

I.5.2. Intérêt pronostique des anticorps anti-PLA2R dans les glomérulonéphrites extra-membraneuses primitives

La présence d'AC anti-PLA2R est un marqueur diagnostique de la glomérulonéphrite extra-membraneuse (GEM) primitive. L'utilité pronostique des AC anti-PLA2R est toutefois encore discutée. (**Jullien et al, 2014**) conduit une étude rétrospective étudiant la relation entre le taux d'AC anti-PLA2R présent au moment du diagnostic et l'évolution de la GEM. Cette étude monocentrique a inclus l'ensemble des adultes atteints de GEM primitive entre 1975 et 2007 pour lesquels du sérum prélevé au moment de la biopsie rénale et conservé à -80°C était disponible. Le taux d'AC anti-PLA2R était rétrospectivement mesuré par test ELISA. L'association du taux d'AC avec l'activité (protéinurie et fonction rénale au diagnostic) et l'évolution (rémission et fonction rénale au dernier recul) de la GEM a été analysée (corrélation et Kaplan–Meier).

Au total, 68 patients avec un recul moyen de 108 mois étaient analysés. Soixante pour cent des sujets avaient un taux d'AC anti-PLA2R positif au diagnostic. Aucune corrélation n'était retrouvée entre le taux d'AC et l'activité de la maladie ou le risque d'évolution vers l'insuffisance rénale chronique ou terminale. Cependant, un taux faible d'AC était significativement et graduellement associé à l'évolution vers la rémission spontanée. Bien que le taux d'AC anti-PLA2R mesuré au diagnostic ne prédise pas l'évolution vers l'insuffisance rénale chronique de la GEM primitive, les résultats suggèrent que ce taux pourrait permettre d'identifier précocement les patients qui vont spontanément évoluer vers la rémission.

Chapitre 2
Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

Dans le but de déterminer Le taux des AC anti-PLA2R (IgG), le dosage d'anti-PLA2R est effectué au niveau de laboratoire d'immunologie. Tout cela a comme objectif de diagnostiquer la GEM primaire.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

✓ Cadre d'étude

Il s'agit d'une étude prospective, effectuée au niveau de service de Néphrologie CHU NAFISSA HAMOUD Ex : Parnet a Hussein dey en collaboration avec service d'immunologie de l'EPH ROUIBA sur une période de 5 mois du 15 janvier au 15 juin.

✓ Population étudiée

La taille de notre population est de 23 patients atteints d'une glomérulonéphrite extra-membraneuse de deux sexes et âgés entre 16ans à 73ans.

✓ Prélèvement

Le prélèvement sanguin est réalisé à jeun entre 8:30h et 10h du matin au niveau de service de néphrologie CHU NAFISSA HAMOUD sur le sang veineux prélevé au niveau de la veine de pli sur le coude avec garrot sur des tubes secs. Puis, les transportés au laboratoire d'immunologie a l'EPH Rouïba à une température ambiante.

✓ Préparation du sérum

L'étape de centrifugation est préalable avant le dosage des anti-PLA2R, elle sépare le culot(globules rouges, globules blancs, plaquettes) du surnagent (plasma ou sérum) par une centrifugeuse ROTOFIX 32 A à 4000 tours/min pendant 2 minutes.

✓ Enregistrement des patientes

Pour chaque patient, les tubes d'échantillonnage ont des étiquettes qui étiqueté le nom, prénom et le numéro d'enregistrement.

✓ Recueil des données

- Les prélèvements sanguins sont accompagnés d'une fiche de renseignements (**Annexe01**).
- L'identité du patient : nom, prénom, âge, sexe.
- La date de réception.
- Le nom du médecin traitant.
- Les signes cliniques.

II.1.2. Matériel non biologique

Le matériel nécessaire pour le fonctionnement d'un laboratoire d'immunologie comporte un équipement spécifique. (**Annexe 02**).

II.2. Méthode

Les données ont été recueillies à partir des dossiers des malades hospitalisés, en se basant sur une fiche d'exploitation (**Annexe 01**), établie après recherche bibliographique. Cette fiche regroupe les paramètres suivants :

- Sociodémographiques (âge et sexe).
- Biologiques (bilan sanguin et urinaire).
- Para cliniques (radiologiques, échographiques ...).
- Cliniques (antécédents personnels et familiaux, manifestations cliniques).

➤ Difficultés rencontrées :

- Nous avons trouvé des dossiers et des bilans incomplets.
- Nombre de patients limités à cause de l'épidémie du Covid-19.

II.2.1. Dosage des auto- Anticorps ANTI PHOSPHOLIPASE A2 Récepteur (anti- PLA2R)

Nous avons réalisé un suivi des patients avec GEM, Chaque patient a bénéficié de deux dosages :

- 1^{er} dosage : le mois de janvier
- 2^{ème} dosage : le mois de juin

✓ Objectif

Diagnostiquer la GEM primaire, de prédire l'évolution de la maladie et de suivre l'état des patients. Le diagnostic de la GEM primaire se fait traditionnellement par intégration des données cliniques (protéinurie, fonction rénale, créatinine) et des résultats histologiques d'une biopsie rénale. La biopsie représente la méthode de référence pour diagnostiquer la GEM.

✓ Le principe du dosage

Basés sur la méthode immun-enzymatique ELISA qui fournit un test in vitro quantitatif pour les AC humains de la classe IgG contre PLA2R dans le sérum ou le plasma. Le kit de test contient des bandes de micro titration, chacune avec 8 puits de réactifs détachables revêtus de PLA2R. Dans la première étape de réaction, des échantillons dilués de patients sont incubés dans les puits. Dans le cas d'échantillons positifs, des AC IgG spécifiques (également IgA et IgM) se lient aux Ag. Pour détecter les AC liés, une seconde incubation est effectuée en utilisant une IgG anti-humaine marquée par une enzyme (conjugué enzymatique) catalysant une réaction de couleur.

✓ La méthode (Annexe 03)**• Préparation et stabilisation des réactifs :**

Tous les réactifs doivent être amenés à une température ambiante 30min avant son utilisation, après la première utilisation, les réactifs sont stockés à une température comprise entre +2°C et +8°C protégés de toute contamination.

• Préparation et stabilisation des échantillons de prélèvement :

L'échantillon : sérum humain.

Stabilité : les échantillons de patients à analyser peuvent généralement être conservés entre +2°C et +8°C pendant 14 jours, les échantillons dilués doivent être incubés dans un délai d'un jour ouvrable.

Dilution des échantillons : les échantillons des patients sont dilués au 1:101 dans un tampon d'échantillon. Par exemple : diluer 10 µl de sérum dans 1,0 ml de tampon d'échantillon et bien mélanger par vortex.

- **Incubation**

Pour une analyse quantitative, incuber les calibrateurs 1 à 5 avec les contrôles positifs et négatifs et les échantillons de patients.

1-incubation des échantillons : transférer 100 µl du contrôle positif, du contrôle négatif, des calibrateurs, des échantillons de patients dilués dans les puits de microplaques individuels selon le protocole de pipetage. Incuber pendant 30 min à température ambiante.

➤ Lavage : (Automatique)

Laver les puits de réactifs 3 fois avec 450 µl de tampon de lavage, après le lavage, éliminez soigneusement tout le liquide de la microplaque en la tapotant sur du papier absorbant, les ouvertures étant tournées vers le bas, afin d'éliminer tout le tampon de lavage résiduel.

2- Incubation du conjugué : pipeter 100µl de conjugué enzymatique dans chacun des puits de la microplaque. Incuber pendant 30 min à température ambiante.

➤ Lavage : vider les puits, lavé comme décrit ci-dessus

3- Incubation du substrat : pipeter 100µl de substrat enzymatique dans chacun des puits de la microplaque. Incuber pendant 15 min à température ambiante, protéger de la lumière directe du soleil.

4- Arrêter la réaction : pipeter 100µl de solution d'arrêt dans chacun des puits de la microplaque dans le même ordre et à la même vitesse que la solution de substrat a été introduite.

5-mesure : la mesure photométrique de l'intensité de la couleur doit être effectuée à une longueur d'onde de 450 nm et à une longueur d'onde de référence comprise entre 620 nm et 650 nm dans les 30 minutes suivant l'ajout de la solution d'arrêt. Avant la mesure, agitez légèrement la microplaque pour assurer une distribution homogène de la solution.

- **Le calcul des résultats :**

Tracer une courbe standard à partir de laquelle on obtient la concentration d'AC dans l'échantillon inconnu peut être prise est obtenue en traçant les valeurs d'extinction mesurées pour les 5 sérums de calibrage contre les concentrations correspondantes (DO). La courbe standard peut être calculée par ordinateur en utilisant l'une des techniques d'ajustement (EXCEL).

Si l'extinction d'un échantillon de patient est supérieure à celle du calibre 5 (1500 RU/ml), le résultat doit être signalé comme étant >1500UR/ml. Il est recommandé de mesurer

à nouveau l'échantillon lors d'un nouveau test à une dilution de 1:400, La limite supérieure de la plage normale (seuil) recommandée par EUROIMMUN est de 20 unités relatives (RU/ml).

EUROIMMUN recommande d'interpréter les résultats de la manière suivante :

<14 RU/ml : négative

≥ 14 a < 20 RU/ml : limite

≥ 20 RU/ml : positive

Pour le diagnostic, les symptômes cliniques du patient doivent toujours être pris en compte en plus des résultats sérologiques.

Chapitre 3
Résultats et discussion

III. Résultats

Notre étude prospective s'est étalée du 15 janvier 2022 au 15 juin 2022 sur une période de 5 mois. L'échantillon étudié se compose de 23 patients ayant un âge compris entre 16 et 73 ans, atteints de la Glomérulonéphrite Extra-membraneuse.

III.1. Répartition des patients selon le sexe

Parmi nos patients qui ont une GEM, nous avons retrouvé que (56,52%) sont du sexe masculin contre une proportion de (43,47%) du sexe féminin, ce qui correspond à un sexe ratio de 1.3 (figure 15) .

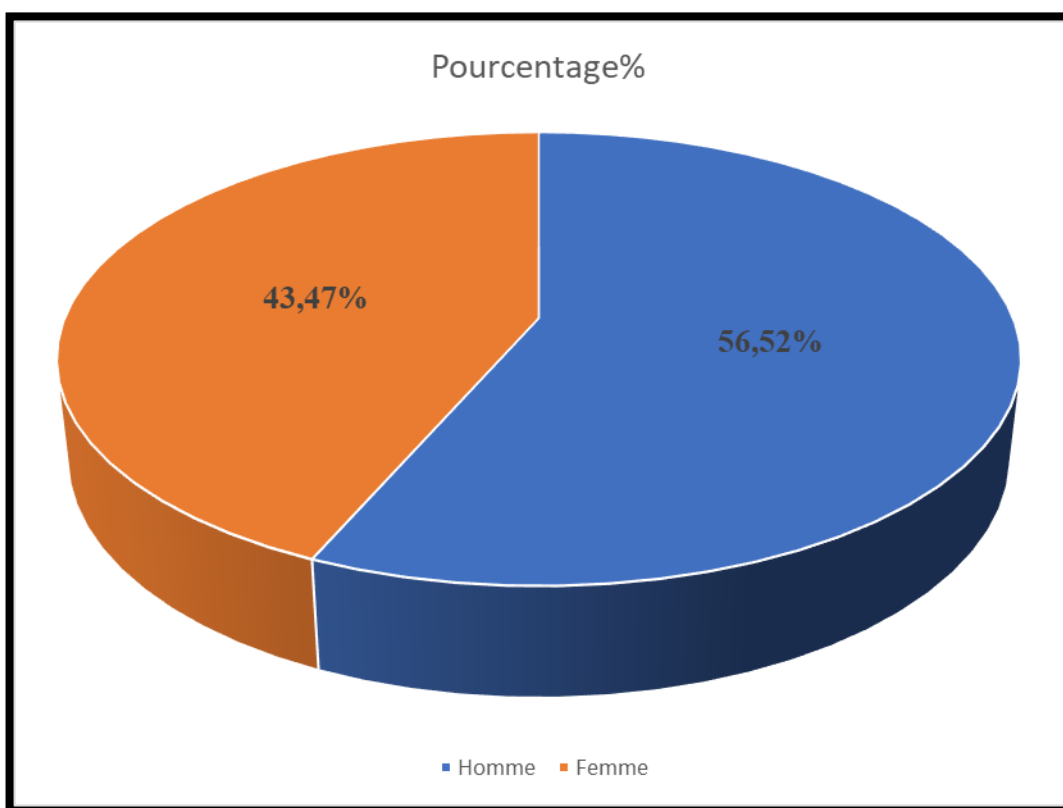


Figure 15: Répartition des patients selon le sexe (%).
sexe ratio 1.3

Dans la littérature, la GEM peut atteindre les 2 sexes avec une prédominance masculine et un sexe ratio homme/femme de 2,1 (Wang et al,2015). En ce qui concerne nos malades, les hommes étaient plus souvent atteints de la GEM que les femmes (56,52% vs 43,47% avec un sexe ratio de 1,3).

III.2. Répartition des patients selon l'âge

L'âge moyen des sujets est de 45 ans avec un minimum de 16 ans et un maximum de 73 ans. La tranche d'âge la plus touchée est celle des [30-50] ans, avec la plus grande proportion à (47,82%). Les patients âgés entre [50-70] ans représentent (26,08%), alors que les patients qui ont tranche d'âge ≤ 30 et >70 ans représentent respectivement la faible proportion de (13,04%) (figure 16).

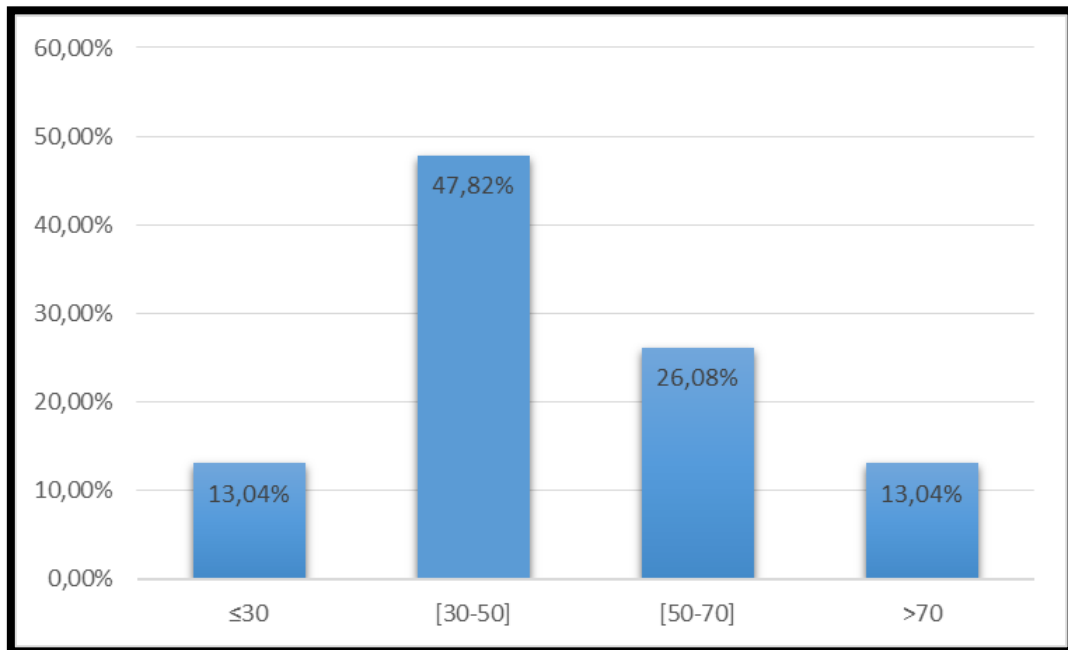


Figure 16: Répartition des patients selon l'âge (%).

Selon nos résultats, la tranche d'âge la plus touchée par la Glomérulonéphrite extra membraneuse est la tranche entre [30-50] ans.

La maladie peut se voir à tout âge, avec un pic d'incidence entre 30 et 50 ans (Wang et al,2015), ce qui est concordant avec notre série où l'âge moyen était de 45 ans avec des extrêmes de 16 à 73 ans.

III.3. Répartition des patients selon les paramètres biologiques

Chaque patient a bénéficié de deux (02) dosages de chacun des paramètres suivants : albuminémie, créatininémie, protéinurie des 24h et l'anti-PLA2R.

- 1er dosage : le mois de janvier
- 2ème dosage : le mois de juin

III.3.1. Premier dosage

III.3.1.1. Répartition des patients selon le taux de la créatinine

Chez les 23 patients un dosage de la créatinine est réalisé, les résultats sont représentés dans la figure 17.

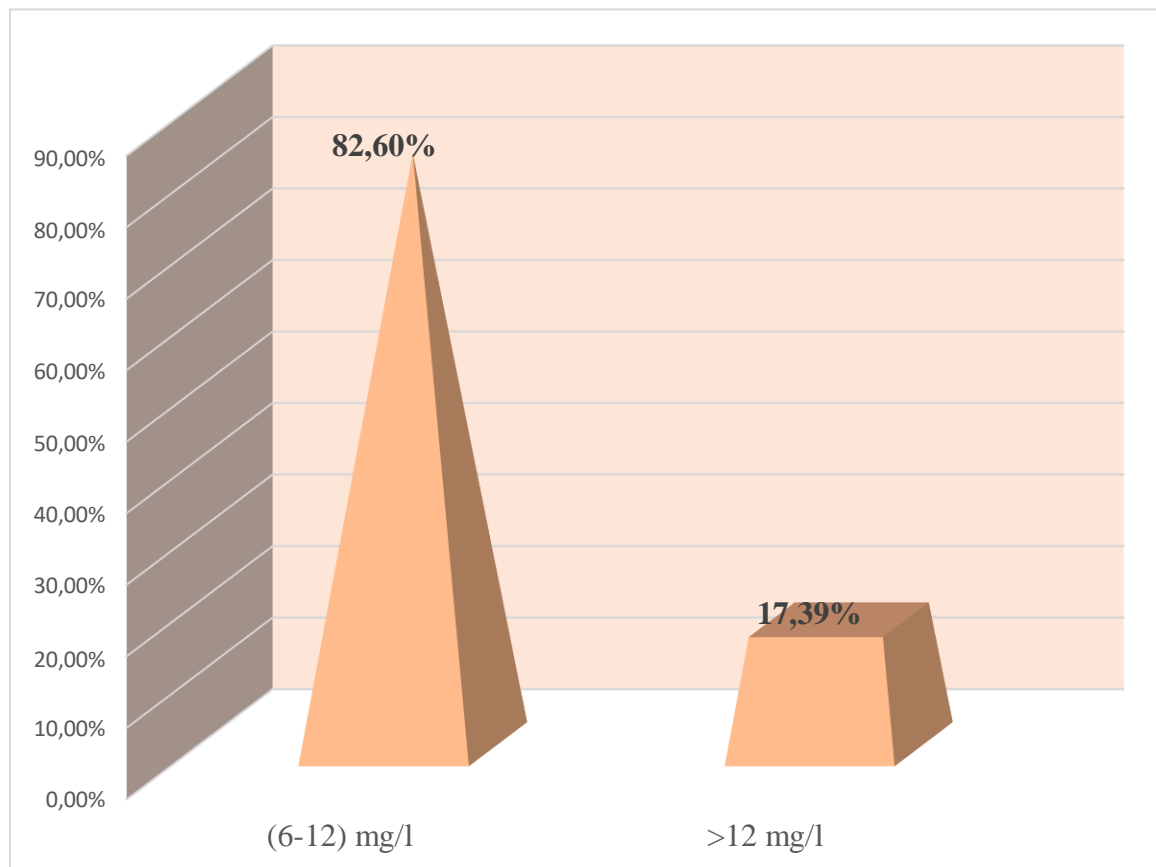


Figure 17: Répartition des patients selon le taux de la créatinine

Les patients avaient un taux de la créatinine normal (6-12) mg/l dont 82,60 % (19 patients) des cas, les patients avaient un taux de la créatinine supérieur au taux normal >12 mg/l dont 17,39 % (4 patients).

III.3.1.2. Répartition des patients selon le taux de l'albuminémie

Un autre dosage d'albumine a été effectué chez les 23 patients, voici les résultats ci-joints(**figure 18**) :

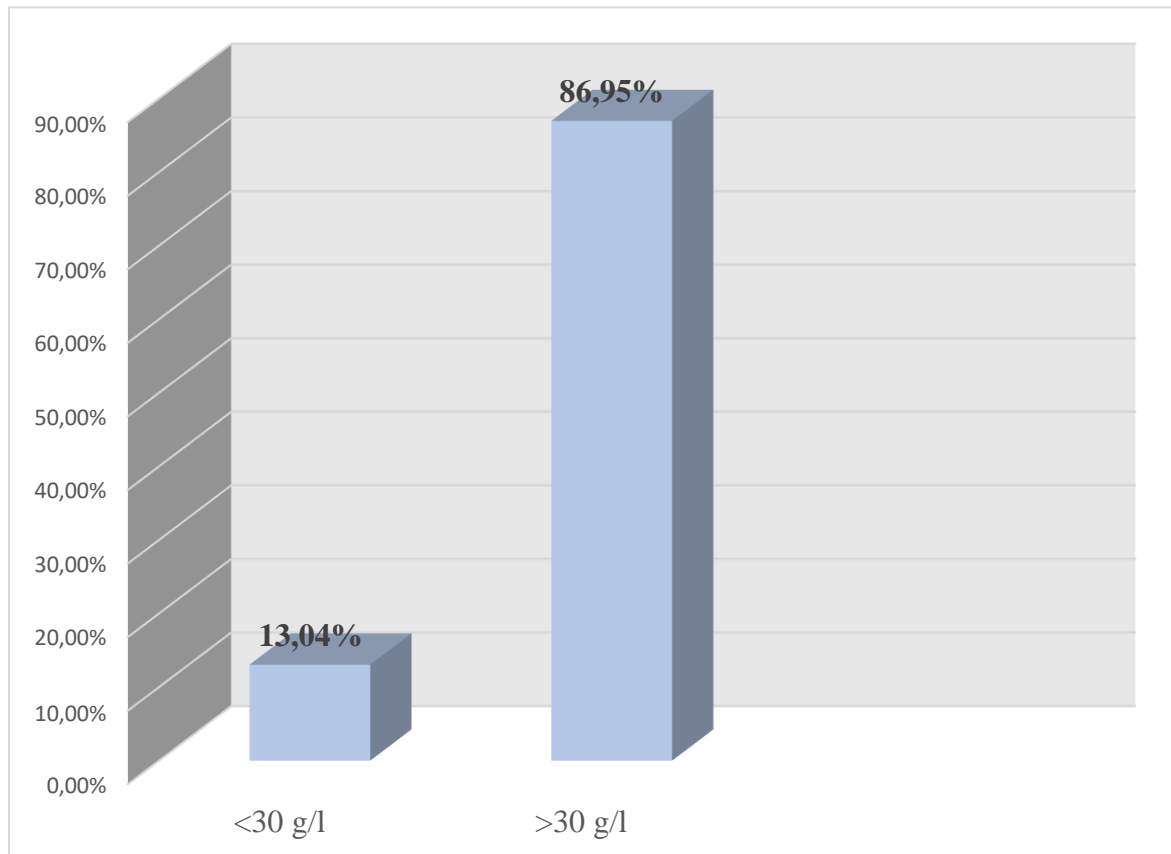


Figure 18: Répartition des patients selon le taux de l'albuminémie

- Les patients avaient un taux d'albuminémie < 30 g/l dont 13,04 % (3 patients) des cas.
- Les patients avaient un taux d'albuminémie > 30g/l dont 86,95 % (20 patients) des cas.

III.3.1.3. Répartition des patients selon le taux de la protéinurie de 24h

Les résultats sont regroupés dans la figure 19 :

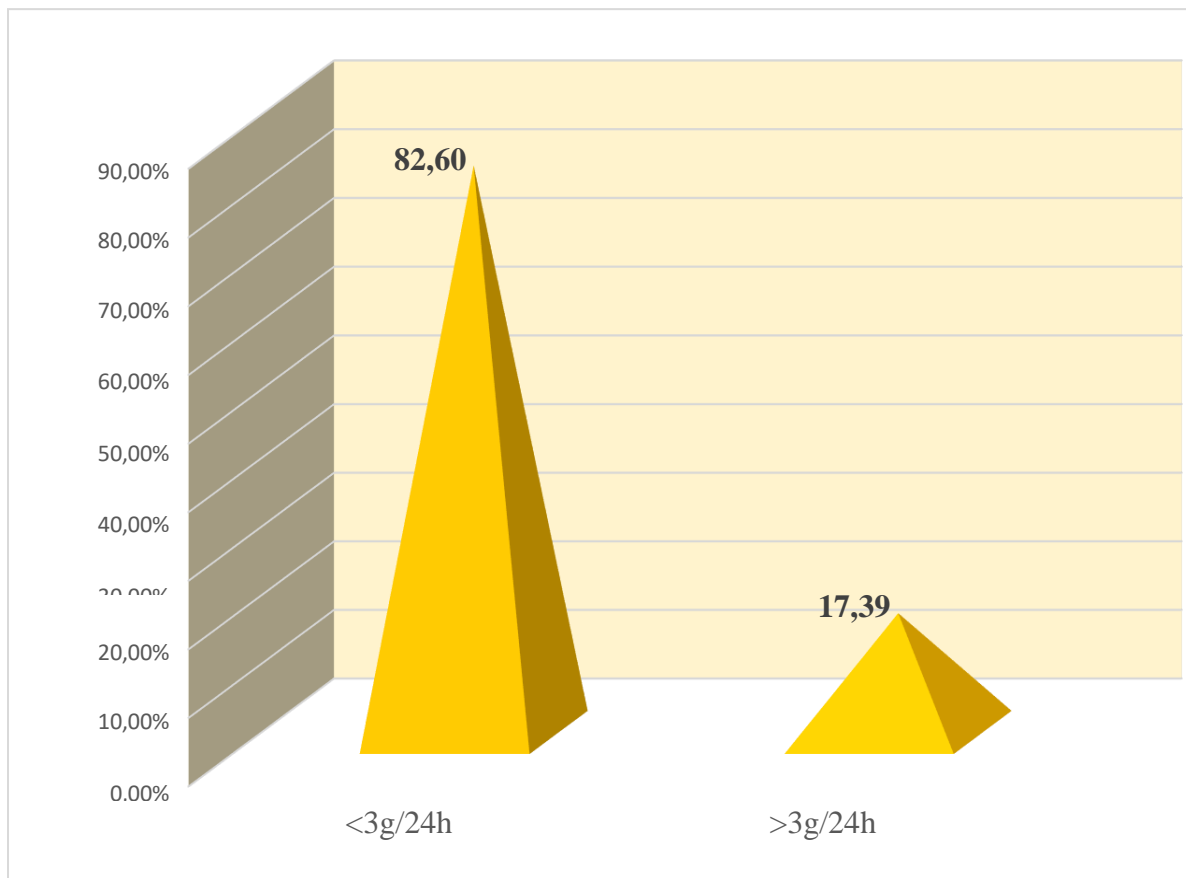


Figure 19: Répartition des patients selon le taux de la protéinurie de 24h

On note que

- 19 patients ayant une valeur normale < 3 g/24h dont 82,60%.
- 4 patients ayant une valeur élevée >3 g/24h dont 17,39%.

III.3.1.4. Répartition des patients selon le dosage d'anti PLA2R

Nous avons réalisé un dosage des anti PLA2R chez les 23 Patients au niveau de service d'immunologie de l'EPH ROUIBA, les résultats sont regroupés dans le tableau :

Tableau 1: Répartition des patients selon le dosage d'anti PLA2R.

PLA2R	<u><20 UR/ml</u>	<u>>20 UR/ml</u>
Effectifs	<u>21</u>	<u>2</u>
Pourcentage	<u>91,30%</u>	<u>8,69%</u>

On sait très bien que dans l'auto-immunité la valeur normale d'un dosage d'anti PLA2R selon la technique ELISA dans un bilan de la GEM est définie par <20 UR/ml.

Donc on note que

- 21 patients ayant un résultat négatif <20 UR/ml, dont 91,30% des cas.
- 2 patients ayant un résultat positif ≥ 20 UR/ml, dont 8,69% des cas.

Selon le sexe :

Le nombre des patients ayant un résultat positif est deux femmes.

III.3.2. Deuxième dosage

III.3.2.1. Répartition des patients selon le taux de la créatinine

Chez les 23 patients un dosage de la créatinine est réalisé, les résultats sont représentés dans la figure 2

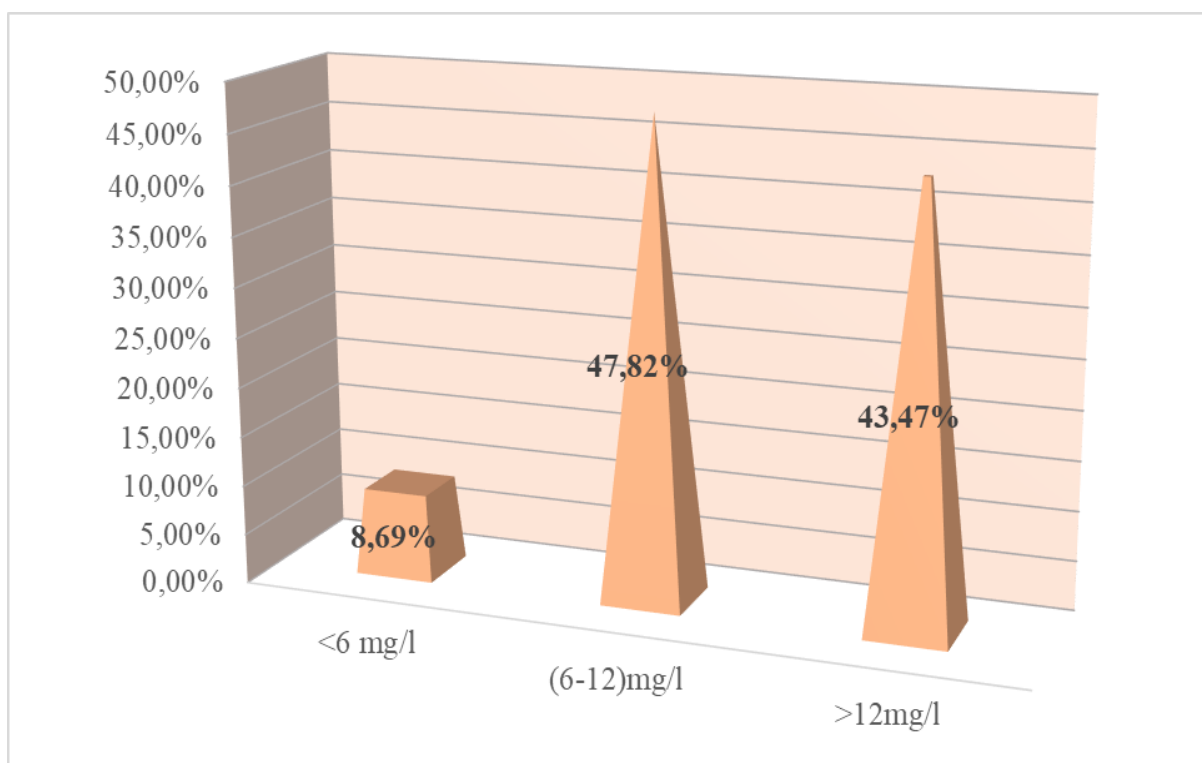


Figure 20: Répartition des patients selon le taux de la créatinine

Les patients avaient un taux de la créatinine inférieur à 6 mg/l dont 8,69% (2patients) des cas, les patients avaient un taux de la créatinine normal (6-12) mg/l dont 47,82 % (11 patients) des cas, les patients avaient un taux de la créatinine supérieur au taux normal >12 mg/l 43,47%

(10 patients).

III.3.2.2. Répartition des patients selon le taux de l'albumine

Un autre dosage d'albumine a été effectué chez les 23 patients le mois de juin, voici les résultats ci-joints :

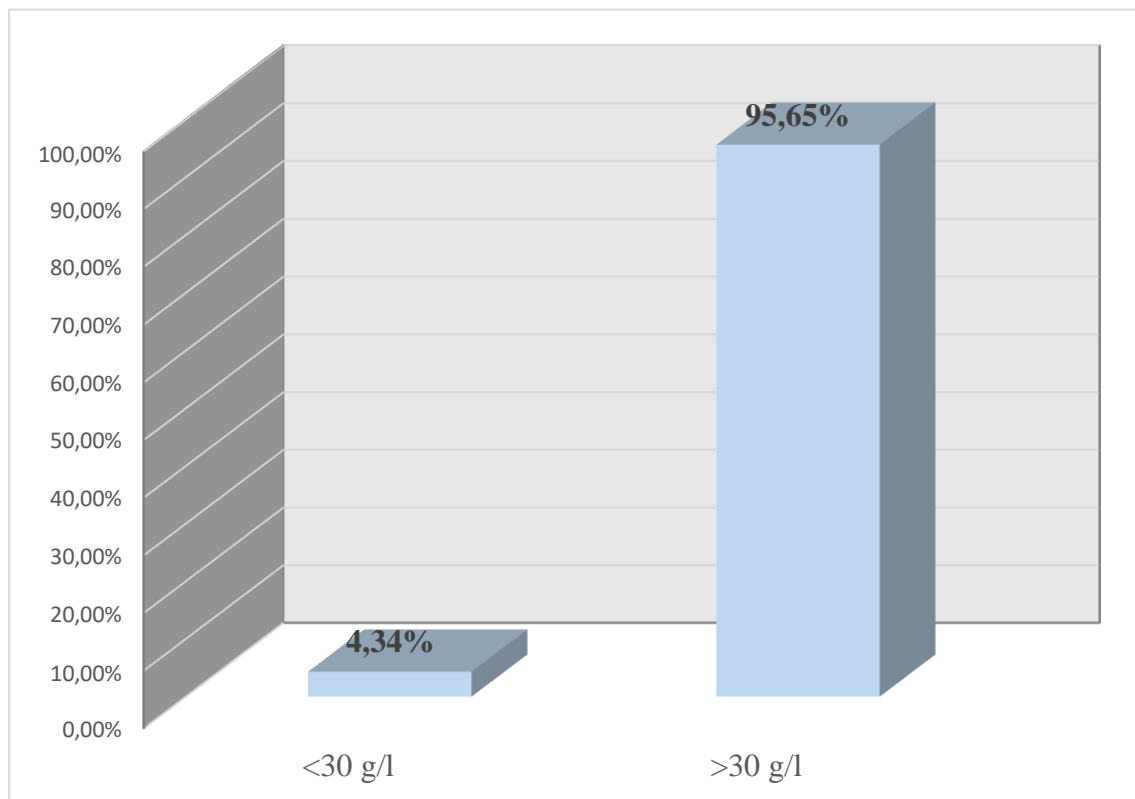


Figure 21: Répartition des patients selon le taux de l'albumine

- Les patients avaient un taux d'albuminémie < 30 g/l dont 4,34% (1 patient) des cas.
- Les patients avaient un taux d'albuminémie > 30g/l dont 95,65 % (22 patients) des cas.

III.3.2.3. Répartition des patients selon le taux de la protéinurie de 24h

Les résultats sont regroupés dans la figure 22 :

Nous avons mesuré la protéinurie de 24h chez nos patients pour un 2eme dosage, la valeur d'un syndrome néphrotique est définie par une protéinurie supérieure à 3g/24h

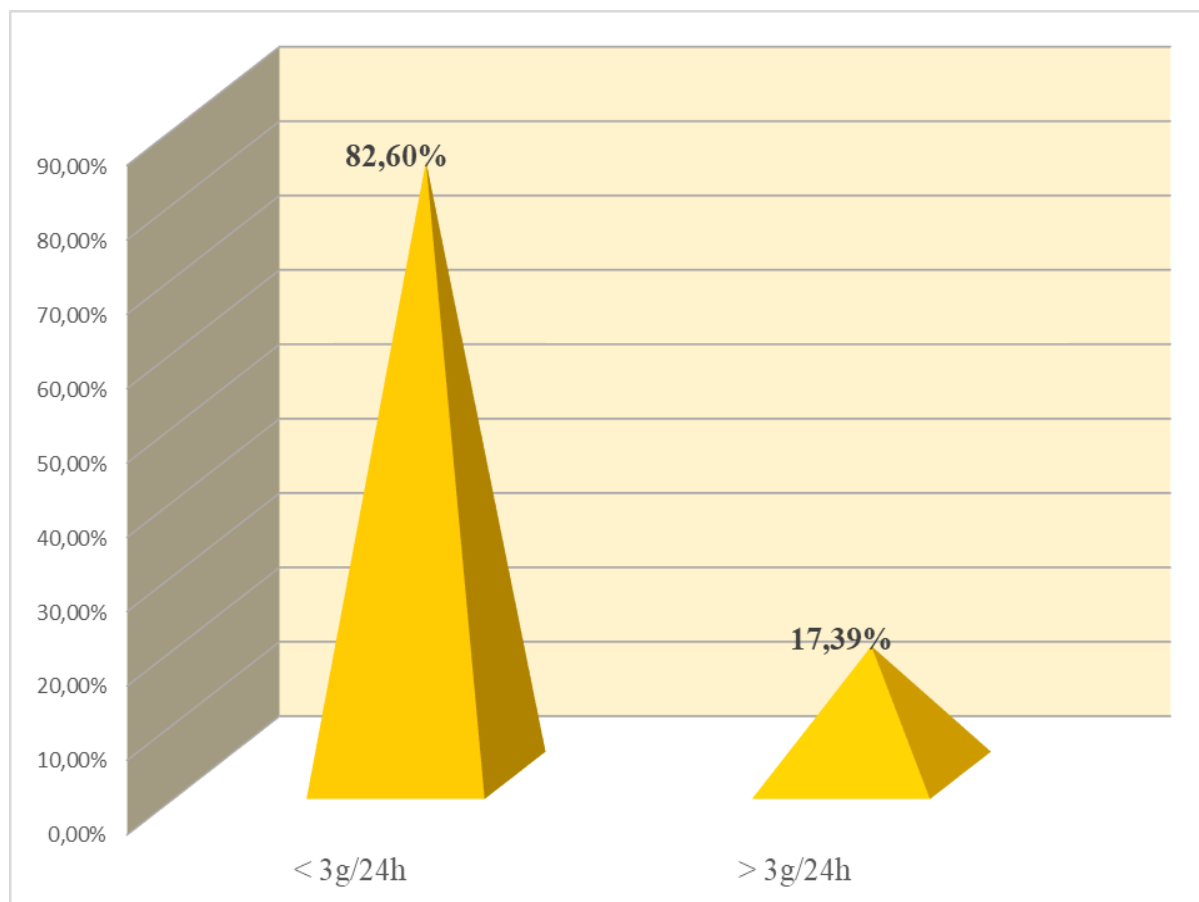


Figure 22: Répartition des patients selon le taux de la protéinurie de 24h

On note que

- 19 patients ayant une valeur normale < 3 g/24h dont 82,60%.
- 4 patients ayant une valeur élevée >3 g/24h dont 17,39%.

III.3.2.4. Répartition des patients selon le dosage d'anti PLA2R

Nous avons réalisé un 2eme dosage des anti PLA2R le mois de juin chez les 23 Patients, les résultats sont regroupés dans le tableau :

Tableau 2: Répartition des patients selon le dosage d'anti PLA2R.

<u>PLA2R</u>	<u><20</u>	<u>≥20</u>
<u>Effectifs</u>	<u>19</u>	<u>4</u>
<u>Pourcentage</u>	<u>82,60%</u>	<u>17,39%</u>

Donc on note que dans le 2eme dosage on a

- 19 patients ayant un résultat négatif <20 UR/ml, dont 82,60% des cas.
- 4 patients ayant un résultat positif ≥ 20 UR/ml, dont 17,39% des cas.

Selon le sexe

Le nombre des patients ayant un résultat positif selon le sexe est deux femmes et deux hommes.

- La rémission totale est définie par une protéinurie des 24h <3 g/24h, une albuminémie >30 g/l et un taux d'anticorps anti-PLA2R <20 UR/ml.
- La rémission partielle est définie par une protéinurie des 24h >3 g/24h, une albuminémie <30 g/l et un taux d'Ac anti-PLA2R >20 UR/ml.

Au mois de janvier, la rémission totale était retrouvée chez 78,26% des patients, elle est devenue cinq (05) mois après à 65,21%.

En littérature, plusieurs études ont été menées ; El Adraoui,2015 rapportait dans leur étude incluant 30 patients, le syndrome néphrotique était le principal mode de révélation (93,3%). À 6 mois il été obtenu une rémission chez 46,7% des patients.

Durant les 6 mois de suivi, dans notre série, un seul patient (4,34%) a présenté une disparition du titre des AC anti-PLA2R avec une diminution de la protéinurie. Quatre patients (17,39%) ont eu une augmentation de titre des AC anti-PLA2R avec l'augmentation chez trois patients et la stabilité chez un seul patient dans le taux de la protéinurie, les 18 patients (78,26%) sont restés stables (<20 UR/ml).

Deniziaut et *al*,2012 ont suivi 42 patients atteints de GEM idiopathique, 19 patients (45%) présentaient une diminution du titre ou disparition des AC anti-PLA2R et 23 patients (55%) présentaient une augmentation. Chez 73% des patients présentant une diminution du titre d'AC anti-PLA2R la protéinurie est également diminuée. Inversement, lorsque le titre des AC est stable ou augmenté, la protéinurie augmente dans 91% des cas.

Durant les 6 mois de suivi, dans notre série, on a remarqué qu'un (01) seul patient (4,34%) a présenté une disparition du titre des AC anti-PLA2R avec une augmentation de l'albuminémie , 1 seul patient (4,34%) a eu une augmentation du titre des AC anti-PLA2R avec l'augmentation

du taux d'albumine , 1 seul patient (4,34%) a eu une augmentation de titre des AC anti-PLA2R avec la diminution du taux d'albumine, deux patients (8,69%) ont eu une augmentation de titre des AC anti-PLA2R avec une stabilité du taux d'albumine .

Pour la créatininémie, on a remarqué qu'un 1 seul patient (4,34%) a présenté une disparition du titre des AC anti-PLA2R avec une diminution de taux de la créatinine, trois patients (13,04%) ont eu une augmentation de titre des AC anti-PLA2R avec une diminution de taux de la créatinine, et 1 seul patient (4,34%) a eu une augmentation de titre des AC anti-PLA2R avec l'augmentation de taux de la créatinine.

Par rapport à ces paramètres (la créatinine et l'albumine) nous n'avons trouvé aucune étude pour faire une comparaison

*Conclusion
Et
Perspectives*

Conclusion et perspectives

La glomérulonéphrite extra membraneuse constitue la principale cause du syndrome néphrotique chez l'adulte.

En matière de physiopathologie, de nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension de la forme idiopathique de cette pathologie avec principalement l'identification du principal antigène cible de cette pathologie, le récepteur de la phospholipase A2 (PLA2R), retrouvé chez 70 % des patients. Selon nos résultats, il existe une corrélation entre titre des auto-anticorps anti-PLA2R et degré de la protéinurie des 24h et aussi la rémission. En règle générale plus haut c'est le titre des auto-anticorps anti-PLA2R, plus élevé est le risque de progression vers l'insuffisance rénale.

Concernant le taux de la créatinine et d'albumine n'est pas toujours associé au titre des auto-anticorps anti-PLA2R.

L'identification de ces anticorps circulant et le suivi sérologique des patients est indispensable pour ses intérêts diagnostic, thérapeutique, de surveillance et pronostic. Les anticorps sériques ont une spécificité et une sensibilité. Un titre très élevé est un signe d'activité de la maladie. Le monitoring du titre d'anticorps anti-PLA2R est très utile pour apprécier la réponse au traitement des patients atteints de GEM et pour la surveillance. Il s'agit d'une avancée significative pour la pratique médicale.

Comme perspective, une hypothèse mise en terrain correspond à le suivi des patients selon leur protocole des médicaments et suivant d'autres paramètres comme les antécédents familiaux, la tension artérielle ...

*Références
bibliographiques*

Référence bibliographique

- 1- **Alain Ramé, Sylvie Théron**. Anatomie et Physiologie.5ème édition. Paris : Muriel Chabert, 2007, pp.318.
- 2- **Anthony A, Killeen Ph D**. Formation, Transport, et Elimination de l'urine. Le rein série guide d'apprentissage. 2017, 43, p.22-23-24.
- 3- **Anglicheau.D. ; Jasques Boffa.J. ; Callard.P. ; Choukroun.G. ; Combe.C. ; Daugas.E. ; Dussol.B. ; Esnault.V. ; Flamat.M. ; François.H. ; Frinat.L. ; Houillier.P. ; Hurault de Ligny.B. ; Moulin.B. ; Noelle Peraldi.M. ; Rieu.P.** ; Physiologie et physiopathologie rénale, CUEN, 2016.
- 4- **Anders HJ, Ponticelli C**. Glomerular disease: Membranous nephropathy and the Henle-Koch postulates. *Nat Rev Nephrol*. 2016 ;12 :447-8.
- 5- **Bessaguet F., Desmolière A.**, Les reins. *Actualités Pharmaceutiques*, 2020 ,59(595-596), 57–60.
- 6- **Bourquin.V; Ponte.B. ; Zellweger.M. ; Lévy.M. ; Moll.S.** ; Les glomérulonéphrites primitives en bref, 2013.
- 7- **Beck LH Jr, Bonegio RG, Lambeau G**. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy *N Engl J Med* ;2009; 361 :11-21
- 8- **Chaouchi K et Haouas N**.2018. Le traitement de l'anémie chez les patients hémodialysés au niveau d'EPH Ain defla, mémoire de fin d'études, Ain defla, 45.p.
- 9- **Callard.P**, Physiologie et physiopathologie rénales, Publication du CUEN, 2016.137.1.7.
- 10- **Chaffanjon.P**, Anatomie du rétropéritoine : Reins et vaisseaux,2010 ; chapitre 12 :2-17, France.
- 11- **Cosserat, J., Grant, A., & Waugh, A.** (2015). *Ross et Wilson. Anatomie et physiologie normales et pathologiques*. Elsevier Masson.
- 12- **Cybulsky AV, Quigg RJ, Salant DJ** (2005) Experimental membranous nephropathy redux. *Am J Physiol Renal Physiol* 289 : F660– F671
- 13- **Danial. B**, Histologie de l'appareil urinaire.2008, pp 1.50.
- 14- **Ducloux , D** ; Physiopathologie et traitement des complications du syndrome néphrotique . *Néphrologie & Thérapeutique* 7, Elsevier Masson (EMC), 2011 ,52–57.
- 15- **Dahan K.**, Physiopathologie, démarche diagnostique et avancées thérapeutique dans le glomérulonéphrite extra-membraneuse. France .2016, pp.674.679.

- 16- Debiec H., Ronco P.**, Immunopathogenesis of membranous nephropathy: an update (2014).36 pp.381.397.
- 17- Deniziaut, G. ; Mougari, F. ; Anton, R ; Ripert-Bernusset, S. ; Bilot, E.; Johanete, C.** Anticorps anti-récepteur à la phospholipase A2 : marqueur sérologique de la glomérulonéphrite extra-membraneuse. Elsevier Masson SAS,2012,25-28.
- 18- Dragon-Durey.M.A,** Le système du complément, Disponible sur <http://adrien.Six.online.fr> (page consultée le 04/2022)
- 19- Daugan.M.; Noe.R.; Fridman.W.H.; Sautes-Friman.C.; Roumenina.L.T.** Le système de complement: Une épée à double tranchant dans la progression tumorale.Med Sci,2017,33,871-877.
- 20- El Adraoui.Y.,** (2015). La glomérulonéphrite extra membraneuse. Aspect clinique, biologique, thérapeutique et évolutifs : à propos de 30 cas. Thèse de Doctorat d'état en médecine. Université Mohanmed -V Rabat. Faculté de Médecine et de pharmacie de Rabat, Maroc,p.175.
- 21- Fakhouri,F.; Kandel-Aznar,C.** Les glomérulonéphrites membranoprolif.ratives primitives : quelques considerations cliniques à propos d'un cas. SRLF et Lavoisier SAS,2017,26.456-463.
- 22- Frimat.M.,** (2013). Lésion endothéliales liées de contrôle du complément : de la génétique du complément au syndrome hémolytique et urémique. Thèse de Doctorat d'état en physiologie-physiopathologie.Université Paris Descartes Science de la vie et de la santé.France.p,176.
- 23- Glassock , M.D. ; Richard, J.** Human idiopathic membranous nephropathy- A mystery solves. N Engl J Med, 2009, 361, 81-83.
- 24- Girard.C. ; Seitz-Polski.P. ; Dolla.G. ; Augert.A. ; Vindrieux.D. ; Bernard.D. ; Lambeau.G. ;** Nouveau rôle physiopathologique pour le récepteur PLA2R1 dans le cancer et la glomérulonéphrite extra-membraneuse.2014,30,519-525.
- 25- Hanba, M.** (2019). Facteurs pronostiques de l'insuffisance rénale aigue chez l'adulte à l'hopital militaire régional universitaire d'Oran « Doctorat ». Université d'Oran 1 Ahmed benbella.
- 26- Hihara,K.; Lyoda,M.; Tachibana,S; Iseri,K.; Salto,T.; Yamamoto,Y.; Suzuki,T.; Wada,Y.; Matsumoto.K.; Shibata,T.** Anti-phospholipase A2 receptor(PLA2R) antipody and glomerular PLA2R expression in Japanese patients with membranous nephropathy. Plos one, 2016, 1-12.

- 27- Jullien.P.; Seitz-Polski.B.; Maillard.N.; Thibaudin.D.; Laurent.B.; Claisse.G.; Alamartine.E.; Lambeau.G.; Mariat.C.** Intérêt pronostique des anticorps anti-PLA2R dans les glomérulonéphrites extra-membraneuses primitives.2014,10,261-290.
- 28- Lacour, B.** Physiologie du rein et bases physiopathologiques des maladies rénales. Revue Francophone Des Laboratoires, 2013(451), 25–37.
- 29- Laurence,H.; Beck,Jr.** PLA2R and THSD7A: Disparate Paths to the Same Disease. Journal of the American Society of Nephrology Jasn,2017, 28,2579-2589.
- 30- Miot.C. ; Poli.C. ; Beauvillain.C. ; Jeannin.P. ; Renier.G. ; François Subra.J. ; Chevaller.A. ;** Apport de l'immunologie à la prise en charge diagnostique et thérapeutique des glomérulonéphrite extra-membraneuse. Elsevier.2017.495 ;1-20.
- 31- Miloudi.**Le système du complément,Disponible sur <http://univ.ency-education.com>. Consulté le (03/2022)
- 32- Pozdzik.A.A. ; Debiec.H. ; Brochérious.I. ; Husson.C. ; Rorive.S. ; Broeders.N. ; Le Moine.A. ; Ronco.P. ; Nortier.J. ;** Anti PLA2R and anti-NEP antibodies in membranous nephropathy : an update, 2015, Rev.Med.Brux,171-176.
- 33- Patel,D.; Nivera,N.; Tunkel.AR.** Anti-glomerular basement mebrane disease superimposed on membranous nephropathy: a case report and review of the literature.Journal of Case Reports,2010, 1-5.
- 34- Ross M.H, Romrell et Kaye G.I,** Histology : Atext and Atlas. 2 em Ed.2008.
- 35- Rabiller J.,** (2013). Exploration des difficultés dans la prise de traitements au long cours chez le patient transplanté rénal : comment le rendre acteur de sa santé. Thèse de Doctorat en pharmacie , université angers : UFR sciences pharmaceutiques et ingénierie de la santé , p.211.
- 36- Rosenberg M.J.,** (2018). Glomérulonéphrites extra-membraneuses à sérologie PLA2R1 négative : étude observationnelle et analytique sur une série retrospective,multicentrique. Thèse en doctorat d'état en médecine spécialité néphrologie, Université de Nice Sophia-Antipolis Faculté de médecine de Nice, France, p.52.
- 37- Recommandations de bonnesw pratiques médicales. Glomérulonéphrite.**Url : <https://www.Sante.gov.ma> (page consultée le 04/2022)
- 38- Seitz-Polski B.,**(2014) Nouveaux marqueurs diagnostiques et pronostiques dans la glomérulonéphrite extra-membraneuse : suivi des anticorps anti PLA2R1 chez le greffé rénale : caractérisation des épitopes reconnus par les anticorps ant-PLA2R1 : identification d'une nouvelle cible antigénique. Thèse de doctorat en science de la vie. Université de Nice Sophia-Antipolis.p.205.

- 39- Silverthorn, D.U., Ober, W.C., Garrison, C.W., Silverthorn, A.C., Johnson, B.R.** .Physiologie humaine, une approche intégrée. 4ème édition. France : Pearson Education, 2007,pp.936.
- 40- Seitz-Polski B., Lambeau G., Esnault V.,** Glomérulonéphrite extra-membraneuse : mécanisme et histoire naturelle. France. 2017, pp.575.581.
- 41- Seitz-Polski.P. ; Dolla.G., Payré.C. ; Girard.C.A. ; Polidori.J. ; Zoryi.k. ; Birgy-Barelli.E. ; Jullien.P. ; courivaud.C. ; Krummel.T. ; Benzaken.S. ; Bernard.G. ; Burtey.S. ; Mariat.C. ; Esnault.V.L.M. ; Lambeau.G. ;** Epitope spreading of autoantibody response to PLA2R associate with poor prognosis in membranous nephropathy,2015,JASN,1-17.
- 42- Sukocheva.O.; Menschikowski.M.; Hagelgans.A.; Sastry Yalra.N.; Siegert.G.; Reddanna.P.; Bishayee.A.**Current insights functions of phospholipase A2 receptor in normal and cancer cells: more question than answers.2017,9-11.
- 43- Titora G.J Angostakos N.P.P.**(1988) : principe d'anatomie et de physiologie Ed motereal quebec.pp :706,707,711,717.
- 44- Tomas NM, Beck LH Jr, Meyer-Schwesinger C, Seitz-Polski B, Ma H, Zahner G, et al.** Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy. N Engl J Med. 2014;371:2277-87.
- 45- Tang.H. ; Zhu.R. ; Waldman.M. ; Zhu.Q. ;** Structural determinants of the dominant conformational epitope of phospholipase A2 receptor in primary membranous nephropathy,2022, JBC,1-15.
- 46- Takahachi.S.; Watanabe.Y.; Fujioka.D.; Nakamura.T.; Nakamura.K.; Obata.J.; Kugiyama.K.C.** Type lectin-like and fibronectin -like type II domain of phospholipase A2 receptor 1 modulate binding and migratory responses to collagen.FEBS,2015,589,829-835.
- 47- Van de logt.A E. ; Fresquet.M. ; Weszels.JK. ; Brenchley.P.** The anti PLA2R antibody in membranous nephropathy ; what we know and what remains a decade after its discovery. Elsevier.2019 ; 1-11.
- 48- Wang.Y,Wang.G.P,Li.B.M,Chen.Q.K.** Clinicopathological analysis of idiopathic membranous nephropathy in young adults. Genetics and Molecular Research 14 (2): 4541-4548 (2015).
- 49- Zeller M.** (2016). Physiologie rénale.UE 2.2 Cycle de la vie et grandes fonction. 35(1),7.

Annexes

A 01

RESEIGNEMENTS POUR BILAN IMMUNOLOGIQUE

Date : .../.../....

Nom :

Prénom :

Sexe : F: H:

Age :

Hospitalisé :

Externe :

Service :

Médecin traitant :

Début de la symptomatologie :

Signes cliniques : (détaillés).....

.....
.....
.....

Résultats des examens complémentaires : (si déjà faits)

Examens biologiques :

Créatinine : Albumine : Protéinurie des 24h :

D'autres :

Examens radiologiques :

.....

Résultat Biopsie : (si déjà faits).....

Diagnostic suspecté :

Traitement éventuel : le ou les quel(s) :.....

.....

Examens demandés :

Dosage des auto-anticorps Anti Phospholipase A2 Récepteur.

<p>Matériel consommable</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Coton -Garrot en caoutchouc -Sparadrap médical -Gants chirurgicaux -Les tubes sec -Les tubes à essai avec portoire -Microplaque -Micropipettes de 50ul /1000ul -Embouts bleus et jaunes -Etiquettes d'identité -Eau distillée
<p>Appareillage</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Centrifugeuse ROTOFIX 32 A -Incubateur de microplaques IPS -Laveur de microplaques PW 4 -Lecteur de microplaques d'absorbance PR 4100 TSC - Réfrigérateur pour la conservation du réactif
<p>Réactifs</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Calibrateur 1 2 Ru/ml -Calibrateur 2 20 Ru/ml -Calibrateur 3 100 Ru/ml -Calibrateur 4 500 Ru/ml -Calibrateur 5 1500 Ru/ml -Contrôle positive (IgG humain) -Contrôle négative (IgG humain) -Conjugué enzymatique (anti IgG humain marqué par le peroxydase) -Tampon d'échantillonnage -Solution de lavage concentré * 10 -Chromogène/substrat(TMB/H2O2) -Solution stop 0,5 M acide sulfurique

A 02

Appareillage :



Figure 23: Centrifugeuse ROTOFIX 32 A

Centrifugeuse robuste et polyvalente, indispensable pour les tâches de routine de laboratoire dans les cabinets médicaux et les laboratoires hospitaliers de petite taille, en particuliers pour les tâches de biologie clinique et de cytologie, ainsi que pour la préparation des échantillons dans les laboratoires en milieu industriel et en recherche.

- Boîtier et couvercle en métal, chambre en acier inoxydable, dispositif pratique de verrouillage du couvercle, orifice d'observation dans le couvercle.
- Clavier à grille facile à utiliser pour une saisie rapide, précise et simple des paramètres par le biais de touches de sélection.
- Touche d'impulsion pour une centrifugation courte, touche RCF.

Spécification :

Modèle : ROTOFIX 32 A

Capacité max-rotor libre : 4*100 / 32*15ml

Vitesse max-rotor angulaire(min-1) : 6000

RFC max- rotor angulaire (*g) : 4226

Minuterie : 1-99 min, fonctionnement continu, mode cycle court (touche à impulsion)

Alimentation : 208 – 240 V / 50 – 60 Hz

L*P*H (mm) : 366*430*257

Poids (kg) : 23



Figure 24: Incubateur de microplaques IPS

L'incubateur des microplaques IPS est un incubateur sec utilisé pour chauffer et maintenir une température constante et homogène à l'intérieur des puits d'une microplaque contenant un milieu réactionnel donné.

- Utilisable pour toutes les techniques de microplaques.
- Ne nécessite ni eau ni entretien.
- Température d'incubation régulée à 0,5 °C
- Peut contenir jusqu'à 4 microplaques de 96 puits.

Un capteur de température est situé sous la plaque chauffante IPS. Un contrôleur connecté à ce capteur applique un courant à un élément qui chauffe la plaque. Le capteur surveille et régule en permanence la température.

Le couvercle de l'IPS réduit l'effet des paramètres externes sur la température de la plaque chauffante et sur les microplaques.

Spécification :

Plage de fonctionnement : 30 – 40 °C

Variation de température : +- 0,5 °C

Dimension : 240*360*160 mm

Poids : 7,2 (kg)

Capacité : 1 à 4 microplaques de 96 puits



Figure 25: Laveur de microplaques PW40

Laveur de microplaques PW40 est compacte et programmable, avec un peigne de lavage à 8 canaux, une pompe à vide et des pompes de distribution intégrées. Le laveur PW40 est facile à programmer et offre un large choix de méthodes de lavage, qui peuvent être combinées selon les besoins de l'utilisateur. Une séquence logique de questions permet à l'opérateur de programmer facilement les lavages.

Caractéristique et avantage :

Compatible avec les puits en U, en V ou à fond plat. Les têtes d'aspiration de distribution peuvent être ajustées verticalement et horizontalement sur les puits de microplaque à 0,1 mm près.

Le couvercle protège l'environnement immédiat contre les aérosols.

Le support de microplaque autoclavable se retire facilement pour la décontamination.

Essais Bio-Rad préprogrammés le laveur PW40 comprend un collecteur à 8 voies relié à une pompe à vide et une pompe de distribution intégrée (les collecteurs en option sont disponibles séparément). Un flacon de lavage, un flacon de déchets et un flacon de rinçage sont inclus (2 L chacun).

Des capteurs de niveau de liquide et un capteur de vide assurent la sécurité quotidienne du cycle de lavage des microplaques.

Dimension (I*L*H) : 368*530*243 mm

Poids : 10,1 kg

Tension et fréquence d'entrée : 110-120 V ou 220-240 V / 50-60 Hz

Sortie : 100 VA max

Condition de fonctionnement : 15-30 °C / 15-85 % HR

Performances

Précision : + 5 % RSD (0,9 % NaCl W/v)

Volume de lavage : 50-3000 ul par puits

Volume résiduel par puits : < 2ul par puits

Capacité de stockage : jusqu'à 75 kits

Temps de trempage en mode de plaque : 0-60 min par intervalle de 1 s

En mode bandelette : 0-16 min par intervalle de 1 s



Figure 26: lecture de microplaques d'absorbance PR 4100 TSC

Le lecteur de microplaques PR 4100 est le lecteur de microplaque d'absorbance 8 canaux de nouvelle génération de BIO-Rad.

Il fournit des mesures précises, reproductibles et rapides à partir d'un design compact et innovant. Contrôlé par un PC, le système est validé avec le menu complet des tests EIA de BIO-Rad.

Fiabilité améliorée :

- La dernière technologie LED pour une longue durée de vie et un fonctionnement sans maintenance.
- Le lecture de microplaques d'absorbance à 8 canaux pour des mesures rapides, fonction de contrôle qualité complète avec plaque à vérification multiples.

Conception innovante :

- Empreinte compacte lecteur autonome fonctionnant avec un PC portable.

Logiciel basé sur Windows R 10.

Logiciel complet d'analyse des données.

- Protocole validé selon le processus d'assurance qualité de BIO-Rad
- Analyse de données puissante avec analyse EIA qualitative et quantitative complète.

Conforme aux normes 98/79 CE IVD-D et FDA 21 CFR part 11.



Figure 27: Vortex Mixer assistant reamix 278

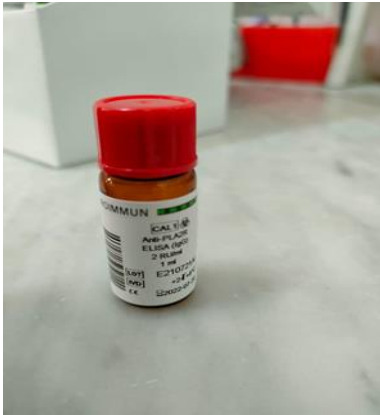


Figure 28: Calibrateur 1 (1 ml)



Figure 29: Calibrateur 2 (2 ml)

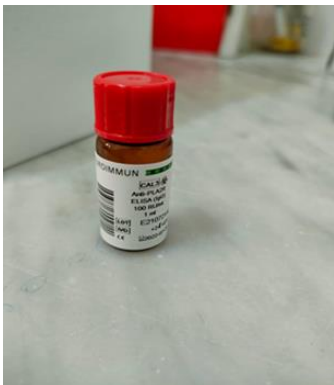


Figure 30: Calibrateur 3 (1 ml)

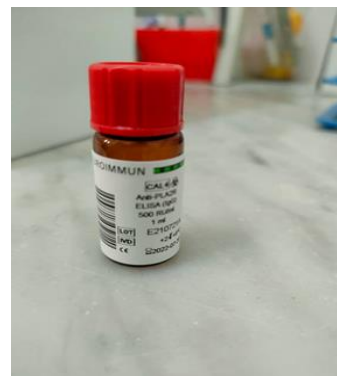


Figure 31: Calibrateur 4(1 ml)

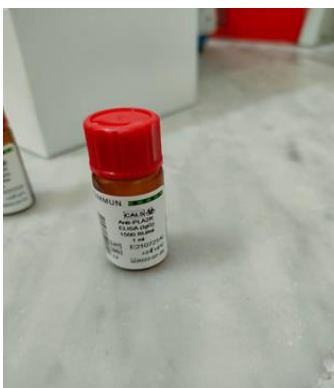


Figure 32: Calibrateur 5 (1 ml)

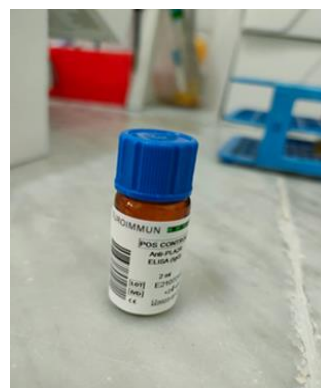


Figure 33: Contrôle positive (2 ml)

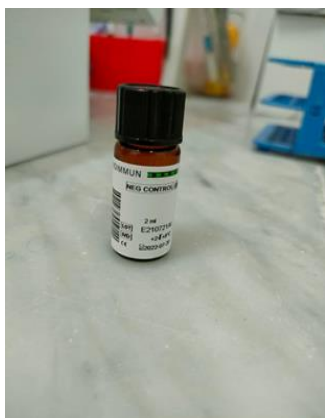


Figure 34: Contrôle négative (2 ml)

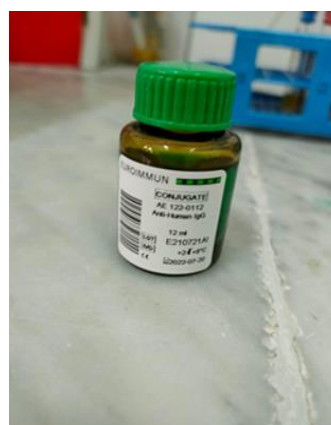


Figure 35: Conjugué enzymatique (12 ml)

REF : 122-0112



Figure 36: Tampon d'échantillonnage (100 ml)

REF : 1100-0100

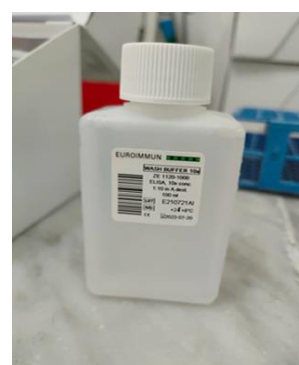


Figure 37: Solution de lavage (100 ml)

REF : 1120-1000

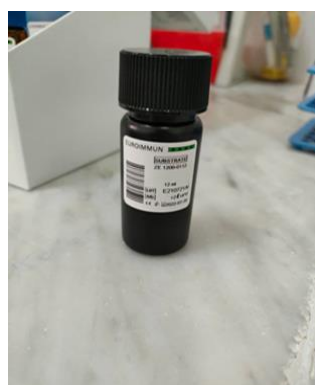


Figure 38: Substrat (12 ml)

REF : 1200-0112



Figure 39: solution stop (12 ml)

REF : 1210-0112

A 03

EUROIMMUN

Medizinische
Labordiagnostika
AG

Anti-PLA2R ELISA (IgG)

Test instruction

ORDER NO.	ANTIBODIES AGAINST	IG CLASS	SUBSTRATE	FORMAT
EA 1254-9601 G	PLA2R	IgG	Ag-coated microplate wells	96 x 01 (96)

Indication: membranous glomerulonephritis (MGN).

Application: Autoantibodies of class IgG against phospholipase A2 receptors are highly specific for the diagnosis of primary MGN and can be detected in the serum of up to 70%-75% of patients. The ELISA allows qualitative and quantitative determination of human autoantibodies of class IgG against PLA2 receptors. Therapy outcome can be monitored by measuring the anti-PLA2R antibody titer. A titer increase, decrease or disappearance generally precedes a change in the clinical status. Thus, the determination of the antibody titer has a high predictive value with respect to clinical remission, relapse or risk assessment after kidney transplantation.

Principles of the test: The ELISA test kit provides a semiquantitative or quantitative in vitro assay for human autoantibodies of the IgG class against PLA2R in serum or plasma. The test kit contains microtiter strips each with 8 break-off reagent wells coated with PLA2R. In the first reaction step, diluted patient samples are incubated in the wells. In the case of positive samples, specific IgG antibodies (also IgA and IgM) will bind to the antigens. To detect the bound antibodies, a second incubation is carried out using an enzyme-labelled anti-human IgG (enzyme conjugate) catalysing a colour reaction.

Contents of the test kit:

Component	Colour	Format	Symbol
1. Microplate wells , coated with antigens: 12 microplate strips each containing 8 individual break-off wells in a frame, ready for use	—	12 x 8	[STRIPS]
2. Calibrator 1 2 RU/ml (IgG, human), ready for use	red	1 x 1.0 ml	[CAL 1]
3. Calibrator 2 20 RU/ml (IgG, human), ready for use	red	1 x 2.0 ml	[CAL 2]
4. Calibrator 3 100 RU/ml (IgG, human), ready for use	red	1 x 1.0 ml	[CAL 3]
5. Calibrator 4 500 RU/ml (IgG, human), ready for use	red	1 x 1.0 ml	[CAL 4]
6. Calibrator 5 1500 RU/ml (IgG, human), ready for use	red	1 x 1.0 ml	[CAL 5]
7. Positive Control (IgG, human), ready for use	blue	1 x 2.0 ml	[POS CONTROL]
8. Negative control (IgG, human), ready for use	green	1 x 2.0 ml	[NEG CONTROL]
9. Enzyme conjugate peroxidase-labelled anti-human IgG (rabbit), ready for use	green	1 x 12 ml	[CONJUGATE]
10. Sample buffer ready for use	light blue	1 x 100 ml	[SAMPLE BUFFER]
11. Wash buffer 10x concentrate	colourless	1 x 100 ml	[WASH BUFFER 10x]
12. Chromogen/substrate solution TMB/H ₂ O ₂ , ready for use	colourless	1 x 12 ml	[SUBSTRATE]
13. Stop solution 0.5 M sulphuric acid, ready for use	colourless	1 x 12 ml	[STOP SOLUTION]
14. Test instruction	—	1 booklet	
15. Quality control certificate	—	1 protocol	
[LOT] Lot description	CE	↓ Storage temperature	
[ND] In vitro diagnostics		☒ Unopened usable until	

EUROIMMUN

Medizinische
Labordiagnostika
AG

Preparation and stability of the reagents

Note: All reagents must be brought to room temperature (+18°C to +25°C) approx. 30 minutes before use. After first use, the reagents are stable until the indicated expiry date if stored at +2°C to +8°C and protected from contamination, unless stated otherwise below.

- **Coated wells:** Ready for use. Tear open the resealable protective wrapping of the microplate at the recesses above the grip seam. Do not open until the microplate has reached room temperature to prevent the individual strips from moistening. Immediately replace the remaining wells of a partly used microplate in the protective wrapping and tightly seal with the integrated grip seam (Do not remove the desiccant bag).
Once the protective wrapping has been opened for the first time, the wells coated with antigens can be stored in a dry place and at a temperature between +2°C and +8°C for 4 months.
- **Calibrators and controls:** Ready for use. The reagents must be mixed thoroughly before use.
- **Enzyme conjugate:** Ready for use. The enzyme conjugate must be mixed thoroughly before use.
- **Sample buffer:** Ready for use.
- **Wash buffer:** The wash buffer is a 10x concentrate. If crystallization occurs in the concentrated buffer, warm it to 37°C and mix well before diluting. The quantity required should be removed from the bottle using a clean pipette and diluted with deionized or distilled water (1 part reagent plus 9 parts distilled water).
For example: For 1 microplate strip, 5 ml concentrate plus 45 ml water.
The working strength wash buffer is stable for 4 weeks when stored at +2°C to +8°C and handled properly.
- **Chromogen/substrate solution:** Ready for use. Close the bottle immediately after use, as the contents are sensitive to light ☞. The chromogen/substrate solution must be clear on use. Do not use the solution if it is blue coloured.
- **Stop solution:** Ready for use.

Storage and stability: The test kit has to be stored at a temperature between +2°C to +8°C. Do not freeze. Unopened, all test kit components are stable until the indicated expiry date.

Waste disposal: Patient samples, control and incubated microplate strips should be handled as infectious waste. All reagents should be disposed of according to official regulations.

Warning: All materials should be treated as being a potential infection hazard and should be handled with care. Some of the reagents contain the toxic agent sodium azide. Avoid skin contact.

Preparation and stability of the patient samples

Samples: Human serum or EDTA, heparin or citrate plasma.

Stability: Patient samples to be investigated can generally be stored at +2°C to +8°C for up to 14 days. Diluted samples should be incubated within one working day.

Sample dilution: Patient samples are diluted 1:101 in sample buffer. For example: dilute 10 µl serum in 1.0 ml sample buffer and mix well by vortexing (sample pipettes are not suitable for mixing).

NOTE: Calibrators and controls are prediluted and ready for use, do not dilute them.

EUROIMMUN

Medizinische
Labordiagnostika
AG

Incubation

For **qualitative/semiquantitative analysis** incubate **calibrator 2** along with the positive and negative controls and patient samples. For **quantitative analysis** incubate **calibrators 1 to 5** along with the positive and negative controls and patient samples.

Partly) manual test performance

Sample incubation:
(1st step)

Transfer 100 µl of the positive control, negative control or diluted patient samples into the individual microplate wells according to the pipetting protocol. Incubate for **30 minutes** at room temperature (+18°C to +25°C).

Washing:

Manual: Empty the wells and subsequently wash 3 times using 300 µl of working strength wash buffer for each wash.

→ Automatic: Wash reagent wells 3 times with 450 µl of working strength wash buffer (program setting: e.g. TECAN Columbus Washer "Overflow Modus").

Leave the wash buffer in each well for 30 to 60 seconds per washing cycle, then empty the wells. After washing (manual and automated tests), thoroughly dispose of all liquid from the microplate by tapping it on absorbent paper with the openings facing downwards to remove all residual wash buffer.

Note: Residual liquid (> 10 µl) remaining in the reagent wells after washing can interfere with the substrate and lead to false low extinction values. Insufficient washing (e.g., less than 3 wash cycles, too small wash buffer volumes, or too short residence times) can lead to false high extinction values.

Free positions on the microplate strip should be filled with blank wells of the same plate format as that of the parameter to be investigated.

Conjugate incubation:
(2nd step)

Pipette 100 µl of enzyme conjugate (peroxidase-labelled anti-human IgG) into each of the microplate wells. Incubate for **30 minutes** at room temperature (+18°C to +25°C).

Washing:

Empty the wells. Wash as described above.

Substrate incubation:
(3rd step)

Pipette 100 µl of chromogen/substrate solution into each of the microplate wells. Incubate for **15 minutes** at room temperature (+18°C to +25°C) protect from direct sunlight.

Stopping the reaction:

Pipette 100 µl of stop solution into each of the microplate wells in the same order and at the same speed as the chromogen/substrate solution was introduced.

Measurement:

Photometric measurement of the colour intensity should be made at a wavelength of 450 nm and a reference wavelength between 620 nm and 650 nm **within 30 minutes of adding the stop solution**. Prior to measuring, slightly shake the micro-plate to ensure a homogeneous distribution of the solution.

EUROIMMUN

Medizinische
Labordiagnostika
AG

Test performance using fully automated analysis devices

Sample dilution and test performance are carried out fully automatically using the analysis device. The incubation conditions programmed in the respective software authorised by EUROIMMUN may deviate slightly from the specifications given in the ELISA test instruction. However, these conditions were validated in respect of the combination of the EUROIMMUN Analyzer I and the Analyzer I-2P and this EUROIMMUN ELISA. Validation documents are available on inquiry.

Automated test performance using other fully automated, open system analysis devices is possible, however, the combination should be validated by the user.

Pipetting protocol

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C 2	P 6	P 14	P 22			C 1	P 2	P 10	P 18		
B	pos.	P 7	P 15	P 23			C 2	P 3	P 11	P 19		
C	neg.	P 8	P 16	P 24			C 3	P 4	P 12	P 20		
D	P 1	P 9	P 17	P 25			C 4	P 5	P 13	P 21		
E	P 2	P 10	P 18				C 5	P 6	P 14	P 22		
F	P 3	P 11	P 19				pos.	P 7	P 15	P 23		
G	P 4	P 12	P 20				neg.	P 8	P 16	P 24		
H	P 5	P 13	P 21				P 1	P 9	P 17	P 25		

The pipetting protocol for microtiter strips 1-4 is an example for the qualitative/semiquantitative analysis of 25 patient sera (P 1 to P 25).

The pipetting protocol for microtiter strips 7-10 is an example for the quantitative analysis of 25 patient sera (P 1 to P 25).

The calibrators (C 1 to C 5), the positive (pos.) and negative (neg.) controls, and the patient samples have each been incubated in one well. The reliability of the ELISA test can be further improved by duplicate determinations for each sample. Both positive and negative controls serve as internal controls for the reliability of the test procedure. They should be assayed with each test run.

Calculation of results

Qualitative/semiquantitative: Results can be evaluated semiquantitatively by calculating a ratio of the extinction value of the control or patient sample over the extinction value of calibrator 2. Calculate the ratio according to the following formula:

$$\frac{\text{Extinction of the control or patient sample}}{\text{Extinction of calibrator 2}} = \text{Ratio}$$

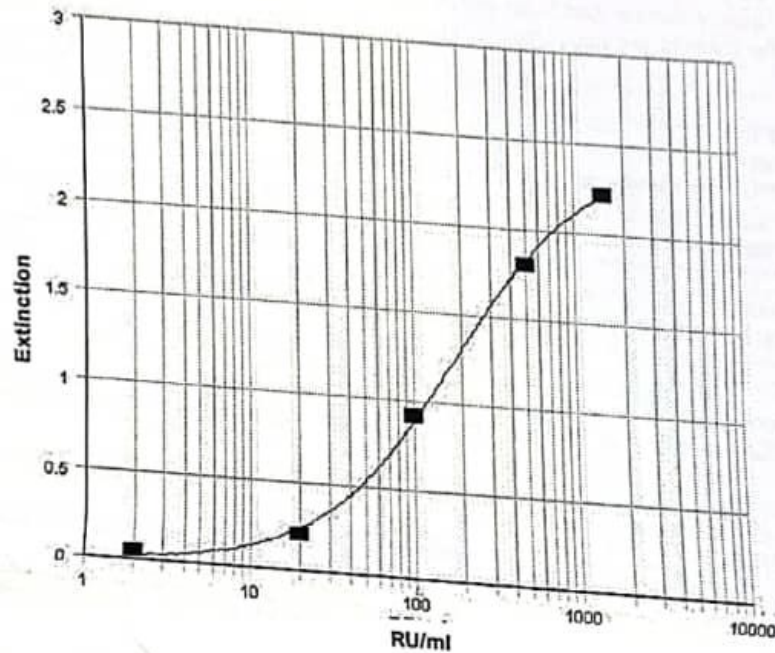
EUROIMMUN recommends interpreting results as follows:

Ratio <0,7:	negative
Ratio ≥0,7 to <1,0:	borderline
Ratio ≥1,0:	positive

EUROIMMUN

Medizinische
Labordiagnostika
AG

Quantitative: The standard curve from which the antibody concentration in the unknown sample can be taken is obtained by plotting the extinction values measured for the 5 calibration sera (linear, y-axis) against the corresponding concentrations (logarithmic, x-axis). The standard curve can be calculated by computer using one of the following curve-fitting techniques: 4-parameter logistic, 5-parameter logistic, spline fits, log/logit curve and lim/limit curve. The following plot is an example of a typical calibration curve. Please do not use this curve for the determination of antibody concentrations in patient samples.



If the extinction for a patient sample lies above that of calibrator 5 (1500 RU/ml), the result should be reported as ">1500 RU/ml". It is recommended that the sample be remeasured in a new test run at a dilution of e.g. 1:400. The result in RU/ml read from the calibration curve for this sample must then be multiplied by a factor of 4. The upper limit of the normal range (cut-off) recommended by EUROIMMUN is 20 relative units (RU)/ml. EUROIMMUN recommends interpreting results as follows:

<14 RU/ml:	negative
≥14 to <20 RU/ml:	borderline
≥20 RU/ml:	positive

For duplicate determinations the mean of the two values should be taken. If the two values deviate substantially from one another the sample should be retested.

For diagnosis, the clinical symptoms of the patient should always be taken into account along with the serological results.

EUROIMMUN

Medizinische
Labordiagnostika
AG

Test characteristics

Calibration: As no international reference serum exists for antibodies against PLA2R antigen, the calibration is performed in relative units (RU).

For every group of tests performed, the extinction values of the calibrators and the relative units and/or ratios determined for the positive and negative controls must lie within the limits stated for the relevant test kit lot. A quality control certificate containing these reference values is included. If the values specified for the controls are not achieved, the test results may be inaccurate and the test should be repeated.

The activity of the enzyme used is temperature-dependent and the extinction values may vary if a thermostat is not used. The higher the room temperature (+18°C to +25°C) during substrate incubation, the greater will be the extinction values. Corresponding variations apply also to the incubation times. However, the calibrators are subject to the same influences, with the result that such variations will be largely compensated in the calculation of the result.

Antigen: The reagent wells are coated with recombinant phospholipase A2 receptors. The recombinant protein based on human cDNA was produced in a human cell line.

Linearity: The linearity of the Anti-PLA2R ELISA (IgG) was determined by assaying at least four serial dilutions of different patient samples. The coefficient of determination R^2 for all sera was > 0.95. The Anti-PLA2R ELISA (IgG) is linear at least in the tested concentration range (6 RU/ml to 1500 RU/ml).

Detection limit: The lower detection limit is defined as the mean value of an analyte-free sample plus three times the standard deviation and is the smallest detectable antibody titer. The lower detection limit of the Anti-PLA2R ELISA (IgG) is 0.6 RU/ml.

Cross reactivity: The ELISA specifically detects antibodies of class IgG directed against PLA2R. There were no cross reactions with other autoantibodies in samples of patients with thyroiditis (n = 5), Sjögren's syndrome (n = 5), SSc (n = 5) and RA (n = 5).

Interference: Haemolytic, lipaemic and icteric samples showed no influence on the result up to a concentration of 10 mg/ml for haemoglobin, 20 mg/ml for triglycerides and 0.4 mg/ml for bilirubin in this ELISA.

Reproducibility: The reproducibility of the test was investigated by determining the intra- and inter-assay coefficients of variation using three sera. The intra-assay CVs are based on 20 determinations and the inter-assay CVs on three determinations performed in 10 different test runs.

Intra-assay variation, n = 20		
Serum	Mean value (RU/ml)	CV (%)
1	26	3.4
2	97	1.7
3	861	5.7

Inter-assay variation, n = 3 x 10		
Serum	Mean value (RU/ml)	CV (%)
1	28	4.2
2	99	6.4
3	878	10.3

EUROIMMUN

Medizinische
Labordiagnostika
AG

Clinical sensitivity and specificity: Sera from 122 patients with primary membranous glomerulonephritis (pMGN), from a control panel of 342 patients with other diseases and 191 healthy blood donors were investigated using the EUROIMMUN Anti-PLA2R ELISA. The sensitivity of the ELISA for pMGN was 97.5%, at a specificity of 100%, including borderline results.

n = 122		IIFT	
		positive	negative
ELISA	positive	118	0
	borderline	1	0
	negative	3	0

Panel	Anti-PLA2R ELISA	
	n	(specificity) borderline / positive
Other glomerulonephritides	181	0 (100%)
Other autoimmune diseases	161	0 (100%)
Blood donors	191	0 (100%)
Total	533	0 (100%)

Reference range: Levels of anti-PLA2R antibodies were analysed in 191 sera from healthy blood donors using the EUROIMMUN ELISA. The mean concentration of antibodies against PLA2R was 0.4 RU/ml and ranged from 0.0 to 5.0 RU/ml. With a cut-off value of 20 RU/ml, 0% of blood donors were anti-PLA2R positive.

Cut-off	Percentile
3.8 RU/ml	99.
5.0 RU/ml	100.



Clinical Significance

The detection of autoantibodies against phospholipase A2 receptors (PLA2R) is useful in the diagnosis of primary membranous glomerulonephritis (MGN, pMGN), which has formerly been known as idiopathic membranous nephropathy (IMN). MGN is a chronic inflammatory disease of the renal corpuscle (glomeruli), which is accompanied by a progressive reduction in kidney function.

The autoimmune mechanism of MGN, which was first discovered and described in 2009, is the result of autoantibodies reacting with PLA2R (transmembrane glycoproteins), which are expressed in human glomeruli on the surface of podocytes. They are involved in regulatory processes in the cell following phospholipase binding. Up until now two main groups of PLA2R have been described (types M and N), with the M type of the PLA2 receptor being identified as the major target antigen of autoantibodies. Autoantibodies against PLA2R are suspected to be pathogenetically relevant, although the exact pathogenesis is still unknown. Circulating autoantibodies expressed by MGN patients bind to PLA2R on podocytes. Immune complexes are produced in situ in the area of the glomerular basement membrane. There, they might trigger complement activation, which causes damage to podocytes and the blood-urine barrier. This leads to protein entering the primary urine, and subsequently proteinuria. Alternatively, the autoantibodies can also act as receptor agonists or antagonists and damage the podocyte architecture and, hence, the barrier function.

MGN is the most frequent kidney disorder with nephrotic syndrome. With increasing proteinuria, the long-term risk of kidney failure with major morbidity and mortality becomes higher, particularly in connection with thromboembolic and cardiovascular complications.

MGN is prevalent in all ethnic groups and genders, with men over 40 years of age and of white skin colour being more frequently affected. In young women with suspected MGN, lupus nephritis should be considered. MGN is rare in children (only 2-3% of kidney disorders in children).

Symptoms in MGN:

- Around 80% of MGN patients suffer from nephrotic syndrome with sometimes severe oedema in the legs and eye lids, weight gain and reduced urination.
- Around 20% of patients have proteinuria without any additional symptoms.
- Around 50% of patients have microscopic haematuria, albuminuria and glucosuria.
- Around 70% of patients show normal blood pressure and kidney function at the onset of the disease.

MGN can proceed in many different ways. In around one third of cases the disease heals spontaneously. In a further third it is stagnant and in the final third it progresses to chronic kidney failure. Acute kidney failure is rare. In chronic cases, complete kidney failure (terminal kidney insufficiency) occurs after five years in approx. 15% of untreated patients, after ten years in approx. 35% and after 15 years in approx. 40%.

Primary membranous glomerulonephritis (pMGN) should be discriminated from secondary membranous glomerulonephritis (sMGN), which is a secondary (accompanying) disease in infections, in drug therapy or abuse or intake of toxins, in collagenosis and other autoimmune diseases and in tumours. sMGN improves with treatment of the underlying disease. The treatment of MGN as an independent disease improves prognosis, particularly with respect to nephrotic syndrome and hypertonicity.

Diagnosis of MGN is made by kidney puncture, histological examination and electron microscopy of the kidney tissue. The deposition of immune complexes on the outside of the glomerular basement membrane is characteristic for the disease.

Serological diagnosis of MGN, however, is less time-consuming and less stressful for the patient. The identification and characterisation of PLA2R (type M) as the target antigen of circulating antibodies in MGN has proven to be of major importance for non-invasive diagnostics. Autoantibodies of class IgG against PLA2R are highly specific for the diagnosis of primary MGN. They can be detected in the serum of up to 70% to 75% patients. They are not exhibited by healthy blood donors or patients with lupus or IgA nephritis.



RC-IFT and ELISA are available for the determination of autoantibodies against PLA2R. The Anti- PLA2R RC-IFT uses transfected cells as standard substrate. The Anti- PLA2R ELISA is based on purified human recombinant receptor from transfected cells. RC-IFT and ELISA are suited for qualitative and quantitative detection of human autoantibodies of class IgG against PLA2R. The success of therapeutic measures can be assessed by means of the anti- PLA2R titer. A titer increase, decrease or disappearance generally precedes a change in the clinical status. Thus, the determination of the autoantibody titer has a high predictive value with respect to clinical remission or relapse and estimation of the risk of relapse after kidney transplantation.

Literature references

1. Beck LH Jr, Bonegio RG, Lambeau G, Beck DM, Powell DW, Cummins TD, Klein JB, Salant DJ. **M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy.** *N Engl J Med* 361 (2009) 11-21.
2. Beck LH Jr, Salant DJ. **Membranous nephropathy: recent travels and new roads ahead.** *Kidney Int* 77 (2010) 765-770.
3. Chen A, Frank R, Vento S, Crosby V, Chandra M, Gauthier B, Valderrama E, Trachtman H. **Idiopathic membranous nephropathy in pediatric patients: presentation, response to therapy, and long-term outcome.** *BMC Nephrol* 8 (2007) 11.
4. Debiec H, Martin L, Jouanneau C, Dautin G, Mesnard L, Rondeau E, Mousson C, Ronco P. **Autoantibodies Specific for the Phospholipase A2 receptor in Recurrent and De Novo Membranous Nephropathy.** *Am J Transplant* 11 (2011) 2144-2152.
5. Debiec H, Ronco P. **Nephrotic syndrome: A new specific test for idiopathic membranous nephropathy.** *Nat Rev Nephrol* 7 (2011) 496-498.
6. EUROIMMUN AG. **Stöcker W, Schlumberger W, Krüger C. Alle Beiträge zum Thema Autoimmundiagnostik.** In: Gressner A, Arndt T (Hrsg.) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 2. Auflage. Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2012).
7. Gunnarsson I, Schlumberger* W, Rönnelid J. (*EUROIMMUN AG) **Antibodies to M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) and membranous lupus nephritis.** *Am J Kidney Dis* 59 (2012) 582-589.
8. Hofstra JM, Beck LH Jr, Beck DM, Wetzels JF, Salant DJ. **Anti-phospholipase A2receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy.** *Clin J Am Soc Nephrol* 6 (2011) 1286-1291.
9. Hofstra JM, Wetzels JF. **Anti-PLA2R antibodies in membranous nephropathy: ready for routine clinical practice?** *Neth J Med* 70 (2012) 109-113.
10. Fervenza FC, Sethi S, Specks U. **Idiopathic membranous nephropathy: diagnosis and treatment.** *Clin J Am Soc Nephrol* 3 (2008) 905-919.
11. Hoxha E, Harendza S, Zahner G, Panzer U, Steinmetz O, Fechner* K, Helmchen U, Stahl RA. (*EUROIMMUN AG) **An immunofluorescence test for phospholipase-A2-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis.** *Nephrol Dial Transplant* 26 (2011) 2526-2532.
12. Hoxha E, Kneißler U, Stege G, Zahner G, Thiele I, Panzer U, Harendza S, Helmchen UM, Stahl RA. **Enhanced expression of the M-type phospholipase A2 receptor in glomeruli correlates with serum receptor antibodies in primary membranous nephropathy.** *Kidney Int* (2012) Jun 6. doi: 10.1038/ki.2012.209. [Epub ahead of print]
13. Michel PA, Dahan K, Ancel PY, Plaisier E, Mojaat R, De Seigneux S, Daugas E, Matignon M, Mesnard L, Karras A, François H, Pardon A, Caudwell V, Debiec H, Ronco P. **Rituximab treatment for membranous nephropathy: a French clinical and serological retrospective study of 28 patients.** *Nephron Extra* 1 (2011) 251-261.

EUROIMMUNMedizinische
Labordiagnostika
AG

14. Ponticelli C, Passerini P. **Can prognostic factors assist therapeutic decisions in idiopathic membranous nephropathy?** J Nephrol 23 (2010) 156-163.
15. Ronco P, Debiec H. **Antigen identification in membranous nephropathy moves toward targeted monitoring and new therapy.** J Am Soc Nephrol 21 (2010) 564-569.
16. Ronco P, Debiec H. **Pathogenesis of membranous nephropathy: recent advances and future challenges.** Nat Rev Nephrol 8 (2012) 203-213.
17. Ruggenenti P, Cravedi P, Remuzzi G. **Latest treatment strategies for membranous nephropathy.** Expert Opin Pharmacother 8 (2007) 3159-3171.
18. Stahl R, Hoxha E, Fechner* K. (*EUROIMMUN AG) **PLA2R autoantibodies and recurrent membranous nephropathy after transplantation.** N Engl J Med 29 (2010) 496-498.
19. Stöcker* W, Fauer* H, Krause* C, Barth E, Martinetz T. (*EUROIMMUN AG) **Vorfahren zur Optimierung der automatischen Fluoreszenzerkennung in der Immundiagnostik.** Deutsche Patentanmeldung (Offenlegungsschrift) DE 10 2006 027 516.0 und WO2007140952 (2006).

Résultats du mois de Janvier

Patients	Sexe	Âge	Paramètres				Biopsie		Type de la biopsie
			Créatinine mg/l	Protéinurie 24h	Albuminémie g/l	Anti-PLA2R	Oui	Non	
1	Femme	53	10	0,1	41	<20UR	/		Néphropathie EM de classe III
2	Femme	31	10	2,5	42	<20UR	/		GEM de type I
3	Homme	71	12	0,48	43	<20UR	/		GEM
4	Femme	41	10,4	0,56	40	<20UR		/	
5	Femme	73	12	0,05	45	<20UR	/		GEM
6	Homme	70	18	3,46	25	<20UR	/		GEM de type II polytypique
7	Homme	32	13,9	2,6	35	<20UR	/		GEM
8	Homme	50	7,22	2	36	<20UR	/		GEM
9	Femme	48	7,53	0,16	42	<20UR	/		GEM
10	Femme	53	20	6,2	19,6	30UR		/	
11	Femme	44	10	2,2	31	342UR	/		GEM
12	Femme	19	6,5	1,35	34	<20UR	/		GEM de type I polytypique
13	Homme	24	8,55	0,17	32	<20UR	/		GEM
14	Homme	40	6,9	0,3	49	<20UR	/		GEM de type II
15	Homme	19	7	0,25	30	<20UR		/	
16	Homme	55	10,8	1,29	34	<20UR	/		GEM
17	Femme	51	12	3,4	25	<20UR	/		GEM de type I.II polytypique
18	Femme	45	13,9	0,9	42,3	<20UR		/	GEM de type II polytypique
19	Homme	35	9,6	0,36	39	<20UR	/		GEM
20	Homme	54	12	1,2	33	<20UR	/		GEM
21	Homme	71	8	1,2	31	<20UR		/	
22	Homme	43	7,3	4,41	32	<20UR		/	
23	Homme	38	7,7	0,59	41,4	<20UR	/		GEM

Résultats du mois de Juin

Patients	Sexe	Âge	Paramètre				Biopsie		Type de la biopsie
			Créatinine mg/l	Protéinurie 24h g/24h	Albuminémie g/l	Anti-PLA2R	Oui	Non	
1	Femme	53	12,8	0,138	36	<20UR	/		GEM polytypique de type II
2	Femme	31	8	0,65	42	<20UR	/		GEM de type I
3	Homme	71	12,5	0,35	43	<20UR	/		GEM
4	Femme	41	6,22	1,55	40,1	<20UR		/	
5	Femme	73	12	0,17	45,8	<20UR	/		GEM
6	Homme	70	18	3,46	39	<20UR	/		GEM de type II polytypique
7	Homme	32	15,56	6,6	33	<20UR	/		GEM
8	Homme	50	15,56	0,055	36	<20UR	/		GEM
9	Femme	48	7,6	0,18	42,28	<20UR	/		GEM
10	Femme	53	14,36	0,7	39,29	<20UR		/	
11	Femme	44	8	2,8	31	444UR	/		GEM
12	Femme	16	5	1,7	41	32UR	/		GEM de type I polytypique
13	Homme	24	9,33	0,127	38,2	<20UR	/		CEM
14	Homme	40	7,96	0,163	48,48	<20UR	/		GEM de type II
15	Homme	19	4,05	0,345	28	42UR		/	
16	Homme	55	9,6	0,39	34	<20UR	/		GEM
17	Femme	51	15	0,951	36	<20UR	/		GEM de type I. II polytypique
18	Femme	45	13,05	1,5	40,62	<20UR	/		GEM de type II polytypique
19	Homme	35	8,92	0,3	42,75	<20UR	/		GEM
20	Homme	54	13,6	7,2	37,3	<20UR	/		GEM
21	Homme	71	15,6	1,2	31	939UR		/	
22	Homme	43	8,45	3,99	47	<20UR		/	
23	Homme	38	8,59	0,27	42,1	<20UR	/		GEM