

ÉCOLE DOCTORALE 414

INSERM UMR_S 1109 et UMR_S 1138

THÈSE présentée par :

Anna DUVAL

soutenue le : **09 octobre 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

**Étude de la génétique du complément
dans la néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA
et son impact en clinique**

THÈSE dirigée par :

Pr **CAILLARD Sophie**

Dr **FREMEAUX-BACCHI Véronique**

PR, Université de Strasbourg

PR Emérite, Assistance publique des Hôpitaux de Paris

RAPPORTEURS :

Pr **FAKHOURI Fadi**

Pr **ZUBER Julien**

PR, Université de Lausanne

PR, Université de Paris-Sorbonne

MEMBRES DU JURY :

Pr **GUERROT Dominique**

Pr **CARAPITO Raphaël**

PR, Université de Rouen

PR, Université de Strasbourg

INVITÉ :

Pr **MAILLARD Nicolas**

Université de Saint-Etienne

Remerciements

C'est le moment de clôturer ces trois années de thèse. Ces quelques mots écrits ne seront pas suffisants pour remercier toutes les personnes que j'ai pu côtoyer ces trois dernières années et qui ont contribué à cette incroyable aventure. Travailler, apprendre et évoluer avec vous a été un plaisir.

Je souhaiterai tout d'abord remercier l'ensemble des membres du jury : Pr Dominique Guerrot d'avoir accepté d'être président du jury, Pr Julien Zuber et Pr Fadi Fakhouri de me faire l'honneur d'être mes rapporteurs et Pr Raphaël Carapito d'être mon examinateur pour ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers mes deux directrices de thèse, Dr Véronique Frémeaux-Bacchi et Pr Sophie Caillard. Merci Véronique pour tous ces échanges enrichissants, ça a été un plaisir et un privilège d'apprendre avec vous (et, au passage, de m'avoir contaminée de votre passion du complément)! Nos discussions animées autour de la C3 convertase dans son bocal ou sur le chemin du retour de l'HEGP vont me manquer. Merci Sophie pour votre disponibilité, votre écoute, votre soutien constant et surtout votre confiance. Je me réjouis de réintégrer l'équipe.

Je remercie Pr Christophe Mariat et Pr Nicolas Maillard, pour leur collaboration dans ce travail qui a largement contribué à la réussite de cette thèse. Merci Nicolas d'avoir accepté d'être membre du jury invité.

Je remercie Pr Olivier Thaumat et Pr Bruno Moulin pour leur implication dans ces travaux de thèse et leur présence indéfectible à mes comités de suivi.

Un grand merci à Pr Sophie Limou, Martin Morin et Axelle Durand pour m'avoir accueillie dans leur unité et de m'avoir initiée au monde obscur de la bioinformatique. Merci pour votre aide et votre disponibilité.

Je remercie Pr Isabelle Cremer de m'avoir accueillie dans son unité inserm ainsi que Pr Siamak Bahram d'avoir rendu cette thèse possible.

Je remercie tous les membres de l'équipe Complément du Centre de Recherche des Cordeliers, en particulier : Pr Lubka Roumenina, Pr Sophie Chauvet, Dr Marie-Agnès Dragon-Durey pour votre soutien, vos retours sur mon travail et tous vos conseils précieux qui ont grandement contribué à l'avancée de ma réflexion et du projet. A Tania, pour m'avoir appris toutes tes astuces pour la culture cellulaire et la production de protéines recombinantes, qui ont été essentielles pour ce travail.

A mes « cothésards », Marie-Sophie, Anne, Julia R, Margot, Idris, Marina, Mikel et tous les membres de l'unité pour tous les moments forts partagés. Merci à Maxime Lecerf pour la gestion des Expi²⁹³ et tes conseils précieux.

A toute l'équipe complément de l'HEGP, en particulier Paula, pour ta disponibilité et d'avoir répondu à toutes mes requêtes « improbables ».

A tous mes collègues et amis du service de Néphrologie du CHU de Strasbourg. Merci pour votre enthousiasme, votre dynamisme et votre soutien dans l'inclusion des patients. Mention spéciale pour « l'équipe de choc », Sophie J, Audrey K, Muriel et Karima et l'ensemble de l'équipe paramédicale qui ont battu tous les records ! Au plaisir de pouvoir retravailler très bientôt avec vous.

A l'équipe d'anatomopathologie, Pr Marie-Pierre Chenard pour votre soutien. Jérôme et Augustin, votre contribution dans ce projet a été essentielle.

Aux patients qui ont accepté de participer à ce projet.

A mes proches, ma famille, ma belle-famille et mes amis pour vos encouragements et votre soutien indéfectible.

Enfin, Benjamin, merci pour ton soutien au quotidien. Pour le reste, tu sais déjà.

Table des matières

Remerciements.....	3
Table des matières.....	7
Liste des abréviations	9
Liste des tableaux	11
Liste des figures	13
Liste des annexes.....	15
Introduction.....	17
I – Le système du complément.....	21
1. Introduction générale	21
2. Rôle physiologique	23
3. Cascade d’activation	25
4. Principaux régulateurs	30
5. De la physiologie vers la pathologie.....	42
II – La génétique du complément et son implication en pathologie	45
1. Vue d’ensemble	45
2. Définitions et données en population générale.....	45
3. Les variants rares du complément	46
4. Particularités du <i>locus CFH-CFHR1-5</i> (variants rares et recombinaisons)	49
5. Polymorphismes et haplotypes.....	51
6. Le concept de « complotype »	55
III – Rôle du complément dans la néphropathie à dépôts mésangiaux d’IgA	57
1. Aspect épidémiologiques et définition	57
2. Physiopathologie de la néphropathie à dépôts mésangiaux d’IgA	60
3. Conséquences de l’activation du complément	71
4. Génétique du complément dans l’IgAN	73
5. Thérapies ciblant le complément dans l’IgAN.....	78
Hypothèses de travail	87
Partie 1. Étude des biomarqueurs d’activation/régulation du complément chez les patients porteurs d’une IgAN	93
I – Biomarqueurs plasmatiques d’activation du complément dans l’IgAN.....	97
1. Introduction	97
2. Patients et méthodes	98
3. Résultats.....	102
4. Conclusions	117
II – Modèle <i>ex vivo</i> d’activation du complément à la surface des HMEC-1.....	121
1. Introduction	121
2. Patients et méthodes	124
3. Manuscrit 1	134
4. Profils d’activation <i>ex vivo</i> du complément chez les donneurs sains	177
5. Activation <i>ex vivo</i> du complément chez les patients porteurs d’une IgAN.....	181
Partie 2. Impact de la génétique du complément dans l’IgAN	203
III – Analyse de la génétique du complément dans l’IgAN	205
1. Introduction	205

2. Méthodes : analyse génétique	206
3. Méthodes : analyse fonctionnelle des variants recombinants du FH	212
4. Données en population générale	225
5. Manuscrit 2	245
6. Conclusion	315
Discussion	317
Perspectives	329
Conclusions	331
Bibliographie	333
Annexes	355
Résumé	437
Abstract	437

Liste des abréviations

1kGe : <i>1000 Genomes Phase 3 cohort</i>	FD : facteur D
ACMG : <i>American College of Medical Genetics</i>	FH: facteur H
ANOVA : <i>one-way analysis of variance</i>	FHR1-5 : protéine associée au FH
ApoE : apolipoprotéine E	FHL-1 : <i>FH-like 1 protein</i> , splice-variant du FH
BSA : <i>bovine serum albumin</i>	FI : facteur I
C3a des-Arg : C3a des-Arginine, C3a inactivé	FP : facteur P, ou properdine
C3bBb: C3 convertase alterne	GAG : glycosaminoglycanes
C3bB : proconvertase alterne	GalNac : N-acétylgalactosamine
C3 _{nef} : <i>C3 nephritic factor</i> , anticorps stabilisateur de la C3bBb	GC3 : glomérulonéphrite à dépôts de C3
C4BP : <i>C4 binding protein</i>	Gd-IgA1 : IgA1 galactose-déficiente
C4b2b : C3 convertase classique	gnomAD : <i>genome Aggregation Database</i>
CADD : <i>combined annotation dependent depletion</i>	GVB : <i>gelatin veronal buffer</i>
C1GALT1 : <i>core 1 β,1,3-galactosyltransferase</i>	GWAS : <i>genome-wide association studies</i> , études d'associations pangénomiques
CL-10 : <i>collectin-10</i> , ou collectin-liver 1 (CL-L1)	EFS : établissement français du sang
CL-11 : <i>collectin-11</i> , ou <i>collectin-kidney 1</i> (CL-K1)	Gd-IgA1-IC : complexe immun contenant de l'IgA1 déficiente en galactose
CR1 : <i>complement receptor 1</i> , ou CD35	He : hétérozygote
CRP : <i>C reactive protein</i>	HMEC-1 : <i>human microvascular endothelial cells</i> , lignée d'origine dermique
ΔCFHR1-R3: délétion <i>CFHR1-CFHR3</i>	Ho : homozygote
ΔCFHR1-R4: délétion <i>CFHR1-CFHR4</i>	HPN : hémoglobinurie paroxystique nocturne
DAA: <i>decay accelerating activity</i> , activité de dissociation de la C3/C5 convertase	HSF : hyalinose segmentaire et focale
DAF : <i>decay-accelerating factor</i> , ou CD55	HTA : hypertension artérielle
DAMPs : <i>damage-associated molecular pattern</i>	HTAm : hypertension artérielle maligne
DDD : glomérulonéphrite à dépôts denses	HUVEC : cellules endothéliales macrovasculaires humaines issues de la veine ombilicale (cellules primaires)
DFG _e : débit de filtration glomérulaire estimé	HWE : équilibre de Hardy-Weinberg
DGKe : <i>diacylglycerol kinase epsilon</i>	IF : immunofluorescence
DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge	Ig : immunoglobuline
EFS : établissement français du sang	ICONE : IgA C omplement N ephropathy
eQTL : <i>expression quantitative trait locus</i>	IgAN: néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA
EUR : sous-population d'ancestralité européenne	
FB : facteur B	

IgAVN: Vasculite à IgA avec atteinte rénale
IHC : immunohistochimie
IRCT : insuffisance rénale chronique terminale
ITGAM : *integrin subunit alpha M*, CD11b, ou *complement receptor 3 (CR3)*
ITGAX : *integrin subunit alpha X*, CD11c, ou *complement receptor 4 (CR4)*
MAC : complexe d'attaque membranaire, C5b-9
MAF : fréquence de l'allele mineur
MALT : *mucosa-associated lymphoid tissue*
MASP : *mannose-binding lectin serine protease*, sérine protéase associée au MBL
MA(T) : microangiopathie (thrombotique)
MBL: *mannose binding lectin*
MCP : *membrane cofactor protein*, ou CD46
MFI : *mean fluorescence intensity*
OD : densité optique
OPD : dihydrochlorure d'o-phénylènediamine
OX-24 : anticorps monoclonal murin anti-FH humain
PAMPs : *pathogen-associated molecular pattern*
PBMC : *peripheral mononuclear blood cells*, cellules mononucléées du sang périphérique
PBS : phosphate buffer saline
PFA : paraformaldéhyde
PKRAD : polykystose rénale autosomique dominante
PolyPhen-2 : *polymorphism phenotyping V2*
PRM : *pattern recognition molecule*
PTX3 : pentatrexine 3
rFH-WT: *recombinant FH wild type*, FH recombinant de référence
sC5b-9 : C5b-9 soluble
SD : *standard deviation*
SIFT : *sorting intolerant from tolerant*

SHUa : syndrome hémolytique et urémique atypique
ST6GALNAC2 : *α-2,6-sialyltransferase 2*
SVF : sérum de veau foetal
TED : *thiester domain*, domaine thioester
THBD : thrombomoduline
UPCR : ratio proteinurie sur créatininurie, en g/g
VA : voie alterne
VC : voie classique
VL : voie des lectines
VT : voie terminale
VBS : *veronal buffer saline*
VUS : variant de signification indéterminée

Liste des tableaux

TABLEAU 1. PRINCIPALES FONCTIONS DECRITES DES FHR1-5	39
TABLEAU 2. PRINCIPALES PATHOLOGIES ASSOCIEES AUX VARIANTS GENETIQUES RARES DU COMPLEMENT	50
TABLEAU 3. PRINCIPALES EVIDENCES ETAYANT L'IMPLICATION DU COMPLEMENT DANS L'IGAN	66
TABLEAU 4. DONNEES EN FAVEUR D'UN ROLE DE LA DELETION <i>CFHR1-R3</i> DANS L'IGAN	74
TABLEAU 5. VARIANTS RARES DES GENES <i>CFH-CFHR1-5</i> PRECEDEMMENT RAPPORTES CHEZ DES PATIENTS IGAN	76
TABLEAU 6. ÉLÉMENTS EN FAVEUR D'UN ROLE DES FH, FHR1-5 DANS L'IGAN	77
TABLEAU 7. THERAPIES CIBLANT LE COMPLEMENT EN COURS D'ESSAIS THERAPEUTIQUES PHASES II/III DANS L'IGAN	82
TABLEAU 8. CARACTERISTIQUES ET RESULTATS DES ESSAIS CLINIQUES DES MOLECULES AYANT ATTEINT LA PHASE 3 DES ESSAIS THERAPEUTIQUES DANS L'IGAN.	83
TABLEAU 9. VALEURS DE REFERENCE POUR LE MULTIPLEX ELISA	102
TABLEAU 10. CARACTERISTIQUES DES COHORTES D'ETUDE	105
TABLEAU 11. DESCRIPTION DES PARAMETRES CLINICO-BIOLOGIQUES SELON LE CLUSTER	114
TABLEAU 12. CARACTERISTIQUES DES PATIENTS TRANSPLANTES TESTES DANS LE MODELE ENDOTHELIAL	182
TABLEAU 13. VARIANTS IDENTIFIES CHEZ LES PATIENTS IGAN TRANSPLANTES EVALUES DANS LE MODELE ENDOTHELIAL	189
TABLEAU 14. AMORCES UTILISEES POUR LA GENERATION DE FH MUTANTS (RFH) PAR MUTAGENESE DIRIGEE	214
TABLEAU 15. REPARTITION DES VARIANTS RARES DES 6 GENES DU COMPLEMENT DANS LA POPULATION EUROPEENNE DE REFERENCE	226
TABLEAU 16. FREQUENCE DES POLYMORPHISMES ETUDIES DANS LA POPULATION DE REFERENCE	228
TABLEAU 17. FREQUENCE ET DISTRIBUTION DES HAPLOTYPES DU <i>CFH</i> DANS LA POPULATION GENERALE.	228
TABLEAU 18. FREQUENCE DES HAPLOTYPES DU <i>CFH</i> CHEZ LES PATIENTS PORTEURS D'UNE IGAN (N=260) ET LE PANEL DE REFERENCE (N=503)	240
TABLEAU 19. DISTRIBUTION DES HAPLOTYPES DES <i>CFH-CFHR</i> ENTRE 3 NEPHROPATHIES MEDIEES PAR LE COMPLEMENT	241

Liste des figures

FIGURE 1. SPECTRE DES PRINCIPALES PATHOLOGIES MEDIEES PAR LE COMPLEMENT	22
FIGURE 2. CASCADE D'ACTIVATION DU COMPLEMENT	26
FIGURE 3. FORMATION D'UNE C3 CONVERTASE ALTERNE (C3BBb) SUR LA SURFACE CELLULAIRE	28
FIGURE 4. PRINCIPAUX REGULATEURS DU COMPLEMENT.....	30
FIGURE 5. LOCUS RCA (COMPLEMENT REGULATORY ACTIVITY).....	31
FIGURE 6. INTERACTION DU FH AVEC LES GLYCOSAMINOGLYCANES MEMBRANAIRES	32
FIGURE 7. PRINCIPAUX LIGANDS DU FH ET LEURS SITES D'INTERACTION PROTEIQUE.....	34
FIGURE 8. HOMOLOGIE STRUCTURELLE ENTRE LE FH ET LES FHR1-5.....	36
FIGURE 9. HYPOTHESES : LA BALANCE FH/FHR.....	38
FIGURE 10. MEMBRANE COFACTOR PROTEIN (MCP), UN REGULATEUR MEMBRANAIRE CLE DES DEPOTS DE C3B ET DE C4B	40
FIGURE 11. « HOTSPOTS » DES VARIANTS DU CFH IDENTIFIES DANS 3 PATHOLOGIES MEDIEES PAR LE COMPLEMENT	48
FIGURE 12. HAPLOTYPES DU LOCUS CFH-CFHR ET LEUR ASSOCIATION EN PATHOLOGIE	53
FIGURE 13. HAPLOTYPES DES CFHR1: ISOFORMES FHR1*A ET FHR1*B	54
FIGURE 14. LES FORMES ET SOUS CLASSES D'IGA.....	62
FIGURE 15. MODELE « MULTI-HIT » PROPOSE POUR LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'IGAN	63
FIGURE 16. VUE D'ENSEMBLE DES INHIBITEURS DU COMPLEMENT EN ESSAI THERAPEUTIQUE (PHASE II, PHASE III) DANS L'IGAN ..	81
FIGURE 17. L'INACTIVATION DES DEPOTS DE C3B EN IC3B, UNE ETAPE CLE DANS LE CONTROLE DE L'ACTIVATION DU COMPLEMENT	88
FIGURE 18. HYPOTHESES DE TRAVAIL CONCERNANT LE ROLE DE LA GENETIQUE DU COMPLEMENT DANS L'IGAN	89
FIGURE 19. VALEURS DE REFERENCE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DES BIOMARQUEURS D'ACTIVATION DU COMPLEMENT (ELISA MULTIPLEX) CHEZ LES 124 DONNEURS SAINS	103
FIGURE 20. CONCENTRATIONS PLASMATIQUES D'IMMUNOGLOBULINES TOTALES (IGA, IGG, IGM) ET DE Gd-IGA1.....	106
FIGURE 21. C3, C4 ET RATIO IGA:C3 PLASMATIQUES CHEZ LES PATIENTS TRANSPLANTES IGAN ET PKRAD	108
FIGURE 22. CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DES REGULATEURS PLASMATIQUES DU COMPLEMENT FH, FI ET PROPERDINE	108
FIGURE 23. FRAGMENTS D'ACTIVATION DU COMPLEMENT PLASMATIQUES CHEZ LES PATIENTS TRANSPLANTES POUR UNE IGAN OU UNE PKRAD	109
FIGURE 24. CORRELATION ENTRE LES FRAGMENTS D'ACTIVATION DU FACTEUR B (Bb, Ba) ET LA FONCTION DU GREFFON.....	110
FIGURE 25. MATRICE DE CORRELATION ENTRE LES BIOMARQUEURS D'ACTIVATION DU COMPLEMENT ET D'ACTIVITE DE L'IGAN ET LES PARAMETRES DE FONCTION DU GREFFON	111
FIGURE 26. PROFILS D'ACTIVATION DU COMPLEMENT CHEZ LES PATIENTS IGAN TRANSPLANTES	113
FIGURE 27. FRAGMENTS D'ACTIVATION PLASMATIQUES DU COMPLEMENT CHEZ LES PATIENTS IGAN TRANSPLANTES RENAUX OU NON.....	116
FIGURE 28. PRINCIPES DE MESURE DE L'ACTIVATION EX VIVO DU COMPLEMENT DANS UN MODELE ENDOTHELIAL	123
FIGURE 29. MESURE D'ACTIVATION DU COMPLEMENT EX VIVO A LA SURFACE D'HMEC-1 QUIESCENTES	128
FIGURE 30. TESTS D'ACTIVATION DU COMPLEMENT EN PHASE FLUIDE PAR LES IGA1 PURIFIEES	131
FIGURE 31. PROFILS D'ACTIVATION EX VIVO DU COMPLEMENT CHEZ LES DONNEURS SAINS: HYPOTHESES	178

FIGURE 32. FREQUENCES DES HAPLOTYPES DU <i>CFH</i> SELON L'INTENSITE DES DEPOTS DE COMPLEMENT ENDOTHELIAUX	180
FIGURE 33. ACTIVATION <i>EX VIVO</i> DU COMPLEMENT CHEZ LES PATIENTS TRANSPLANTES IGAN	184
FIGURE 34. ACTIVATION <i>EX VIVO</i> DU COMPLEMENT CHEZ LES PATIENTS TRANSPLANTES RENAUX POUR UNE IGAN.....	186
FIGURE 35. DEPOTS DE C3B/iC3B ET C5B-9 CHEZ LES PATIENTS IGAN PORTEURS D'UN VARIANT DU <i>CFH</i> OU DU <i>CFHR5</i>	190
FIGURE 36. BIOMARQUEURS D'ACTIVATION DU COMPLEMENT SELON L'INTENSITE DES DEPOTS DE C5B-9	192
FIGURE 37. ASSOCIATION DU PROFIL D'ACTIVATION <i>EX VIVO</i> DU COMPLEMENT ET DES BIOMARQUEURS D'ACTIVITE DE L'IGAN ...	194
FIGURE 38. SDS-PAGE DES PRODUITS DE PURIFICATION DES IGA1 SERIQUES DE PATIENTS ET DE DONNEUR SAINS	196
FIGURE 39. ACTIVATION <i>EX VIVO</i> DU COMPLEMENT A LA SURFACE DES HMEC-1 APRES INCUBATION AVEC DU SERUM DE DONNEUR SAIN SUPPLEMENTE EN IGA1 PURIFIEES	197
FIGURE 40. ACTIVATION DU COMPLEMENT EN PHASE FLUIDE PAR LES IGA1 PURIFIEES DE PATIENTS OU DE DONNEURS SAINS	199
FIGURE 41. STRUCTURE DU PLASMIDE pCDNA3.1(+)<i>CFH</i>-WT-HIS-TAG	212
FIGURE 42. SEQUENCE PROTEIQUE DU FH RECOMBINANT UTILISE COMME REFERENCE (rFH-WT)	213
FIGURE 43. ÉVALUATION FONCTIONNELLE DES VARIANTS DU FH <i>IN VITRO</i>.....	218
FIGURE 44. MESURE DE L'ACTIVITE DE DISSOCIATION DE LA C3Bb CONVERTASE PAR LE FH PAR LUMINEX®	219
FIGURE 45. MESURE DE L'ACTIVITE COFACTEUR DU FI DU FH PAR LUMINEX®.....	223
FIGURE 46. ÉTUDE GENETIQUE DES PATIENTS PORTEURS D'UNE IGAN PRIMITIVE	229
FIGURE 47. VARIANTS DU SCR1-4 ET SCR19-20 DU <i>CFH</i> IDENTIFIES CHEZ LES PATIENTS PORTEURS D'UNE IGAN	232
FIGURE 48. LOCALISATION DES VARIANTS FAUX-SENS, NON-SENS ET FRAMESHIFT DU <i>CFH</i> (MAF<0,1%) ET DU <i>CFHR5</i> (MAF<1%) CHEZ LES PATIENTS ET LES CONTROLES	233
FIGURE 49. PRODUCTION DE FACTEUR H RECOMBINANT (rFH) PAR LES EXPi293™	234
FIGURE 50. TESTS FONCTIONNELS DES VARIANTS RECOMBINANTS DU FH (rFH)	235
FIGURE 51. NOMBRE DE COPIE DES GENES <i>CFH</i>, <i>CFHR1-5</i> ETUDIE PAR MLPA.....	237
FIGURE 52. PROBABILITE DE SURVIE RENALE EN FONCTION DU NOMBRE D'HAPLOTYPES DE <i>MCP GGAAC</i>.....	243

Liste des annexes

ANNEXE 1. REVUE N°1. COMPLEMENT IN IgAN: FROM MECHANISTIC CONTEXT TO THERAPEUTIC OPPORTUNITIES	357
ANNEXE 2. REVUE N°2. EX VIVO TEST FOR MEASURING COMPLEMENT ATTACK ON ENDOTHELIAL CELLS: FROM RESEARCH TO BEDSIDE	375
ANNEXE 3. ECULIZUMAB AS A THERAPEUTIC APPROACH FOR SEVERE CRESCENTIC RECURRENCE OF IMMUNOGLOBULIN A NEPHROPATHY AFTER KIDNTRANSPLANTATION	403
ANNEXE 4. REVUE N°3. COMPLEMENT BIOLOGY FOR HEMATOLOGISTS	413
ANNEXE 5. ABSTRACT PRESENTE LORS DE L'ERA EDTA 2023	431

Introduction

Introduction

Ma thèse porte sur le rôle du système du complément dans la néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA (IgAN). Dans ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'étude des facteurs génétiques portant sur les principaux gènes de la voie alterne du complément et leur impact sur la susceptibilité, la progression et/ou le phénotype clinique de patients porteurs d'une IgAN issus d'une cohorte française. Nous avons étudié plus spécifiquement l'impact des variants génétiques portant sur le gène du facteur H (*CFH*) identifiés chez ces patients en combinant une approche fonctionnelle à notre étude.

L'implication du système du complément dans la pathogénèse de l'IgAN suscite un intérêt grandissant, avec un rôle de plus en plus reconnu de l'activation de la voie alterne et de la voie des lectines du complément (1–7).

Cette thèse a été motivée par plusieurs observations. Tout d'abord, par l'identification par des études d'association pangénomiques de grande échelle (8–10), de facteurs de susceptibilité génétique vis-à-vis du risque de développement d'une IgAN portant sur les gènes de régulation du complément, tout particulièrement le *locus* du gène du FH (*CFH*) et de ses protéines associées (*CFHR1-5*). Ensuite, par la mise en évidence d'autres variants rares du *CFH* et/ou des *CFHR1-5* chez des patients porteurs d'une IgAN (cohortes asiatiques essentiellement)(11–17). Enfin, par des données plus récentes suggérant un déséquilibre de la balance entre ces protéines, appelée « balance *CFH/CFHR* », altérant la capacité du FH à réguler efficacement le complément à la surface des tissus comme facteur de sévérité ou de progression de l'IgAN (15–19).

Mon travail de thèse avait pour objectifs : **i)** d'étudier la capacité d'activation du complément à la surface cellulaire endothéliale par le sérum de patients porteurs d'une IgAN dans un modèle *ex vivo* ; **ii)** de rechercher **des facteurs génétiques de susceptibilité modulant les capacités de régulation du complément** et d'étudier leur impact en clinique.

Dans la première partie, je présenterai le système du complément, ses fonctions physiologiques, ses différentes voies d'activation et ses principaux régulateurs. Puis, je m'intéresserai à l'implication du complément – et notamment de la génétique du complément – en pathologie. Enfin, j'aborderai la néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA et les éléments en faveur d'un rôle du système du complément dans cette glomérulopathie, ayant conduit à ce jour à la mise en place d'essais thérapeutiques testant les molécules ciblant le complément dans cette indication. Dans la dernière partie, je présenterai nos hypothèses de travail et discuterai les principaux résultats obtenus.

I – Le système du complément

1. Introduction générale

Le système du complément est un système effecteur ancien et conservé au cours de l'évolution, composé de plus de 50 protéines circulantes ou membranaires (20–24). Ce système, initialement décrit comme un composant thermolabile du sérum, tient son nom de sa capacité à « compléter » l'action des immunoglobulines pour la lyse bactérienne (25). Il est désormais établi que le complément constitue un composant essentiel du système immunitaire jouant un rôle crucial dans l'immunité innée et la défense contre les agents pathogènes (20,21,24), dans l'homéostasie tissulaire ou encore dans l'interface entre l'immunité innée et adaptative (20,26). Ce système s'organise dans une cascade enzymatique complexe de serine-protéases jouant un rôle de sentinelle, notamment dans la circulation sanguine. En présence d'une surface activatrice (p.ex. débris cellulaires, paroi bactérienne), ce système puissant est capable de s'amplifier en quelques minutes (27). Par conséquent, l'activation du système du complément est finement régulée pour permettre le maintien des fonctions d'opsonisation des pathogènes tout en évitant une activation inappropriée, pouvant engendrer une inflammation et des lésions tissulaires (22).

Ainsi, une régulation imparfaite du système complément peut être délétère et contribuer au développement de pathologies, comme des infections (22,23), des pathologies auto-immunes (22,28) une inflammation chronique (24,29), une microangiopathie thrombotique (MAT) (28,30,31) ou encore, de cancers (32) (**Figure 1**).

Le système du complément suscite un intérêt grandissant de la part des cliniciens, compte-tenu du nombre croissant de molécules ciblant différents niveaux de la cascade d'activation actuellement en cours d'essais thérapeutiques dans de plus en plus d'indications (28,29,33). Une

bonne compréhension des mécanismes d'activation du complément, de son implication en pathologie et des effets escomptés de sa modulation thérapeutique devient alors primordiale.

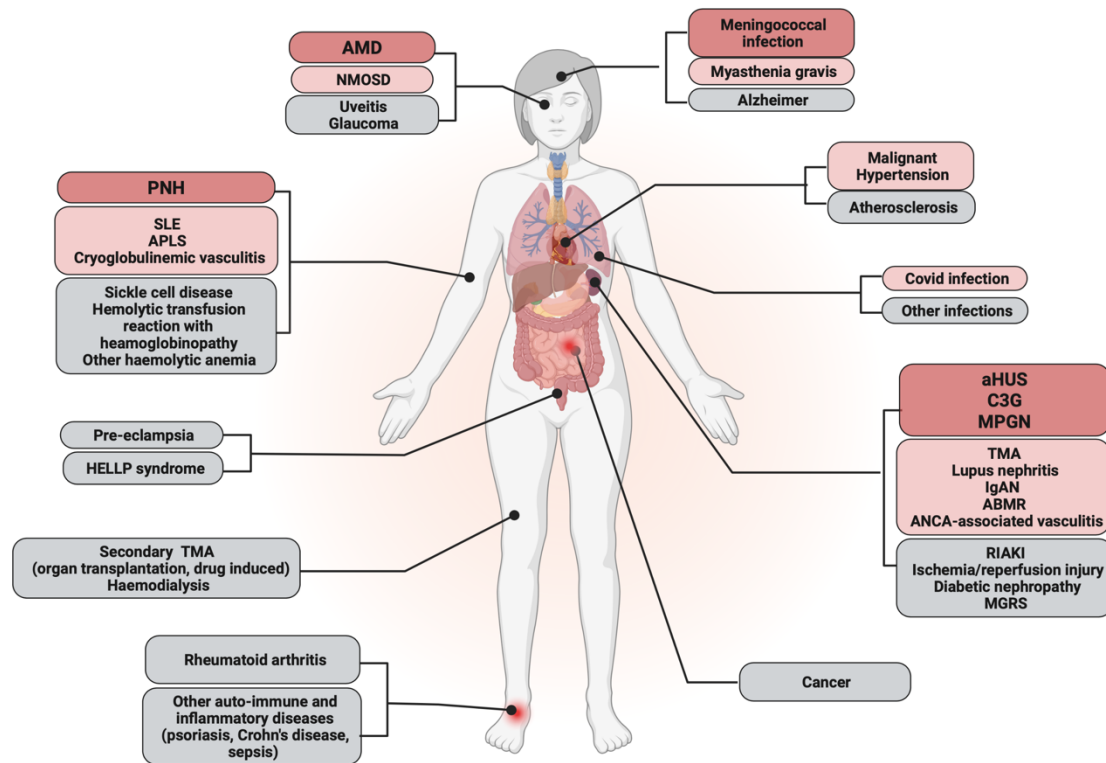


Figure 1. Spectre des principales pathologies médiées par le complément

Vue d'ensemble des principales pathologies dans lesquelles le système du complément est impliqué (défaut ou excès d'activation). Les codes couleur correspondent au niveau d'importance du système du complément dans la pathogénèse. Les pathologies dans lesquelles le système du complément joue un rôle central sont représentées en **rouge**. Les pathologies dans lesquelles a été démontré une contribution du complément dans la pathogénèse figurent en **rose**. Les autres pathologies dans lesquelles le complément joue un rôle plus accessoire sont représentées en **gris**. Schéma issu de Meuleman MS, Duval A, *et al.* Front Immunol. 2022.

2. Rôle physiologique

Les rôles physiologiques du système du complément sont multiples et s'étendent bien au-delà de la lyse bactérienne, premièrement décrite (25). Physiologiquement, le complément participe à la défense contre les agents pathogènes, en stimulant la réponse inflammatoire tout en participant à leur opsonisation et à leur destruction directe par des mécanismes de lyse cellulaire (20,24). Au-delà de son rôle dans la lutte anti-infectieuse, le système du complément contribue à l'homéostasie, en aidant notamment à l'élimination des débris cellulaires et des corps apoptotiques (34). Le système du complément est composé de protéines plasmatiques produites essentiellement par le foie et d'un ensemble de protéines membranaires exprimées à la surface des cellules. Le complément agit dans le plasma, dans les tissus et également en intracellulaire (35,36).

La fonction d'opsonisation constitue l'un des rôles essentiels du système du complément. L'objectif étant « d'étiqueter » les surfaces cellulaires, les agents pathogènes, les complexes immuns ou d'autres surfaces activatrices afin de stimuler la réponse inflammatoire, l'élimination et la destruction des corps opsonisés. Ces fonctions effectrices du complément, distinguant les agents pathogènes ou les cellules endommagées des cellules saines du « soi », sont permises par l'équilibre subtil entre les molécules activatrices du complément et la présence de régulateurs du complément sur ces surfaces (37). Ces fonctions d'opsonisation sont en lien avec différents procédés. Le premier est permis par l'activation permanente et à bas bruit de la voie alterne du complément via l'activation spontanée de la molécule C3. Le C3 est une protéine centrale du système du complément, circulant à une concentration d'environ 1g/L dans le sérum (27). Une petite fraction de cette protéine s'hydrolyse spontanément dans la circulation – « C3 tick over » ou C3(H₂O) – libérant un pont thioester « labile » conférant au C3(H₂O) une structure proche de la molécule C3b, fragment d'activation du C3 (38). L'activation à bas bruit de la voie alterne avec la génération de C3 convertases « de phase fluide » va conduire à la libération de petites quantités de C3b. Ce C3b, de demi-vie très courte (estimée à environ 60 µs)(20), peut ensuite se lier de façon covalente aux groupements hydroxyles d'une surface située à

proximité immédiate de son lieu de génération. Le second procédé dépend de signaux ou de motifs présents à la surface des pathogènes ou des cellules endommagées (PAMPs ou DAMPs), spécifiquement reconnus par des molécules solubles aux fonctions de *pattern recognition molécule* (PRM) (C1q pour la voie classique ; Mannose-Binding Lectin, MBL, ficolin ou collectin pour la voie des lectines).

Le C3b lié à la surface des cellules du soi (p.ex. cellules endothéliales) est rapidement éliminé par les régulateurs membranaires ou circulants participant à sa dégradation en fragments inactifs (iC3b, C3dg). Ce mécanisme participe notamment à la clairance des corps apoptotiques ou des débris cellulaires par phagocytose (39,40). La clairance des complexes immuns est favorisée par la fixation du C3b à la surface des immunoglobulines interagissant avec le *Complement Receptor 1* (CR1 ou CD35) exprimé à la surface des érythrocytes (41), permettant ensuite leur transport vers le foie ou la rate et leur clairance (42).

L'activation de la cascade du complément ne prend pleinement lieu qu'en présence d'une surface pathogène ou d'une « surface activatrice » dépourvue de régulateurs. Dans ce contexte, le C3b lié forme à son tour un nouveau complexe enzymatique appelé « convertase » qui a la capacité de cliver d'autres molécules de C3 et d'amplifier l'activation du complément (C3 convertases). De plus, l'activité des convertases induit une inflammation locale et l'attraction de cellules immunitaires par la libération d'anaphylatoxines (27,43). Au final, la formation de nouvelles convertases (C5 convertases) permet l'engagement de la voie terminale du complément aboutissant à la lyse et à la destruction du pathogène. Ces phénomènes contribuent à l'activation de la réponse immunitaire adaptative (26).

Il existe donc des surfaces « activatrices » (p.ex. bactéries) et des surfaces protégées vis-à-vis de l'attaque du complément (p.ex. cellules du soi). Ces différences observées entre les surfaces dépendent majoritairement de la présence de régulateurs membranaires ou de leur capacité à recruter les régulateurs circulants du complément (21). Ceci souligne l'importance centrale des régulateurs du complément dans l'équilibre entre la physiologie et la pathologie.

Les interactions entre le système du complément et l'immunité adaptative sont nombreuses. Les cellules dendritiques ainsi que les lymphocytes T et B expriment des récepteurs aux fragments d'activation du complément (p.ex. récepteur au C3b, CR2)(44). Le complément participe aux processus de présentation antigénique, à l'activation et à la polarisation de la réponse immunitaire ainsi qu'au métabolisme des lymphocytes T et B (20,45–48). Une sécrétion auto- ou paracrine de protéines du complément par les cellules immunitaires participerait à ces mécanismes. Le complément intracellulaire serait également essentiel au maintien du tonus lymphocytaire.

Enfin, le système du complément est étroitement lié à d'autres processus et voies métaboliques comme la cascade de coagulation (49–52), l'inflammation (53) ou le métabolisme glucidique et lipidique (35). La découverte plus récente d'un rôle du complément en intracellulaire (35,54) et de fonctions « non-canoniques », non dépendantes de la cascade d'activation, ont ouvert la perspective de fonctions du complément encore plus vastes, aujourd'hui méconnues.

3. Cascade d'activation

3.1. Voies initiatrices

Les principales protéines de la cascade du complément sont nommées en fonction de leur ordre de découverte : les protéines de la cascade d'activation initialement décrites de la voie classique sont numérotées de C1 à C9 et les composants de la voie alterne sont nommés par des lettres. L'ajout d'une lettre « b » ou « a » aux composants du complément (p.ex. C2, C3, C4 et C5) indique les fragments d'activation de grande et de petite taille, respectivement. Dans cette thèse, nous adopterons la nouvelle nomenclature pour nommer les protéines de la cascade (55).

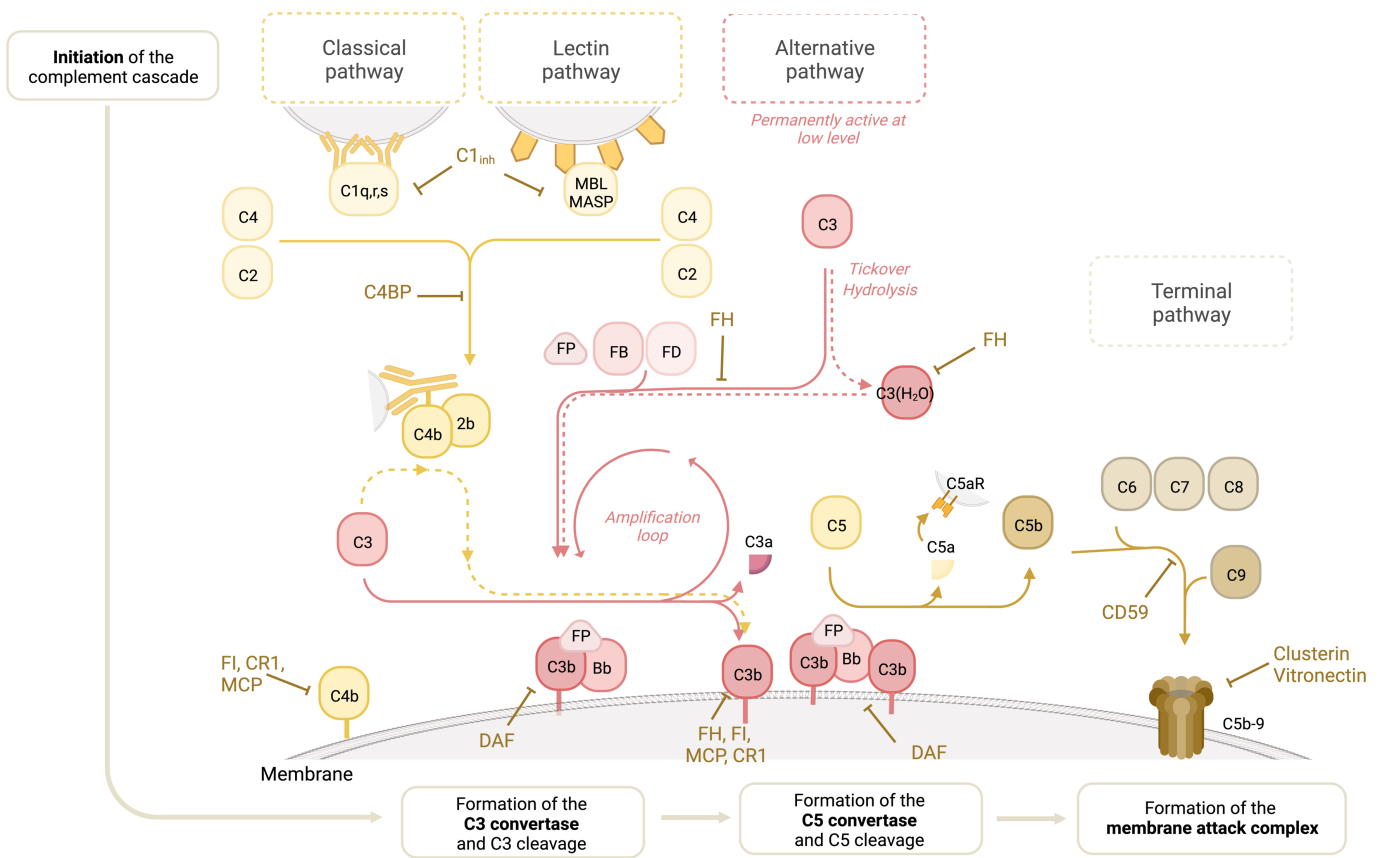


Figure 2. Cascade d'activation du complément

La voie classique du complément est initiée par la liaison de la protéine C1q à un complexe immunitaire (constitué d'IgG, IgM) à la surface d'un pathogène ou d'une cellule. Cela permet la formation d'un complexe à l'activité de sérine protéase (C1q,r,s) qui à son tour clive C4 et C2. C4b et C2b s'assembleront pour former une C3 convertase classique (C4b2b). La voie des lectines est initiée par la reconnaissance de résidus mannose à la surface d'une cellule par le complexe MASP/MBL ou ficolin. La voie alterne du complément est activée en permanence à bas bruit par l'hydrolyse spontanée du C3, générant une faible quantité de C3b (ou C3H₂O) prêt à se lier de manière covalente sur une surface. La liaison du facteur B (FB) à C3b forme une C3 pro-convertase (C3bB). L'activation ultérieure de FB lié au C3b en Bb par le facteur D (FD) forme une C3 convertase alterne (C3bBb). Les C3 convertases peuvent alors cliver de nouvelles molécules de C3 en leur forme active C3b. L'enrichissement en dépôts de C3b à proximité des C3 convertases permet la formation de C5 convertases capables de cliver le C5 en C5b et C5a. L'assemblage de C5b avec les composants terminaux (C6-C9) formera un complexe d'attaque membranaire (MAC ou C5b-9) sur la membrane. Pour éviter son auto-amplification, la cascade est étroitement régulée par des régulateurs présents dans le plasma et membranaires (représentés en marron). *Abbreviations* : FB : facteur B ; FD : facteur D ; FH : facteur H ; FI : facteur I ; FP : properdine ; C5aR : récepteur du C5a ; MAC, complexe d'attaque membranaire (ou C5b-9) ; MASP : sérine protéase associée à MBL; MBL : mannose-binding lectin. Schéma adapté de Duval A., Frémeaux-Bacchi V. Am J. Hematol. 2023.

La plupart des composants circulants du complément est produite majoritairement par le foie, à l'exception de certaines protéines telles que le facteur D (FD) et le C1q, qui sont principalement synthétisées par les adipocytes et les monocytes (56,57). La plupart des composants peut être directement synthétisée par les cellules rénales (58). L'activation du système du complément s'organise dans une cascade enzymatique de sérines-protéases, activant de façon séquentielle les différentes protéines circulant sous forme de zymogènes (forme inactive) (**Figure 2**).

Trois voies initient l'activation du complément : la voie classique (VC), la voie des lectines (VL) et la voie alterne (VA). La cascade du complément est initiée par des changements conformationnels des *pattern recognition molecules* (PRM) suite à la reconnaissance de signaux de danger (PAMPs ou DAMPs) (VC, VL), ou spontanément (VA) .

La voie classique (VC) est activée par la liaison de C1q aux complexes immuns, composés d'immunoglobulines G ou M (IgG ou IgM) liées à leur antigène et organisées en cluster. La fixation labile du C1q aux complexes immuns permet la fixation des sérines protéases C1r et C1s, formant ainsi le complexe C1q,r,s. Le C1r et le C1s s'activent après leur liaison au C1q. Le C1s devient capable de cliver et d'activer le C2 en C2b et C2a ainsi que le C4 en C4b et C4a. Le C4b exprime alors un pont thioester lui conférant la capacité de se lier de façon covalente à une surface proche du complexe C1q,r,s. La liaison ultérieure du C2b généré au C4b forme un complexe enzymatique à l'activité de sérine-protéase appelée convertase. L'initiation de la VC conduit à la formation d'une C3 convertase « classique », C4b2b (anciennement appelée C4b2a) (55). Cette C3 convertase est alors capable de cliver et d'activer la molécule C3 du complément en ses fragments actifs : C3b et C3a.

L'activation de la **voie des lectines (VL)** présente des similitudes avec l'activation de la voie classique. La VL est déclenchée par la reconnaissance de patterns de glycosylation (p.ex. résidus mannoses) notamment présents à la surface des bactéries par MBL. Les MBL fixés à la surface s'organisent ensuite en complexes avec les MBL sérine-protéases (MASP)-1 et MASP-2. L'activation séquentielle de MASP-2 lui confère la capacité de cliver et d'activer le C4 et le C2, engendrant la

formation de C3 convertases classiques (C4b2b). MASP-1 serait capable de cliver le C2 uniquement, amplifiant alors – modestement – l’activation locale du complément. D’autres lectines, en particulier les ficolines (L-ficolin, M-ficolin et H-ficolin) ainsi que les collectines (CL-10 et CL-11) (59), sont aussi capables d’activer la VL du complément par la reconnaissance d’autres patterns de glycation exprimés en surface tels que les résidus les N-acétylgalactosamine (GalNac) ou les résidus fucose (59).

La **voie alterne (VA)**, continuellement activée, initie le clivage de la molécule de C3 en C3b qui se lie ensuite aux surfaces par la libération d’un pont thioester (TED). Le facteur B (FB) est une sérine protéase de 93 kDa présente dans la circulation. Celui-ci peut se lier au C3b lié en surface et former une proconvertase (C3bB). L’oscillation du FB sur le C3b et son basculement en position « ouverte » va permettre le positionnement du facteur D (FD) pour son clivage en Bb (**Figure 3**). Le clivage du FB en Bb libère son activité de sérine protéase, formant ainsi une C3 convertase active C3bBb. Cette C3bBb clive ensuite le C3 en ses fragments actifs, le C3b et le C3a. Le C3b généré se lie ensuite de façon covalente à une surface présente aux environs immédiats, offrant la possibilité de formation de nouvelles C3 convertases (C3bBb). La properdine (ou facteur P, FP) constitue un régulateur positif de la voie alterne du complément. La properdine joue un rôle de stabilisatrice de la convertase C3bBb, augmentant sa demi-vie (60). Un rôle éventuel de la properdine comme initiateur de l’activation de la VA en agissant comme PRM est controversé (61,61,62).

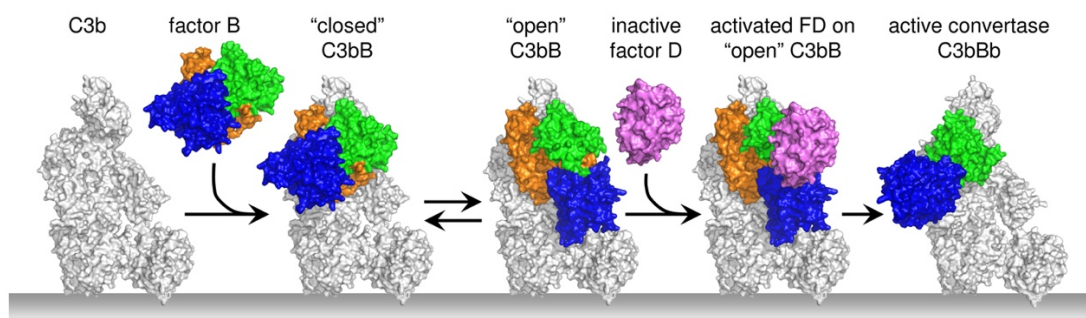


Figure 3. Formation d'une C3 convertase alterne (C3bBb) sur la surface cellulaire

Schéma de Piet Gros. <http://www.crystal.chem.uu.nl>

3.2. Amplification et engagement de la voie terminale

L'activation de l'une des trois voies du système du complément conduit à la formation de C3 convertases (C3bBb ou C4b2a) dont l'activité génère de nombreux dépôts de C3b. Ces dépôts de C3b peuvent être soit **i)** inactivés et dégradés par les régulateurs membranaires ou le recrutement de régulateurs circulants (inactivation protéolytique du C3b en iC3b par le Facteur I (FI) et ses cofacteurs), soit **ii)** amplifiés, par le recrutement du FB puis FD permettant formation de nouvelles C3 convertases (C3bBb). Ceci forme la « boucle d'amplification » de la voie alterne du complément. La voie alterne est par conséquent capable d'amplifier l'activation du complément quelle que soit la voie initiatrice.

L'enrichissement en dépôts de C3b à proximité étroite d'une C3 convertase, modifie la conformation du complexe enzymatique, devenant alors une C5 convertase (C3bBbC3b ou C4b2bC3b), capable de cliver et d'activer le C5 en C5a et C5b. Ceci engage la voie terminale (VT) commune du complément : le C5b généré s'assemble avec les composants terminaux (C6, C7, C8), puis d'insère à travers les phospholipides membranaires. L'addition de multiples molécules de C9 aboutit à la formation d'un pore appelé complexe d'attaque membranaire (MAC, ou C5b-9). La formation d'un MAC sur une surface non protégée, comme les bactéries gram-négatives (p.ex. *Neisseria species*)(63) induit leur destruction par lyse cellulaire. La formation d'un MAC sur une cellule nucléée (p.ex. cellules endothéliales) n'a pas de conséquences lytiques mais peut cependant engendrer des dommages irréversibles en induisant un flux calcique initiant des voies de signalisations intracellulaires, modifiant le phénotype cellulaire (activation, libération de cytokines pro-inflammatoires, prolifération) et pouvant aboutir à l'induction d'une apoptose (64).

En plus de la formation du MAC et de la fonction d'opsonisation, l'activité des C3/C5 convertases génère des fragments d'activation du C3 et du C5, les anaphylatoxines C3a et C5a, qui stimulent l'inflammation sur le site d'activation du complément par le recrutement de cellules immunitaires exprimant leurs récepteurs (65–68).

4. Principaux régulateurs

Pour maintenir les fonctions d'opsonisation tout en évitant des dommages tissulaires par l'engagement inapproprié de la VT du complément, le système du complément est étroitement régulé par des protéines solubles ou membranaires telles que le facteur H (FH), le facteur I (FI), la C4-binding protein (C4BP), MCP (*membrane cofactor protein*, ou CD46), CR1 (*complement regulator 1*, ou CD35), CD55 (ou *decay-accelerating factor*, DAF), CD59, la clusterine, et la vitronectine (**Figure 4**). Ces protéines contrôlent l'activation du complément dans la circulation, sur les surfaces cellulaires et non-cellulaires (p.ex. membranes basales). Dans cette section, nous nous focaliserons sur les régulateurs du complément importants pour la suite de notre étude, en particulier : le FH et les FHRs, le FI et MCP.

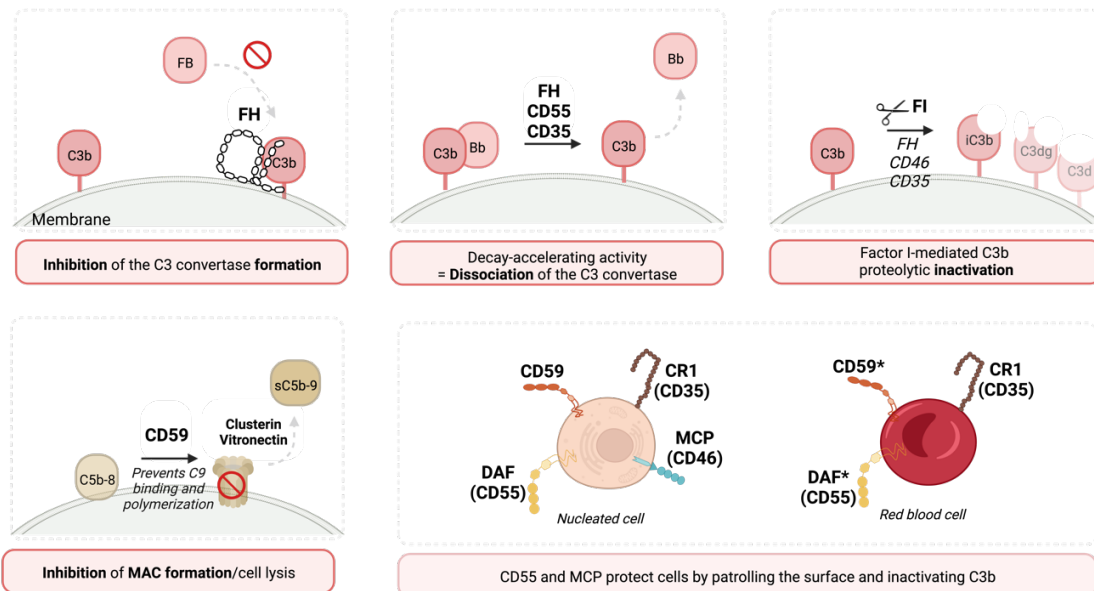


Figure 4. Principaux régulateurs du complément

(A) La fixation du FH sur le C3b prévient la formation de C3 convertases C3bBb en par compétition avec le FB. **(B)** La dissociation des C3 convertases classiques est accélérée par le DAF, le CR1 et le C4BP. La dissociation des C3 convertases alternes est accélérée par le DAF, le FH et le CR1. **(C)** L'inactivation protéolytique du C3b en iC3b par le FI et ses cofacteurs prévient la formation de nouvelles convertases. Les cofacteurs du FI sont : MCP, CR1, FH. MCP et C4BP participent à l'inactivation du C4b en iC4b par le FI. **(D)** L'assemblage du C5b-9 peut être inhibé par le CD59 ou éliminé de la surface cellulaire par la vitronectine et la clusterine. **(E)** L'expression des différents régulateurs membranaires du complément varie selon les types cellulaires. Les érythrocytes n'expriment pas le MCP, les rendant particulièrement susceptibles à l'activation du complément. *Abréviations* : C4BP : C4 binding protein, CR1 : complément récepteur 1 ; DAF : decay-accelerating factor ou CD55 ; FB : facteur B ; FH : facteur H ; FI : facteur I ; MAC : complexe d'attaque membranaire (C5b-9). Schéma issu de Duval A, et al. AJH 2023.

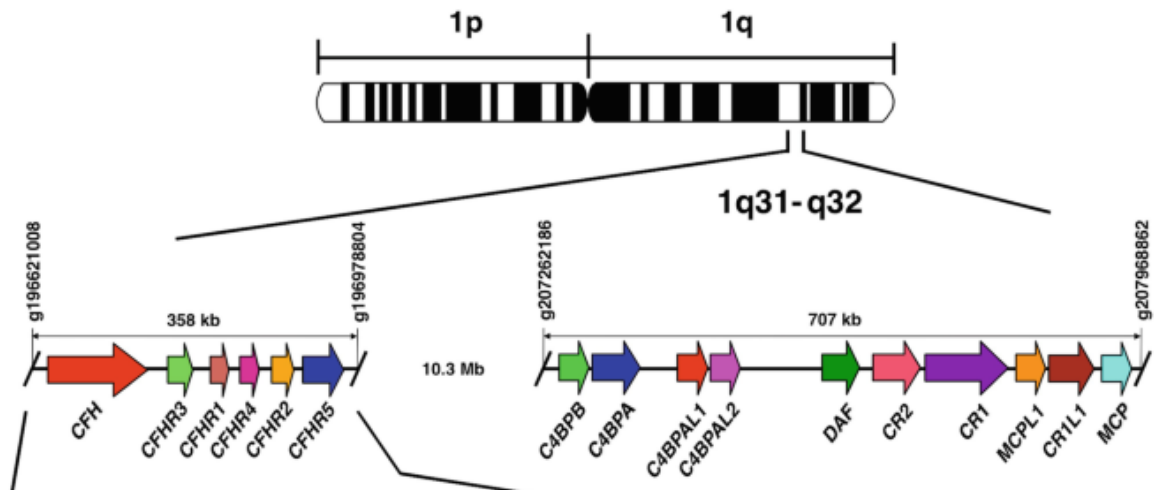


Figure 5. Locus RCA (complement regulatory activity)

Plusieurs protéines régulatrices du complément sont codées par le *locus* « RCA » (*complement regulatory activity*), situé en 1q31-1q32. Ce *locus* comprend notamment les gènes codant pour le FH et ses protéines associées (FHR1-5), C4BP, DAF (ou CD55), CR1 et MCP. Schéma adapté à partir de Garcia-Fernandes, *et al.* Method in Molecular biology, 2021.

3.1. Le facteur H, principal régulateur de la voie alterne du complément

Le facteur H (FH) est le principal régulateur de la voie alterne du complément. Son gène (*CFH*) est situé au sein du bras long du chromosome 1 (1q32), dans le *locus* RCA (*complement regulatory activity*) (**Figure 5**). Il s'agit d'une protéine de 155 kDa (1231 acides aminés, incluant le peptide signal), circulant dans le plasma à une concentration d'environ 200-500 µg/mL. Sa structure se compose de 20 domaines répétitifs appelés *Short Consensus Repeats* (SCR) ou *Complement Control Protein* (CCP) composés chacun d'environ 60 acides aminés.

Le FH est un puissant régulateur du système du complément agissant dans la circulation (« phase fluide ») et également sur les surfaces du soi (69), en se liant aux glycosaminoglycanes (GAG) (p.ex. les acides sialiques) membranaires (70). L'activité régulatrice du FH est permise par trois principales fonctions. Le FH **i)** prévient la formation de la C3 convertase alterne (C3bBb) par compétition avec la fixation du FB au C3b, **ii)** accélère la dissociation de la C3 convertase alterne (C3bBb) formée à la surface et **iii)** agit comme cofacteur du FI pour l'inactivation du C3b en iC3b sur la surface cellulaire.

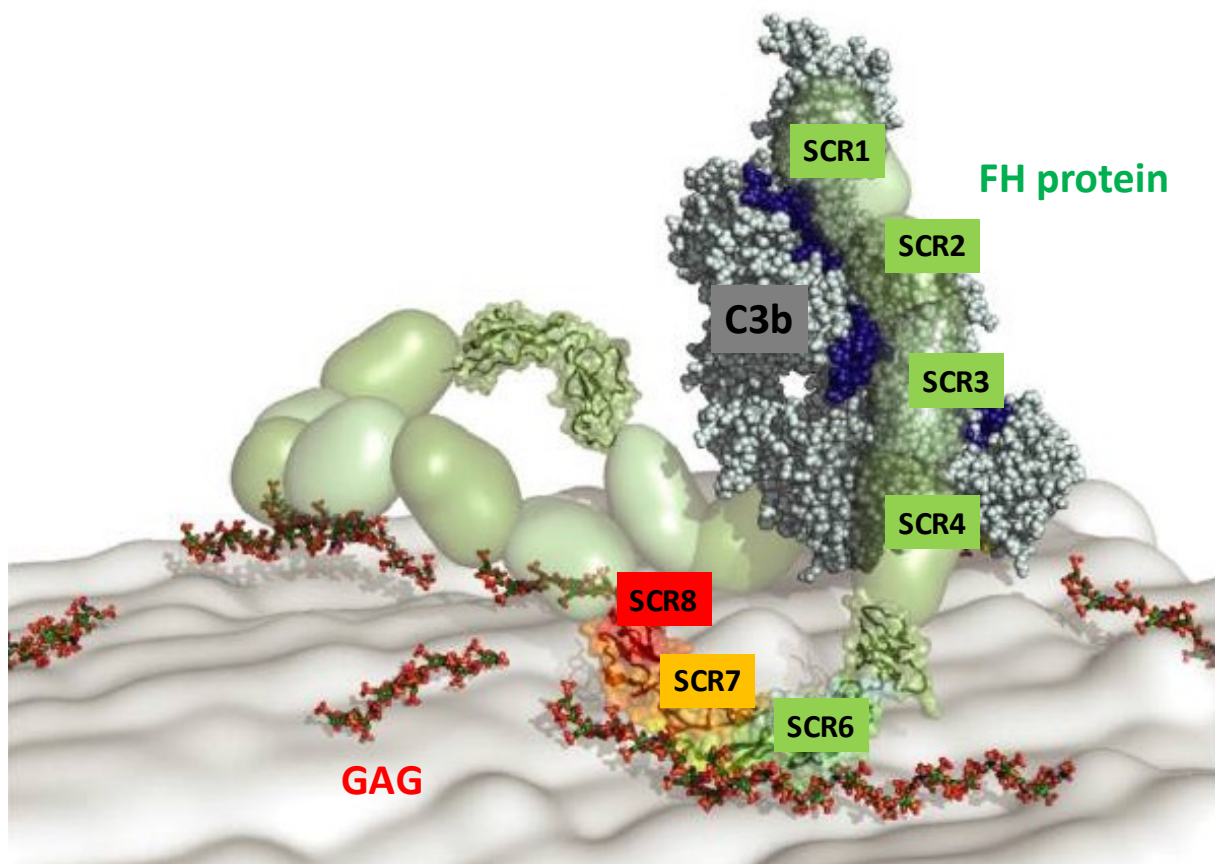


Figure 6. Interaction du FH avec les glycosaminoglycans membranaires

Illustration de l'hypothèse actuelle du positionnement et de l'interaction du FH avec les domaines riches en sulfates des glycosaminoglycans (GAG) membranaires. Le FH est représenté en vert et le C3 en gris. Les zones d'interaction entre le C3b et les SCR 1-4 du FH sont mises en valeur en bleu. Le FH se fixe au C3 par ses SCR 1-4 (C3b, partie C3c) et ses SCR 19-20 (C3b/C3d). Des sites d'interaction membranaires (Glycosaminoglycans, héparanes sulfates) supplémentaires sont présents au niveau des domaines centraux SCR 6-8 (verte/jaune/rouge). Schéma adapté à partir du modèle proposé par Prosser, et al. J exp Med, 2007.

Actuellement, le modèle proposé pour la régulation du C3b par le FH consiste en une fixation simultanée d'une molécule de C3b par les SCR1-4 et les SCR19-20 (**Figure 6**) (69,71). Le positionnement des SCR1-4 du FH sur le C3b interfère avec la fixation du FB et facilite le positionnement du FI pour l'inactivation du C3b. Les domaines du FH situés en zone centrale (SCR5-18) auraient un rôle de maintien structurel, formant une boucle permettant le positionnement adéquat du FH sur le C3b. Ceci serait permis notamment par la formation d'un angle au niveau du SCR 13 et la présence de potentiels sites additionnels d'ancrage aux GAG ou héparanes sulfates membranaires au niveau des SCR7 et SCR10-13 (69,71–74). L'interaction des SCR6-10 du FH avec le C3b (partie C3c) a été rapportée dans

des études *in vitro* (75,76). Ce site additionnel de fixation du C3b en zone centrale du FH reste cependant controversé. Les domaines SCR17-18 du FH comporteraient un site permettant la dimérisation du FH *in vitro* (77). Ce site potentiel pourrait permettre au FH, ancré par ses SCR19-20 à la surface cellulaire, de renforcer son rôle de régulation en recrutant d'autres molécules de FH, augmentant ainsi sa concentration locale (77). Cette hypothèse intéressante reste cependant à mieux caractériser.

Le FH comporte également plusieurs sites de N-glycosylation. La désialylation du FH *in vitro* par la neuraminidase (enzyme notamment produite par les *Streptococcus pneumoniae*) pourrait altérer la capacité de régulation du complément par le FH, soulevant l'hypothèse d'une possible importance de ces motifs glycosylés pour sa fonction régulatrice (78).

En plus de son activité de régulation du complément, le FH contribue à l'homéostasie cellulaire, en participant à la clairance silencieuse des cellules endommagées et des débris cellulaires (70). Le FH intracellulaire pourrait aussi exercer un rôle dans l'homéostasie de la cellule endothéliale (79). D'autres fonctions « non-canoniques », distinctes de la régulation du complément, lui sont également décrites. Le FH aurait une capacité de fixation à la C réactive protéine (CRP, à concentration forte, sous forme monomérique) (80,81), à la pentatrexine 3 (PTX3), à certains motifs présents à la surface d'agents pathogènes (p.ex. *Streptococcus* groupe B) (82), à des toxines bactériennes (p.ex. Shiga toxine 2) (83), au *complement receptor 3* (CR3) (84) ou encore à l'apolipoprotéine E (ApoE)(85) (**Figure 7**).



Figure 7. Principaux ligands du FH et leurs sites d'interaction protéique

Les domaines du FH ayant une importance majeure pour la fonction régulatrice du complément sont en rouge, les domaines importants pour l'interaction avec la membrane cellulaire ou d'autres protéines circulantes sont en orange. Les domaines avec un rôle fonctionnel plus secondaire décrit sont en jaune.

Le **FH-like 1 (FHL-1)** correspond à un variant protéique de 42 kDa issu d'un épissage alternatif du gène du FH (*CFH*). Cette protéine circulerait à des concentrations beaucoup plus faibles que le FH (environ 10 fois moins) dans le plasma (86). Sa structure protéique comprend les 7 premiers domaines (SCR) du FH. Le FHL-1 partage donc des sites de fixation au C3b avec le FH (SCR1-4, et dans une moindre mesure, les SCR5-7) mais ne possède pas de domaine équivalent aux SCR19-20 du FH, limitant son ancrage membranaire (87). Les rôles du FHL-1 ne sont pas encore complètement caractérisés. Plus petit que le FH, le FHL-1 pourrait jouer un rôle de régulation du complément dans les tissus ou les localisations non accessibles pour le FH (p.ex. membrane de Bruch, dans l'œil) (87).

3.2. Les protéines associées au FH : les FHR1-5

Les protéines associées au facteur H (FHR) sont constituées d'un groupe de 6 protéines circulantes (FHR1, FHR2, FHR3, FHR4A, FHR4B et FHR5) (88–90). Ces protéines sont codées par les gènes *CFHR1-5*, situés à l'extrémité 3' du gène du *CFH*, dans le *locus* 1q32 (91). Les gènes *CFHR1-5* sont les produits de duplications anciennes du gène du *CFH* (91). Par conséquent, les protéines FHR arborent une forte homologie avec le FH (91,92). Ceci leur confère des propriétés proches - mais non complètement équivalentes – à celles du FH. En effet, les FHR1-5 possèdent des domaines carboxy-terminaux (C-ter) fortement similaires aux SCR19-20 du FH permettant leur ancrage membranaire et leur liaison au C3b/C3d (90). Par exemple, le domaine SCR5 du FHR1 se distingue du SCR20 du FH par seulement deux acides aminés (L290 et A296 correspondant aux S1191 et V1197 du FH) (88,93,94). A l'inverse, les FHR ne partagent pas de domaine similaire aux SCR1-4 du FH et n'ont donc pas d'activité régulatrice du C3b (**Figure 8**).

Les FHR1, 2 et 5 possèdent des domaines de dimérisation au niveau de leur extrémité N-terminale, permettant la formation d'homo- ou d'hétérodimères dans la circulation (95,96). La formation d'hétérodimères pourrait notamment permettre la modulation de l'activité des FHRs par la fixation simultanée à différents ligands ou l'augmentation de leur affinité pour la fixation du C3b ou des héparanes sulfates membranaires (73,95,97). La possibilité de formation d'hétérodimères de FHR5 *in vivo* reste incertaine (96–99).

Le rôle précis des protéines FHR1-5 dans l'activation du complément n'est pas complètement compris. Des fonctions régulatrices du C3b ou des C3/C5 convertases par les FHRs ont été initialement décrites dans des modèles *in vitro*. Cependant cette activité potentielle de régulation du complément par les FHRs se produit le plus souvent à des concentrations bien plus élevées que leurs concentrations physiologiques plasmatiques.

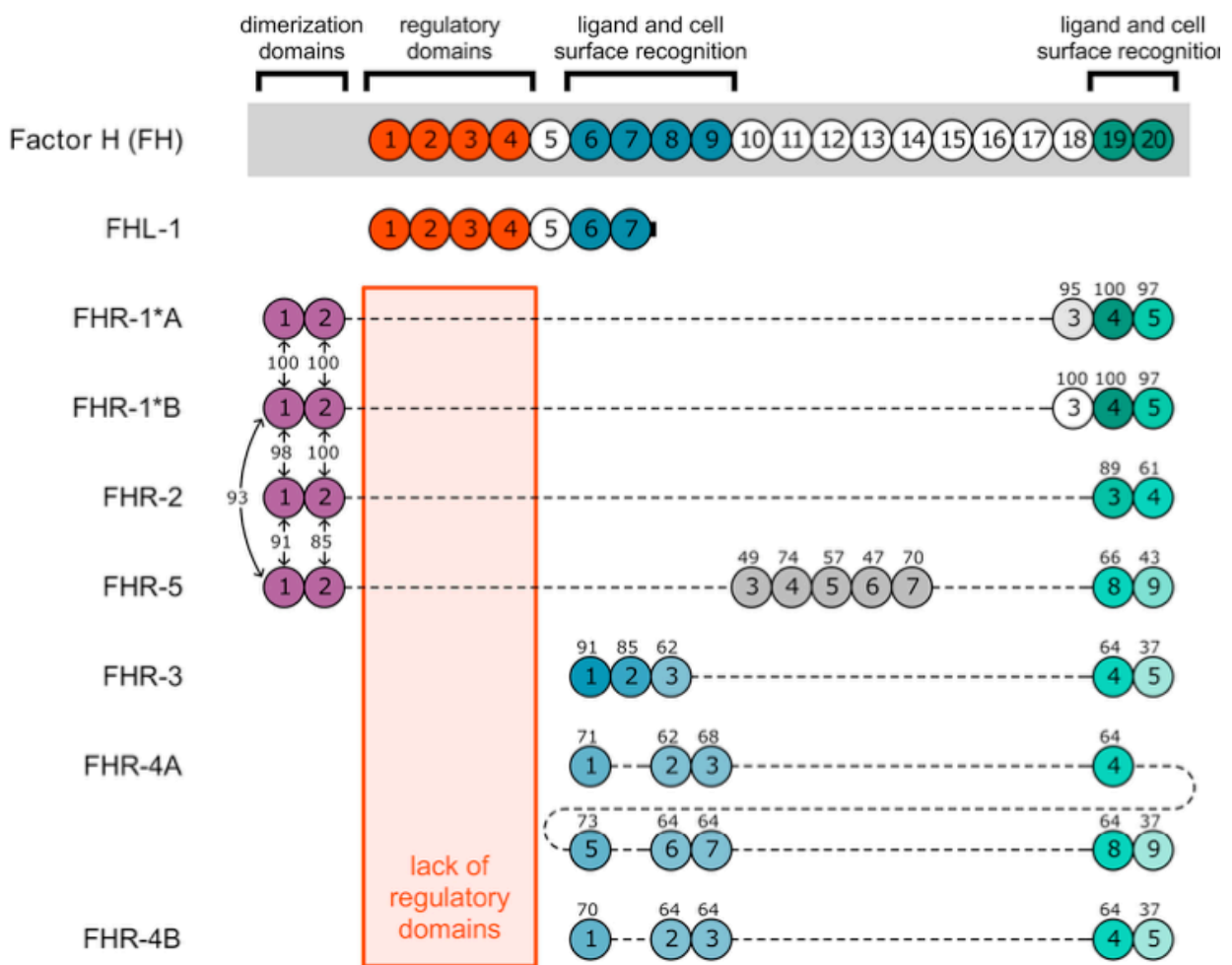


Figure 8. Homologie structurale entre le FH et les FHR1-5

Les protéines FH et FHR1-5 sont composées de domaines CCP (*complement control protein*) ou SCR. Le FH contient 20 SCR. Les SCR 1-4 sont essentiels pour l'activité régulatrice du FH : ils permettent la fixation du FH avec le C3b, son activité de cofacteur du FI ainsi que de son activité de dissociation de la C3 convertase. Les SCR 19-20 du FH interagissent avec les acides sialiques membranaires. Les domaines centraux SCR 6-9 interagissent avec différents ligands (glycosaminoglycanes, CRP, etc.), précédemment détaillés. Le FHL-1 correspond à un variant protéique du FH issu d'un épissage alternatif composés des 7 premiers domaines SCR du FH, dont les domaines de fixation au C3b SCR 1-4. Les FHR1-5 partagent un haut degré d'homologie avec le FH. Les SCR des FHR sont alignés verticalement avec les SCR du FH les plus proche structurellement. Le pourcentage d'homologie entre les séquences peptidiques des SCR du FH et des FHR1-5 est indiqué en gris, au-dessus de chaque domaine. Les SCR 1 des FHR1, 2 et 5 comportent un site de dimérisation. Figure issue de Cserhalmi, *et al.* Seminar in Immunology, 2019.

L'hypothèse actuelle est que les protéines FHR1 et FHR5 moduleraient l'activité régulatrice du FH au niveau des surfaces cellulaires présentant une densité élevée en C3b/C3d, en agissant comme des compétiteurs du FH, notamment sur la surface des cellules endothéliales (100). De plus, la petite taille des FHRs par rapport au FH (37-80 kDa contre 155 kDa, respectivement) pourrait faciliter l'accès des FHR à certains tissus plus difficilement accessibles pour le FH. Ainsi, il est possible que les ratios FHR1:FH et FHR5:FH soit augmentés dans certains tissus (p.ex. le glomérule rénal) (97,101,102), et que l'effet compétiteur de ces FHR sur l'activité régulatrice du FH s'exerce principalement localement (103). Par exemple, le FHR5 posséderait une affinité particulière pour la laminine, un composant majeur de la membrane basale glomérulaire et de la matrice extracellulaire mésangiale (104). Des dépôts de FHR5 mésangiaux ont été identifiés dans différentes glomérulopathies (p.ex. glomérulonéphrite à dépôts de C3, GC3 et IgAN). La colocalisation des dépôts de FHR5 avec les dépôts de C3b/iC3b soutient un rôle du FHR5 dans l'activation ou la régulation locale du complément (96,102,105). Les rôles physiologiques des FHR2, 3 et 4 sont méconnus.

De façon notable, la concentration plasmatique de différentes FHR (FHR1, 3 et 4) peut être influencée par des facteurs génétiques. Dans la population générale, la délétion conjointe des gènes *CFHR1-R3* – et par conséquent un déficit protéique total ou partiel de FHR1 et de FHR3 – est fréquente. La fréquence de la délétion homozygote *CFHR1-R3* est d'environ 8% chez les Européens et encore plus élevée chez les Nigériens où elle atteindrait une fréquence de 25%. Dans la population Française, environ 1 individu sur 3 présente une délétion hétérozygote de *CFHR1-R3* et 1 individu sur 20 n'exprime ni FHR1, ni FHR3. La délétion *CFHR1-R4*, moins fréquente (environ 2% de porteurs hétérozygotes en Europe) est associée à un déficit de FHR1 et FHR4 (106). L'observation fréquente de ces délétions géniques en population générale montre que le défaut d'expression des protéines FHR1, FHR3 et/ou FHR4 n'est pas pathologique *per se*. Cela appuie l'hypothèse que ces FHR n'ont pas de rôle biologique majeur.

A l'inverse, un déséquilibre entre le FH et les FHR1,5 à la faveur des FHRs (\downarrow FH et/ou \uparrow FHR1,5) pourrait être responsable d'une amplification du complément (88,103–105,107) (**Figure 9**). Un déséquilibre de cette balance a notamment été associé à différentes glomérulopathies, incluant la GC3, la glomérulonéphrite à dépôts denses (DDD), l'IgAN et la glomérulonéphrite à *CFHR5* (102,105,107–110). Une vue d'ensemble des principales fonctions biologiques des FHR (décrites ou suspectées) est présentée dans le **Tableau 1**. Les autres fonctions spécifiques des protéines FHR restent toutefois à découvrir.

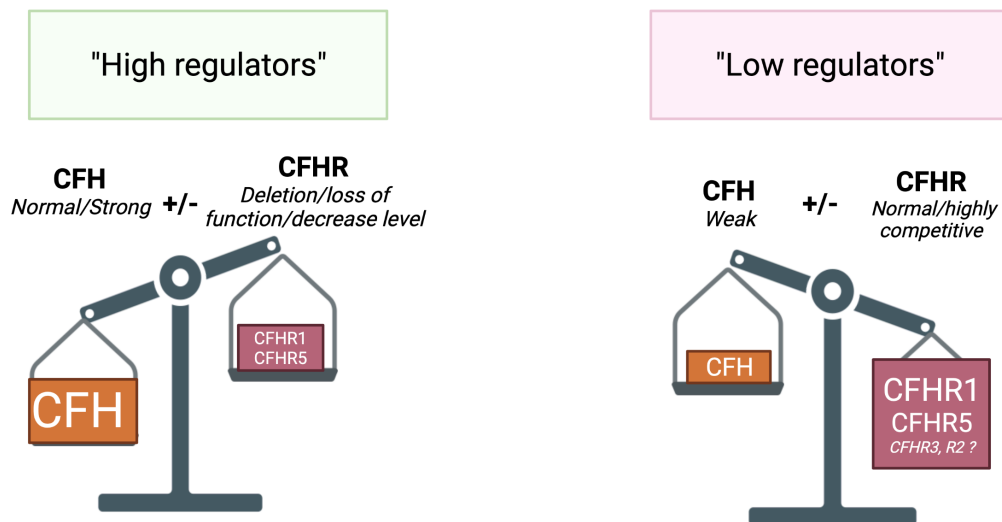


Figure 9. Hypothèses : la balance FH/FHR

Abréviations : *CFH* : gène du FH, *CFHR1* : complement factor H related protein 1 gene.

Tableau 1. Principales fonctions décrites des FHR1-5

Protéine	Concentration plasmatique, Ratio FHR:FH*	Principaux ligands <i>in vitro</i>	Principales fonctions <i>in vitro</i>		
			Régulation des dépôts de C3b	C3 convertase (C3bBb)	C5 convertase
FHR1 (37-42kDa)	~ 70-100 µg/mL (88,111,112) (ratio 0.3:1)	C3b/C3d(111), Héparanes sulfates (113) HDL(113)	Compétition avec la fixation du FH au C3b membranaire <i>Activité cofacteur du FI***(114)</i>	↑ formation (115), ↓ dissociation (116) Inhibition de l'activité de la C3bBb*** (114)	↓ passage de la C3 vers la C5 convertase et de la lyse érythrocytaire (96,111)
FHR2 (24-28kDa)	~ 50 µg/mL	C3b/C3d Héparanes sulfates HDL (113)	Pas de compétition avec le FH pour le liaison au C3b à concentrations physiologiques (96,117)	Inhibition de l'activité de la C3bBb (114)	Pas de donnée
FHR3 (35-56 kDa)	~ 70-100 µg/mL (116)	C3b/C3d (118) Héparine	Compétition avec la fixation du FH au C3b membranaire <i>Activité cofacteur du FI discutée</i>	<i>Possible inhibition de la C3bBb</i>	Pas de donnée
FHR4 (A ou B, 86 ou 42 kDa)	Non déterminée	C3b/C3d (118) CRP, HDL (88)	Uncertain	Uncertain	Pas de donnée
FHR5 (62 kDa)	5 µg/mL (115)	C3b/C3d et iC3b (96,102) Héparine (95), Laminine (119), PTX3 (115), HDL (113), CRP (113)	Compétition avec la fixation du FH au C3b membranaire <i>Activité cofacteur du FI***</i>	Compétition avec la régulation de la C3bBb par le FH <i>Activité de dissociation de la C3bBb***</i>	Pas de donnée

***uniquement à concentrations très élevées. *Abréviations* : Les cellules en orange indiquent un effet des FHR en faveur d'une augmentation de l'activation du complément. Les cellules en vert indiquent un rôle de régulation ou d'absence de compétition avec l'activité du FH du complément. HUVEC : cellules endothéliales microvasculaires humaines issues de la veine ombilicale (cellules primaires).

3.4. Principaux régulateurs des dépôts de C3b ou C4b

Le *Membrane Cofactor Protein* (MCP, ou CD46) est un régulateur transmembranaire exprimé sur quasi toutes les cellules nucléées se présentant sous 4 isoformes issues d'épissages alternatifs d'un même gène de 46 kb (120). MCP possède 4 domaines CCP extracellulaires structurellement similaires aux domaines SCR 1-4 du FH, permettant à MCP de se lier au C3b et au C4b. MCP constitue donc un régulateur clé des trois voies d'activation du complément en agissant en cofacteur du FI (**Figure 10**).

Le facteur I (FI) est une sérine protéase circulante participant à l'inactivation du C3b en iC3b et du C4b en iC4b par clivage protéolytique, en présence de cofacteurs. Les **cofacteurs du FI** sont le FH, MCP (ou CD46) (*précédemment décrits*), CR1 (ou CD35) et la C4BP. Le FH interagit avec le FI par ses SCR 1-3 et le C3b. Le CR1 est un régulateur membranaire du C3b et du C4b notamment exprimé à la surface des érythrocytes, des leucocytes et des podocytes. Il se compose de 30 domaines CCP extracellulaires comportant des sites de liaison au C3b et au C4b.

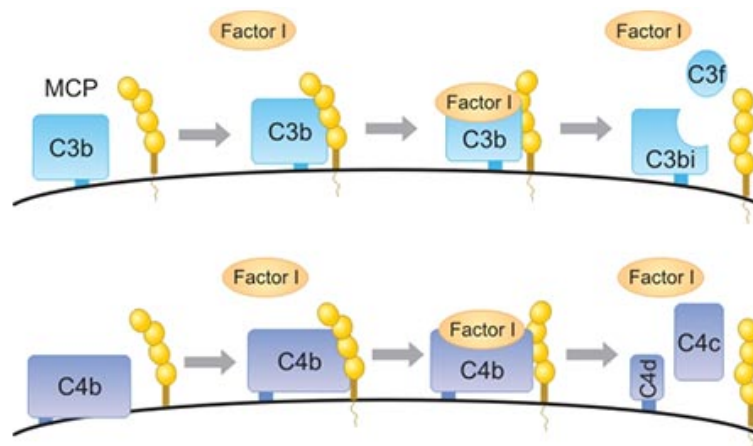


Figure 10. Membrane cofactor protein (MCP), un régulateur membranaire clé des dépôts de C3b et de C4b

Abréviations : MCP : membrane cofactor protein. Schéma adapté de Riley-Vargas, *et al.* Cell 2004.

Ces cofacteurs sont essentiels pour l'activité protéolytique du FI. La fixation préalable des cofacteurs du FI au C3b ou au C4b permet le recrutement du FI plasmatique et son bon positionnement pour la libération de son activité de sérine-protéase. Les produits de dégradation iC3b et iC4b sont inaptes pour la formation de nouvelles convertases. Le FI et le CR1 poursuivent ensuite le clivage du iC3b et du iC4b en C3d et C4d. Ces marqueurs restent alors ancrés à la surface cellulaire.

3.5. Principaux régulateurs de la C3 convertase

Le *decay accelerating factor* (**DAF**, ou CD55) est un régulateur membranaire accélérant la dissociation des C3/C5 convertases formées sur la surface cellulaire. Le **FH** et la **C4BP** possèdent une activité similaire de dissociation de la C3bBb et de la C4b2b, respectivement.

3.6. Les régulateurs de la voie terminale du complément

Le **CD59** est un régulateur membranaire prévenant l'ancrage membranaire du C5b-8 et du C5b-9 (121,122). La **clusterine (CLU)** et la **vitronectine** plasmatique se lient aux complexes terminaux (C5b-7, C5b-8 et C5b-9), les rendant solubles, prévenant ainsi leur insertion membranaire (123).

5. De la physiologie vers la pathologie

A l'heure actuelle en 2023, plus de 50 pathologies avec l'émergence d'un rôle du complément ont été décrites, avec des mécanismes d'activation et des degrés d'implication variables (1,22,31,124). Les maladies liées au complément dépendent de plusieurs facteurs, incluant : **i**) l'intensité du trigger activant la cascade du complément (p.ex. présence et nature du pathogène, abondance des PAMPs ou DAMPs, présence de complexes immuns, voies impliquées) ainsi que **ii**) des fonctions ou concentrations relatives des protéines composant la cascade d'activation/régulation du complément. Ces anomalies de la balance du complément peuvent être en lien avec des anomalies acquises (125) ou génétiques.

La voie alterne du complément joue un rôle majeur dans l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) (126), le syndrome hémolytique et urémique atypique (SHUa)(127) et dans la glomérulonéphrite à dépôts de C3 (GC3) (128,129). La voie classique du complément s'illustre notamment dans la physiopathologie du lupus (130).

Les **microangiopathies thrombotiques (MAT)** sont définies par une triade associant une anémie hémolytique mécanique, une thrombocytopénie et une atteinte d'organe (128,131–133). Le tableau de MAT est principalement engendré par des lésions endothéliales favorisant la formation de microthrombi dans les petits vaisseaux de différents organes périphériques et une thrombopénie de consommation. La formation de thrombi dans le lit vasculaire engendre ensuite la lyse mécanique des globules rouges passant à travers les thrombi de fibrine (127). Cela conduit à une anémie hémolytique et à l'apparition de schizocytes dans la circulation. Une dérégulation du complément peut sous-tendre les mécanismes à l'origine des lésions endothéliales et l'apparition du phénotype pro-thrombotique dans la MAT (134). Les MAT forment un ensemble hétérogène de pathologies incluant le SHUa, le prototype de pathologie médiée par la VA du complément. Dans le **SHUa**, la dérégulation du complément est en lien avec une susceptibilité génétique portant sur les gènes de la VA du complément chez 1 patient sur 2 (128,135–137) ou plus rarement par des anomalies acquises (p.ex.

anticorps anti-FH). D'autres formes de MAT secondaires à différents triggers (p.ex. infections, cancers, transplantation) sont décrites, avec une contribution variable du complément(132,134,136).

La GC3 est une glomérulopathie rare (prévalence $<5/10^6$ d'individus) caractérisée par une dérégulation de la VA du complément dans la circulation et au niveau du glomérule rénal. Cette activation incontrôlée de la VA du complément engendre les dépôts de C3b/iC3b tissulaires rénaux, associés ou non à une consommation plasmatique du C3. Dans cette glomérulonéphrite, la dérégulation de la voie alterne peut être en lien avec des anomalies acquises (p.ex. anticorps stabilisant la C3bBb convertase, C3 nephritic factor, C3_{nef}) ou, moins fréquemment, avec un terrain génétique de susceptibilité (environ 25% des patients) (138).

Dans la section suivante nous nous intéresserons à la génétique du complément et à son implication en pathologie.

II – La génétique du complément et son implication en pathologie

1. Vue d'ensemble

Comme illustré depuis ces dix dernières années, la génétique est très diversifiée englobant des variants rares introniques ou exoniques, des polymorphismes (*single nucleotide polymorphism*, SNP), des recombinaisons génétiques ou encore des anomalies du nombre de copies de gènes ou d'exons (délétions, duplications, *etc.*).

La génétique du complément n'échappe pas à cette logique : toutes les protéines de la cascade du complément ont des anomalies génétiques décrites. Ces anomalies génétiques peuvent avoir des conséquences variables comme des gains ou pertes de fonction ou d'expression protéique ou encore ne pas avoir de conséquences pathologiques.

2. Définitions et données en population générale

2.1. Variants rares

Les **variants rares** se définissent comme des variants génétiques ayant une fréquence allélique mineure (*minor allele frequency*, MAF) inférieure à 1 % dans la population générale. Ces variants peuvent avoir ou non des conséquences sur l'expression, la concentration ou la fonction de la protéine finale. Tout variant rare n'est donc pas systématiquement pathogène (136). En effet, des centaines de variants rares du complément sont présents sous forme hétérozygote dans la population générale. Dans la population Européenne issue de la cohorte « 1000 Genomes Project Phase 3¹ » (139,140), 18,1% des donneurs présentent au moins un variant rare (faux-sens, non-sens ou frame-shift) avec une MAF < 1% parmi les six principaux gènes du complément (*CFH*, *CFI*, *CFB*, *MCP*, *C3* et *CFHR5*), dont 8,7%

¹ Disponible sous ce lien: <https://www.internationalgenome.org/data-portal/data-collection/30x-grch38>

portent au moins un variant ultra-rare avec une MAF < 0,1% (*données personnelles*). Dans la Genome Aggregation Database (gnomAD)² (137,141), environ 8% des donneurs ont un variant (faux-sens, non-sens ou frame-shift) sur le gène du *CFH*, dont 2,3% portent un variant du *CFH* avec une MAF < 0,1% (137). Ainsi, dans les pathologies médiées par le complément telles que le SHUa, la GC3 ou encore la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) (142), ce n'est pas la présence isolée de variants rares du complément, mais plutôt leur fréquence élevée et leur distribution qui constituent des arguments en faveur d'un rôle du complément dans leur développement (136).

2.2. Polymorphismes

Les polymorphismes se définissent comme des variants génétiques communs, ayant une fréquence allélique mineure d'au moins 1% dans la population générale. Par définition, les polymorphismes – fréquents en population générale – ne sont pas pathogènes. En revanche, ceux-ci peuvent moduler discrètement la fonction ou la concentration protéique et ainsi influencer la susceptibilité au développement de pathologies médiées par le complément, modifier leur pénétrance ou altérer le phénotype final.

3. Les variants rares du complément

3.1. Impact des variants du complément

Une diminution de l'activation globale du complément en lien avec des déficits protéiques complets peut être responsable d'une susceptibilité augmentée aux infections ou aux pathologies auto-immunes (143). A l'inverse, les variants génétiques du complément, en particulier de la VA, responsables d'une dérégulation du complément, peuvent s'associer à des maladies rares (p.ex. SHUa ou GC3) (132,138) ou plus fréquentes (p.ex. DMLA) (144). L'identification de variants génétiques (rares

² Disponible sous ce lien : <https://gnomad.broadinstitute.org>

ou polymorphismes) portant sur les principales protéines activatrices ou régulatrices du complément dans ces pathologies ont permis d'enrichir les connaissances sur la physiologie du complément ainsi que sur les mécanismes pathogènes propres mis en jeu dans chacune d'entre elles (138).

3.2. Impact des variants rares du complément en pathologie

Des variants rares peuvent favoriser une dérégulation du complément par plusieurs mécanismes. Ces variants peuvent entraîner un déficit protéique quantitatif ou fonctionnel (p.ex. variants perte de fonction portant sur les régulateurs de la VA du complément : FH, FI, MCP) (128,135,136,145) ou encore favoriser la génération d'une C3 convertase « hyperactive », résistant à la régulation (gain de fonction de protéines activatrices C3 ou de FB) (146,147) (**Tableau 2**). A l'inverse, les déficits complets en C3, FD, FB, properdine ou protéines de la voie terminale augmentent la susceptibilité aux infections (148).

Les variants ultra-rares (MAF<0,1%) se situant dans le gène du *CFH* sont associés à différentes pathologies, incluant le SHUa (13-27 % des patients) (129,135,136), la GC3 (149), et, dans une moindre mesure, la DMLA. Ces variants affectent notamment les domaines fonctionnels C-terminaux (SCR19-20) (SHUa) ou N-terminaux (GC3) du FH (**Figure 11**). La distribution différente des variants dans ces différentes pathologies appuie l'hypothèse de différents mécanismes à l'origine de la dérégulation du complément dans ces pathologies (150), avec une dérégulation du complément principalement à la surface des cellules endothéliales (SHUa) et/ou une altération de l'activité régulatrice du FH dans la circulation (GC3).

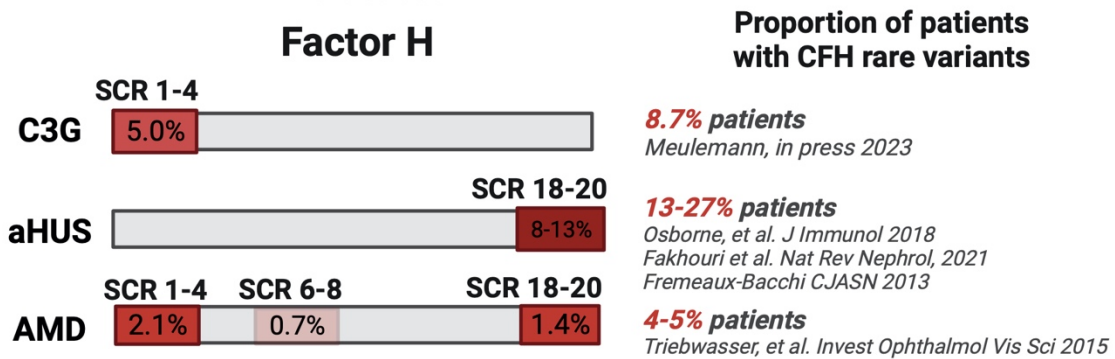


Figure 11. « Hotspots » des variants du CFH identifiés dans 3 pathologies médiées par le complément

La protéine du facteur H est représentée en gris. Les numéros correspondent aux domaines SCR. Les zones en rouge représentent les zones principales de localisation des variants rares identifiés chez les patients. *Abréviations* : aHUS : atypical Hemolytic and Uremic syndrome, Syndrome Hémolytique et Urémique atypique ; AMD : age-related macular degeneration, dégénérescence maculaire liée à l'âge, C3G : glomérulonéphrite à dépôts de C3, SCR : short consensus repeat region.

4. Particularités du *locus CFH-CFHR1-5* (variants rares et recombinaisons)

Les gènes du *CFHR1-5* sont issus de duplications anciennes du gène du *CFH*. Le cluster des gènes *CFH-CFHR* contient donc une répétition de larges régions nucléotidiques aux séquences nucléotidiques très proches, y compris dans les introns et en régions intergéniques. Cette proximité de séquences favorise la survenue de recombinaisons génétiques ainsi que des variations du nombre de copies de gènes ou d'exons comme des duplications, délétions ou inversions entre les *CFH* et *CFHR* (151). Ces réarrangements génétiques sont notamment responsables de la délétion d'un large segment d'ADN (environ 84 kb) des gènes *CFHR1* et *CFHR3* (délétion *CFHR1-R3*). Cette délétion est associée à une susceptibilité augmentée au développement d'un SHUa médié par des anticorps anti-FH (152). D'autres réarrangements complexes plus rares entre les gènes *CFH* et *CFHR* induisent la formation de gènes hybrides *CFH::CFHR1*, *CFH::CFHR3* ou encore *CFHR1::CFH*. Ces réarrangements présents chez 5% des patients porteurs d'un SHUa, conduisent à la production de protéines hybrides FH/FHR agissant en tant qu'antagonistes compétiteurs du FH (153–156). D'autres réarrangements (p.ex. duplication d'exon) ou variants rares à l'origine d'un gain de fonction des FHR5 sont associés à la glomérulopathie à *CFHR5* ou encore à la GC3 (157).

Tableau 2. Principales pathologies associées aux variants génétiques rares du complément

Gène	Déficit quantitatif ou fonctionnel	Gain de fonction ou ↑expression protéique
CFH	SHUa, DMLA, GC3, DDD	
CFI	SHUa, DMLA, GC3	
MCP	SHUa	
C3	Infections*	SHUa
CFB	Infections*	SHUa
CFHR1	IgAN*, DMLA* SHUa avec Ac anti-FH, MAT secondaire au Carfilzomib ou à l'allogreffe de moelle osseuse* Lupus	SHUa DMLA
CFHR2		
CFHR3	IgAN*, DMLA* SHUa avec Ac anti-FH, MAT secondaire au Carfilzomib ou à l'allogreffe de moelle osseuse*	Méningite à méningocoque
CFHR4		
CFHR5		GC3, IgAN, glomérulopathie à CFHR5
C1q, C1r, C1s	Infections à germes encapsulés (<i>Streptococcus pneumoniae</i>) Pathologies auto-immunes dont lupus	
C2, C4, MBL	Infections, notamment muqueuses	
Composant terminaux C5- C9	Infections dont méningites à <i>Neisseria meningitidis</i>	

Les pathologies en **rouge** présentent une susceptibilité augmentée, les pathologie pour lesquelles les variants génétiques du complément sont protectrices sont en **vert**. * délétion ou déficit homozygote surtout. *Abréviations* : GC3 : glomérulonéphrite à dépôts de C3, DDD : glomérulonéphrite à dépôts denses ; IgAN : néphropathie à dépôts d'IgA, MAT : microangiopathie thrombotique ; SHUa : syndrome hémolytique et urémique atypique.

5. Polymorphismes et haplotypes

Les gènes des principaux régulateurs du complément (dont *CFH*, *CFHR1-5*, *C4BP1*, *CR1*, *CD55* et *MCP*) se situent au sein du *locus* 1q32, d'une longueur d'environ 12 Mb (137). Compte-tenu de cette proximité génétique, les polymorphismes situés dans les différents gènes sont transmis en déséquilibre de liaison. La combinaison des polymorphismes transmis « en bloc » au sein d'un bras allélique forme un haplotype. La fréquence de polymorphismes ou des haplotypes du complément varie en fonction des populations et des zones géographiques et peut impacter la susceptibilité de développer une pathologie médiée par le complément (**Figure 12**).

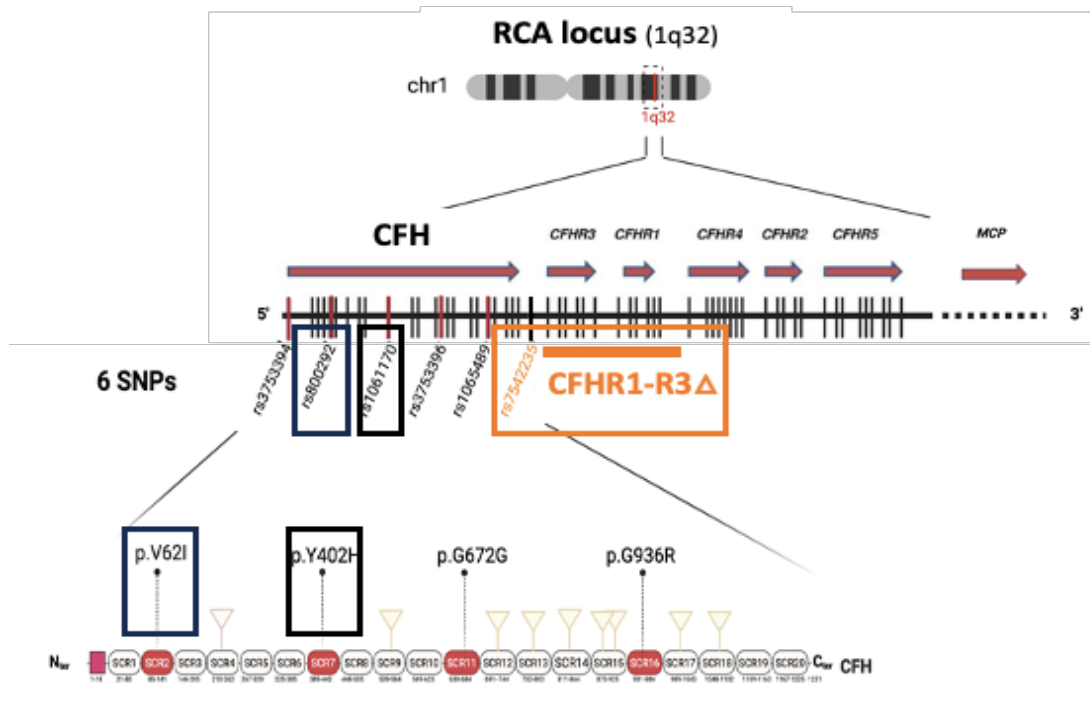
5.1. Haplotypes du *CFH* et *CFHR*

Le *CFH* est un gène de 95 kb. La combinaison de plusieurs polymorphismes introniques ou exoniques du *CFH* et *CFHR* permet la formation d'haplotypes (H) (158). La formation des haplotypes au sein de cette région peut être réalisée en combinant 2, 4, voire plus de 10 SNPs, illustrant ainsi une grande variété de configurations d'haplotypes possibles. A ce jour, l'haplotype le plus représenté est issu de la combinaison de 4 SNP situé dans le gènes du *CFH* (**figure 12**, représenté en fond orange). Cette combinaison de 4 polymorphismes forme 4 haplotypes dominants, numérotés par ordre de fréquence. Ces haplotypes se distinguent les uns des autres par la présence ou non de certains polymorphismes. L'haplotype 1 (*CFH*-H1) porte le polymorphisme *CFH* p.Y402H et serait « à risque » vis-à-vis de la susceptibilité au développement de la DMLA. Ce polymorphisme situé en région centrale du FH (SCR7) modulerait la capacité du FH à se lier aux GAG (p.ex. héparanes sulfates) membranaires et à la CRP (71,159,160). Cette région centrale du FH (SCR6-8) serait particulièrement importante pour la régulation du complément par le FH à la surface de l'endothélium rétinien et de la membrane de Bruch au niveau de la macula (160). L'haplotype *CFH*-H2 porte le polymorphisme *CFH* p.V62I. Des études *in vitro* (161,162) ont montré une capacité de liaison au C3b et une activité cofacteur du FI augmentée pour le FH_{62I} comparé au FH_{62V}. Cet haplotype serait protecteur vis-à-vis du risque de

développer un SHUa ou une DMLA. L'haplotype *CFH*-H3 est « à risque » pour le SHUa (particulièrement sous la forme homozygote) (163) et neutre pour la DMLA (160). Le *CFH*-H4, en déséquilibre de liaison avec la délétion *CFHR1-CFHR3* chez les sujets européens est associé à un risque de développer du SHUa médié par des anticorps anti-FH et serait protecteur vis-à-vis du développement de la DMLA. La transmission de ces haplotypes elle-même en déséquilibre de liaison avec d'autres haplotypes des gènes *CFHR* situés en 3' ajoute une complexité supplémentaire (**Figures 12 et 13**). Il est donc difficile de déterminer quel(s) polymorphisme(s) module(nt) précisément l'activité du complément ou modifie(nt) le tropisme des différentes pathologies médiées par le complément pour un organe donné.

5.2. Haplotypes de *MCP*

Un haplotype de *MCP* (*MCP_{ggaac}*) a été associé à une susceptibilité de développement d'un SHUa, en particulier quand il est présent sous la forme homozygote et/ou associé à d'autres variants de la voie alterne (135,137). L'haplotype *MCP_{ggaac}* combine 5 polymorphismes situés en zone promotrice du gène. Les mécanismes reliant cet haplotype à une dérégulation du complément dans le SHUa sont actuellement mal compris. Une hypothèse est que cet haplotype serait associé à une diminution de la transcription du gène *MCP* et, par conséquent, une diminution de son expression membranaire. Cette hypothèse appuyée par une seule étude *in vitro* (164) reste cependant à vérifier *in vivo*.



Haplotype	CFH						CFHR1/CFHR3		Association avec la pathologie	
	Promoteur c.1-331C>T	rs800292 p.V62I	rs1061170 p.Y402H	rs375336 p.G672G	rs1065489 p.G936D	Délétion CFHR1-R3	Haplotype CFHR1	Risque	Protection	
H1	C	G	C	A	G	Non	A	DMLA GC3,DDD	SHUa	
H2	C	A	T	A	G	Non (Européens) Oui (Africains)	A ou B --	--	DMLA, SHUa, GC3	
H3	T	G	T	G	T	Non	B	SHUa	Infection à méningocoque	
H4	C	G	T	A	G	Oui (Européens) Non (Africains)	-- A ou B	SHUa avec anticorps anti-FH	DMLA	

Figure 12. Haplotypes du locus CFH-CFHR et leur association en pathologie

Abbreviations : GC3 : glomérulonéphrite à dépôts de C3, DDD : glomérulonéphrite à dépôts denses ; DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge, SHUa : syndrome hémolytique et urémique atypique.

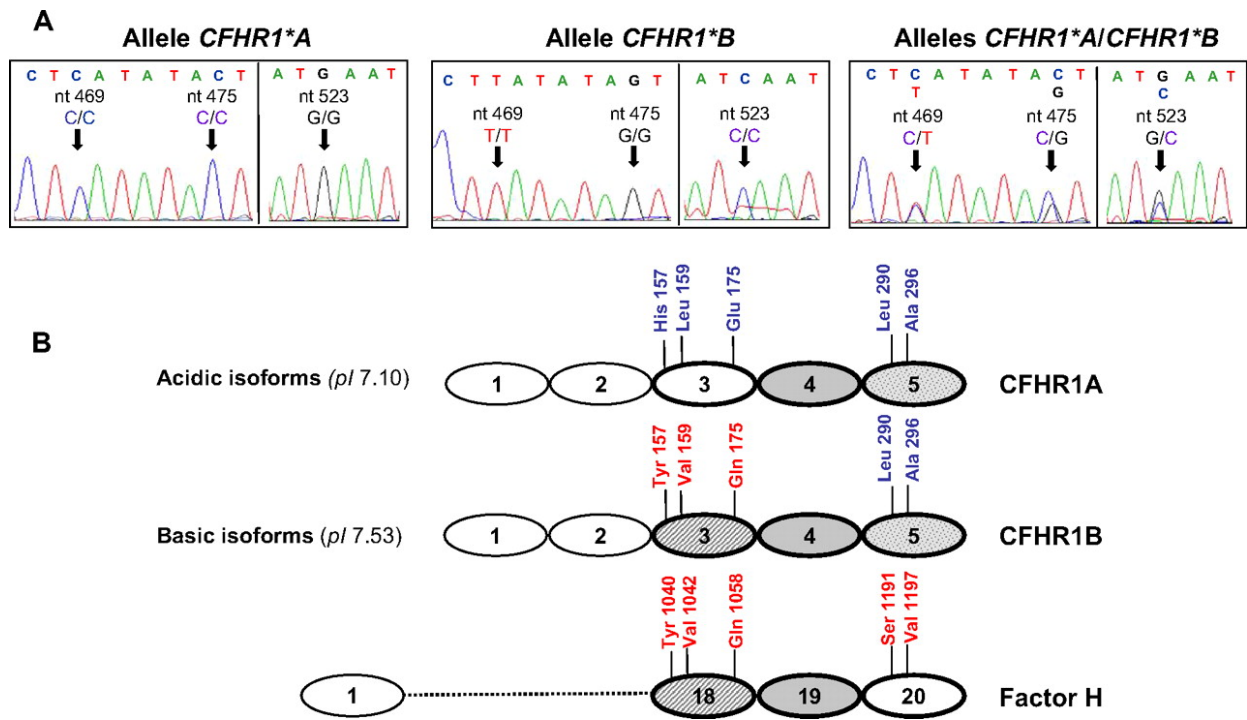


Figure 13. Haplotypes des *CFHR1*: isoformes *FHR1A et *FHR1**B**

La combinaison de 3 polymorphismes au niveau de l'exon 4 (codant pour le SCR3) du *CFHR1* permettent la définition de 2 haplotypes de *CFHR1* : *CFHR1**A et *CFHR1**B, « A » pour « acide » et « B » pour « basique ». L'isoforme *FHR1**A exprime les acides aminés His/Leu/Glu dans le SCR3 tandis que le *FHR1**B exprime le Tyr/Val/Gln. Ceci confère au SCR3 du *FHR1**B une séquence peptidique identique à celle du SCR18 du FH. Le *FHR1**B constituerait un « compétiteur fort » du FH pour la régulation du complément à la surface des cellules endothéliales, notamment glomérulaires et constituerait un facteur de susceptibilité au développement de SHUa Figure issue de Garrido, *et al.* Blood 2009.

6. Le concept de « complotype »

Le concept de complotype, introduit par Claire Harris (162,165), supporte l'hypothèse que la combinaison de polymorphismes portant sur certains gènes du complément pourrait influencer l'activité de la cascade. En l'occurrence, la combinaison de polymorphismes portant sur trois gènes impliqués dans la formation et la régulation de la C3 convertase alterne C3bBb (FH_{62V}, C3_{102G} et FB_{32R})(161,166,167) aurait un effet additif, multipliant par 6 l'activité de la C3 convertase générée *in vitro* (167). Plus récemment, Arjona, *et al.* ont montré que la combinaison des haplotypes du CFH (CFH-H3, _{gtgt}), de MCP_{ggaac} et du nombre de variants rares (suspectés pathogènes) avaient un effet additif sur la pénétrance du SHUa chez 372 apparentés de patients (163). Dans cette étude, la pénétrance du SHUa était de 36% à 44 ans chez les porteurs de 2 variants rares du complément. La pénétrance du SHUa augmentait considérablement à 100% à 44 ans chez les porteurs combinant 2 variants rares et les haplotypes MCP_{ggaac} et CFH-H3 « à risque » de SHUa.

Ainsi de nombreuses pathologies médiées par le complément pourraient être la conséquence d'un rôle cumulatif de variants rares, polymorphismes et haplotypes au sein de plusieurs gènes du complément mais aussi non liés au complément (p.ex. gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire, maintien de l'intégrité endothéliale, immunité innée / adaptative) (136). Ceci souligne le caractère intriqué de la génétique du complément. L'impact précis de ces associations complexes sur la susceptibilité, la pénétrance ou le phénotype d'une pathologie complément-médiée constitue un terrain de recherche encore peu exploré.

Dans la section suivante, nous nous intéresserons à la néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA (IgAN) et des arguments appuyant l'implication du complément dans sa pathogénèse.

III – Rôle du complément dans la néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA

1. Aspect épidémiologiques et définition

La néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA (IgAN) est la glomérulonéphrite primitive la plus fréquente dans le monde et une cause majeure d'insuffisance rénale, notamment chez les jeunes adultes (168–171). Malgré des progrès récents significatifs dans la compréhension des mécanismes impliqués dans sa pathogénèse, la physiopathologie de l'IgAN n'est encore que partiellement comprise. Ceci est en partie en lien avec les multiples visages de cette néphropathie montrant une grande hétérogénéité dans ses manifestations cliniques, histologiques ainsi que dans les profils évolutifs des patients. Ces paramètres ainsi que sa prévalence varient considérablement selon les zones géographiques du globe (169,170,172–174). La prévalence de l'IgAN est la plus élevée en Asie (\approx 50% des glomérulonéphrites primitives en Chine) (170,175), puis chez les patients Européens (169) et beaucoup plus faible chez les sujets Africains (173). L'étude de registres européens a permis d'estimer l'incidence annuelle de l'IgAN à environ 0,76 individu sur 100 000 et sa prévalence à 2-3 individus sur 10 000 (169). En France, l'IgAN représente actuellement 12% des glomérulonéphrites primitives et la 5^{ème} cause d'insuffisance rénale terminale (IRCT) (3,9% des patients incidents en IRCT/an)³. Chez les Asiatiques, le sexe ratio hommes/femmes (H:F) est équilibré, tandis qu'une prédominance masculine (sexe ratio H:F 2:1) est observée chez les Européens.

L'âge médian de survenue de la néphropathie est d'environ 30 ans (169,171,176,177). L'IgAN peut cependant se développer à tous les âges de la vie. Les manifestations cliniques de l'IgAN sont multiples. La forme la plus commune est une insuffisance rénale lentement progressive (178). Certains patients vont présenter des formes « indolentes » avec des altérations urinaires mineures et une stabilité de la fonction rénale (179,180). L'IgAN peut aussi se manifester par la survenue d'une

³ Données du registre REIN 2021 : https://www.agence-biomedecine.fr/IMG/pdf/rapport_rein_2021_2023-06-26.pdf

hématurie macroscopique récidivante suite à des infections muqueuses, en particulier chez les enfants et les jeunes adultes occidentaux (171). D'autres patients présentent une forme plus sévère avec un tableau de glomérulonéphrite rapidement progressive ou de vascularite à IgA (Purpura Rhumatoïde) avec atteinte rénale (Vascularite à IgA avec atteinte rénale, IgAVN). Ces formes d'IgAN associées à une prolifération extracapillaire (définies comme > 50% des glomérules avec une prolifération extracapillaire) ont un pronostic rénal défavorable, et une survie rénale de 57% à 1 an (181,182). Selon des études de registre, 1 patient sur 3 porteur d'une IgAN développera une IRCT dans les 20 ans suivant le diagnostic (169,176,183–185), et près de la moitié des patients évolueront vers une IRCT au cours de leur vie (185). De plus, la récurrence de l'IgAN est fréquente après transplantation rénale (10-42% de récurrence histologique à 5 ans) et peut impacter la survie du greffon (186). Ces données épidémiologiques soulignent toute l'importance de s'attaquer à cette préoccupation de santé publique.

Le diagnostic de l'IgAN est histologique et basé sur un seul critère : la mise en évidence de dépôts immuns d'IgA dominants (ou codominants) au sein du mésangium glomérulaire (187). Ces dépôts d'IgA sont souvent accompagnés d'une prolifération mésangiale pouvant être associée à une expansion de la matrice extracellulaire mésangiale. Ce critère diagnostique histologique quasi unique contraste avec la grande hétérogénéité clinique et la diversité des données épidémiologiques observées. Ceci souligne la notion que le diagnostic d'une IgAN reflète probablement tout un ensemble de pathologies aux mécanismes proches mais non complètement identiques (172). Cela contribue notamment à la difficulté rencontrée pour le développement de thérapies spécifiques dans cette indication.

Les principaux facteurs pronostiques de l'évolution de l'IgAN sont majoritairement communs aux autres glomérulonéphrites ou maladies rénales chroniques, tels que le débit de filtration glomérulaire estimé (DFGe), le degré de protéinurie (188) ou encore la présence d'une hypertension

artérielle non contrôlée (185,189,190). Une hématurie persistante pourrait constituer un facteur de risque additionnel favorisant le déclin de la fonction rénale chez les patients IgAN (191).

Plusieurs scores histologiques pronostiques ont été développés dans l'IgAN. Le score MEST-C de la classification d'Oxford 2016 est actuellement le plus largement utilisé (192,193). Ce score regroupe 5 paramètres histologiques : la présence d'une hypercellularité mésangiale (M), d'une hypercellularité endocapillaire (E), d'une sclérose glomérulaire segmentaire (S), d'une fibrose interstitielle / atrophie tubulaire (T) et d'une prolifération extracapillaire (C). Ce score, validé en population adulte et pédiatrique (194,195) permet de prédire le risque de survenue du critère composite IRCT ou baisse du DFGe de 50%. Les critères M, S, T et C sont des facteurs de risque indépendants d'évolution vers l'IRCT. Le critère E perd sa valeur pronostique en cas de traitement immunosuppresseur (196). La répétition des biopsies semble améliorer la valeur pronostique du score MEST-C (197). Ce score montre cependant certaines limites, notamment dans sa reproductibilité selon les centres (198), dans sa valeur pronostique limitée chez les patients avec un DFGe < 30mL/min/1,73m² et/ou une protéinurie > 0,5g/jour et son absence d'applicabilité pour les formes d'IgAVN (199).

Enfin, ces différents paramètres cliniques, biologiques et histologiques sont incapables de clairement distinguer les patients qui bénéficieraient ou non d'une immunosuppression. Ceci souligne toute l'importance du développement de nouveaux biomarqueurs pronostiques spécifiques à l'IgAN.

2. Physiopathologie de la néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA

2.1. Modèle physiopathologique actuel

La physiopathologie de l'IgAN est complexe et n'est pas entièrement élucidée. Le modèle le plus largement accepté est multifactoriel et connu sous le nom de modèle "multi-hits" (200) (**Figure 14**). Ce modèle, initialement proposé par Suzuki, *et al.* (200) englobe une combinaison de facteurs environnementaux, immunologiques et génétiques (8,200,201). Ainsi, la survenue de plusieurs événements (ou « hits ») serait nécessaire pour le développement de la néphropathie.

Le premier événement (« Hit 1 ») implique la synthèse d'une molécule d'IgA1 anormalement glycosylée, appelée IgA1 déficiente en galactose (Gd-IgA1). Le deuxième événement (« Hit 2 ») concerne la production d'anticorps ciblant la Gd-IgA1. Ces (auto)anticorps et les molécules de Gd-IgA1 forment ensuite des "complexes immuns" dans la circulation (« Hit 3 »)(202). Le dernier événement (« Hit 4 ») implique le dépôt de ces complexes immuns dans le mésangium glomérulaire. La combinaison de ces événements font de l'IgAN une glomérulonéphrite auto-immune (203).

L'IgAN peut être primitive ou secondaire. Les formes secondaires sont principalement associées à des infections, des pathologies inflammatoires ou auto-immunes affectant notamment le tractus gastro-intestinal, le foie ou la peau (187). Les formes secondaires d'IgAN auraient une pathogénèse également centrée sur la synthèse de Gd-IgA1 (205). Pour la suite du manuscrit nous nous concentrerons sur les formes primitives de la néphropathie.

2.2. Étape 1. Synthèse d'IgA galactose déficientes circulantes

Le premier événement consiste en la synthèse d'une IgA1 montrant un déficit relatif de O-glycosylation (206), que nous appellerons Gd-IgA1 (207).

L'IgA est l'immunoglobuline la plus abondante dans les sécrétions muqueuses, jouant un rôle important dans l'immunité des muqueuses. Il existe deux sous-classes d'IgA : l'IgA1 et l'IgA2. L'IgA1 est présente dans les muqueuses (forme polymérique) et dans la circulation (formes monomériques essentiellement) tandis que l'IgA2 est principalement retrouvée dans les muqueuses. Physiologiquement, l'IgA1 est principalement synthétisée par le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT) (muqueuses intestinale, respiratoire et nasopharyngée) et par la moelle osseuse (207). L'isoforme IgA1 se distingue notamment de l'IgA2 par sa longue région charnière (13 acides aminés de plus comparé à l'IgA2), largement O-glycosylée (208). Le motif unique de glycosylation de l'IgA1 est construit par l'action séquentielle d'enzymes appelées glycosyltransférases (p.ex. : α -2,6-sialyltransferase 2, ST6GALNAC2 et core 1 β ,1,3-galactosyltransferase, C1GALTC1) (**Figure 15**). Chez les patients développant une IgAN, une altération de l'activité des différentes glycosyltransférases (209) ou une modification « acquise » des IgA1 normo-galactosylées serait à l'origine de la production d'IgA1 présentant un déficit « relatif » en résidus galactoses (Gd-IgA1) (207). Ce déficit de O-glycosylation des IgA1 serait en lien avec une susceptibilité génétique (210,211). Un autre mécanisme potentiellement impliqué pourrait être la digestion enzymatique des résidus galactoses d'IgA1 normo-glycosylées par des bactéries du microbiote des muqueuses, en particulier de la muqueuse intestinale. Après leur formation, les Gd-IgA1 (polymériques et portant le composant sécrétoire)(212,213) produites dans la lumière intestinale pénétreraient dans la circulation sanguine. Cependant, les mécanismes par lesquels cela se produit ne sont pas encore bien caractérisés (203).

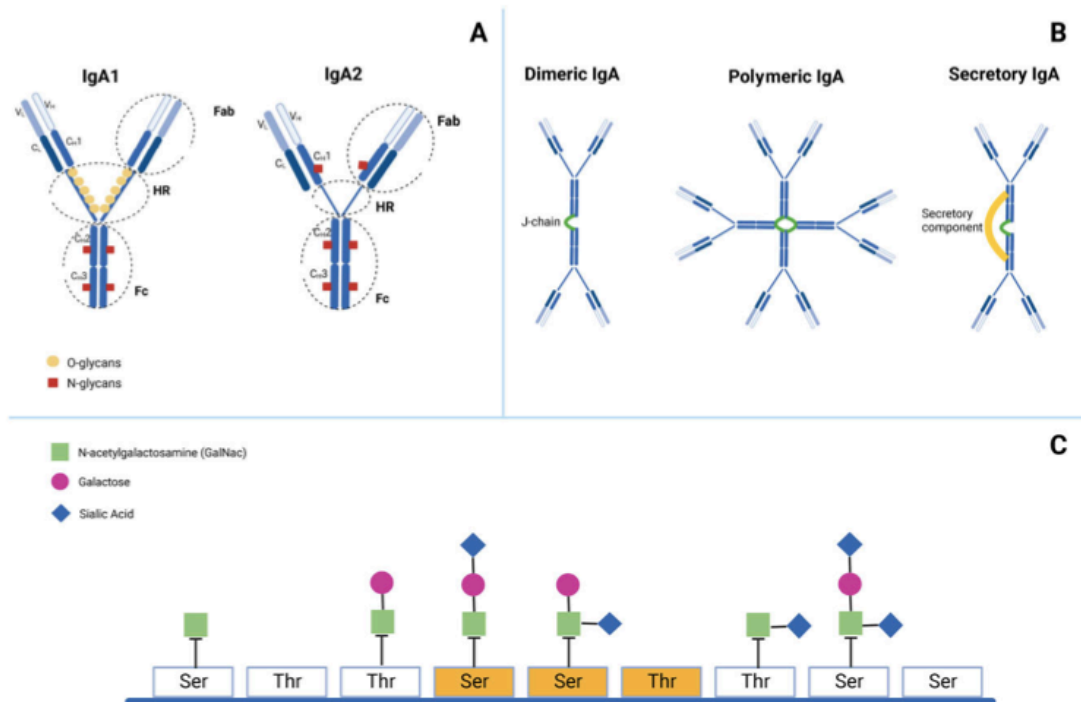


Figure 14. Les formes et sous classes d'IgA

Panel A. Les IgA1 et IgA2 se distinguent par leur région charnière largement O-glycosylée. **Panel B.** Les IgA s'associe sous forme dimérique ou polymérique. Les formes sécrétoires s'associent le composant sécrétoire. Le panel C. représente une vue schématique des 9 sites potentiels de O-glycosylation présents au sein de la région charnière des IgA1. De façon physiologique, jusqu'à 6 sites sur 9 sont O-glycosylés. Le nombre total et les patterns de glycosylations varient entre différentes molécules d'IgA1. Cette hétérogénéité d'O-glycosylation module les fonctions biologiques des IgA1, notamment dans l'immunité antibactérienne au niveau muqueux. Six différents motifs de O-glycosylation sont retrouvés dans la région charnière de l'IgA1. Les résidus en jaune sont les sites présentant le plus fréquemment un déficit d'O-glycosylation dans l'IgAN. Schéma issu de Gentile, *et al.* 2023. *Abréviations :* IgA1 : immunoglobuline A1, IgA2 : immunoglobuline A2, HR : *hinge region*, région charnière.

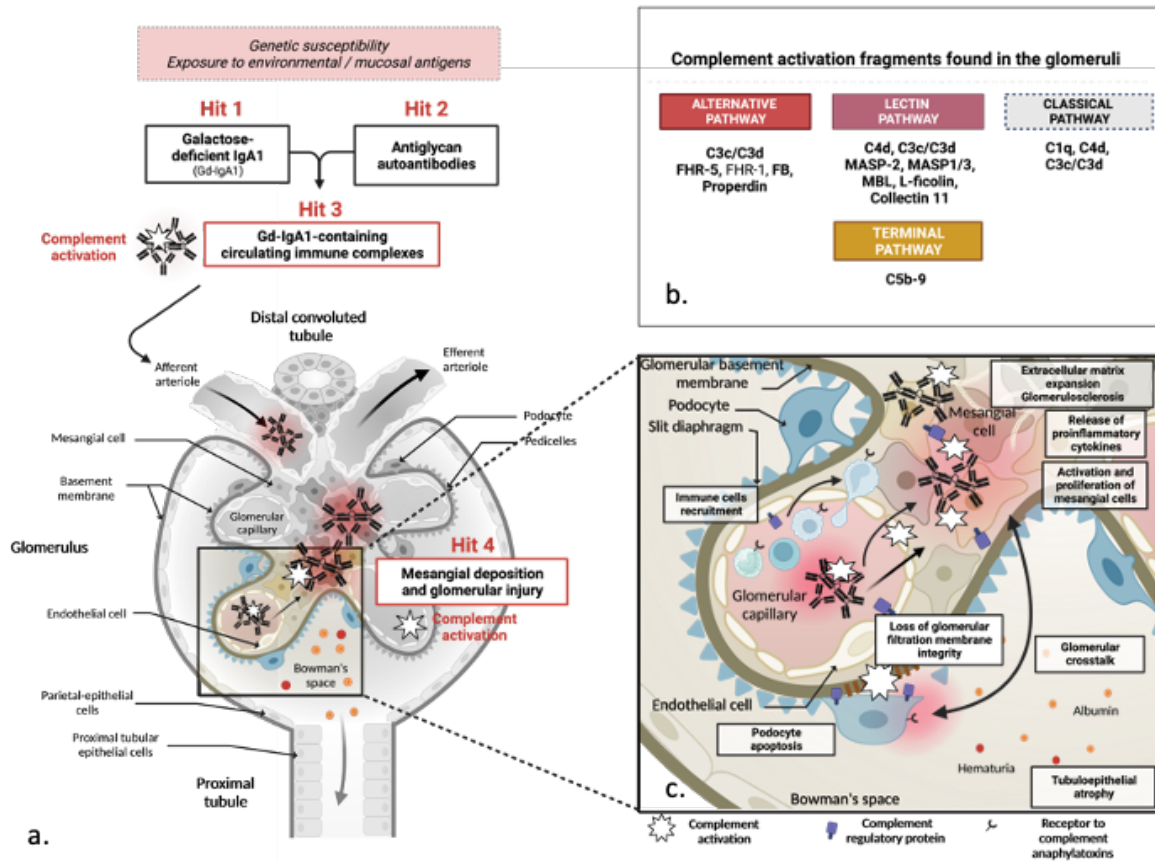


Figure 15. Modèle « multi-hit » proposé pour la physiopathologie de l'IgAN

Panels a-c. Représentation schématique du modèle “multi-hit” de la pathogénèse de l'IgAN. L'IgAN est actuellement considérée comme une glomérulonéphrite auto-immune dont le développement nécessite la combinaison de plusieurs événements ou « hits ». Les patients porteurs d'une IgAN développeraient une réponse immunitaire anormale à des antigènes muqueux ou à des facteurs environnementaux, résultant en la synthèse d'IgA1 galactose-déficients (Gd-IgA1) (« Hit 1 ») et d'autoanticorps, majoritairement IgG et IgM (« Hit 2 »). La combinaison de ces événements conduit à la formation de « complexes immuns » pathologiques (Gd-IgA1-IC) dans la circulation sanguine (« Hit 3 »). Ces complexes immuns de haut poids moléculaires vont ensuite se déposer et s'accumuler dans le mésangium rénal, engendrant une inflammation locale, l'activation du complément et les dommages glomérulaires (« Hit 4 »). L'activation du système du complément (voie alterne, voie des lectines essentiellement) se passe majoritairement dans le mésangium rénal au contact des complexes immuns déposés (« Hit 4 »). Le complément pourrait également être directement activé dans la circulation sanguine par les complexes immuns (« Hit 3 »). Les étapes impliquant l'activation du complément sont encadrées en rouge. **Panel b.** Principales protéines du complément identifiées par immunohistochimie/immunofluorescence et protéomique dans les glomérules des patients porteurs d'une IgAN. **Abréviations:** AP: *alternative pathway*, voie alterne; Gd-IgA1: *galactose-deficient IgA1*, IgA1 galactose déficient; Gd-IgA1-IC: *galactose-deficient IgA1-immune complexes*, complexes immuns contenant des IgA1 galactose déficients; LP: *lectin pathway*, voie des lectines. Schéma issu de Duval A, *et al.* NDT 2023.

2.3. Étapes 2-4. Formation de « complexes immuns » et dépôt mésangial

La présence de Gd-IgA1 dans la circulation sanguine de manière isolée n'est pas suffisante pour déclencher la néphropathie (214). En effet, des Gd-IgA1 peuvent être notamment détectées chez les individus (indemnes de néphropathie) apparentés à des patients, soulignant la participation d'une susceptibilité génétique dans la O-glycosylation des immunoglobulines mais également l'implication d'autres facteurs (214). Parallèlement à la synthèse de Gd-IgA1, les patients porteurs d'une IgAN produiraient des (auto)anticorps (IgG et/ou IgM) ciblant la région charnière des Gd-IgA1 riche en résidus N-acétyl-galactosamine (GalNac) (203,207,215). La fixation des IgG-IgM aux Gd-IgA1 ou l'auto-agrégation de molécules de Gd-IgA1 (216) formerait alors des « complexes immuns » de haut poids moléculaire (« Hit 3 »), couplés au récepteur Fc α RI (ou CD89)(217). Ces complexes immuns, échappant à la clairance hépatique (207) s'accumulent ensuite dans le mésangium rénal (« Hit 4 »). Plusieurs facteurs contribueraient au tropisme mésangial particulier des Gd-IgA1-IC, notamment : la charge négative de ces complexes d'immunoglobulines, un rôle potentiel des récepteurs aux IgA (CD71, sCD89), la présence d'antigènes locaux spécifiques de l'IgA exprimés sur les cellules mésangiales (β II-spectrine) (218) et les propriétés rhéologiques de la microcirculation glomérulaire (219).

La pathogenèse multifactorielle de l'IgAN peut être influencée par divers facteurs, notamment l'exposition à des antigènes environnementaux, des infections muqueuses et des facteurs génétiques potentiels pouvant influencer la réponse humorale (*loci* HLA) (220–222), l'O-glycosylation de l'IgA1 (211), l'immunité innée et l'inflammation locale (8,10,221,223,224).

Le complément a été identifié comme un des facteurs contribuant à l'inflammation glomérulaire associée à l'IgAN et à la progression de la néphropathie (1,7,225). L'activation du système du complément se produit dans le mésangium ("Hit 4"), potentiellement directement sur les Gd-IgA1-IC dans la circulation ("Hit 3"), ainsi qu'au niveau des muqueuses. Le complément présent dans le rein est principalement supposé d'origine systémique, avec la possibilité d'une contribution supplémentaire de composants issus d'une synthèse locale (226) (**Figure 15**).

3. Rôle du complément dans l'IgAN

Les dépôts de C3, colocalisant avec les dépôts d'IgA au niveau du mésangium rénal chez plus de 90% des patients, constituent l'empreinte de l'activation du complément dans l'IgAN. Les dépôts de C3 (C3b/iC3b) observés dans le mésangium peuvent provenir **i)** de l'activité de C3 convertases locales, **ii)** du transport de C3 lié aux Gd-IgA1-IC apporté dans le mésangium par les complexes immuns, **iii)** avec la contribution potentielle de C3 sécrété localement en réponse aux Gd-IgA1-IC par les cellules mésangiales notamment (227).

3.1. Où se produit l'activation du complément ?

L'activation du complément prend essentiellement place dans les glomérules. Des dépôts mésangiaux de protéines des trois voies du complément ont été mis en évidence en immunomarquage, avec des proportions variables selon les patients (**Tableau 3**). Chez environ 40-50% des patients, la colocalisation de dépôts de C3 avec des dépôts de C4d (sans C1q) suggère une implication potentielle de la voie des lectines dans l'activation locale du complément (228). Pour d'autres patients, la présence de C3 sans C4d ni C1q pourrait indiquer une activation de la voie alterne du complément au premier plan (environ 40-50% des patients) (229). A l'inverse, la fréquence globalement faible des dépôts de C1q (~10%), marqueur de l'activation de la voie classique, est quelque peu inattendue compte tenu du rôle central des complexes immuns - composés notamment d'IgG/IgM - dans l'IgAN.

Rein (glomérule)	<p>Dépôts caractéristiques immuns retrouvés en IF/IHC de routine</p> <ul style="list-style-type: none"> • Co localisation des dépôts d'IgA et de C3 dans le mésangium (>90% des patients) • C4d mésangial/artériolaire (30-64% des patients) • C1q mésangial/anses capillaires glomérulaires (5-18% des patients) <p>Autres marqueurs identifiés dans le mésangium en IF/IHC</p> <ul style="list-style-type: none"> • VA : Properdine (FP), FB, FHR5 • VL : MBL, MASP1/3, MASP2, L-ficoline, Collectine-11 • VT : dépôts fréquents de C5b-9 (MAC) <p>➔ Intensité des dépôts de C3 de de FHR5 liés au pronostic rénal</p> <p>➔ Marqueurs d'activation de la voie des lectines (MBL, L-ficoline, MASP2 and MASP1/3) associés à la sévérité de la néphropathie</p> <p>Données de transcriptomique et de protéomique</p> <ul style="list-style-type: none"> • VA: FHR1, FHR5, FHR2, FHR4 • Synthèse intra-rénale de C3, Collectine-11, C1q
Circulation sanguine	<ul style="list-style-type: none"> • Déséquilibre de la balance FH/FHR associé à un pronostic rénal défavorable (↑ du ratio FHR1:FH ratio, ↑FHR1-5) • ↑ du ratio Gd-IgA1:C3 chez les patients présentant une forme progressive d'IgAN • ↑ Composants de la VL (MASP-3, MASP-1, MAp19, L-ficoline, M-ficoline) • ↑ ou ↓ MBL • ↓ MASP-3 associé avec la sévérité de la néphropathie
Urine	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ des fragments d'activation de la VA, VL et de la VT dans les urines de patients porteurs d'une néphropathie à IgA (<i>ELISA, analyses protéomiques</i>)
Muqueuses	<ul style="list-style-type: none"> • Déficience en MBL pourrait exposer les patients à une forme progressive de la néphropathie, et pourrait être en lien avec le phénotype de la néphropathie (prodromes infectieux, hématurie macroscopique) (cohorte asiatique)
Facteurs génétiques	<ul style="list-style-type: none"> • Rôle protecteur de la délétion <i>CFHR1-R3</i> vis-à-vis du risque de développement d'une IgAN (GWAS) • Les variants rares du <i>CFH</i>, <i>CFHR5</i> et/ou de la voie des lectines seraient liées à une évolution rénale défavorable et à la survenue d'une microangiopathie thrombotique ou non thrombotique
Modèles expérimentaux	<p>Modèles cellulaires</p> <ul style="list-style-type: none"> • L'inhibition thérapeutique des récepteurs au C3a/C5a inhibe la prolifération cellulaire et la production de cytokines proinflammatoires (IL-6, MCP-1) des cellules mésangiales exposées aux IgA (Lignée HMCs) <p>Modèles murins</p> <ul style="list-style-type: none"> • L'inhibition thérapeutique des récepteurs au C3a/C5a améliore le phénotype de l'IgAN chez la souris • Le dépôt mésangial d'IgA polymériques (et non monomériques), engendre des dépôts mésangiaux de C3, une hypercellularité mésangiale, une expansion de la matrice extra-cellulaire et une protéinurie chez les rats. • Des dépôts de complément (VA, VC/VL), IgG et IgM colocalisent avec les dépôts d'IgA dans le modèle murin d'IgA spontanée gddY. La codéposition d'IgG, IgM et complément s'atténue chez les souris gddY invalidées pour CD5L/AIM.

Tableau 3. Principales évidences étayant l'implication du complément dans l'IgAN

Abréviations: FHR: protéine associée au FH ; Gd-IgA1: IgA1 galactose-déficient; GWAS: genome-wide association studies, études d'association pangénomique; IgAN: néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA; IL-6: interleukine 6; MAC: complexe d'attaque membranaire, ou C5b-9; MASP: mannose binding lectin associated serine protéase; MAp19: produit d'épissage alternatif de MASP-2; MBL: mannose binding lectin; MCP-1: monocyte chemotactic protein-1 ; VA: voie alterne; VC : voie classique ; VL : voie des lectines ; VT : voie terminale du complément.

La détection de biomarqueurs sensibles, tels que le C5a et les produits de dégradation du C3, dans le plasma des patients porteurs d'une IgAN apporte des preuves supplémentaires de l'activation du complément dans la circulation sanguine. Chez la majorité des patients porteurs d'une IgAN, le niveau d'activation du complément au niveau plasmatique serait « subtil », c'est-à-dire n'entraînant pas de consommation significative de C3 et de C4 (C3 et C4 plasmatiques normaux) (229). Une étude chinoise portant sur 343 patients porteurs d'une IgAN a révélé une corrélation inverse entre les taux plasmatiques de C3 et l'intensité du dépôt de C3b/iC3b dans le mésangium. Dans cette étude, les patients présentant des taux plasmatiques de C3 subnormaux (définis comme C3 <90 mg/dL) présentaient un déclin plus rapide du DFGe et une survie rénale réduite (230). En lien avec ces résultats, le ratio Gd-IgA1:C3, qui reflète partiellement cette discrète consommation de C3, pourrait servir de biomarqueur pour la progression de la néphropathie (231). Ces observations constituent des preuves indirectes d'une activation modérée du complément dans la circulation (sans toutefois de consommation franche du C3) jouant un rôle dans le développement et la progression de l'IgAN.

3.2. Quelle(s) voie(s) du complément est/sont activée(s) ?

La voie alterne : la force de frappe

L'implication de la voie alterne du complément dans l'IgAN repose sur un large faisceau d'arguments (229,232). La détection de dépôts glomérulaires mésangiaux d'autres protéines composant la convertase alterne du complément, telles que le properdine (FP) et le facteur B (FB), accompagnant les dépôts de C3, offre des preuves supplémentaires de l'activation de la voie alterne dans les tissus rénaux (16,233). La voie alterne pourrait être directement activée à la surface des Gd-IgA1-IC de haut poids moléculaire, mais le mécanisme moléculaire exact n'est pas clairement défini. Une étude *in vitro* (234), a montré de manière surprenante que les agrégats d'IgA générés à partir d'IgA sériques issues de donneurs sains et immobilisés sur plaque, pouvaient activer la voie alterne du complément *in vitro*. Dans ces expérimentations, seules les IgA agrégées chimiquement de manière

covalente avaient la capacité d'activer la voie alterne. Le degré d'activation de la voie alterne était positivement corrélé au poids moléculaire des agrégats.

La voie alterne du complément sert de « force de frappe » pour le système du complément et possède la capacité de s'auto-amplifier ou d'amplifier une activation initiale par d'autres voies en quelques secondes. Ce processus génère du nouveau C3b, dont l'intensité du dépôt est liée à la progression de l'IgAN (230). Le contrôle efficace du C3b déposé par le FH est maintenu grâce à un équilibre entre la quantité et la fonction de protéines compétitrices, telles que les FHR1-5. Un déséquilibre dans la concentration ou la fonction du FH et des FHR (FHR1, FHR5 surtout) dans la circulation et/ou au niveau tissulaire pourrait perturber l'activité régulatrice du FH à la surface cellulaire. Plusieurs éléments soutiennent cette hypothèse dans l'IgAN. Notamment, le marquage des FHR1 et FHR5 colocalise avec les dépôts de C3 et l'intensité du marquage FHR5 glomérulaire serait corrélée à la sévérité de l'IgAN (16,110). De plus, l'augmentation du ratio FHR1:FH et de la concentration plasmatique de FHR5 ont également été associés à l'activité de l'IgAN (16,18,110,235). Ces résultats, confortés par des données de protéomique glomérulaire plus récentes (236,237), étayent l'hypothèse selon laquelle les FHR pourraient jouer un rôle préjudiciable dans l'IgAN en modulant subtilement la régulation du complément au niveau glomérulaire.

2.2. Voie des lectines : un facteur associé à la sévérité de l'IgAN

La voie des lectines joue un rôle crucial dans l'immunité innée, en particulier au niveau des muqueuses. Cette voie est notamment activée lorsque MBL se lie à des résidus de glycation présents sur les agents pathogènes. Des études *in vitro* ont démontré que les IgA polymériques (et non monomériques) se lient à MBL, activant ensuite la voie des lectines du complément, avec une réponse dose-dépendante et calcium-dépendante (238).

Dans l'IgAN, la détection de dépôts de C4d mésangiaux (sans C1q) combinée à la présence d'autres initiateurs de la voie des lectines - dont la L-ficoline, le collectine-11, la MBL et MASP - offre des preuves d'une activation locale de la voie des lectines (233,239–241). Le C4d est un produit d'activation (et d'inactivation) du C4, dont la liaison covalente à la surface cellulaire peut persister pendant plusieurs semaines. Le C4d sert alors de marqueur d'une activation passée de la voie des lectines (en l'absence de C1q). Le C4d mésangial et/ou artériolaire peut être détecté chez jusqu'à 30-64 % des patients, et cela pourrait être lié à une diminution du DFGe, au degré de protéinurie, ainsi qu'à l'inflammation et à la fibrose interstitielles (16,241,242). De plus, des dépôts de C4d artériolaires et glomérulaires seraient plus fréquemment observés chez les patients porteurs d'une IgAN associée à des lésions de microangiopathie histologique, avec ou sans lésions thrombotiques (MAT ou MA)(239). Cependant, les mécanismes exacts par lesquels l'activation de la voie des lectines elle-même, indépendamment de son amplification par la voie alterne, pourrait induire directement une MA(T) ne sont pas encore compris (239). La synthèse locale de composants de la voie des lectines, notamment de collectine-11 (CL-11), par des cellules mésangiales activées au contact des Gd-IgA1-IC pourrait jouer un rôle dans l'exacerbation des dommages médiés par le complément (240). De plus, des concentrations élevées de protéines de la voie des lectines dans le plasma (MASP1/3, L-ficoline) et dans l'urine (MBL) pourraient être liées à des formes progressives d'IgAN (110,243). Par conséquent, la voie des lectines est considérée comme un catalyseur de l'activation du complément contribuant à la sévérité de l'IgAN.

2.4. Faut-il exclure la voie classique de la pathogenèse de l'IgAN ?

Les complexes immuns contenant des Gd-IgA1 sont placés au centre du modèle pathologique actuel de l'IgAN. Ces complexes immuns de poids moléculaire élevé comprennent des IgG et/ou des IgM (217), des immunoglobulines susceptibles d'initier la voie classique du complément, tandis que les dépôts de C1q sont typiquement absents (5-18% des patients).

Des dépôts mésangiaux d'IgG colocalisant avec des dépôts d'IgA sont identifiés en immunofluorescence de routine chez 20-30 % des patients (244). De plus, la présence de ces dépôts serait indépendamment corrélée à un pronostic rénal défavorable (244). Dans cette étude de Shin, *et al.*, l'intensité du dépôt mésangial d'IgG était corrélée avec la présence de C1q, elle-même associée à la sévérité de l'IgAN (244). Il est possible que l'activation de la voie classique du complément dans les cas les plus sévères (ou montrant des lésions de chronicité) puisse résulter de lésions glomérulaires significatives. De manière intéressante, Risk *et al.* (245) ont révélé que les biopsies de patients porteurs d'une IgAN, considérées négatives pour les IgG en marquage immunofluorescence de routine, contenaient en réalité des IgG. Cette découverte souligne les limites actuelles des techniques d'immunofluorescence utilisées en routine, ne détectant qu'une partie des dépôts immuns. Récemment, Siefert *et al.* nous ont donné une illustration remarquable des limites des immunomarquages actuels et la nécessité de techniques de démasquage antigéniques adéquats pour la révélation des dépôts glomérulaires de C1q dans la glomérulonéphrite extra-membraneuse (246). D'autres données expérimentales dans un modèle murin d'IgAN spontanée (souris *gddY*) ont montré que l'inhibiteur d'apoptose des macrophages (AIM/CD5L) s'avérait crucial pour la liaison des dépôts d'IgA déposés dans le mésangium rénal avec des IgM/IgG, entraînant l'activation du complément, l'inflammation glomérulaire et les lésions rénales (247). Dans ce modèle, la formation de complexes immuns aurait lieu dans le tissu rénal. De plus, dans ce modèle murin, l'activation du système du complément semble être déclenchée secondairement aux dépôts d'IgG/IgM, ce qui faciliterait un processus dépendant de la voie classique du complément.

L'implication potentielle de la voie classique du complément dans l'IgAN est également étayée par des analyses protéomiques et transcriptomiques menées sur des échantillons de biopsies de patients. Ces études ont révélé une surexpression de signatures de la voie classique du complément, en particulier du C1q, suggérant une possible synthèse locale (248). Sur la base de ces éléments, il serait injustifié d'exclure complètement une contribution potentielle de la voie classique du complément dans l'IgAN.

3. Conséquences de l'activation du complément

La formation des C3 convertases conduit à la libération des fragments d'activation du C3, C3a et C3b, au sein des glomérules. Plusieurs cellules du parenchyme rénal expriment des récepteurs aux fragments d'activation du complément. Les cellules tubulo-épithéliales et les podocytes expriment notamment le récepteur au C3a (C3aR). La libération locale de C3a et sa liaison à son récepteur contribuerait aux lésions podocytaires médiées par le complément (249) et faciliterait l'infiltration de cellules immunitaires sur le site de l'activation du complément (250). Les récepteurs du complément au C3b (CR1) sont exprimés sur les podocytes, tandis que les cellules myéloïdes expriment des récepteurs au iC3b (p.ex. Complement receptor 3, CR3). Une étude en immunohistochimie a révélé une diminution de l'intensité du marquage du CR1 au niveau glomérulaire chez les patients porteurs d'une IgAN, identifiant une relation inverse entre les dépôts glomérulaires de C5b-9 et l'intensité de CR1 (251). Chez le rat, l'inhibition thérapeutique des récepteurs C3a/C5a atténuerait le phénotype de l'IgAN, soutenant un rôle des récepteurs aux anaphylatoxines du complément dans la genèse des lésions rénales (252).

Des dépôts mésangiaux de complexe d'attaque membranaire (MAC, ou C5b-9) ont été identifiés en immunohistochimie sur des petites séries de patients porteurs d'une IgAN (253), avec une fréquence estimée chez jusqu'à 100% des patients. La fréquence relativement importante de ce marqueur d'activation de la voie terminale constitue une indication de l'activation de l'ensemble de la cascade du complément au sein des glomérules. Dans l'IgAN, le MAC s'insère à la surface des cellules mésangiales, podocytaires, endothéliales et au niveau de la membrane basale glomérulaire. L'insertion du MAC sur ces cellules nucléées ne provoque pas de lyse cellulaire, mais peut cependant entraîner des dommages cellulaires irréversibles en modifiant le phénotype de la cellule cible (64). L'insertion du C5b-9 à la surface des cellules mésangiales stimule l'activation cellulaire, la synthèse de la matrice extracellulaire, la production de cytokines (TGF- β , IL-6), de facteurs profibrotiques et l'apoptose cellulaire (254–258). Le C5b-9 peut également attaquer directement les podocytes (251). L'insertion

d'un MAC à la surface d'un podocyte engendre, entre-autres, la production de cytokines inflammatoires, d'oxydants et de composants de la matrice extracellulaire. Ces phénomènes contribuent à la perte d'intégrité de la barrière de filtration glomérulaire et à l'apparition ou à l'aggravation de la protéinurie. L'interaction entre les cellules mésangiales et les cellules endothéliales glomérulaires activées crée un micro-environnement inflammatoire, intensifiant l'agression podocytaire.

La présence de C5b-9 soluble (sC5b-9, issu de la formation et de la régulation du C5b-9 déposé en surface tissulaire) peut être détectée dans les urines de patients porteurs d'une IgAN. Ce sC5b-9, potentiellement libéré dans la chambre urinaire par les podocytes, serait corrélé au degré de protéinurie. Sa valeur pronostique reste cependant incertaine (259).

Simultanément, l'activation mésangiale du complément et la production de cytokines pro-inflammatoires et profibrotiques exacerbent la fibrose tubulointerstitielle, participant au déclin irréversible de la fonction rénale.

4. Génétique du complément dans l'IgAN

4.1. Loci de susceptibilité

Les études d'association pangénomiques (GWAS) ont renforcé l'hypothèse d'un rôle de l'activation (et de l'amplification) du complément dans l'IgAN en identifiant le *locus* RCA (1q32) comme *locus* de susceptibilité de l'IgAN (8–10). Comme précédemment décrit, ce *locus* contient des gènes régulateurs de la voie alterne du complément, en particulier les gènes *CFH* et *CFHR1-5*. De façon intéressante, un polymorphisme (*single nucleotide polymorphism*, SNP) (rs6677604) localisé dans cette région est l'un des polymorphismes le plus fortement associé à la susceptibilité de développer la néphropathie chez les Européens et les Asiatiques (10). Ce polymorphisme présente un fort déséquilibre de liaison avec la délétion des gènes *CFHR1-R3*. Cette délétion *CFHR1-R3* (associée à l'allèle rs6677604-A) serait quant à elle protectrice vis-à-vis de la susceptibilité de développer une IgAN, en particulier sous la forme homozygote (16) (**Tableau 4**). D'autres gènes du complément (*CFB*) et des gènes associés au complément (*ITGAM*, *ITGAX*) ont également été identifiés comme autres *loci* de susceptibilité (260).

4.2. Influence des polymorphismes des gènes du complément : facteur de sévérité/progression ?

Dans l'IgAN, des polymorphismes portant sur différents gènes de la voie alterne et de la voie des lectines ont été identifiés comme potentiels facteurs de progression ou de sévérité de l'atteinte rénale. Ces polymorphismes sont associés à une modification subtile du niveau d'expression ou de fonction de différentes protéines intervenant dans la cascade, comme des SNP portant sur des gènes de la voie des lectines (*MBL2*, p.G54D et *FCN2*, p.A258S) ou de la voie alterne (*CFH*, p.V62I ; *CFB*, p.R32W et le polymorphisme rs4151657 situé en zone intronique du gène *CFB*), identifiés dans la population chinoise (220,261–263). Le polymorphisme *C3* p.R102G a été associé à un déclin plus rapide du débit de filtration glomérulaire dans une population européenne (264).

Tableau 4. Données en faveur d'un rôle de la délétion *CFHR1-R3* dans l'IgAN

Référence	Méthode d'évaluation de la $\Delta CFHR1-R3$	Nombre de patients et de contrôles		Fréq. $\Delta CFHR1-R3$ (%)		Fréq. des porteurs (%) de la $\Delta CFHR1-R3$ Ho/He/non porteurs		Association de la $\Delta CFHR1-R3$ dans l'IgAN					
		IgAN	Contrôles	IgAN (%)	Contrôles (%)	IgAN (%)	Contrôles (%)	↓ susceptibilité génétique	Sévérité	Score MEST-C	Dépôts mésangiaux de C3	[FH, C3, C3a] _{plasma}	Survie post transplantation
Gharavi, <i>et al.</i> 2011 (8)	rs667760 (GWAS)	1194*	902	4.1	7.3	N/A	N/A	✓					
	rs667760 (GWAS)	1238	1172	17	23	N/A	N/A	✓					
Xie, <i>et al.</i> 2016 (9)	rs6677604 (GWAS +MLPA)	1185*	882	4.0	7.2	1.1/3.7/9 5.2	1.2/7.1/91.7	✓	✗	✓			
	rs6677604 (GWAS)	1472	722	5.1	7.0	1.8/4.6/9 3.6	1.5/5.9/92.6	✓	✗	✓			
Zhu, <i>et al.</i> 2015(17)	rs6677604 (GWAS)	365	117	5.3	28.2	0/10.7/89 .3	4.3/47.9/47.9	✓	✗	✗	✓	✓	
	rs6677604 (GWAS)	1178*	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	✓	✗	✗	✓	✗	
Pesce, <i>et al.</i> 2020 (265)	rs6677604 (Sanger)	67 KTR	N/A	16.4	N/A	0/32.8/67 .2	N/A		✗	✗	?		Meilleure fonction/survie du greffon
Tortajada, <i>et al.</i> 2017(16)	MLPA	106	188	15.0	22.9	0.9/28/71	5.9/34/60.1	✓	✗	✗	✗	✓	
Jullien, <i>et al.</i> 2013 (266)	qPCR/Blot	639	N/A	19.5	N/A	4/29/65	N/A	✗	✗	✗	✓		
Kang, <i>et al.</i> 2023 (267)	rs6677604 TaqMan assay	1781	N/A	6.0	N/A	0,3/11/89	N/A		✗	✗	✓		

Abréviations : *CFHR1* : complément factor H related protein 1 gene, $\Delta CFHR1-R3$: délétion *CFHR1-CFHR3*, Fréq. : fréquence, IgAN: néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA, Ho : homozygotes, He : hétérozygotes, ↓ diminution, MEST-C : score histologique de la classification d'Oxford 2016, FH : facteur H, N/A : absence de donnée. ✓ présence d'une association ✗ absence d'association

4.2. Les variants rares du complément

Dans une cohorte espagnole, des variants rares (MAF<0.1%) dans les gènes de régulation de la VA du complément ont été identifiés chez cinq patients présentant une concentration de FH plasmatique basse (16). Parmi ces patients, 4 portaient un variant portant sur le *CFH* et 1 avait un variant portant sur le *CFI*. Trois des quatre variants du *CFH* identifiés dans cette cohorte se situaient dans l'extrémité N-terminale du FH (SCR1-4). De façon intéressante, 4/5 patients portant un variant rare du complément ont présenté un tableau de microangiopathie thrombotique biologique et/ou rénale durant le suivi (16). Dans une autre cohorte chinoise de 94 cas présentant des lésions de microangiopathie artériolaire, près de la moitié des patients présentaient des variants rares dans des gènes liés au complément, en particulier au sein des *CFHRs* (268). D'autres variants rares portant principalement sur les gènes des *CFH* et *CFHR* ont été rapportés chez les patients IgAN. Une vue d'ensemble des cas décrits est présentée dans les **tableaux 5 et 6**. De façon intéressante, les patients IgAN porteurs de ces variants présentaient un phénotype de MA(T) ou d'hypertension artérielle maligne (HTAm), avec le plus souvent un pronostic rénal défavorable. Ces observations suggèrent que ces variants rares pourraient intensifier l'activation du complément déclenchée par les Gd-IgA-IC.

Cependant, les voies spécifiques par lesquelles les polymorphismes et les variants rares des gènes du complément influencent la progression de l'IgAN ou modifient le phénotype final nécessitent d'être précisés.

Tableau 5. Variants rares des gènes *CFH-CFHR1-5* précédemment rapportés chez des patients IgAN

Gène	Référence	Cohorte d'étude	Méthode	Principaux résultats	Variants identifiés
CFH	Tortajada, <i>et al.</i> (16)	49 patients IgAN insuffisant rénaux chroniques, cohorte espagnole	Séquençage direct	Variants rares du <i>CFH</i> chez 4 patients avec un FH plasmatique bas. MAT chez 3/4 patients	p.V17G (He, pathogénique) p.C66Y (He, pathogénique) p.C205* (He, pathogénique) p.W978L (He, pathogénique)
	Li, <i>et al.</i> (269)	94 patients IgAN avec MA histologique, cohorte chinoise	Exome	59% des patients avec un variant sur les gènes associés au complément, 1/94 avec un variant <i>CFH</i>	p.P606H (He, VUS) (1 patient)
	Nakamura, <i>et al.</i> (270)	1 cas reporté de MAT-IgAN	Panel ngs	--	p.R1215Q (He, pathogénique) (1 patient)
	Manenti, <i>et al.</i> (271)	1 cas d' IgAVN avec MAT biologique et rénale	Panel ngs	--	CFH-H3 gtgt (Ho) + <i>MCP ggaac</i> (He) Pas de variant rare
	Manenti, <i>et al.</i> (272)	Série de 6 cas MAT + IgAN	Panel ngs	2/6 patients avec un variant rare du <i>CFH</i>	p.N516K (He, VUS) p.S883Hfs (He, pathogénique)
	Schmitt, <i>et al.</i> (12)	1 cas rapporté IgAN + MAT (enfant)	Séquençage direct	--	p.A48S, he, VUS
CFHR1	Pas de donnée				
CFHR2	Li, <i>et al.</i> (269)	94 patients IgAN avec MA histologique, cohorte chinoise	Exome	--	c.59_63delCAATG (splice, He, VUS)
CFHR3	Li, <i>et al.</i> (269)	94 patients IgAN avec MA histologique, cohorte chinoise	Exome	--	p.S153F (He, VUS) (1 patient) p.P212S, (He, VUS) (1 patient)
CFHR4 (A ou B)	Cavero, <i>et al.</i> (273)	7 patients IgAN avec MAT biologique en contexte d'HTAm	Pas décrit	Variants portant sur les gènes associés au complément chez 4/7 patients	Chez un patient: CFHR4: p.Ser233Thr (He, VUS), combiné à un <i>MCP ggaac</i> (Ho) et <i>CFHR1-R3</i> délétion (Ho)
CFHR5	Zhai, <i>et al.</i> (14)	500 patients IgAN 576 contrôles Cohorte Chinoise	Séquençage direct	43/500 patients porteurs d'un variant rare <i>CFHR5</i> (He) Variants rares du <i>CFHR5</i> associés à une susceptibilité de développer une IgAN	- 6 variants non-synonymes: p.V170M, p.Q111P, p.N178S, p.N178S, p.E274D dont 3/6 pathogènes <i>in vitro</i> (↑ fixation au C3b pour p.V170M, p.N178S et p.E274D) - 1 variant faux-sens : p.Leu259* (6 patients, aucun contrôle) - 1 variant avec perte de codon stop p.ter570R (patients et contrôles) - 2 splice-site variants
	Li, <i>et al.</i> (269)	94 patients IgAN avec MA histologique , cohorte chinoise	Exome	3/94 porteurs d'un variant rare du <i>CFHR5</i>	p.V170M (He, pathogénique) p.P453S (He, VUS) p.N178S, (He, pathogénique)
	Guzzo, <i>et al.</i> (15)	1 cas rapporté de IgAN + MAT	Panel ngs	--	c.361delC, p.Q121Yfs*10 (He, MAF<0.01%) <i>CFH-H3 gtgt</i> (Ho) + <i>MCP ggaac</i> (Ho)

Abréviations : *CFH* : gène du facteur H du complément ; *CFHR1-5* : genes des protéines associées au FH, FHR1-5, HTAm : Hypertension artérielle maligne, IgAN : néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA. MA(T) : microangiopathie (thrombotique), ngs : *next generation sequencing*.

Tableau 6. Éléments en faveur d'un rôle des FH, FHR1-5 dans l'IgAN

Protéine	Compartiment			Données génétiques	
	Concentration plasmatique	Glomérule	Urines	Variants rares	Polymorphismes
FH	[FH] normale (16,18,274) ↑ [FH] chez les IgAN + MA (262) [FH] patients IgAVN > IgAN (275) Pas de valeur pronostique	↓ dépôts FH (formes progressives) (110)	Présence de FH (276), corrélation avec la créatininémie (protéomique) (277)	Associés avec une ↓[FH] et/ou un phénotype de MA(T) (16,269)	rs800292-GG (FH_{62v}) associé à un C3 plasmatique subnormal, ↑ dépôts de C3 (278), prévalence plus élevée chez les patients avec IgAN + MA (262) rs412852-G (intronique) associé à survie rénale (262)
FHR1	↑ FHR1 chez les patients comparés aux contrôles (PKRAD) (16) ↑ FHR1:FH (formes progressives) (16,18)	↑ FHR1 (IgAN>IgAVN) (protéomique) (233,237,279) Pas d'association avec le pronostic ni la sévérité (110)	<i>Absence de donnée</i>	<i>Absence de donnée</i>	Rôle protecteur de la délétion CFHR1-R3 (ou rs6677604-AA) (Ho)(8-10,260,280,281) rs6677604-AA ou délétion CFHR1-R3 (Ho) associés à des ↓ dépôts de C3b/iC3b (11,266) 2 copies de CFHR1-R3 associée à une moins bonne survie du greffon (265)
FHR2	<i>Absence de donnée</i>	↑ FHR2 (protéomique)(279)	Présence de FHR2 (276), corrélation avec la créatininémie et au degré de FI/AT (protéomique) (277)	1 cas reporté IgAN et MA (269)	<i>Absence de donnée</i>
FHR3	<i>Absence de donnée</i>	↑ FHR3 (protéomique)(279)	<i>Absence de donnée</i>	1 cas reporté IgAN et MA (269)	Rôle protecteur de la délétion CFHR1-R3 (ou rs6677604-AA) (Ho)(8-10,260,280,281) rs6677604-AA ou délétion CFHR1-R3 (Ho) associé à des ↓ dépôts de C3b/iC3b (11,266) 2 copies de CFHR1-R3 associée à survie du greffon (265)
FHR4 (A ou B)	<i>Absence de donnée</i>	<i>Absence de donnée</i>	Présence de FHR4 (276)	1 cas reporté IgAN, HTA maligne et MAT (282)	<i>Absence de donnée</i>
FHR5	↑ FHR5 (formes progressives) (18)	- Dépôts en IHC/IF (101,278) et identification en protéomique (237,279) - ↑ dépôts FHR5 (formes progressives) (110)	<i>Absence de donnée</i>	↑ susceptibilité vis-à-vis du développement de IgAN (14) Absence d'impact sur le phénotype clinique ni la progression de l'IgAN (14,15,283)	<i>Absence de donnée</i>

Les données en **orange** sont associées à : une **susceptibilité génétique augmentée** vis-à-vis du risque de développement d'une IgAN, un **pronostic rénal défavorable** ou à la **sévérité** de la présentation clinique. Les éléments en **vert** sont **protecteurs** vis-à-vis de la **susceptibilité génétique** au développement d'une IgAN, un **pronostic rénal favorable** ou à une **présentation clinique moins sévère**. En absence d'impact sur ces paramètres, les éléments sont présentés en **noir**. *Abbreviations* : HTA : hypertension artérielle ; MA(T) : microangiopathie (thrombotique) ; PKRAD : polykystose rénale autosomique dominante, VUS : variant de signification indéterminée.

5. Thérapies ciblant le complément dans l'IgAN

5.1. Nouvelles perspectives thérapeutiques dans l'IgAN

L'avenir du traitement de l'IgAN pourrait bientôt changer. À l'heure actuelle, l'approche principale pour ralentir la progression de la néphropathie vise principalement à contrôler la protéinurie et l'hypertension artérielle. Malgré la nature (auto)-immune présumée de l'IgAN, l'utilisation d'immunosuppresseurs reste controversée (284). Les résultats récents de l'étude NeflgArd ont mis en évidence les avantages potentiels de l'utilisation de stéroïdes à libération locale intestinale chez les patients IgAN à risque de progression pour la prévention du déclin de la fonction rénale (285). Le mycophénolate mofétil pourrait constituer une solution d'épargne de corticoïdes pour les patients asiatiques porteurs d'une IgAN à risque de progression (286). Le complément, un autre facteur contribuant aux lésions glomérulaires, émerge comme une nouvelle cible potentielle pour le traitement de l'IgAN. Actuellement, 12 thérapies ciblant le complément sont en phase II ou III d'essais cliniques dans l'IgAN. Ces thérapies et leurs mécanismes d'action sont détaillés dans les **tableaux 7 et 8** et dans la **Figure 16**.

5.2. Niveaux d'action des thérapies ciblant le complément dans l'IgAN

Blocage de la voie terminale

L'éculizumab constitue la molécule pionnière des thérapies ciblant le complément. Cet anticorps monoclonal humanisé se lie avec la molécule C5 du complément, inhibant son clivage par la C5 convertase et les dommages engendrés par les effecteurs terminaux du complément (C5a, C5b-9). Le blocage du C5 prévient l'engagement de la voie terminale commune, indépendamment de la voie initiatrice. L'utilisation de cette molécule a révolutionné la prise en charge des patients porteurs d'un SHUa, en améliorant considérablement leur survie globale et rénale. L'utilisation de l'éculizumab est actuellement validée pour

4 indications : l'hémoglobinurie paroxystique nocturne, le SHUa, la myasthénie acquise généralisée et la neuro-myélite optique.

L'observation d'une fréquence relativement élevée des dépôts glomérulaires de C5b-9 chez les patients IgAN ainsi que l'étude des conséquences tissulaires en lien avec la libération d'effecteurs terminaux (rôle de l'axe C5a/C5aR, C5b-9) dans les différents modèles expérimentaux soutiennent l'engagement de l'intégralité de la cascade du complément dans l'IgAN. Par conséquent, l'inhibition de la voie terminale du complément au niveau du C5 pourrait *a priori* sembler bénéfique pour les patients.

L'utilisation de l'éculizumab a été rapportée chez des cas anecdotiques de patients IgAN présentant un tableau de glomérulonéphrite rapidement progressive en lien avec une prolifération extracapillaire (Voir **Annexe n°3**) ou une IgAN s'associant à un tableau de microangiopathie thrombotique. Dans ces différents cas, l'éculizumab (parfois débuté tardivement dans la prise en charge) a montré une efficacité variable. Des petites séries de cas rapportés associant une IgAN avec une MAT répondraient à l'éculizumab (16,272).

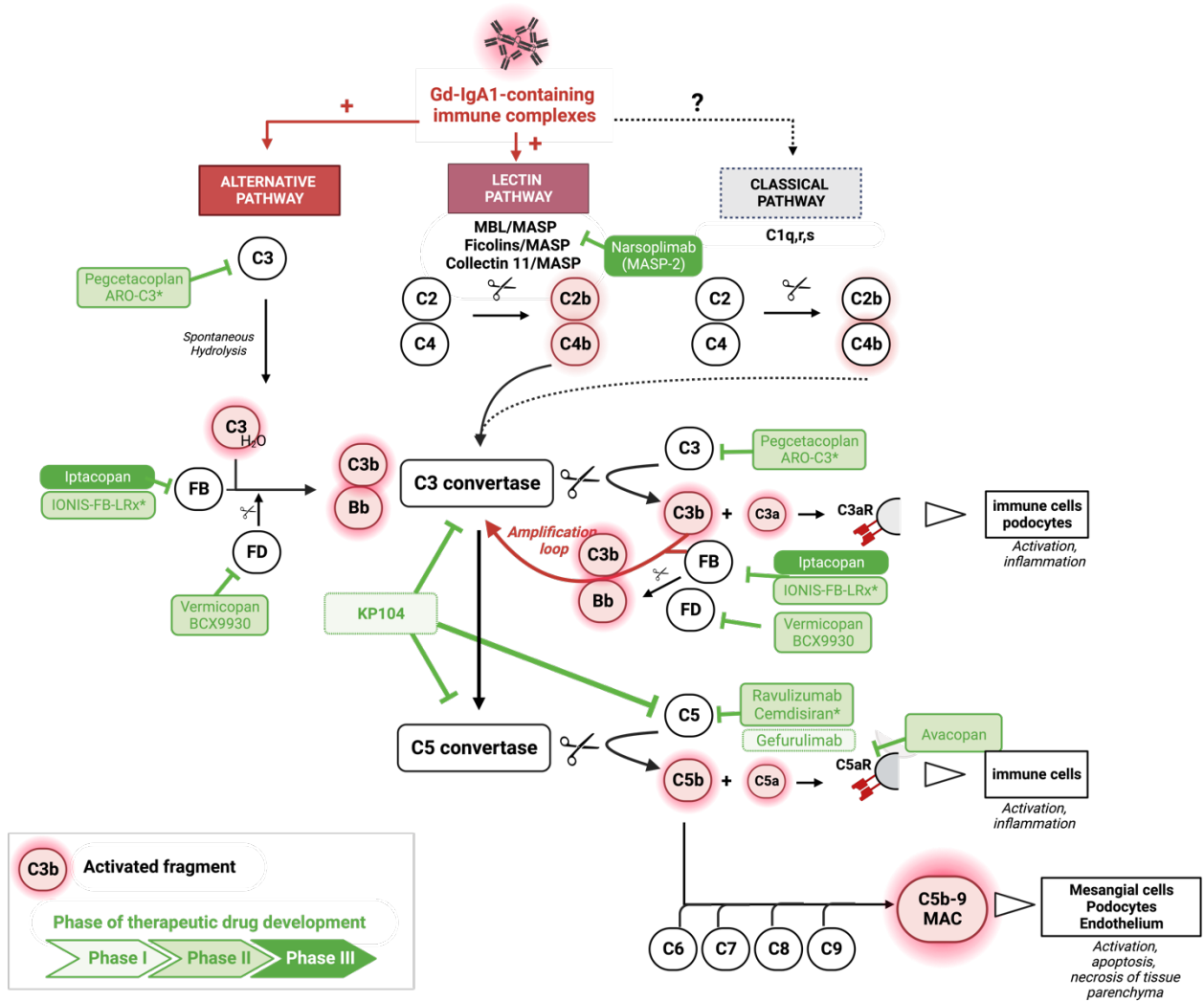
Actuellement, deux molécules inhibant la voie terminale du complément sont testées dans l'IgAN : le ravulizumab et l'avacopan. Le ravulizumab, un anticorps monoclonal anti-C5 proche de l'éculizumab avec une longue durée d'action, est en cours d'essai thérapeutique de phase II dans l'IgAN (NCT04564339). De plus, une étude pilote en ouvert a évalué l'efficacité à court terme de l'avacopan (CCX168), un antagoniste du récepteur C5a (C5aR), chez des patients ayant un rapport protéinurie/créatininurie (UPCR) supérieur à 1 g/g malgré un traitement par un bloqueur du système rénine-angiotensine (NCT02384317). Les résultats à 3 mois de cette étude semblent encourageants avec une réduction de la protéinurie de 50% chez 3 des 7 patients.

Thérapeutiques pour prévenir la formation des C3 convertases

La voie alterne, pivot de l'activation du système du complément, représente la cible principale d'intervention thérapeutique. Contrairement au blocage de la voie terminale, l'inhibition de la voie alterne en amont de la C3 convertase pourrait aider à prévenir la libération des produits d'activation du C3 (C3a, dépôts de C3b) et leurs effets potentiels. L'iptacopan (LNP023) est une petite molécule administrée par voie orale ciblant le FB et inhibant le clivage du C3 par la C3 convertase alterne. Une étude de phase II (NCT03373461) portant sur 58 patients a montré une diminution du ratio UPCR à 3 mois (-23% IC_{80%} [8-34%]) comparé au groupe placebo. La diminution de la protéinurie était dose-dépendante et se poursuivait à 6 mois (-28 à -40%) de traitement par Iptacopan 200mg 2/jour avec un bon profil de sécurité. Ces résultats ont motivé le lancement d'un essai thérapeutique de phase III, APPLAUSE-IGAN (NCT04578834), en cours de recrutement (**Tableaux 7 et 8**). D'autres stratégies actuellement à l'étude comprennent : **i**) le ciblage du C3 en interférant avec sa production, **ii**) la prévention de l'activation et de l'assemblage des composants de la C3 convertase alterne (inhibition de C3, FB et FD), et **iii**) l'accélération de la dissociation de la C3 convertase (**Tableau 7**).

La voie des lectines constitue une autre cible thérapeutique potentielle. Le narsoplimab (OMS721), un anticorps monoclonal IgG4 entièrement humain, cible spécifiquement la protéine MASP-2. Une étude de phase II (NCT02682407) a montré une réduction significative de 61,4% de la protéinurie des 24 heures avec une stabilité du DFGe chez cinq patients. Actuellement, l'essai ARTEMIS-IGAN, un essai clinique de phase III randomisé, en double aveugle et contrôlé par placebo (NCT03608033), évalue cette biothérapie chez les patients présentant une protéinurie supérieure à 1 g/jour.

Les résultats de l'efficacité à long terme de ces inhibiteurs du complément sur le phénotype clinique, les lésions histologiques et le pronostic rénal sont attendus avec impatience.



Voie du complément	Cible thérapeutique	Mécanisme d'action	Agent thérapeutique	Compagnie pharmaceutique	Type d'inhibiteur	Schéma et mode d'administration	Phase d'essai clinique	N° enregistrement de l'essai thérapeutique	Principaux résultats (statut de recrutement)
Voie des lectines	MASP-2	Inhibition de MASP-2 et de l'initiation de la voie des lectines	Narsoplimab (OMS721)	Omeros	Anticorps	IV, 4 mg/kg une fois par semaine	Phase III FDA – “Breakthrough therapy”	NCT03608033 ARTEMIS-IgAN	Pas de résultat disponible (recrutement en cours)
Voie alterne	C3	Inhibition de l'expression du gène C3	ARO-C3	Arrowhead Pharmaceuticals	ARNi	SC, 1 ou 2 doses	Phase I/II	NCT05083364 AROC3-1001	Résultats intermédiaires sur les volontaires sains (partie 1): bon profil de sécurité et de tolérance.
		Inhibition de la fixation/clivage de C3 par la C3 convertase	Pegcetacoplan (APL-2)	Apellis	Peptide	SC, deux fois par semaine	Phase II	NCT03453619 DISCOVERY	Six patients porteurs d'IgAN inclus, Pas de résultat disponible ^A
	Facteur B	Inhibition de l'expression du gène CFB	IONIS-FB-LRx	Ionis Pharmaceuticals	ARNi	SC, tous les mois	Phase II	NCT04014335	Premiers résultats chez 10 patients: ↓ 44% de la protéinurie des 24h par rapport à la protéinurie de base à la semaine 29, bon profil de sécurité ^B
		Inhibition de la sérine protéase FB et du clivage de C3 et C5 par les convertases alternes	Iptacopan (LNP023)	Novartis	Petite molécule	Oral, 200 mg, deux fois par jour	Phase III	NCT04578834 APPLAUSE IgAN	Pas de résultat disponible (recrutement en cours)
	Facteur D	Inhibition du clivage du FB par le FD	Vemircopan (ALXN2050)	AstraZeneca	Petite molécule	Oral, 180 mg/jour	Phase II	NCT05097989	Pas de résultat disponible (recrutement en cours)
			BCX9930	BioCryst	Petite molécule	Oral, deux fois par jour	Phase II	NCT05162066 RENEW	Pas de résultat disponible (recrutement en cours)
Voie alterne et voie terminale	C5/C5b et C3bBb	Inhibition des C3/C5 convertases (domaines du FH) et inhibition du clivage de C5 par la C5 convertase	KP104	Kira Pharmaceuticals	Biothérapie bifonctionnelle (Anticorps + peptide)	SC/IV, 1 à 2 fois par semaine	Phase I	NCT05517980 SYNERGY-1	Recrutement non encore débuté
Voie terminale	C5	Inhibition du clivage de C5 par la C5 convertase	Cemdisiran (ALN-CC5)	Alynham Pharmaceuticals	ARNi	SC, toutes les semaines	Phase II	NCT03841448	Pas de résultat disponible
			Gefurulumab (ALXN1720)	Alexion Astra Zeneca	Anticorps	SC/IV, toutes les semaines	Phase I	NCT05314231	Pas de résultat disponible
			Ravulizumab	Alexion Astra Zeneca	Anticorps	IV, doses d'induction puis maintenance tous les deux mois	Phase II	NCT04564339 SANCTUARY	Pas de résultat disponible
	C5aR1	Inhibition du récepteur 1 au C5a (C5aR1)	Avacopan (CCX168)	ChemoCentryx	Petite molécule	Oral, deux fois par jour	Phase II	NCT02384317	Réduction du ratio protéinurie/créatininurie urinaire chez 6/7 patients (~50% chez 3/7) à la semaine 12, maintenue à la semaine 24 chez 5/7 participants ^C

Tableau 7. Thérapies ciblant le complément en cours d'essais thérapeutiques phases II/III dans l'IgAN

Abréviations : ASN: American Society of Nephrology; C3bBb: C3 convertase alterne; C5aR1: Récepteur 1 au C5a; FB: facteur B; FD: facteur D; FDA: Food and Drug Administration; FH: facteur H; IV: intraveineux; MASP: Mannan-associated serine protease; SC: sous-cutané; A. Résultats présentés au congrès ASN de 2019, PO1852, B. Résultats présentés au congrès ASN, SA-PO714 C. Bruchfeld, *et al.* Clinical Kidney Journal 2022.

Cible, agent thérapeutique	N° enregistrement de l'essai thérapeutique	Phase	Design de l'étude	Principaux critères d'inclusion	Critère d'évaluation	Nombre de patients	Résultats principaux	Références
Anti MASP-2, Narsoplimab (OMS721)	NCT02682407	II	<p>Partie 1: Narsoplimab IV 4 mg/kg 1/semaine, 12 semaines (ouvert), décroissance de stéroïds, 6 semaines de suivi avec une extension additionnelle de 12 semaines (ouvert).</p> <p>Partie 2): Narsoplimab IV 370 mg (dose fixe) ou placebo 12 semaines (double-aveugle, randomization 1:1), 6 semaines de suivi avec un extension additionnel de 12-semaines (ouvert).</p>	<p>Age ≥ 18 ans IgAN diagnostiquée histologiquement PU > 1 g/24h sous SRA DFGe > 30 mL/min/1.73m² PA <150/90 mmHg Corticoïdes > 10mg/j (Partie 1)</p>	PU 24h, 12 semaines	<p>Partie 1: 4 patients</p> <p>Partie 2: 9 patients (5 dans le groupe narsoplimab et 4 dans le groupe placebo : tous les patients ont reçu du narsoplimab dans la phase d'extension)</p>	<p>Partie 1: réduction médiane de la PU 24 h de 72% aux semaines 13-15</p> <p>Partie 2 : réduction médiane de la PU 24h de 61.4% aux semaines 51-54</p> <p>A long terme (n=12, ~3 ans de suivi) : stabilisation du DFGe (n=9), augmentation du DFGe (n=3), réduction médiane de la PU 24h de 38%</p>	<p>Lafayette, <i>et al.</i> Kidney Int Rep 2020^(S1)</p> <p>Résultats présentés lors du congrès de l'ERA EDTA 2021 (Session « Late Breaking Clinical Trials », Barratt J, <i>et al</i>)^(S2)</p>
	NCT03608033 ARTEMIS-IgAN	III	Narsoplimab IV 4 mg/kg une fois par semaine ou placebo, randomisation 1:1.	<p>Age ≥ 18 ans IgAN diagnostiquée histologiquement < 8 ans PU 24 h > 1 g/j < 6 mois avant l'inclusion ou de base DFGe ≥ 30 mL/min/1.73m²</p>	PU 24 h, 12 semaines	450 patients (225 par bras)	Recrutement en cours	Lafayette, <i>et al.</i> Kidney Int Rep 2022 ^(S3)
Facteur B, Iptacopan (LNP023)	NCT03373461 NCT04557462	II	<p>Partie I: Iptacopan 10 mg, 50 mg, 100mg, 200 mg 2/jour, 90 jours</p> <p>Partie II: Iptacopan 10mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg 2/jour ou placebo, 180 jours, analyse intermédiaire à 90 jours</p>	<p>Age ≥ 18 ans IgAN diagnostiquée histologiquement < 3 ans PU ≥ 0.8 g/g ou ≥ 0.75g/24h DFGe ≥ 30mL/min/1.73m² Sous SRA, antihypertenseurs et/ou diurétiques à la dose maximale tolérée ≥ 90 jours avant l'inclusion Vaccination contre <i>N. meningitidis</i>, <i>S. pneumoniae</i>, et <i>H influenzae</i></p>	PU (g/g) à 12 semaines	<p>Partie 1: n=46, Partie 2: n=26 avec 200mg 2/jour, 25 avec placebo</p>	200 mg 2/jour > réduction de 23% réduction de la PU à 12 semaines, réduction de PU continuant à 6 mois	Résultats présentés au World Congress of Nephrology 2022 (Barratt, <i>et al.</i> Kidney Int Rep 2022) ^(S4)
	NCT04578834 APPLAUSE IgAN	III	Iptacopan 200 mg 2/jour contre placebo, randomization 1:1, 24 mois	<p>Age ≥ 18 ans IgAN diagnostiquée histologiquement DFGe ≥ 30mL/min/1.73m² PU > 1 g/g Sous SRA à la dose maximale tolérée Vaccination contre <i>N. meningitidis</i>, <i>S. pneumoniae</i>, et <i>H. influenzae</i></p>	PU (g/g) à 9 mois, Pente de DFGe en 24 mois	450 patients (215 par bras)	Recrutement en cours	Rizk, <i>et al.</i> Kidney Int Rep 2023 ^(S5)

Tableau 8. Caractéristiques et résultats des essais cliniques des molécules ayant atteint la phase 3 des essais thérapeutiques dans l'IgAN.

Abréviations : DFGe: débit de filtration glomérulaire estimé, IgAN: néphropathie à IgA, : PU : protéinurie ; SRA: inhibiteurs du système rénine angiotensine.

5.4. Spécificité des stratégies ciblant le complément dans l'IgAN

La perspective d'utilisation de thérapies ciblant le complément dans l'IgAN illustre la problématique de la translation de thérapies novatrices, efficaces et coûteuses initialement développées pour des affections rares potentiellement mortelles, à des pathologies chroniques plus répandues. Par ailleurs, l'IgAN constitue une néphropathie hautement complexe et hétérogène, dans laquelle l'activation du complément constitue seulement l'un des nombreux facteurs contributifs. De plus, le degré d'activation du complément rencontré dans l'IgAN peut être influencé par divers facteurs, tels que : **i)** l'intensité d'exposition à des facteurs déclenchants ou environnementaux (p.ex. infections notamment muqueuses) engendrant la synthèse de Gd-IgA1 et de complexes immuns et leur dépôt mésangial, **ii)** l'implication et le degré d'activation des différentes voies du complément, et **iii)** des facteurs génétiques modulant la capacité à réguler le complément et l'inflammation glomérulaire à long terme.

Dans des conditions chroniques comme l'IgAN, des stratégies qui ajustent délicatement l'activation du complément de manière ciblée pourraient s'avérer avantageuses pour les patients. L'objectif est alors de « rééquilibrer » la balance d'activation/régulation du complément, en faveur d'une amélioration de la régulation. Néanmoins, il est essentiel de peser les bénéfices attendus d'une inhibition prolongée du complément par rapport aux risques potentiels d'infection, et éventuellement, d'autres effets secondaires à long terme encore inconnus. L'identification de rôles non canoniques de différentes protéines du complément rend les conséquences de la modulation thérapeutique de la cascade du complément d'autant plus imprévisibles.

L'obtention d'une inhibition complète d'une ou des voies de la cascade du complément n'est potentiellement pas souhaitable ni appropriée pour des affections nécessitant un traitement à long terme. De plus, il est également possible que le degré d'implication du complément et la contribution relative de ses différentes voies d'activation diffèrent d'un individu à un autre, ou même, varie au cours

de l'évolution de la néphropathie chez un même individu. Chez certains autres patients, tels que ceux présentant une hématurie macroscopique récurrente isolée, le complément pourrait ne pas être impliqué du tout, et par conséquent, ces patients n'auraient aucun bénéfice à recevoir ces thérapies.

Plusieurs questions se posent à l'heure des premiers résultats des essais thérapeutiques des molécules ciblant le complément dans l'IgAN. Premièrement, déterminer le moment idéal et le niveau optimal de blocage du complément devient impératif. Ensuite, un autre défi majeur réside désormais dans l'identification et la validation de biomarqueurs non invasifs pour sélectionner en toute sécurité les patients qui pourraient bénéficier des thérapies ciblant le complément. De plus, ces biomarqueurs pourraient aider pour le monitoring thérapeutique du niveau de blocage du complément, le suivi des effets collatéraux non désirés ainsi qu'à élaborer une approche thérapeutique hautement individualisée (10).

6. Conclusions

Le complément contribue à la pathogenèse multifactorielle de l'IgAN. Les avancées dans la compréhension des mécanismes régissant l'activation du complément et ses conséquences néfastes au niveau rénal ont ouvert la voie à de nouvelles approches thérapeutiques qui pourraient révolutionner la prise en charge de l'IgAN. Une meilleure compréhension du rôle précis du complément dans l'IgAN est aujourd'hui indispensable pour cibler les patients qui bénéficieront de ces thérapies et pour mieux prévoir les effets de la modulation thérapeutique du complément chez ces patients.

Hypothèses de travail

La voie alterne constitue une voie centrale dans l'activation du système du complément, capable de s'activer quelle que soit la voie initialement engagée. Une des étapes fondamentales pour le maintien de l'activité physiologique du complément et la prévention d'une activation inappropriée passe par le contrôle de la boucle d'auto-amplification destructrice de la voie alterne. Cette auto-amplification du système du complément par la VA est notamment freinée par **i)** l'inactivation du C3b déposé sur la surface cellulaire par différents régulateurs circulants (FH, FI) et membranaires (MCP, CR1) et **ii)** l'accélération de la dissociation des C3 convertases formées (FH, DAF) (**Figure 17**). L'activité de ce système, en balance perpétuelle entre activation et régulation est régie par l'activité respective des différents acteurs, pouvant notamment être modulée par des facteurs génétiques.

Un large faisceau d'arguments soutient un rôle de l'activation du système du complément (VA/VL) dans l'IgAN. Cette activation, prenant essentiellement place au niveau tissulaire rénal, participe à la progression de la néphropathie par le biais de mécanismes micro-inflammatoires. Ces arguments sont appuyés par l'identification d'un *locus* de susceptibilité génétique en 1q32 comprenant les principaux gènes régulateurs de la VA, en particulier les gènes *CFH* et *CFHR1-5*. Ces données génétiques renforcent l'hypothèse d'un rôle propre du FH et de ses protéines associées FHRs dans la régulation locale du complément chez les patients porteurs d'une IgAN. De plus, les variants génétiques (rares ou fréquents) mis en évidence dans ce même *locus* 1q32 sont également associés à d'autres pathologies médiées par le complément.

Cependant, la relation entre la génétique du complément et le développement ou l'évolution de l'IgAN n'est pas complètement élucidée (**Figure 18**).

Nous souhaitons tester les **hypothèses** :

- 1) que les patients porteurs d'une IgAN présenteraient une activation « sous-optimale » du complément au niveau de la circulation, mesurable au niveau plasmatique et dans un modèle fonctionnel endothélial *ex vivo* ;
- 2) que l'existence d'une susceptibilité génétique modulant la cascade d'activation du complément pourrait influencer la progression de l'IgAN, en particulier dans les formes sévères .

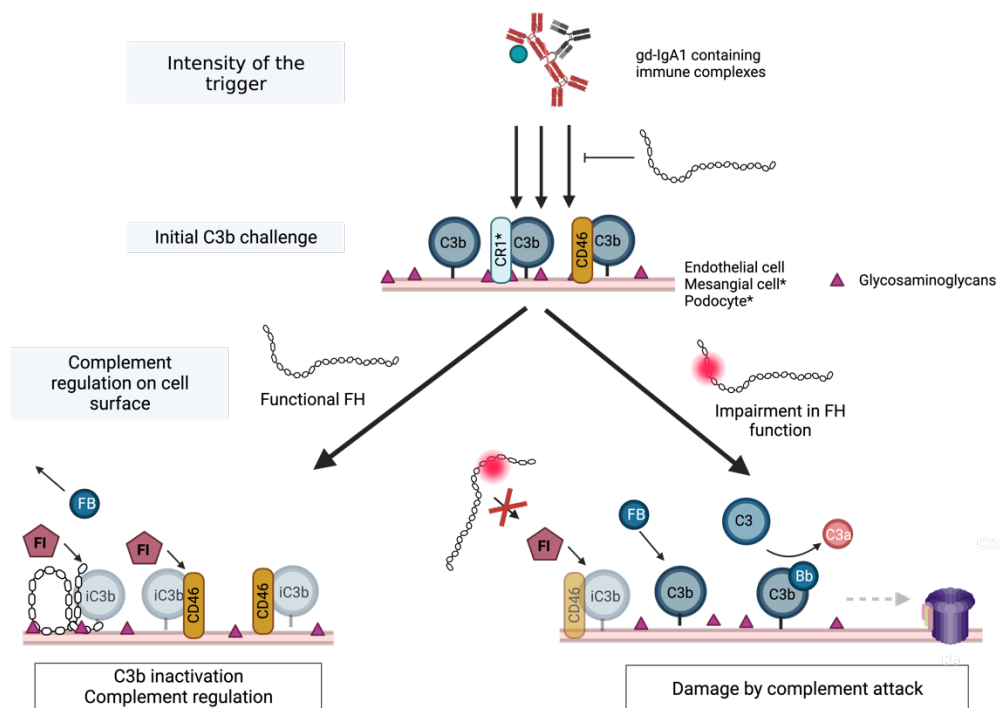


Figure 17. L'inactivation des dépôts de C3b en iC3b, une étape clé dans le contrôle de l'activation du complément

L'étape d'inactivation du C3b déposé sur la surface cellulaire (cellules endothéliales, cellules mésangiales) est pivotale dans l'équilibre de la balance d'activation du complément. Dans l'IgAN, l'activation du complément serait déclenchée par les complexes immuns contenant des IgA1 déficientes en résidus galactose (Gd-IgA1). Ceci conduit à la génération de C3b se déposant majoritairement dans le mésangium et dans les espaces endocapillaires glomérulaires. Le dépôt tissulaire de C3b (conjointement à la libération de son anaphylatoxine C3a) participe à l'attrait de cellules immunitaires sur le site d'activation du complément, à l'inflammation locale, ainsi qu'à la production de facteurs pro-fibrotiques détruisant progressivement le glomérule. La régulation du C3b est permise par l'activité serine protéase du FI en présence de ses cofacteurs circulants (FH) ou membranaires (MCP, CR1). L'expression de ces derniers varie en fonction des types cellulaires : la cellule endothéliale notamment glomérulaire exprime très faiblement le CD35. Le CD46 n'est pas exprimé à la surface des érythrocytes. En cas de dépôts de C3b sur les cellules du soi, les dépôts sont inactivés par les différents régulateurs en iC3b puis en C3dg. En cas de dysfonction de l'activité de régulation du complément à la surface cellulaire (p.ex. variant pathogène du FH ou présence d'anticorps anti-FH), les dépôts de C3b peuvent initier la formation de C3 convertases, amplifiant à leur tour l'activation du complément aboutissant in fine à l'insertion d'un complexe d'attaque membranaire. *Abréviations: CD46 : membrane cofactor protein (MCP), CR1: complement receptor 1.*

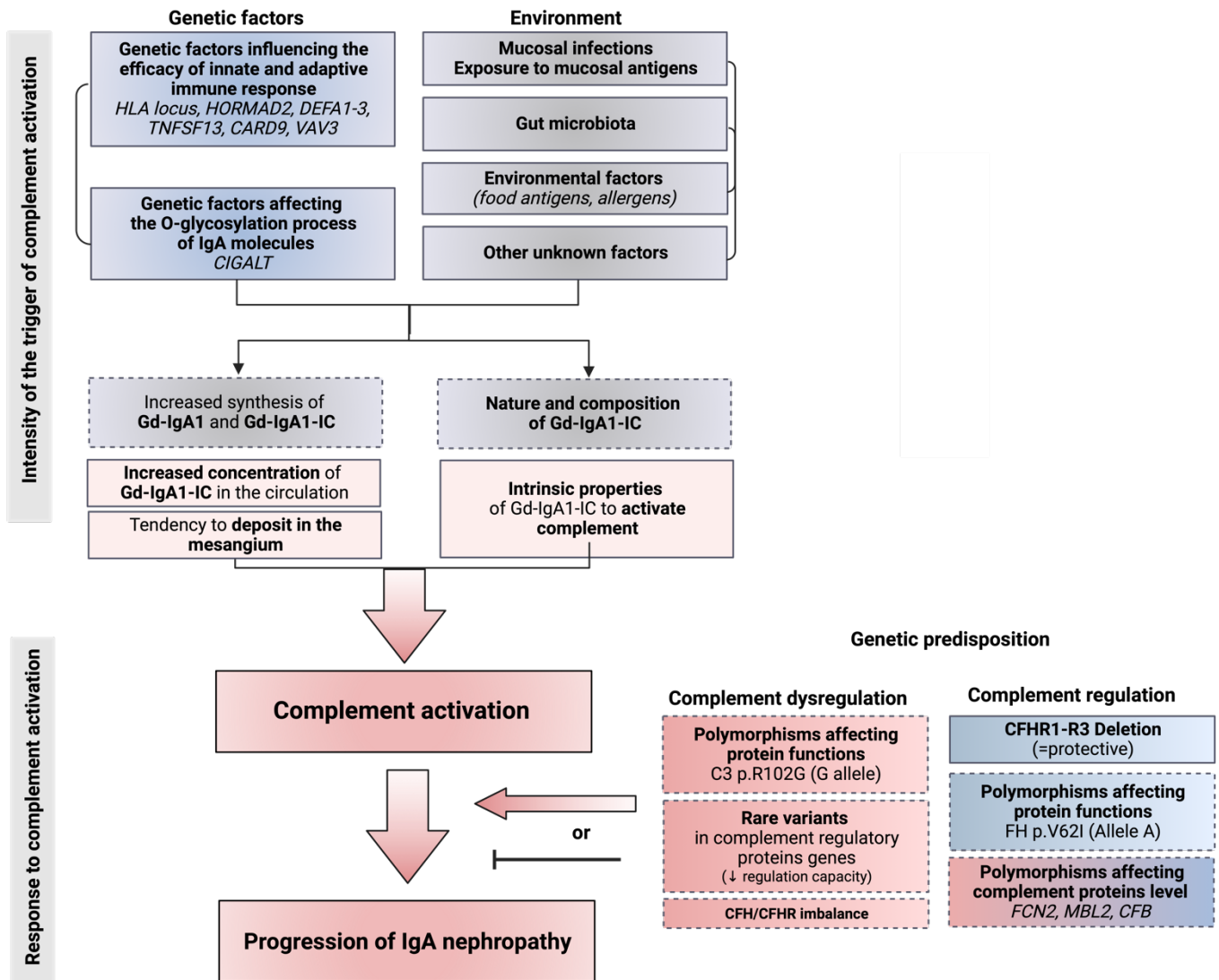


Figure 18. Hypothèses de travail concernant le rôle de la génétique du complément dans l'IgAN

Représentation schématique des potentiels facteurs contribuant à l'activation du complément et à la progression de l'IgAN. Une activation importante et/ou prolongée du complément joue un rôle important dans l'induction de l'inflammation glomérulaire et dans la progression des lésions rénales. Le niveau d'intensité d'activation du complément chez chaque patient pourrait être influencée par une interaction complexe de facteurs génétiques, immunologiques et/ou environnementaux. Les infections muqueuses, la présence d'une dysbiose intestinale, ainsi que d'autres facteurs environnementaux et immunologiques, contribuent à la production d'IgA1 déficientes en galactose (Gd-IgA1) et de complexes immuns pathologiques. Ces derniers constituent un trigger de l'activation du complément, notamment de la voie alterne et de la voie des lectines. Les facteurs génétiques modulant subtilement la réponse immunitaire et la capacité de régulation du complément pourraient influencer le degré d'inflammation glomérulaire engendré par le dépôts de complexes immuns et, par conséquent, la progression de la néphropathie. *Abréviations* : AP : voie alterne ; CP : voie classique ; Gd-IgA1-IC : complexes immuns contenant de l'IgA1 déficiente en galactose ; IgAN : néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA ; LP : voie des lectines. Schéma issu de Duval A, *et al.* NDT 2023.

Les **objectifs de mon travail** étaient :

Objectif 1. D'explorer des biomarqueurs d'activation du complément chez les patients IgAN. Dans ce cadre, nous avons étudié : I- les biomarqueurs plasmatiques d'activation du complément chez les patients IgAN ; II- et complété cette analyse par l'étude fonctionnelle de la capacité du sérum issu de patients à induire *ex vivo* des dépôts de complément à surface de cellules endothéliales en culture. Pour mener cette analyse, nous avons mis au point, standardisé et validé un modèle d'activation *ex vivo* du complément comme outil de mesure de l'activité infraclinique du complément chez les donneurs sains **(A)** puis évalué des sera provenant de patients IgAN dans ce modèle **(B)**.

Objectif 2. D'étudier l'impact de la génétique de la voie alterne du complément chez les patients porteurs d'une IgAN dans la susceptibilité, la sévérité et la progression de la néphropathie. **A)** Dans ce travail, nous avons étudié les principaux gènes de la voie alterne impliqués dans la formation et la régulation de la C3 convertase alterne et des dépôts de C3b, précédemment associés à des pathologies rénales médiées par le complément : les gènes *CFH*, *CFI*, *CFB*, *C3*, *MCP* et *CFHR5*. Nous avons étudié la fréquence des variants rares, des polymorphismes et des principaux haplotypes portant sur ces différents gènes et leur impact sur le pronostic rénal des patients. Nous avons comparé la cartographie de la génétique du complément des patients porteurs d'une IgAN à des données génomiques issues d'une population européenne. **B)** Nous avons complété cette analyse génétique par une étude approfondie des conséquences fonctionnelles des variants du *CFH* identifiés sur la régulation du complément et leur potentielle contribution dans la progression de la néphropathie.

Partie 1. Étude des biomarqueurs d'activation/régulation du complément chez les patients porteurs d'une IgAN

I-Biomarqueurs plasmatiques

I – Biomarqueurs plasmatiques d'activation du complément dans l'IgAN

1. Introduction

Nous avons exploré les biomarqueurs plasmatiques d'activation du complément chez des patients porteurs d'une IgAN. Ces biomarqueurs comprenaient : **1)** les fragments d'activation (Ba, Bb, C3a, C5a, sC5b-9) ; **2)** les concentrations plasmatiques des protéines natives : FH, FI, C3, C4, IgA, IgG, IgM et properdine ; **3)** le taux plasmatique d'IgA1 galactoses-déficientes (Gd-IgA1).

Pour mener ce travail, nous avons préalablement défini les valeurs de référence des concentrations plasmatiques des différents fragments d'activation du complément chez 124 donneurs sains.

Nous avons ensuite analysé ces différents biomarqueurs chez 87 patients transplantés rénaux pour une IgAN et 30 patients transplantés rénaux pour une polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD) (néphropathie génétique non médiée par le complément). Enfin, nous avons complété cette analyse par l'étude des biomarqueurs plasmatiques d'activation du complément chez 20 patients IgAN non transplantés.

2. Patients et méthodes

2.1. Cohortes d'étude

Nous avons analysé les biomarqueurs plasmatiques d'activation du complément chez des patients porteurs d'une néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA transplantés rénaux (n=87) ou non (n=20) inclus dans la cohorte ICONÉ (NCT05234463). Les sujets contrôles étaient des patients transplantés rénaux pour une polykystose rénale aux Hôpitaux universitaires de Strasbourg (DC-2013-1990) (30 contrôles). Nous avons exclu les patients transplantés **1**) présentant un syndrome inflammatoire biologique au moment du prélèvement ou **2**) ayant présenté un rejet cellulaire/humoral dans l'année précédent ou suivant le prélèvement.

Les principales données épidémiologiques et cliniques étaient collectées. Ces données comprenaient : l'âge, le sexe, le délai du prélèvement après la transplantation, la présence d'une récurrence histologique de la néphropathie initiale en post transplantation, la fonction rénale ou du greffon au moment du prélèvement, la pente de DFGe, le ratio protéinurie/créatininurie urinaire (mg/mmol), la présence d'une immunisation ou d'un DSA, ainsi que les antécédents de rejet. La récurrence de la néphropathie initiale était définie comme l'identification de dépôts mésangiaux d'IgA sur la biopsie du greffon.

2.2. Conditions pré-analytiques

Après prélèvement sur tube EDTA, les échantillons sanguins étaient centrifugés pendant 5 minutes à +4000 tr/min à +4°C. Les plasma collectés étaient ensuite aliquotés et immédiatement congelés à -80°C jusqu'à leur analyse. Les échantillons utilisés pour le dosage des biomarqueurs d'activation du complément par ELISA Multiplex MicroVue (Quidel Ortho®, A900, panel 1) et de la properdine n'avaient subi aucun cycle de congélation/décongélation avant l'expérimentation.

2.3. Mesure des fragments d'activation du complément par ELISA Multiplex

Le panel MicroVue (Quidel Ortho®, A900, panel 1) permet la mesure simultanée de plusieurs protéines du complément dans le même échantillon biologique (8 analytes par puit) selon une méthode basée sur le principe de l'ELISA. Le Panel 1 mesure les fragments d'activation du complément : C3a, C5a, C4a, Ba, Bb, C5b-9 soluble (sC5b-9) ainsi que le facteur H (FH) et le facteur I (FI).

Lors de l'expérimentation, les échantillons de plasma ont été décongelés extemporanément et conservés sur glace. Les échantillons de plasma ont été dilués au 1:100 dans le diluant fourni par le kit (*Specimen diluent 1X*, complété par l'ajout d'un inhibiteur du FH et du FI) pour la mesure des fragments d'activation du complément puis ajoutés sur la plaque 96 puits (50 µL/puit), conformément aux instructions du fournisseur. Les 6 calibrateurs et les contrôles haut/bas ont été dilués et déposés extemporanément sur les plaques (50 µL/puit). Le contrôle blanc consistait en 50 µL de diluant. Chaque condition expérimentale a été testée en simplicat. Après une incubation de 120 ± 10 minutes, les plaques ont été lavées avec le tampon de lavage 1X (3 x 300 µL/puit). Après lavage, la plaque est incubée pendant 60 ± 10 minutes avec 50 µL/puit de solution de détection. Après 3 autres étapes de lavages, l'analyte lié est révélé par une réaction enzymatique avec 50 µl de streptavidine-HRP (*horseradish peroxidase*) incubée pendant 20 ± 1 minutes. Après 6 nouvelles étapes de lavage, 50 µL de substrat par puit est ajouté puis la chémiluminescence est lue extemporanément sur un automate dédié (Q-View™ Imager LS). L'intensité des spots correspondant à chaque analyte dosé est mesurée et les concentrations sont calculées en fonction des valeurs des calibrateurs à l'aide du logiciel Qview®. Une soustraction négative des intensités mesurées pour le contrôle blanc a été réalisée pour corriger le signal non spécifique.

Les valeurs de référence pour les différents paramètres de l'ELISA Multiplex ont été établies dans notre laboratoire chez 124 donneurs sains et correspondent à la moyenne + 2 déviations standards (DS) des valeurs mesurées chez ces donneurs (Meuleman MS, Duval A, *et al.* Usefulness and analytical performances of complement multiplex ELISA, *Manuscrit en préparation*).

2.4. Mesure des concentrations plasmatiques de C3, C4 et immunoglobulines (IgA, IgG, IgM) totales

Les concentrations plasmatiques de C3, C4 et immunoglobulines totales (IgA, IgG et IgM) ont été mesurées sur plasma EDTA par immuno-néphélogométrie selon des procédures standardisées (Atellica NEPH 630, Siemens®).

2.5. Mesure de la concentration plasmatique de Properdine

La concentration plasmatique de properdine a été évaluée par un ELISA maison. Des plaques 96 puits (Thermo Scientific™ Nunc™) sont coatées avec un anticorps polyclonal anti-properdine (A239, CompTech®) à 2 µg/mL dans du tampon PBS 1X (50 µL/puit), et incubées une nuit à +4°C. Après 1 heure de blocage à +37°C dans du PBS – BSA 1% (50 µL/puit), les plaques sont lavées (3 x 300 µL) avec du PBS-Tween 0,1%. Les plasmas de patients sont dilués au 1:50 et au 1:400 dans du PBS-BSA 1% (50 µL/puit). La gamme de standard correspond à un pool de plasma de donneurs sains dilués en cascade. Le contrôle blanc correspond à 50 µL de PBS-BSA 1%. La plaque est ensuite incubée 1 heure à +37°C. Toutes les conditions sont testées en duplicats. Après l'incubation, les plaques sont lavées avec du PBS-Tween 0,1% (3 x 300 µL/puits), puis incubées avec 50 µL d'anticorps polyclonal anti-properdine biotinylé "maison" à 3,3 µg/mL (A239, CompTech®) pendant 1 heure à +37°C. Après lavage, l'anticorps lié est rendu visible après 30 minutes d'incubation à +37°C avec de la streptavidine (Agilent Technologies), suivie de 50 µL de dihydrochlorure d'o-phénylènediamine (OPD) dilué dans du substrat 1X (Sigma Aldrich®). La réaction colorimétrique est arrêtée avec 25 µL d'HCl 3N et les densités optiques (OD) sont lues immédiatement sur un lecteur de microplaques à 490 nm.

2.6. Mesure de la concentration plasmatique de Gd-IgA1

La concentration plasmatique d'IgA1 galactose déficientes (Gd-IgA1) a été mesurée sur échantillons de plasma EDTA des patients et des contrôles à l'aide du kit ELISA utilisant le clone KM55 (IBL, Fujioka, Japon) selon les instructions données par les fabricants.

2.7. Analyse statistique

La normalité de distribution des variables continues a été testée par un test de Shapiro-Wilk. Les variables de distribution normale sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type (SD) médiane et intervalle interquartile (IQR) le cas échéant. Les caractéristiques des groupes de patients ont été comparées en utilisant un test de Fisher pour les variables qualitatives et un test de Student ou le test U de Mann-Whitney pour les variables continues. Les comparaisons intergroupes ont été réalisées par une ANOVA (distribution normale) ou un test de Kruskal-Wallis, le cas échéant. Les corrélations entre les biomarqueurs plasmatiques d'activation du complément et les paramètres cliniques a été évaluée avec une corrélation de Spearman. Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (version 4.2.2) avec le package ggplot et le logiciel GraphPad Prism (version 9.5.1).

3. Résultats

3.1. Détermination des valeurs de référence pour les concentrations plasmatiques des fragments d'activation du complément

Nous avons déterminé les valeurs de référence pour les fragments d'activation du complément (C3a, C5a, C4a, Ba, Bb, sC5b-9) et les protéines FI et FH mesurés par ELISA Multiplex (Quidel, ortho®). Les valeurs de référence correspondent aux valeurs moyennes +/- deux déviations standard des valeurs mesurées chez 124 donneurs sains (**Tableau 9, Figure 19**). Les concentrations de C4a mesurées chez les individus sains s'étendent sur toute la gamme de détection du kit. Cet intervalle large de valeurs ne permet pas d'établir des valeurs de références fiables et complique l'interprétation de cet analyte. Par conséquent, nous n'avons pas inclus le C4a pour la suite des analyses.

Tableau 9. Valeurs de référence pour le multiplex ELISA

	Valeurs Min - Max	Valeurs de référence	Interprétabilité pour une détection d'une:
Facteur H (µg/mL)	174 - 654	174 - 544	↑ et ↓
Facteur I (µg/mL)	5,2 – 60,0	4,1 – 41,4	↑ et ↓
Ba (ng/mL)	246 – 970	221 – 727	↑ et ↓
Bb (µg/mL)	0,3 – 3,1	0.2 – 2.4	↑
C3a (ng/mL)	21 – 270	0 – 166	↑
C4a (ng/mL)	73 – 5807	0 – 4723	Indéterminée
C5a (ng/mL)	1.0 – 35.8	0 – 16	↑
sC5b-9 (ng/mL)	127 – 686	43 – 465	↑

Les valeurs de référence correspondent à la moyenne +/- deux déviations standard des concentrations mesurées pour les différents paramètres chez les 124 donneurs sains. Les valeurs du C4a mesurées chez les donneurs sains recouvre l'ensemble de la gamme de détection du kit. Ces valeurs ne permettent pas d'établir de normes pour ce paramètre. *Abréviations* : ↑ : augmentation, ↓ diminution de la concentration.

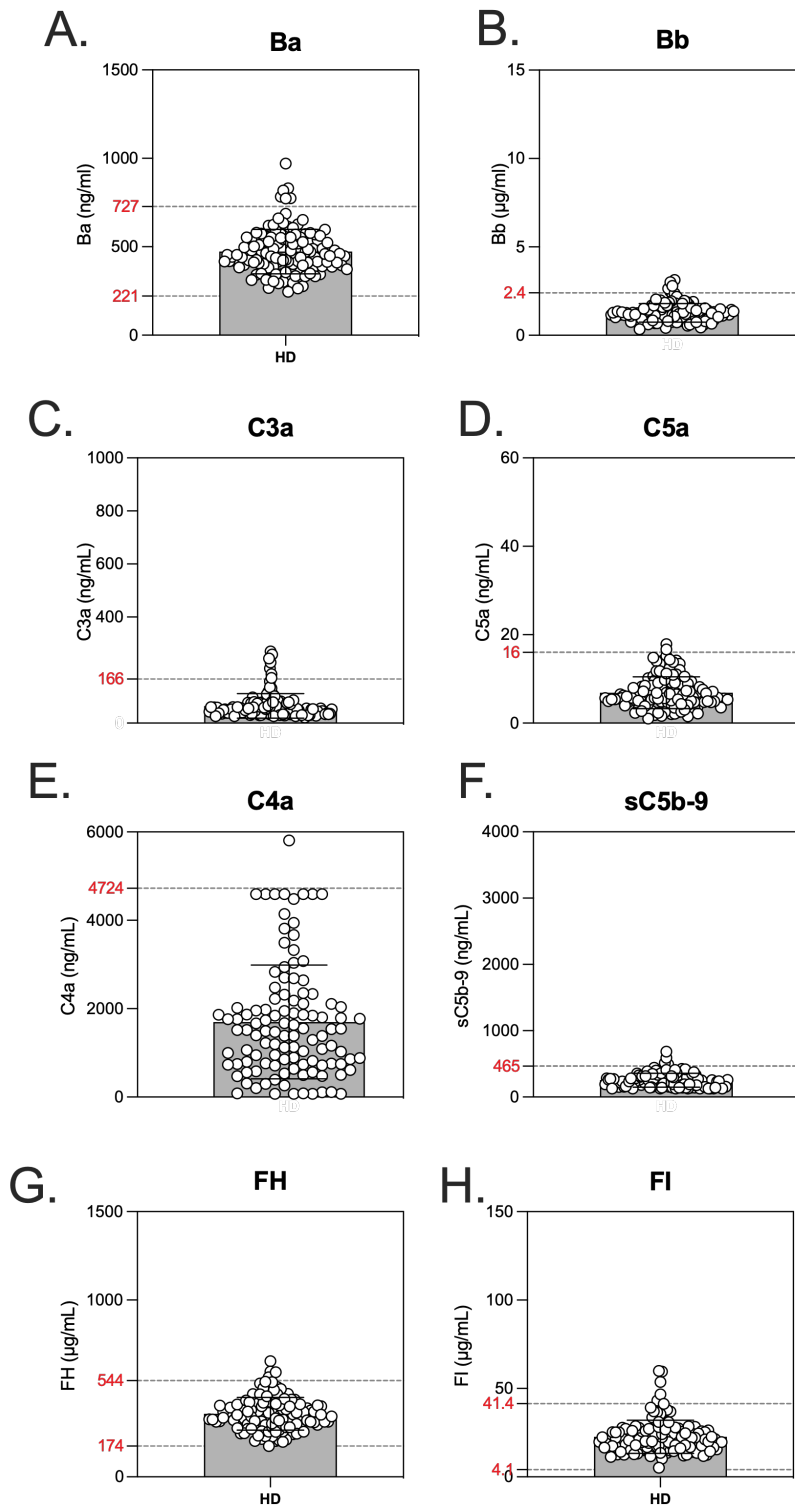


Figure 19. Valeurs de référence des concentrations plasmatiques des biomarqueurs d'activation du complément (ELISA Multiplex) chez les 124 donneurs sains

Les valeurs de référence des différents biomarqueurs correspondent à la concentration moyenne + ou - 2 déviations standards des concentrations plasmatiques mesurées chez 124 donneurs sains. Les valeurs de référence sont notées en rouge. *Abréviations* : FH : facteur H, FI : facteur I.

3.2. Caractéristiques clinico-biologiques des patients transplantés IgAN et PKRAD

Les patients transplantés rénaux pour une IgAN étaient principalement des hommes (sexe ratio hommes/femmes 3:1), prélevés après un délai médian de 49 [19-102] mois après la transplantation. Les patients transplantés pour une PKRAD étaient plus âgés que les patients porteurs d'une IgAN au moment de la transplantation rénale ($45,0 \pm 12,2$ ans, *versus* $53,8 \pm 9,3$ ans, $p < 0,001$) et au moment du prélèvement ($p < 0,001$). Le prélèvement biologique était réalisé plus tardivement après la transplantation chez les patients polykystiques (77 [32-126] mois *versus* 49 [19-102] mois post transplantation, $p = 0,044$). Il n'y avait pas de différence concernant le sexe ratio, le degré d'immunisation anti-HLA ni les paramètres de fonction du greffon entre les deux groupes (**Tableau 10**).

Les concentrations plasmatiques d'immunoglobulines totales (IgA, IgG et IgM) et d'IgA1 galactose-déficientes (Gd-IgA1) ont été évaluées chez 41 patients transplantés pour une IgAN et 17 patients transplantés pour une PKRAD. Les IgA totales plasmatiques et les Gd-IgA1 étaient plus élevées chez les patients transplantés rénaux pour une IgAN ($2,6$ [1,7-3,2] *versus* $1,4$ [1,1-1,8] g/L, $p < 0,001$; et $15,1$ [10,2-32,9] *versus* $9,1$ [4,0-14,7] $\mu\text{g/mL}$, $p = 0,0043$, respectivement). Il n'y avait pas de différence concernant la concentration plasmatique des IgG ou IgM ($p = 0,568$ et $p = 0,234$) (**Figure 20**).

Tableau 10. Caractéristiques des cohortes d'étude

	IgAN (n=87)	PKRAD (n=30)	p-value [§]
Age au prélèvement, années	50,6 (12,4)	61,4 (10,5)	<0,001
Sexe masculin, n (%)	66 (75,9)	19 (61,2)	0,235
Age à la transplantation, années	45,0 (12,2)	53,8 (9,3)	<0,001
Rang de transplantation			
1	81 (93,1)	28 (93,3)	>0,999
≥2	6 (7,4)	2 (6,5)	
Délai post-transplantation, mois	49 [19-102]	77 [32-126]	0,044
Immunsation anti-HLA*			
Patient immunisé, n (%)	49 (56,3)	12 (38,7)	0,142
Présence d'un DSA, n (%)	18 (20,7)	3 (9,6)	0,272
Donnée manquante, n (%)	0 (0)	1 (3,2)	
Récidive de la néphropathie initiale, n (%)	42 (48,3)	--	--
Si oui, délai après transplantation, mois	8,9 [3,2-54,5]	--	--
Paramètres de fonction du greffon			
Créatininémie (μmol/l)	122 [106-153]	123 [106-150]	0,947
DFGe (ml/min/1,73m ²)	57 [41-68]	50 [33-60]	0,092
Ratio protéinurie/créatininurie (mg/mmol)	22 [10-48]	19 [10-41]	0,861

Les variables continues avec une distribution normale sont présentées en moyenne (déviation standard) ou en médiane [intervalle interquartiles] le cas échéant. *Présence d'une immunisation anti-HLA au moment du prélèvement. § variables continues comparées par un test de Student (distribution normale) ou de Mann-Whitney le cas échéant. Variables qualitatives comparées avec un test de Fisher. *Abréviations* : DFGe : débit de filtration glomérulaire estimé, DSA: *donor specific antibody*, anticorps anti-HLA dirigé contre le donneur, HLA : *human leucocyte antigen*.

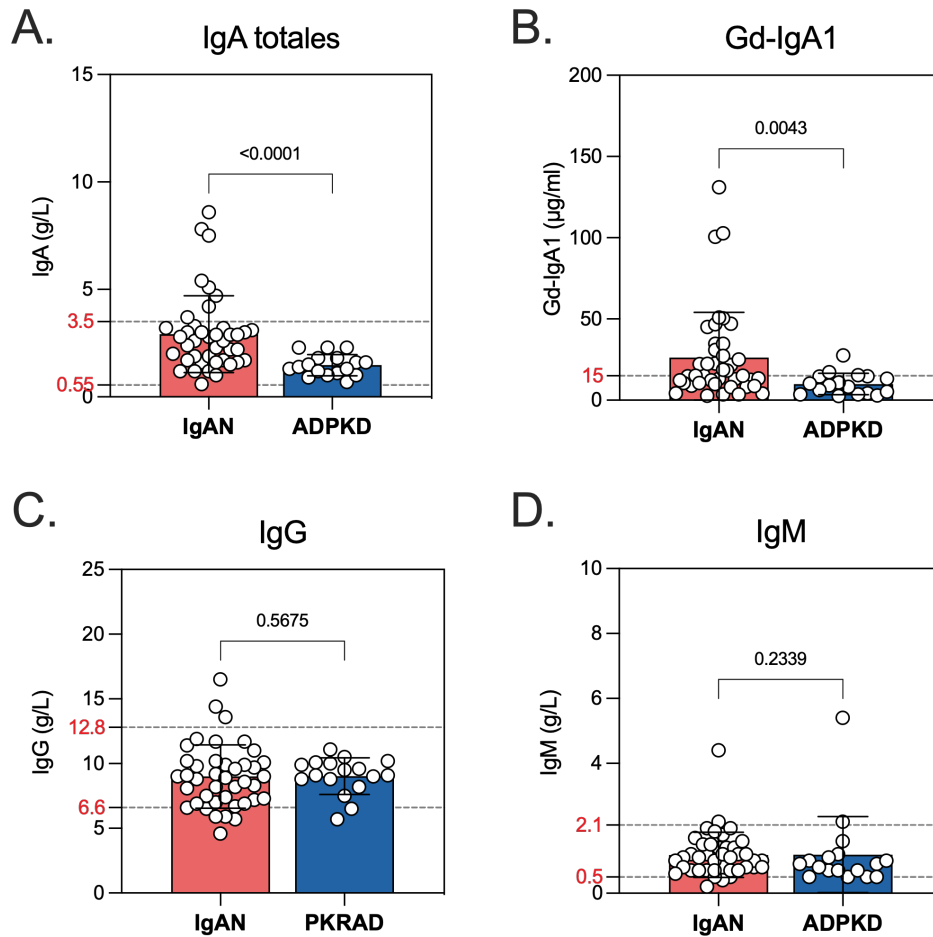


Figure 20. Concentrations plasmatiques d'immunoglobulines totales (IgA, IgG, IgM) et de Gd-IgA1

Comparaison des groupes avec un test de Mann-Whitney. Les valeurs de référence sont notées en rouge. *Abréviations* : IgAN : patients transplantés rénaux pour une néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA, ADPKD : patients transplantés rénaux pour une polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD).

3.2. Biomarqueurs plasmatiques d'activation du complément des patients transplantés IgAN et PKRAD

Concentrations de C3, C4, FI, FI et properdine

Le C3 plasmatique était normal chez l'ensemble des patients. Le C4 plasmatique était normal chez 39/41 patients IgAN (95,2%) et chez les 18 patients polykystiques. Ces résultats signent l'absence de consommation plasmatique franche du C3 et du C4 par les différentes voies du complément chez les patients IgAN (**Figure 21**). Les concentrations plasmatiques du FH, du FI étaient augmentées chez les patients transplantés pour une IgAN comparé aux patients PKRAD ($p=0,0013$, $p=0,0134$ et $p=0,0133$, respectivement) (**Figure 22**). Deux patients IgAN (2,3%) avaient un FH plasmatique subnormal. Les concentrations de properdine étaient augmentées chez les patients IgAN comparé aux polykystiques ($p=0,0113$) avec des valeurs restant dans les normes.

Concentrations des fragments d'activation du complément (Ba, Bb, C3a, C5a, sC5b-9)

Les concentrations de C3a et le Bb plasmatiques étaient augmentées chez les patients transplantés pour une IgAN comparés aux patients polykystiques (respectivement : 161 [98-227] versus 102 [66-172] ng/mL, $p=0,007$ et 3,0 [2,6-4,0] vs 2,5 [2,0-2,8] µg/mL, $p<0,0001$) (**Figure 23**).

Au total, 70/87 patients IgAN (80,5%) avaient un Bb plasmatique élevé. La proportion de patients avec un Bb augmenté était plus importante chez les patients IgAN comparé aux patients polykystiques (70/98, 80,5% versus 16/30, 55,3%, $p=0,0073$). Parmi les 70 patients IgAN avec un Bb plasmatique élevé, 42 patients IgAN (60,0%) présentaient également un C3a anormal.

La concentration du C5a plasmatique était augmentée chez les patients IgAN comparé aux polykystiques (6,3 [3,8-9,2] vs 4,9 [2,8-6,3] ng/mL, $p=0,0274$), avec des valeurs restant dans les normes de référence pour 92,0% des patients IgAN. Il n'y avait pas de différence concernant les biomarqueurs d'activation et de régulation de la voie terminale du complément (sC5b-9) au niveau plasmatique entre les deux groupes ($p=0,186$). Ces biomarqueurs sont augmentés chez 72/93 patients IgAN (82,5%) dont 12 patients avec un sC5b-9 très élevé (>2000ng/mL).

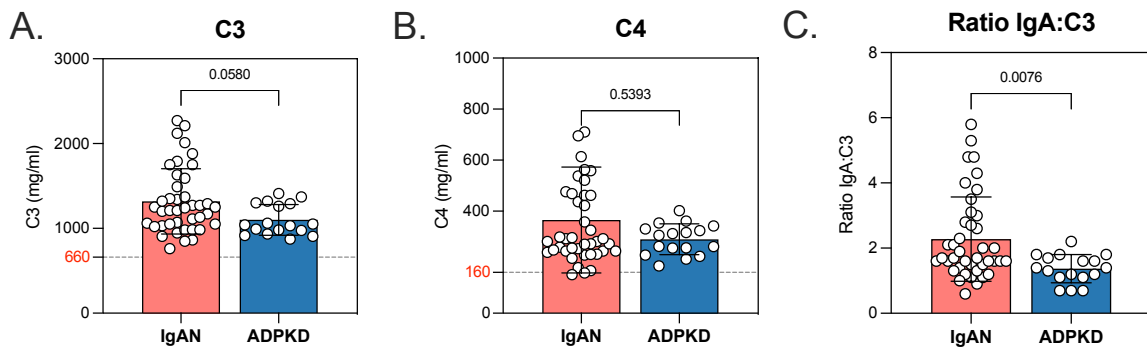


Figure 21. C3, C4 et ratio IgA:C3 plasmatiques chez les patients transplantés IgAN et PKRAD

Le C3 et C4 plasmatiques sont normaux chez l'ensemble des patients IgAN et polykystiques (**panel A**) (**panel B**), excepté deux patients IgAN avec un C4 subnormal. Le ratio plasmatique d'IgA et de C3 (g/g) est augmenté chez les patients IgAN (**panel C**) comparé aux polykystiques. Comparaison des groupes avec un test de Mann-Whitney. Les valeurs basses de référence des différents paramètres sont indiquées en rouge. *Abbréviations* : IgAN : patients transplantés rénaux pour une néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA, ADPKD : patients transplantés rénaux pour une polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD).

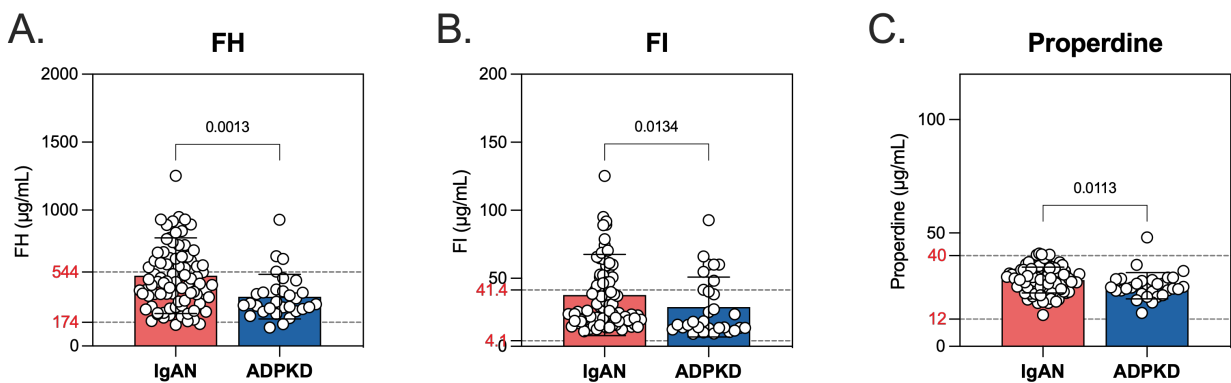


Figure 22. Concentrations plasmatiques des régulateurs plasmatiques du complément FH, FI et properdine

Comparaison des groupes avec un test de Mann-Whitney. Les valeurs de référence des différents paramètres déterminées chez des donneurs sains sont indiquées en rouge. *Abbréviations* : IgAN : patients transplantés rénaux pour une néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA, ADPKD : patients transplantés rénaux pour une polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD).

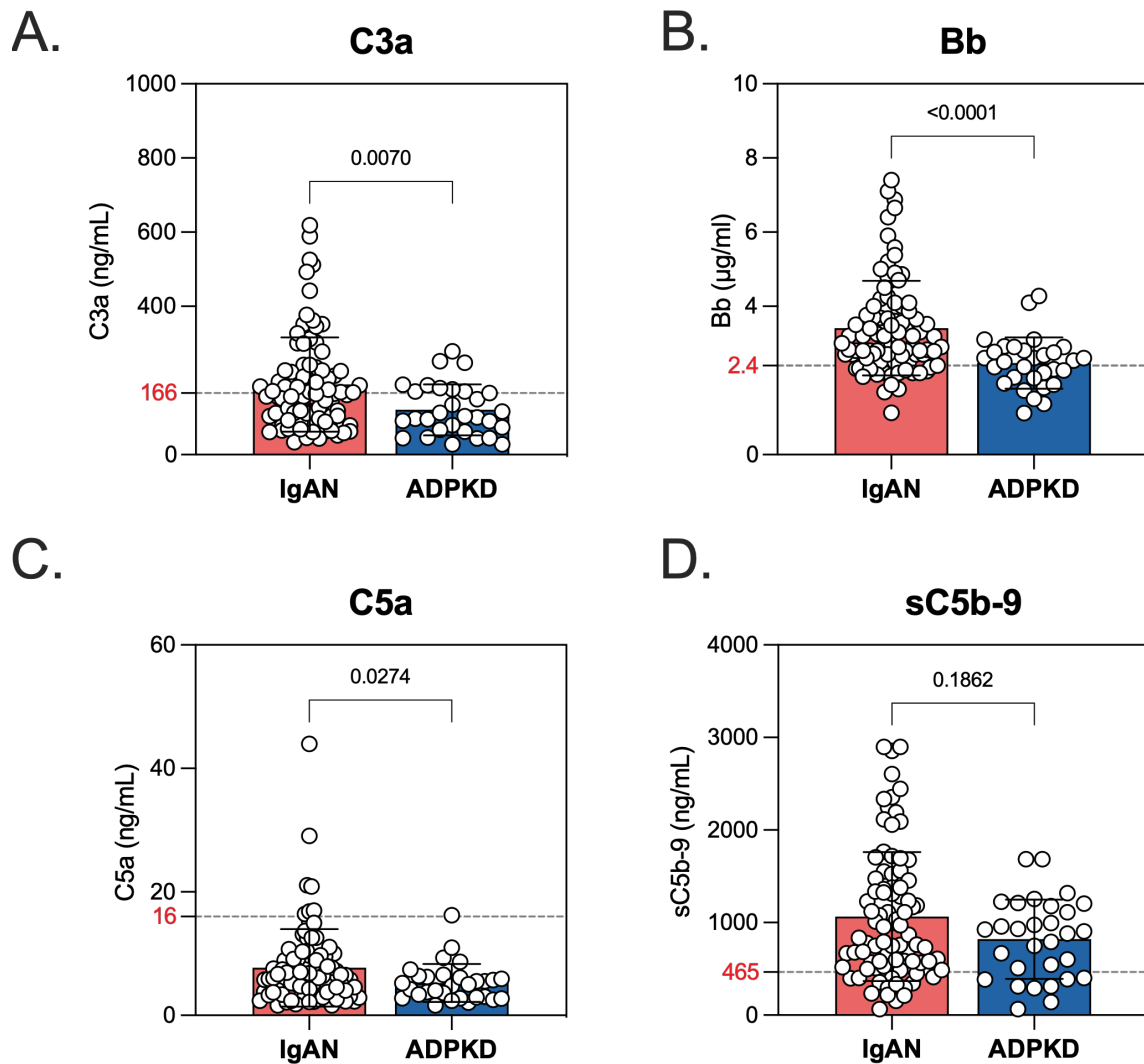


Figure 23. Fragments d'activation du complément plasmatiques chez les patients transplantés pour une IgAN ou une PKRAD

Les patients transplantés rénaux pour une IgAN présentent des marqueurs d'activation des voies initiales du complément avec des signes d'activité de C3 convertases (libération de C3a, **panel A**) et de dissociation de C3 convertases alternes (libération de Bb, **panel B**). Il n'y a pas de différence concernant les marqueurs d'activité de C5 convertases (libération de C5a, **panel C**) ou d'engagement/régulation de la voie terminale (libération de sC5b-9, **panel D**). Comparaison des groupes avec un test de Mann-Whitney. Les valeurs de référence des différents paramètres déterminées chez des donneurs sains sont indiquées en rouge. *Abréviations* : IgAN : patients transplantés rénaux pour une néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA, ADPKD : patients transplantés rénaux pour une polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD).

Il existe une franche corrélation entre les biomarqueurs d'activité de C3 convertases (C3a) et de dissociation de C3bBb (Bb) chez les patients IgAN ($p < 0,001$, $r^2 0,67$). De même, le sC5b-9 était positivement corrélé à la concentration du Bb ($p < 0,001$, $r^2 0,64$) et du C3a ($p = 0,019$, $r^2 0,26$).

Les concentrations plasmatiques du fragment Ba étaient augmentées chez 66,7 et 70,0% des patients IgAN et PKRAD transplantés rénaux, sans différence entre les deux groupes ($p = 0,283$). La corrélation inverse du Ba avec la fonction du greffon pour l'ensemble des patients transplantés ($p < 0,001$, $r^2 0,42$, non retrouvée pour le Bb), complique son interprétabilité en tant qu'indicateur direct de l'activité du complément (**Figure 24**). Ce biomarqueur n'a pas été inclus pour la suite des analyses.

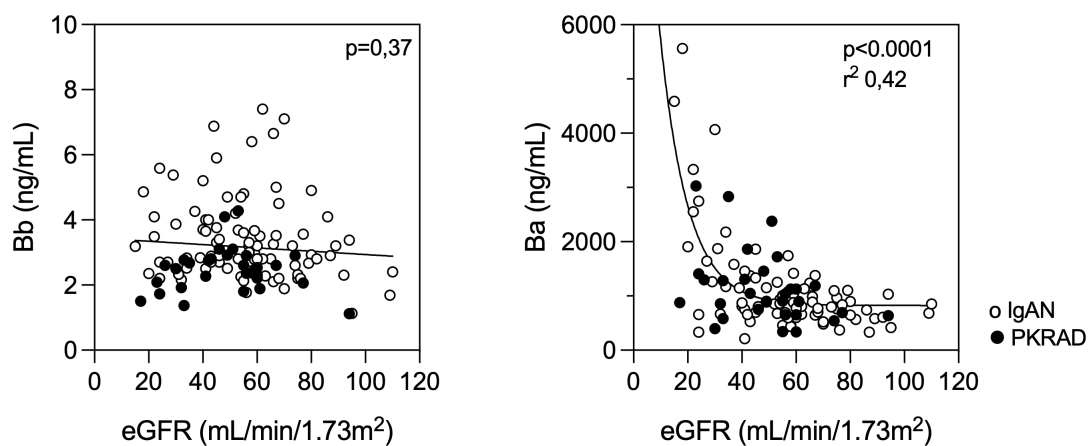


Figure 24. Corrélation entre les fragments d'activation du facteur B (Bb, Ba) et la fonction du greffon

Abréviations : eGFR : débit de filtration glomérulaire estimé ou DFGe, IgAN : patients transplantés rénaux pour une néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA, PKRAD : patients transplantés rénaux pour une polykystose rénale autosomique dominante.

3.3. Corrélation avec les paramètres clinico-biologiques des patients transplantés IgAN et PKRAD

Seul le C3a était positivement corrélé au degré de protéinurie ($p < 0,001$, r^2 0,33) chez les patients IgAN. Cette association n'était retrouvée chez les patients polykystiques ($p = 0,26$). Les concentrations plasmatiques de Gd-IgA1 et des fragments d'activation du complément n'étaient pas corrélés.

Les biomarqueurs d'activation du complément (Bb, C5a, sC5b-9) n'étaient pas associés à l'âge, au délai post-transplantation rénale, aux paramètres de fonction du greffon, ni à la présence d'une immunisation anti-HLA (Figure 25).

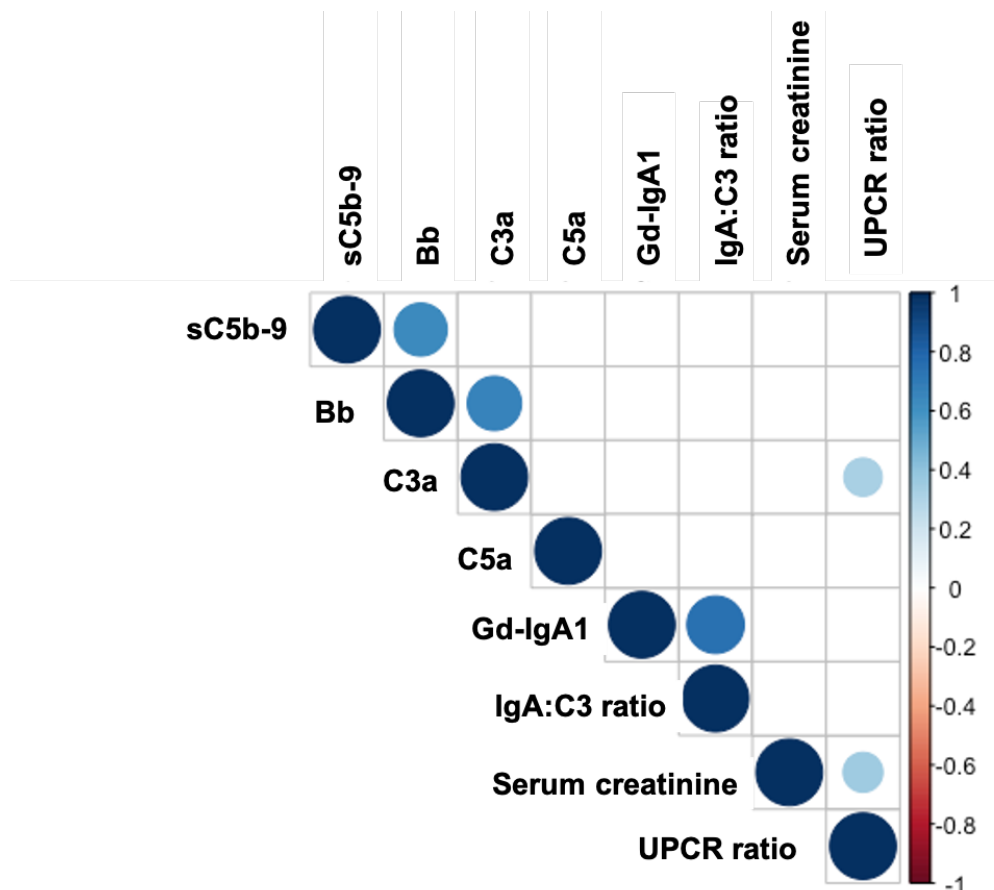


Figure 25. Matrice de corrélation entre les biomarqueurs d'activation du complément et d'activité de l'IgAN et les paramètres de fonction du greffon

Matrice de corrélation entre les biomarqueurs d'activation plasmatiques du complément (Bb, C3a, C5a, sC5b-9), les biomarqueurs d'activité de l'IgAN (Gd-IgA1, ratio IgA:C3 plasmatiques) et les paramètres de fonction du greffon. Les paramètres associées avec une **p-value < 0.01** (méthode de Spearman) sont représentées par des cercles. Les valeurs du coefficient de corrélation r^2 sont représentées en couleur (bleu pour les associations positives, rouge pour les variables inversement corrélées). *Abréviations* : Gd-IgA1 : IgA1 galactose-déficiente ; UPCR : ratio protéinurie/créatininurie, sC5b-9 : C5b-9 soluble.

3.4. Profils d'activation du complément au niveau plasmatique chez les patients transplantés IgAN

Nous avons combiné 3 biomarqueurs signant l'activité de C3 convertases alternes et classiques (C3a), la dissociation de C3 convertases alternes préalablement formées (Bb) et l'engagement de la voie terminale du complément (sC5b-9). La combinaison de ces 3 biomarqueurs permet d'identifier 4 profils de patients (**Figure 26**).

Au total, 48 patients (55,2%) présentent des signes d'activité de C3 convertases au niveau plasmatique (clusters 3 et 4), dont 16 patients (18,4%) présentent les concentrations plasmatiques les plus élevées de sC5b-9, C3a et de Bb. A l'inverse, 15 patients (17,2%, cluster 1) n'activent pas (ou très peu) le complément. Le dernier groupe (n=32, 36,8%, cluster 2) présente une augmentation isolée du sC5b-9, sans signe d'activité de C3 convertases plasmatiques.

La protéinurie était significativement augmentée dans les groupes 3 et 4 présentant des concentrations de C3a les plus élevées comparée aux groupes 1 et 2 ($p=0,0051$). Les concentrations plasmatiques de C5a étaient plus élevées chez les patients des groupes 2 et 4 (sC5b-9 augmenté) ($p=0,017$). Aucune différence concernant les caractéristiques cliniques et les autres paramètres de fonction du greffon entre les 4 groupes de patients n'a été identifiée.

Les patients du cluster 4 présentaient un profil inflammatoire avec un C4 plasmatique plus élevé ($p=0,004$), et une tendance à un C3 augmenté ($p=0,076$) (**Tableau 11**). Parmi les 16 patients du cluster 4, 8 patients (50,0%) ont présenté une histologie récidive de l'IgAN (dont 1 forme avec une prolifération mésangiale en microscopie optique). Dans ce groupe de patients l'IgAN s'était initialement manifestée par une prolifération extracapillaire chez 5 patients et un syndrome néphrotique chez 3 patients.

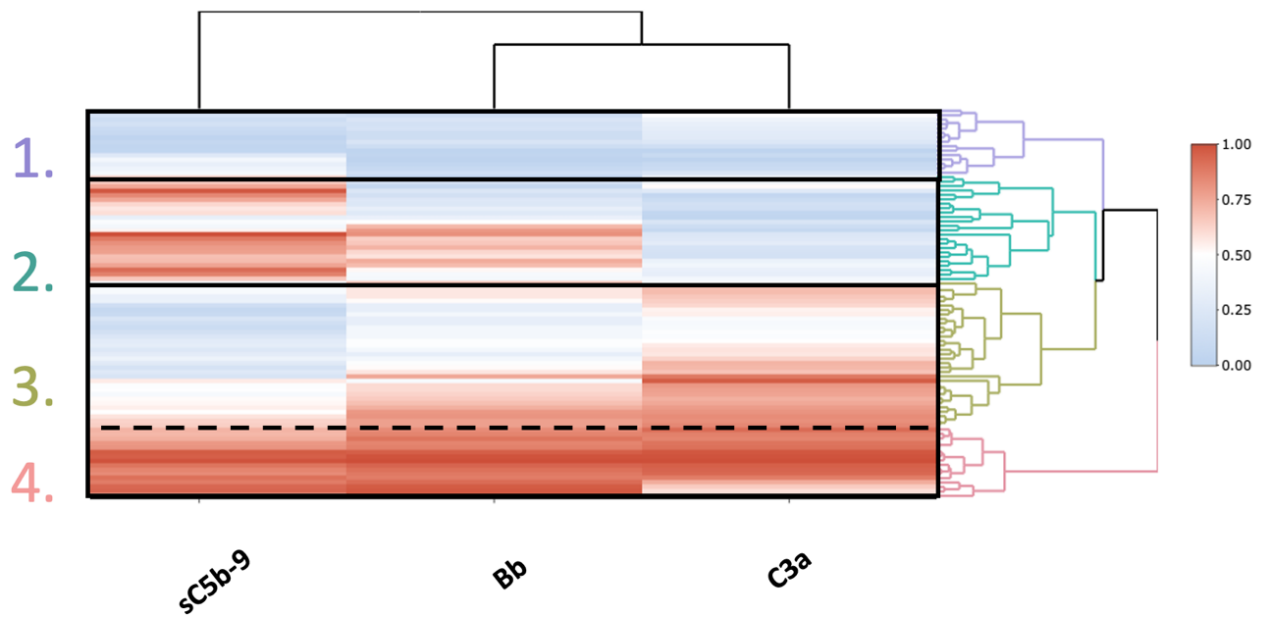


Figure 26. Profils d'activation du complément chez les patients IgAN transplantés

Heatmap représentant les profils d'activation du complément au niveau plasmatique chez les patients IgAN transplantés rénaux. L'analyse permet de définir 4 clusters de patients. Les clusters 1 et 2 n'ont pas de signe d'activité ou de dissociation de C3 convertases. Les clusters 3 et 4 présentent des signes d'activité / dissociation de C3 convertases. Le cluster 4 (18,4 % des patients) est un activateur fort et présente la combinaison des trois biomarqueurs augmentés. *Abréviations* : sC5b-9 : C5b-9 soluble.

Tableau 11. Description des paramètres clinico-biologiques selon le cluster

	Cluster 1 (n=15)	Cluster 2 (n=24)	Cluster 3 (n=32)	Cluster 4 (n=16)	p-value [§]
Age au prélèvement, années	48,8 (11,5)	50,0 (12,9)	50,3 (13,1)	53,6 (11,7)	0,740
Sexe masculin, n (%)	11 (73,3)	16 (66,7)	25 (78,1)	14 (87,5)	0,487
Age à la transplantation, années	44,5 (12,6)	42,8 (10,6)	45,9 (13,9)	46,8 (11,1)	0,738
Rang de transplantation					
1	14 (93,3)	20 (83,3)	31 (96,9)	16 (100)	--
2	1 (6,7)	4 (16,7)	1 (3,1)	0 (0)	
Délai post-transplantation, mois	32 [12-88]	57 [17-127]	45 [17-66]	51 [38-128]	0,292
Immunisation anti-HLA*					
Patient immunisé, n (%)	9 (60,0)	18 (75,0)	14 (44,8)	8 (50,0)	0,122
Présence d'un DSA, n (%)	3 (20,0)	7 (29,2)	7 (21,9)	1 (6,3)	--
Paramètres de fonction du greffon					
Créatininémie (µmol/l)	109 [100-130]	121 [102-156]	126 [103-156]	137 [112-159]	0,411
DFGe (ml/min/1,73m ²)	65,5 (26,8)	55,6 (21,8)	53,2 (17,1)	51,8 (17,6)	0,220
UPCR (mg/mmol)	10,6 [7,0-14,7]	12,1 [8,6-47,1]	31,2 [15,5-47,4]	37,4 [12,1-170]	0,011
Marqueurs d'activité de l'IgAN					
Récidive de l'IgAN**, n (%)	5 (33,3)	16 (66,7)	13 (40,6)	8 (50,0)	0,147
Ratio IgA:C3 (g/g)	1,7 [1,3-4,3]	1,7 [1,4-2,8]	2,1 [1,7-3,2]	2,3 [1,4-4,7]	0,621
Gd-IgA1 plasmatiques (µg/mL)	22,3 [11,7-49,5]	14,2 [9,3-26,8]	16,6 [12,9-30,7]	9,9 [5,3-82,9]	0,612
Complément plasmatique					
C3 (mg/mL)	1205 [1085-1318]	1140 [993-1460]	1280 [965-1335]	1880 [1440-2110]	0,075
C4 (mg/mL)	257 [230-314]	287 [245-456]	246 [185-380]	563 [549-988]	0,004
C3a (µg/mL)	104 [63-121]	88 [66-118]	199 [165-240]	352 [247-480]	<0,001
Bb (ng/mL)	2,2 [1,9-2,4]	2,9 [2,5-3,6]	3,1 [2,8-3,5]	5,3 [4,8-6,6]	<0,001
sC5b-9 (ng/mL)	398 [218-564]	1345 [1088-1699]	604 [502-788]	1888 [1409-2349]	<0,001
C5a (ng/mL)	4,7 [2,9-9,5]	8,0 [6,1-12,0]	5,6 [3,2-7,0]	6,3 [3,7-13,0]	0,017
FH (µg/mL)	386 [253-507]	454 [385-583]	472 [316-655]	567 [373-781]	0,296
FI (µg/mL)	20,1 [15,8-41,9]	18,8 [14,7-21,0]	44,9 [23,9-65,5]	37,7 [24,3-59,0]	<0,001

Les variables continues avec une distribution normale sont présentées en moyenne (déviation standard) ou en médiane [intervalle interquartiles] le cas échéant. *Présence d'une immunisation anti-HLA au moment du prélèvement.** Présence d'une récurrence histologique de l'IgAN au moment du prélèvement. § variables continues comparées par une ANOVA (distribution normale) ou un test de Kruskal-Wallis le cas échéant. Variables qualitatives comparées avec un test du Chi-2. *Abréviations* : DFGe : débit de filtration glomérulaire estimé, DSA : *donor specific antibody*, anticorps anti-HLA dirigé contre le donneur, HLA : *human leucocyte antigen*, IgAN : néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgAN, UPCR : ratio protéinurie/créatininurie urinaire.

3.5. Fragments plasmatiques d'activation du complément chez les patients IgAN non transplantés

Nous avons mesuré les fragments d'activation du complément C3a, C5a, Bb et sC5b-9 chez 20 patients porteurs d'une IgAN non transplantés.

Les 20 patients IgAN non transplantés étaient principalement des hommes (17/20, 85,0%), âgés de 50 [36-66] ans au moment du prélèvement. Le prélèvement était réalisé après un délai médian de 5,7 [2,1-13,2] années après le diagnostic. Le DFGe et le ratio protéinurie sur créatininurie au moment du prélèvement étaient de 33,3 [18,0-76,0] mL/min/1,73m² et de 239 [112-326] mg/mmol. Trois patients étaient dialysés au moment du prélèvement. Parmi ces patients, les manifestations cliniques de l'IgAN étaient : une hématurie macroscopique récidivante après des épisodes infectieux muqueux (n=3), un syndrome néphrotique impur (n=2), une forme extracapillaire ou IgAVN (n=4) dont un patient ayant présenté une HTA maligne, une insuffisance rénale aigue avec hématurie (n=1), ou un tableau de glomérulonéphrite chronique (n=10).

Les profils plasmatiques d'activation du complément étaient globalement similaires entre les patients IgAN transplantés ou non, avec une élévation du C3a, du Bb et du sC5b-9 sans élévation franche du C5a plasmatique (**Figure 27**).

L'analyse des profils d'activation du complément dans le plasma des patients porteurs d'une IgAN (transplantés ou non) confirme la présence d'une activation subtile du complément au niveau plasmatique chez les patients. Cette activation génère la formation de C3 convertases, dont des C3bBb clivant de faibles quantités de C3 (élévation modérée de C3a). Chez les patients IgAN, la cascade d'activation est cependant régulée dans la circulation limitant la génération de C5 convertases plasmatiques et le clivage de C5.

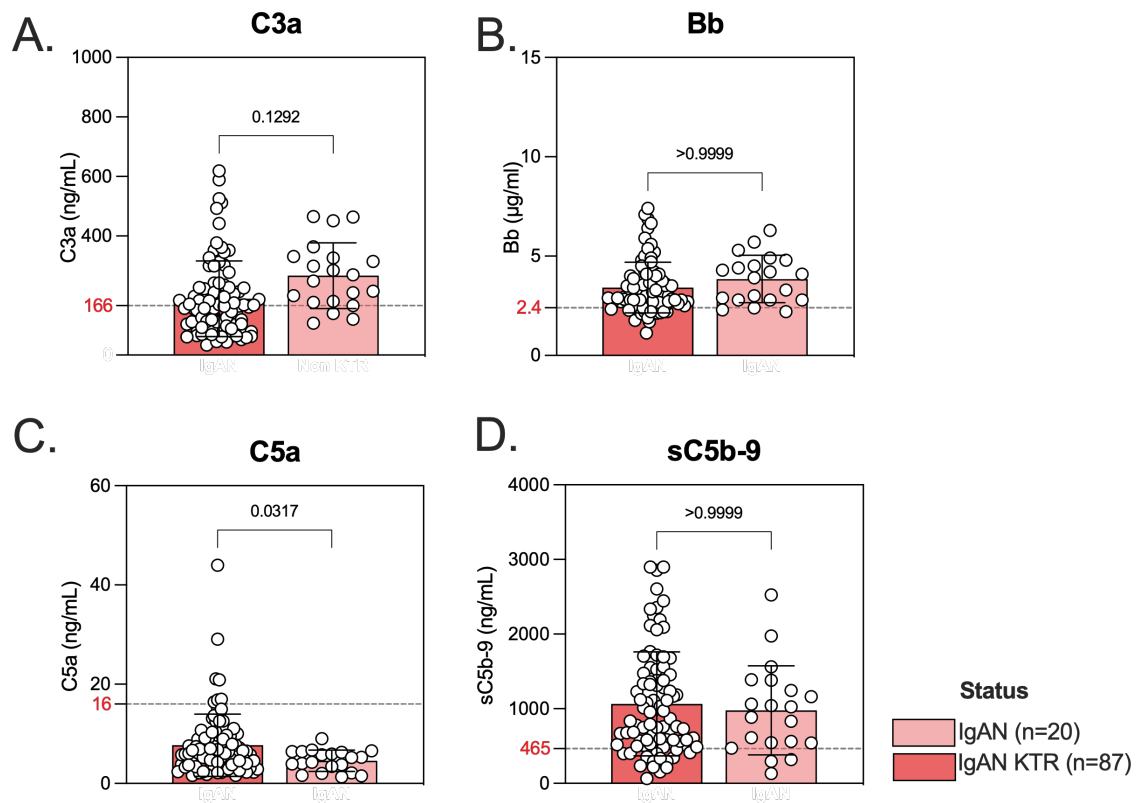


Figure 27. Fragments d'activation plasmatiques du complément chez les patients IgAN transplantés rénaux ou non

Comparaison des groupes avec un test de Mann-Whitney. *Abréviations* : IgAN: patient porteur d'une néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA non transplanté, IgAN KTR : patient transplanté pour une IgAN, KTR : *kidney transplant recipient*.

4. Conclusions

Fragments d'activation du complément

Notre étude est la première à évaluer de manière combinée 5 fragments d'activation du complément (C3a, Bb, Ba, C5a, sC5b-9) plasmatiques chez des patients IgAN. Nos résultats confirment la présence d'une activation du complément à bas bruit mesurable dans le plasma des patients, avec des profils similaires entre les patients IgAN transplantés et non transplantés.

Dans notre cohorte, 80,5% des patients IgAN transplantés rénaux ont un Bb plasmatique élevé et 47,1% ont un C3a et un Bb élevés. L'augmentation conjointe des concentrations plasmatiques du C3a et du Bb indique **i)** la présence de C3 convertases actives chez ces patients et **ii)** la contribution de la voie alterne dans l'activation/l'amplification du complément. Cette activation reste cependant d'intensité modérée, n'entraînant pas de consommation franche du C3 ni du C4 plasmatiques.

L'augmentation limitée des biomarqueurs d'activité des C5 convertases (C5a) indique une régulation des C3 convertases formées dans la circulation et une implication plus restreinte de la voie terminale du complément chez les patients. Ces résultats montrent une activation du complément principalement dépendante des C3 convertases et de leur régulation, prévenant la formation de C5 convertases chez les patients IgAN.

Profils d'activation du complément

Nous avons identifié 4 profils de patients avec différents degrés d'activation du complément au niveau plasmatique : un profil de patients activateurs du complément avec des signes d'activité de C3 convertases et de régulation des C3 convertases alternes (C3bBb) (cluster 4, 18,4% des patients), un profil avec une activation plus modérée du complément (36,8% des patients) et un profil de patients non activateurs (17,2%). L'identification de ces différents profils souligne la complexité des

mécanismes contribuant à l'activation du complément dans l'IgAN et la difficulté posée par l'interprétation isolée des différents biomarqueurs du complément, en particulier du sC5b-9 chez les transplantés.

Nos résultats apportent des informations sur la mécanistique de l'activation du complément dans l'IgAN et repositionne l'importance du rôle de la voie alterne (et de sa régulation) dans la physiopathologie de cette néphropathie. Les fragments mesurés peuvent être le reflet d'une activation du complément prenant place dans la circulation et/ou dans le glomérule rénal. Chez les patients porteurs d'une IgAN, la formation de C3 convertases directement dans la circulation pourrait être facilitée par la présence de surfaces activatrices tels que les complexes immuns circulants.

Les cellules endothéliales glomérulaires sont à l'interface entre la circulation et le mésangium rénal. Ces cellules sont notamment en contact étroit avec les complexes immuns circulants et exposées aux fragments d'activation du complément (p.ex. C3b) générés dans la circulation et se déposant à leur surface. La régulation efficace des dépôts de C3b à leur surface est donc primordiale pour limiter l'amplification du complément et les lésions endothéliales liées au complément.

Nous avons ensuite évalué la capacité des sera issus de patients IgAN à induire une activation *ex vivo* du complément à la surface des cellules endothéliales.

II – Activation du complément *ex vivo* à la surface des cellules endothéliales par le sérum

II – Modèle *ex vivo* d'activation du complément à la surface des HMEC-1

1. Introduction

Actuellement, l'appréciation de l'implication du complément et de son degré d'activation dans une pathologie donnée peut être évaluée par différentes méthodes utilisées en routine ou en laboratoire spécialisé (131). Comme réalisé dans la section précédente, les composants de la cascade du complément (p.ex. consommation de C3, C4) et leurs fragments d'activation (p.ex. augmentation du C5a, C3a) peuvent être dosés dans le plasma par ELISA ou par immuno-néphélométrie (287). D'autres outils consistent en la réalisation de tests fonctionnels hémolytiques évaluant la capacité du plasma issu de patients à induire la lyse d'érythrocytes sensibilisés (288), l'évaluation de dépôts tissulaires de complément en immunohistochimie (IHC) ou en immunofluorescence (IF) sur la biopsie (289), ou encore l'identification de variants génétiques affectant les protéines de la cascade du complément (131).

Ces outils diagnostiques ont cependant plusieurs limites. En effet, les tests hémolytiques et la mesure quantitative des fragments d'activation du complément constituent uniquement des preuves indirectes d'activation récente. Par ailleurs, l'activation du complément peut être présente de manière « sous-optimale », avec des niveaux plasmatiques de C3 et de C4 normaux. De plus, la biopsie des tissus cibles de l'activation du complément n'est pas toujours réalisable. Enfin, l'analyse de la génétique du complément n'est pas disponible immédiatement (290). La recherche de variants génétiques peut également s'avérer infructueuse (p.ex. recherche de variants rares négative dans près de 40% des cas de SHUa (137)) ou identifier des variants de signification indéterminée (VUS), sans preuve d'implication directe dans la symptomatologie (291). Enfin, la négativité de l'analyse génétique ciblée ne permet pas d'exclure formellement un terrain de susceptibilité sous-tendant une dérégulation du complément. De nouveaux outils fonctionnels pour diagnostiquer l'implication du

complément et son degré d'activation – y compris infraclinique – dans une pathologie à un moment donné sont nécessaires.

Notre objectif était de développer un test fonctionnel de mesure de l'activation de la cascade du complément *ex vivo*, en nous basant sur sa physiopathologie (**Figure 29**)(292). Le complément, présent dans le sérum, s'active sous forme de cascade engendrant des fragments d'activation libérés dans la circulation ou se déposant à la surface des tissus. Dans notre modèle d'étude, les cellules endothéliales quiescentes servent de surface régulatrice du complément. L'analyse quantitative des dépôts de fragments d'activation (et dégradation) du complément à leur surface est utilisée comme indicateur de l'activité globale de la cascade d'activation du complément du sérum étudié.

L'activation du système du complément contribue à la progression et à la sévérité de l'IgAN. Cette activation prend essentiellement place au niveau tissulaire rénal, avec une fréquence très élevée des dépôts de C3b/iC3b glomérulaires chez les patients. En revanche, les signes d'activation du complément sont en général absents ou peu marqués au niveau plasmatique (absence de consommation du C3, élévation modérée du C3a). L'hypothèse actuelle selon laquelle l'activation du complément dans la circulation serait potentiellement déclenchée par les complexes immuns pathologiques repose sur un nombre limité d'études *in vitro* (217,234,293), et les mécanismes précis de cette activation ne sont pas connus. Nous avons testé des sera de patients porteurs d'une IgAN dans notre modèle et évalué la capacité d'activation du complément à la surface des cellules endothéliales en culture.

Pour mener cette analyse, nous avons mis au point et validé un modèle endothélial chez les donneurs sains puis évalué des sera de patients porteurs d'une IgAN dans ce modèle. Nous discuterons des principaux résultats obtenus et de la pertinence de ce modèle pour la détection d'une susceptibilité à l'activation/dérégulation *ex vivo* du complément, en particulier chez les patients IgAN.

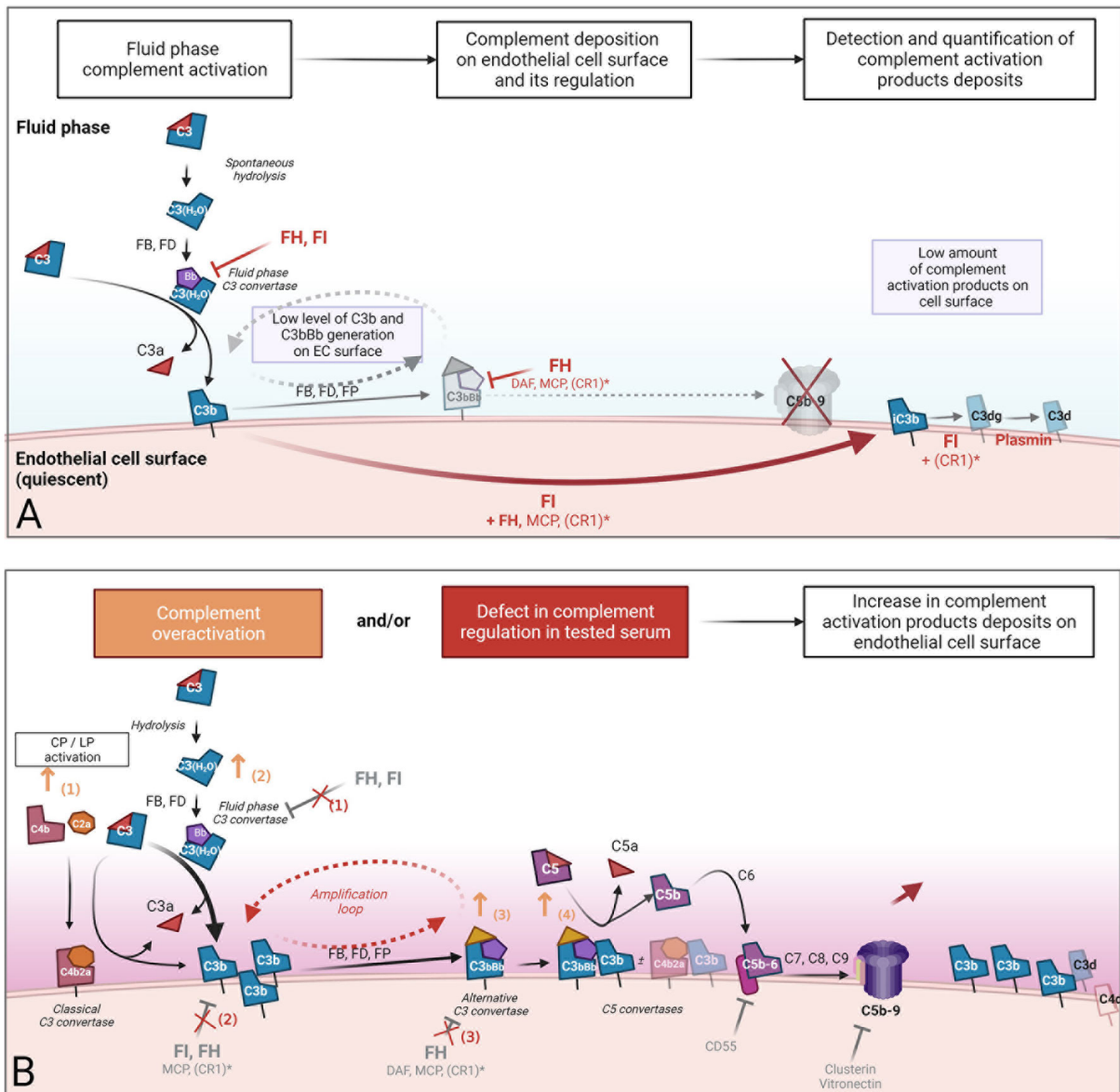


Figure 28. Principes de mesure de l'activation *ex vivo* du complément dans un modèle endothélial

Le test consiste à détecter et quantifier les dépôts de fragments d'activation du complément à la surface des cellules endothéliales en culture après incubation avec du sérum humain. La cellule endothéliale est utilisée comme surface régulatrice. **(A)** En conditions physiologiques, la voie alterne, faiblement active, génère de faibles quantités de C3b. En absence de surface activatrice, le C3b déposé en surface cellulaire est rapidement inactivé par les régulateurs circulants (du sérum) et membranaires (des cellules endothéliales). Une augmentation des dépôts de complément en surface cellulaire **(B)** pourrait résulter **i)** d'une suractivation du complément qui dépasse la capacité de régulation des EC (orange) ou **ii)** d'un défaut de régulation du complément. Les flèches orange représentent certains mécanismes impliqués dans la suractivation du complément dans le sérum (1) : la participation d'une co-activation des voies classique/lectine et de la voie alterne par des immunoglobulines pathologiques ou des complexes immuns (2), une augmentation de la formation de C3 convertases en phase fluide en présence d'hème ou d'une surface activatrice, ou encore une stabilisation des C3 ou C5 convertases (3, 4) par des immunoglobulines pathologiques (C3 nef et C5 nef). Les croix rouges représentent des mécanismes pouvant induire une dérégulation de la voie alterne du complément en phase fluide (1) et à la surface cellulaire (2, 3). Ces mécanismes comprennent : une inhibition du FH par des auto-anticorps anti-FH (p.ex. SHUa), un déficit quantitatif ou fonctionnel des régulateurs du complément (p. ex. variants pathogènes du *CFH* ou *CFI*). *CR1 : faible expression de CR1 par les HMEC-1. **Abbreviations** : CR1 : *complement receptor 1* (CD35) ; FB : facteur B ; FD : facteur D ; FH : facteur H ; FI : facteur I ; FP : properdine ; MCP : *membrane cofactor protein* (ou CD46).

2. Patients et méthodes

2.1. Cohortes d'étude

Mise au point et validation du modèle endothélial

Contrôles internes

Nous avons utilisé du sérum provenant de donneurs de l'établissement français du sang (EFS, convention n°18EFS033) pour la mise au point des conditions expérimentales et comme contrôles pour la validation des expérimentations. Le sérum d'un donneur de l'EFS était utilisé comme contrôle interne (testé sur chaque plaque) et comme condition positive (sérum de l'EFS en présence d'une condition de dérégulation du complément). Ces conditions sont plus amplement détaillées dans la section suivante. Les sera provenant des différents donneurs de l'EFS sont nommés « S » suivi d'un chiffre.

Validation des valeurs de référence

Nous avons défini les scores de niveau de dépôts de fragments d'activation du complément (C3c, C5b-9) mesurés à la surface des cellules endothéliales en testant des sera provenant d'un panel de 38 donneurs. Ces donneurs correspondaient à des candidats éligibles au don de rein, ayant fait l'objet d'une évaluation médicale extensive avec un bilan biologique et rénal complet. Les informations épidémiologiques concernant le donneur et le receveur potentiel ainsi que leur lien de parenté étaient collectées. Les donneurs présentant un ADN disponible en bibliothèque de l'établissement français du sang (EFS) (n=33/38 donneurs) ont bénéficié d'un séquençage génétique ciblé sur les différents gènes de la voie alterne du complément en *next generation sequencing*. Tous les donneurs avaient signé un consentement pour la collection biologique de sérum et d'ADN et son utilisation à des fins de recherche (Bibliothèque n° DC-2013-1990).

Spécificité de la détection des dépôts de C5b-9

Des sera provenant de 10 patients traités par éculizumab ont été utilisés pour la validation du modèle. Les sera de ces patients ont été testés dans le modèle en condition ou non de dérégulation du complément.

Évaluation du modèle *ex vivo* en conditions pathologiques

Cohorte de patients porteurs d'une IgAN

Des sera provenant de patients transplantés rénaux porteurs d'une IgAN ont été collectés durant le suivi, à distance du diagnostic d'IgAN (Biothèques n° DC-2013-1990, NCT05234463).

Cohorte contrôle

Des sera provenant de 13 patients transplantés rénaux pour une pathologie non médiée pas le complément ont été sélectionnés comme population contrôle. Les néphropathies initiales des patients étaient : une polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD) (n=8), une néphropathie diabétique (n=2), une réduction néphronique post-néphrectomie pour un carcinome à cellules claires rénales (n=1), une cystinose (n=1) et une néphropathie tubulo-interstitielle chronique secondaire au lithium (n=1).

Les patients ayant présenté dans l'année précédent ou suivant le prélèvement un évènement infectieux majeur, un rejet, ou un cancer ont été exclus. Les données épidémiologiques, cliniques biologiques concernant la fonction du greffon et de l'immunosuppression ont été collectés (Biothèque n° DC-2013-1990).

Validation du modèle en conditions pathologiques

Nous avons testé le sérum provenant d'un patient porteur d'un SHUa présentant un déficit hétérozygote du FH issu de la cohorte du Centre de Recherche des Cordeliers.

2.2. Modèle endothélial

Conditions pré-analytiques

Les sera étaient collectés sur tubes secs puis placés à température ambiante (maximum 30 min). Après coagulation, les tubes étaient centrifugés à +4°C, 1500 tr/min, pendant 5 min puis le sérum était immédiatement aliquoté et conservé à -80°C jusqu'à l'expérimentation. Les sera utilisés pour la mesure de l'activation *ex vivo* du complément du cellules endothéliales n'avaient pas subi de cycle de congélation/décongélation. Lors de l'expérimentation, les sera étaient décongelés après immersion rapide au bain marie à +37°C, centrifugés 2 min, puis immédiatement déposés sur les cellules endothéliales en culture. Tous les sera utilisés pour cette étude ont fait l'objet du même traitement pré-analytique.

Principe expérimental

Nous avons mesuré l'activation *ex vivo* du complément à la surface de cellules endothéliales quiescentes en culture induite par le sérum de donneurs sains ou de patients porteurs d'une IgAN par un marquage en immunofluorescence (IF) (**Figure 30**).

Dans notre modèle, les cellules endothéliales microvasculaires humaines d'origine dermique (HMEC-1, ATCC®) sont cultivées sur des lamelles de verre dans des plaques de culture à 24 puits selon les instructions du fabricant. Une fois qu'elles ont atteint une confluence d'environ 80-90 %, les cellules sont placées en incubation pendant une nuit dans un milieu sans sérum (OptiMEM®, Gibco™). Après

incubation, les cellules sont lavées avec du PBS1X ++ (Gibco™) puis incubées en présence du sérum de patient ou de donneur sain dilué au 1:3 dans un milieu de culture dépourvu de sérum de veau foetal (SVF) (volume final 300µL/puit) (MCDB 131, Gibco™ ; L-glutamine 10 mM, ATCC® ; pénicilline 100 UI/mL et streptomycine 100 µg/mL, Thermofisher® ; EGF 10 ng/mL, Thermofisher® ; hydrocortisone 1 µg/mL, Sigma®) pendant 60 ou 180 minutes pour évaluer les dépôts membranaires de C3b/iC3b ou de C5b-9, respectivement. Chaque condition expérimentale est testée en duplicats. Afin de limiter la variabilité inter-expérimentation, nous avons ajouté un contrôle interne correspondant à un sérum d'un donneur provenant de l'EFS testé dans chaque expérimentation. La condition positive de dérégulation du complément correspond au même sérum témoin dans lequel a été ajouté un anticorps monoclonal murin anti-FH humain (OX-24) (concentration finale de 75 µg/mL/puit). Les conditions négatives comprenaient : **i)** des cellules incubées sans sérum et **ii)** des contrôles du marquage en immunofluorescence avec des anticorps primaires non spécifiques (IgG de lapin, Jackson).

Après l'incubation, les surnageants sont collectés et conservés immédiatement à -80°C, pour le dosage ultérieur des fragments d'activation du complément C3a et C5a par ELISA (kits C3a et C5a EIA, Microvue®, Quidel). Les cellules sont fixées dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 15 minutes avant la réalisation d'un marquage par immunofluorescence pour la détection des dépôts de C3b/iC3b et de C5b-9 à la surface des cellules endothéliales. Les étapes du marquage en IF comprennent : **1)** un blocage avec ProtBlock™ (ENZO™) pendant 30 minutes, **2)** une incubation avec un anticorps polyclonal (pAb) de lapin anti-C3c humain (rabbit anti-C3c pAb, A032, Dako®, 1:500) ou un anticorps polyclonal de lapin anti-C5b-9 humain (rabbit anti-C5b-9 pAb, 204903, Merck®, 1:100) pendant 2 heures, **3)** suivie d'une incubation avec un anticorps secondaire couplé à l'AF647 (chicken anti-rabbit, AF647 Alexa Fluor, 1:500) pendant 1 heure. Les noyaux ont été colorés avec le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, 1:500, Invitrogen®). Les lamelles sont ensuite montées sur des lames de microscope (milieu de montage Prolong Antifade, Dako), puis scannées (Axioscanner, Zeiss).

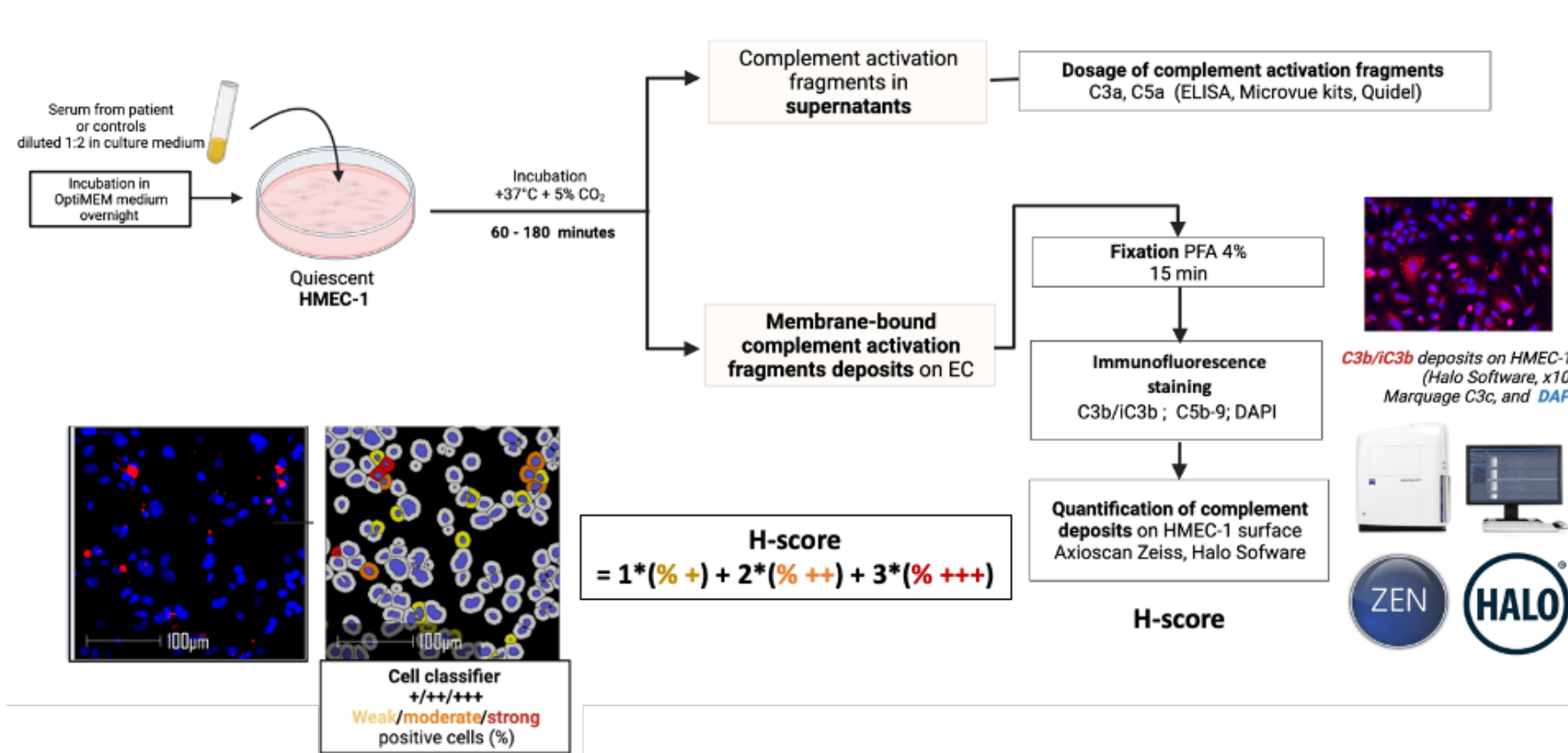


Figure 29. Mesure d'activation du complément *ex vivo* à la surface d'HMEC-1 quiescentes

Principe expérimental de la mesure de l'activation *ex vivo* du complément à la surface de cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMEC-1) quiescentes en culture exposées à du sérum de donneurs sains ou de patients. Durant l'incubation, la cascade du complément s'active et les fragments d'activation du complément C3b/iC3b et C5b-9 se déposent en surface. Après l'incubation, les surnageants sont collectés pour la mesure des fragments d'activation C3a et C5a par ELISA. Les dépôts membranaires sont révélés par un immunomarquage anti-C3c et anti C5b-9. La quantification est ensuite informatisée sur lames numériques. Les résultats sont exprimés en H-score, reflétant l'intensité d'activation du complément à la surface cellulaire. *Abréviations* : HMEC-1 : *human microvascular endothelial cells*, lignée de cellules endothéliales microvasculaires humaines d'origine dermique. PFA : paraformaldéhyde.

Quantification des dépôts et analyse des résultats

Les dépôts de complément à la surface des HMEC-1 sont quantifiés informatiquement sur l'ensemble de la surface de la lamelle (environ 1 cm²) (logiciel Halo®, Indica Labs). Chaque cellule est classée en l'une de quatre catégories en fonction de la taille et de l'intensité des dépôts immuns détectés au niveau membranaire : cellules négatives (0), faiblement positives (1+), modérément positives (2+) ou fortement positives (3+). Les résultats obtenus sont exprimés sous la forme d'un H-score, qui correspond à la somme pondérée du pourcentage de cellules dans chaque catégorie (H-score = 0 x % de cellules (0+) + 1 x % de cellules (1+) + 2 x % de cellules (2+) + 3 x % de cellules (3+), avec une valeur théorique allant de 0 à 300).

Nous avons établi les valeurs seuil de H-score pour définir une activation augmentée du complément à la surface cellulaire en testant 38 donneurs sains. Les normes de H-score sont définies comme la moyenne du H-score + deux écarts-types du sérum des donneurs sains : un H-score > 50 indique des dépôts augmentés de C3b/iC3b et un H-score > 35 indique des dépôts élevés de C5b-9.

Les critères de validation de l'expérimentation étaient : **i)** une valeur mesurée du H-score du sérum témoin (contrôle interne) pour les dépôts de C3b/iC3b ou de C5b-9 inférieure à la moyenne + deux écarts-types de l'ensemble des expérimentations était exclue de l'analyse (H-score C3b/iC3b < 17 et/ou un H-score C5b-9 < 15) ; **ii)** une augmentation des dépôts de C3b/iC3b et C5b-9 du sérum témoin dans la condition positive (OX-24), avec un H-score*2 ; **iii)** une densité cellulaire de 1000 ± 500 cellules/mm² en fin d'expérimentation. Toute expérimentation ne remplissant pas ces critères était exclue de l'analyse finale.

2.3. Tests d'activation du complément par les IgA1 purifiées

Purification des IgA1 sériques

Les IgA1 sériques ont été purifiées à partir de sérum de patients porteurs d'une IgAN (n=15) et de donneurs sains provenant de l'EFS (n=8) par chromatographie d'affinité en utilisant de la résine jacaline. Cette résine lie l'IgA1 humaine mais pas l'IgA2 ni les IgG. Brièvement, des colonnes Pierce de 2mL (référence 89896) sont préparées avec un lit de résine jacaline (Pierce, référence 20395, 2mL de volume de lit de résine) puis équilibrées avec 10mL de PBS 1X. Les sera sont décongelés puis dilués au demi dans du PBS 1X et déposés sur les colonnes. Après décantation du sérum, l'éluat est éliminé puis les colonnes sont lavées par 10 mL de PBS 1X au minimum, jusqu'à obtention d'une absorbance à 280 nm (A_{280}) nulle (spectrophotomètre NanoDrop 2000). Les IgA1 fixées à la résine de Jacaline sont ensuite éluées par un tampon PBS1X 0,1 M alpha-galactose (tampon d'éluion) avec un fractionnement des fractions d'éluion par 1 mL (6 fractions d'éluion). Un aliquot de chaque fraction est conservé pour le dosage ELISA et SDS-Page. Les 3 fractions présentant des A_{280} les plus élevées sont poolées puis dialysées contre du PBS 1X une nuit à +4°C (cassettes de dialyse 10k, 3mL), puis concentrées après centrifugation (tubes Amicon Ultra 4mL 30kDa). Les produits finaux de purification sont dosés par ELISA, aliquotés et conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation. La vérification de la qualité des IgA1 purifiées est évaluée par SDS-Page (Bis Tri 4-12% gradient NuPAGE Invitrogen en conditions réductrices (500 mM dithiothréitol, DTT) ou non réductrices suivi d'une coloration au Bleu de Coomassie.

Tests d'activation du complément en phase fluide

Pour ces expérimentations, 150 µg d'IgA1 purifiées de patients (n=15) ou de donneurs sains (n=8) sont ajoutées dans le sérum d'un même donneur sain (150 µg dans 300µL de sérum) et incubées au bain marie sous agitation à +37°C pendant 30 minutes. La condition positive d'activation du complément est le sérum du donneur testé en présence d'une condition de dérégulation de la voie alterne du complément (OX-24 150µg/mL). Les fragments d'activation du complément C3a et C5a sont dosés extemporanément par ELISA (EIA MicroVue C3a C5a ELISA assay, Quidel) en fin d'expérimentation pour chaque condition expérimentale (**Figure 31**).

Ces conditions expérimentales permettent l'activation des 3 voies du complément.

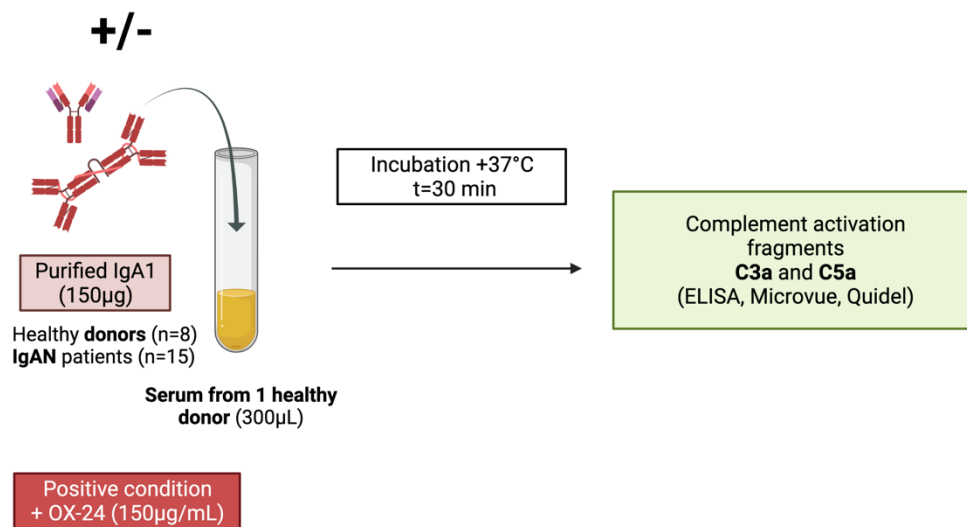


Figure 30. Tests d'activation du complément en phase fluide par les IgA1 purifiées

Abréviations : IgAN : néphropathie à IgA, OX-24 : anticorps monoclonal murin anti FH humain.

Activation *ex vivo* du complément par les IgA1 purifiées à la surface des cellules endothéliales

L'activation *ex vivo* du complément à la surface des cellules endothéliales par les d'IgA1 purifiées issues de patients (n=6) ou de donneurs sains (n=2) a été mesurée dans le modèle précédemment décrit. Pour ces expérimentations, 150 µg d'IgA1 purifiées de patients ou de donneurs sains sont ajoutées dans le sérum d'un même donneur sain (150 µg dans 100µL de sérum/puit, dilution finale au 1/3 dans du milieu de culture). Le sérum supplémenté en IgA1 est ensuite incubé 120 minutes avec des HMEC-1 en culture en présence ou non d'une dérégulation du complément (OX-24). Les dépôts de C3b/iC3b sont ensuite révélés selon la procédure habituelle. Les surnageants de culture cellulaire ont été collectés en fin d'incubation et congelés immédiatement à -80°C pour la mesure ultérieure des fragments d'activation C3a et C5a par ELISA (EIA MicroVue C3a C5a ELISA assay, Quidel).

3. Manuscrit 1

1 **Unraveling complement activation profiles on endothelial cells**
2 **in healthy donors using an *ex vivo* model**

3
4 Anna Duval^{1,2}, Marie Sophie Meuleman¹, Anne Grunenwald¹, Paula Vieira Martins³, Marie-
5 Joëlle Apithy⁴, Sophie Chauvet¹, Lubka Roumenina¹, Sophie Caillard², Véronique Frémeaux-
6 Bacchi^{1,3}.

7
8 1 Centre de Recherche des Cordeliers, Inserm UMR S1138, Paris, France.

9 2 Department of Nephrology Dialysis and Transplantation, University Hospital of Strasbourg,
10 Strasbourg, France.

11 3 Service d'immunologie biologique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital
12 Européen Georges Pompidou, Paris, France.

13 4 Établissement Français du sang, Strasbourg, France

14 5 Service de Néphrologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

15
16 *Corresponding author:* Dr Anna Duval, Department of Nephrology, Dialysis and
17 Transplantation, Strasbourg University Hospitals, 1 place de l'Hôpital 67100 Strasbourg,
18 France. anna.duval@chru-strasbourg.fr

19 *Running title:* *ex vivo* complement activation profiles in healthy donors

20 *Keywords:* Complement, Genetic, Rare variants, endothelium, *ex vivo* assay, therapeutics

21 Abstract word count:250 ; text word count: 3633

22 Number of tables :3, Figures:4

23 Supplemental figures : 4

24 **Abbreviations**

- 25 ADP: adenosine diphosphate
- 26 AMD: age-related macular degeneration
- 27 C3G: C3 glomerulonephritis
- 28 CFH: complement factor H gene
- 29 CFHR5: complement factor H related protein 5 gene
- 30 CFB: complement factor B gene
- 31 CFI: complement factor I gene
- 32 CR1: complement receptor 1, or CD35
- 33 DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
- 34 DAF: decay-accelerating factor, or CD55
- 35 FH: factor H
- 36 FI: factor I
- 37 GnomAD: Genome Aggregation database
- 38 H: CFH haplotype
- 39 HMEC-1: human microvascular endothelial cells
- 40 mAb: monoclonal antibody
- 41 MAF: minor allele frequency
- 42 MCP: membrane cofactor protein, or CD46
- 43 NGS: next generation sequencing
- 44 OX-24: murine anti human FH monoclonal antibody
- 45 RBCs: red blood cells
- 46 SD: standard deviation
- 47 VUS: variant of unknown significance
- 48

49

50 **Abstract** (250 words)

51

52 **Background.** Functional approaches to properly examine individual's susceptibility to
53 complement dysregulation are limited. **Methods.** We assessed *ex vivo* complement activation
54 induced by sera from 38 healthy donors on resting microvascular endothelial cells (HMEC-1)
55 with or without complement dysregulation (OX-24 mAb). Following incubation,
56 immunofluorescence was used to reveal and quantify membrane-bound C3c (evaluating
57 C3b/iC3b) and C5b-9 with a computer-assisted method (H-score). Additionally, complement
58 anaphylatoxins (C3a and C5a) were quantified in cell supernatants by ELISA. Further
59 exploration of *ex vivo* complement activation profiles were conducted by *next generation*
60 *sequencing* of a panel of alternative pathway genes in 32 donors. **Results.** Increase in
61 complement deposition on HMEC-1 surface was defined for a $H\text{-score}_{C3c} > 50$ and/or a $H\text{-score}_{C5b,9} > 30$. Combined analysis of C3b/iC3b and C5b-9 deposition in 35 donors showed that
62 one donor (2.8%) had an isolated increase in C3b/iC3b deposits, 3 (8.6%) had an isolated
63 increase in C5b-9 deposits and one other (2.8%) had both increased C3b/iC3b and C5b-9
64 deposition. Genetic analysis of 32/38 donors revealed 3 heterozygous rare or low frequency
65 missense variants in CFH (p.N1050Y and p.R1210C) and CFI (p.A76G) in 3/5 donors (60%)
66 with increased complement deposition. **Conclusion.** Our *ex vivo* complement activation model
67 allowed the identification of distinct complement activation profiles among healthy donors,
68 revealing genetic susceptibility in 3 donors. This new dynamic and functional model provides
69 an exciting avenue for exploring the mechanisms governing complement dysregulation in
70 various pathologies. **Funding:** This work was supported by a grant from the *Fondation pour la*
71 *Recherche Médicale* (FDM202006011155).

72
73

74

75 **Introduction**

76

77 Maintaining a fine balance between activation and regulation of the complement system
78 on the surface of endothelial cells is essential for maintaining physiological integrity (1,2).
79 However, this finely tuned compromise can be disrupted, resulting in increased complement
80 activation and potential self-inflicted damage. Complement dysregulation is best exemplified
81 by atypical hemolytic and uremic syndrome (aHUS), a prototypical complement dysregulation
82 disorder that is often due to genetic susceptibility in approximately 50% of patients (3–7). In
83 addition, complement dysregulation is involved in a wide range of pathologies, with varying
84 degrees of involvement (8–12).

85 An individual's susceptibility to develop a complement-mediated disease may be
86 influenced by a genetic predisposition that slightly alters the overall activity of the complement
87 cascade. Too little activation may predispose to infections (13,14), while too much may
88 predispose to the development of complement-mediated diseases such as aHUS, C3
89 glomerulonephritis (C3G) or age-related macular degeneration (AMD) (15–19). However, the
90 intricate mechanisms underlying the observed inter-individual differences in susceptibility to
91 complement dysregulation remain incompletely understood. This limited understanding may
92 be attributed, at least in part, to the significant challenge associated with the diagnosis of
93 complement dysregulation.

94 Currently, biological assessment of the involvement of the complement system and its
95 activation level in an individual is based on different methods used in specialized laboratories
96 (20,21). These methods include the quantification of complement cascade components (e.g.,
97 C3 and C4 consumption) and their activation fragments (e.g., increased sC5b-9) in plasma using
98 ELISA or immuno-nephelometry and the performance of functional hemolytic assays to
99 measure the ability of plasma to induce lysis of sensitized red blood cells (RBCs) (22).

4

100 Nonetheless, quantification of complement activation fragments and hemolytic tests
101 provide only indirect evidence of past or recent complement activation. Furthermore, these tests
102 may give normal results, particularly when complement activation occurs at suboptimal
103 levels(3).

104 New functional tools are then needed to diagnose complement dysregulation and to
105 assess the dynamics of the complement cascade in an individual. *Ex vivo* models to measure
106 serum-induced complement activation hold intriguing potential(23–29). However, models to
107 properly evaluate healthy donors' susceptibility to complement activation are limited(30).

108 In this study, we present a functional assay designed to measure serum-induced *ex vivo*
109 complement activation, based on complement physiology(29). The complement system present
110 in serum activates in a cascade process, resulting in the release of complement activation
111 fragments into the supernatant and complement deposition on the cell surface. In our
112 experimental model, quiescent endothelial cells serve as a regulatory surface for complement.
113 Quantitative analysis of membrane-bound complement activation fragments (C3b/iC3b and
114 C5b-9) on endothelial cells is used as an indicator of the overall capacity of the complement
115 cascade to self-activate during the incubation period.

116 In this model, we aimed to explore the inter-individual susceptibility to complement
117 activation of healthy donors. To enhance our comprehension of the observed disparities in *ex*
118 *vivo* complement activation among donors, we integrated a genetic approach, revealing a
119 genetic susceptibility in half of donors with an increased *ex vivo* complement activation.

120

121

122 **Methods**

123

124 *Study cohort*

125 Healthy donors corresponded to eligible candidates for living kidney donation. Donors
126 were included prior to donation or during the follow-up at distance from kidney donation. All
127 donors have undergone a comprehensive medical evaluation and follow-up with a complete
128 biological and renal work-up. Epidemiological information about the donor and the potential
129 recipient, as well as their relationship was collected. Potential donors for a relative suffering
130 from a renal disease, possibly linked to a genetic susceptibility affecting complement genes
131 (e.g., atypical hemolytic and uremic syndrome or C3 glomerulonephritis), were not considered.
132 Written consent was obtained from all tested donors for blood and DNA collection (DC-2013-
133 1990).

134 To validate the *ex vivo* model, we additionally tested the sera from patients. Sera from
135 10 patients treated with eculizumab were used to validate the specificity of the C5b-9 detection
136 on endothelial cells. To assess the relevance of the model under pathological conditions, we
137 additionally tested the sera from one patient with aHUS collected in the acute phase.

138

139 *Sample collection*

140 Whole blood from healthy donors or patients were collected in BD vacutainer collection
141 tubes and centrifuged at + 4°C. Sera were aliquoted and promptly frozen at -80°C until
142 utilization. Sample that are hemolyzed, icteric or lipemic were not considered for biological
143 assessment.

144

145 *Measurement of ex vivo complement activation on endothelial cells and in supernatants*

146 We measured *ex vivo* complement activation on resting endothelial cells after incubation
147 with sera from healthy donors or patients (**Supplemental Figure S1**). To ensure accurate
148 results, all sera assayed in this model were free from freeze-thaw cycles prior to testing.

149 Briefly, human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1, ATCC®) were
150 cultured on glass coverslips in 24-well plates according to the manufacturer's instructions. The
151 cells were regularly tested for mycoplasma and manipulated between 3 and 10 passages. After
152 reaching 80-90% confluence, the cells were incubated overnight in serum-deprived medium
153 (OptiMEM®, Gibco™). The cells were then washed with PBS1X +/+ (Gibco™). During the
154 experiment, the sera tested were rapidly thawed and immediately applied to the cultured cells
155 at a final dilution of 1:3 in culture medium (MCDB 131, Gibco™; L-glutamine 10 mM,
156 ATCC®; penicillin/streptomycin 100 UI/mL/100µg/mL, Thermofisher®; EGF 10 ng/mL,
157 Thermofisher®; hydrocortisone 1µg/mL, Sigma®). Each condition was tested in duplicate.
158 HMEC-1 cells were then incubated for either 60 or 180 minutes to assess C3b/iC3b or C5b-9
159 deposition, respectively. One healthy donor serum was used as an internal control in each
160 experiment. The positive condition indicating complement dysregulation was replicated by
161 adding a mouse anti-human FH monoclonal antibody (OX-24, final concentration 75µg/mL) to
162 the healthy donor serum. Negative conditions included: i) cells incubated without serum and ii)
163 immune labelling controls with irrelevant antibodies (rabbit IgG, Jackson). After incubation,
164 cells supernatants are collected and immediately frozen at -80°C for subsequent measurement
165 of complement anaphylatoxins (C3a and C5a) by ELISA. Cells were fixed in 4%
166 paraformaldehyde for 15 minutes and immunofluorescence staining was used to detect
167 C3b/iC3b and C5b-9 deposition on the HMEC-1 surface. This was achieved by a series of steps
168 including blocking with ProtBlock™ (Enzo™) for 30 minutes, incubation with rabbit polyclonal
169 anti-human C3c antibody (Dako®, 1:500) or rabbit polyclonal anti-human C5b-9 antibody
170 (Merck®, 1:100) for 2 hours, followed by incubation with chicken anti-rabbit antibody (AF647,

171 Alexa Fluor, 1:500) for 1 hour. Cell nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phénylindole
172 (DAPI, 1:500, Invitrogen®). The coverslips were then mounted on microscope slides.
173 Automated image acquisition of the slides was carried out using a fluorescence scanner
174 (Axioscanner, Zeiss). Complement deposition on the endothelial cells was then quantified on
175 the digital slides using standardized computer-assisted analysis (Halo® software, Indica Labs).
176 Uniform image acquisition protocols and quantification algorithms were applied consistently
177 across all experiments. Deposits were quantified over the entire surface of the slide
178 (approximately 1 cm²), excluding any areas affected by artefacts. Each cell was classified into
179 one of four categories based on the size and intensity of the immune deposits on its surface:
180 negative (0), weak (1+), moderate (2+) or strong (3+) positive cell. The final results were
181 expressed as an H-score, which is the weighted sum of the percentage of cells in each category.
182 Further details about the control conditions of the *ex vivo* complement activation model are
183 given in the **Supplementary Figure S2**.

184

185 *Measurement of complement anaphylatoxins C3a and C5a in the supernatants*

186 Supernatants obtained after 60 minutes and 180 minutes of incubation were quantified
187 for C3a and C5a anaphylatoxins levels by ELISA (C3a and C5a EIA MicroVue, Quidel®).
188 Concentrations are presented in μg or ng/mL of serum. Complement anaphylatoxins were
189 assessed under conditions with or without complement dysregulation. Elevated complement
190 activation in supernatants was defined as concentrations exceeding the mean plus two standard
191 deviations (SD) of those measured in sera from healthy donors.

192

193 *Genetic analysis*

194 Patients with available DNA sample were included for a genetic sequencing of a home-
195 made panel of the main alternative pathway genes (CFB, C3, CFH, CFI, CFHR5) by *next*

8

196 *generation sequencing*, as previously described (31). Variant with a minor allele frequency
197 (MAF) below 1% in the Genome Aggregation database (GnomAD, available from:
198 <https://gnomad.broadinstitute.org>) were defined as rare variants. Variants with a low frequency
199 (defined for MAF between 1 and 5%) were also reported.

200

201 *Definition of a threshold for ex vivo complement activation measurement*

202 The threshold for increased complement activation in the *ex vivo* model was defined as
203 the mean H-score plus two standard deviations (SD) from the sera of healthy donors. Donors
204 with rare or low frequency variants in the complement genes CFH, CFI, and the two extremes
205 were not considered for threshold determination for complement deposition.

206

207 *Statistical Analyses*

208 Variables are reported as median and interquartile range [IQR] or means and standard
209 deviation (SD) as indicated. Comparison of the level of complement activation biomarkers was
210 performed using a Mann-Whitney test (unpaired data) or a Wilcoxon test (paired data). The
211 correlation between the level of complement anaphylatoxins and complement deposition on
212 HMEC-1 surface was analyzed using the Pearson's correlation. The level of complement
213 deposition between groups donors carrying or not a variant in the complement alternative
214 pathway genes were compared using an ANOVA. For all analysis, a two-tailed alpha risk of p
215 < 0.05 was considered as statistically significant. All analysis were performed with GraphPad
216 Prism Software V9.3.1 (San Diego, CA).

217

218 *Data availability*

219 The dataset and experimental protocol supporting the findings of this study are available
220 on reasonable request from the corresponding author AD.

221
222 **Results**

223

224 *Study cohort*

225 Forty donors were enrolled in this study. Two of them were excluded due to a hemolyzed
226 aspect of the collected serum. Consequently, a definitive group of 38 healthy donors were
227 evaluated for *ex vivo* complement activation upon thawing. Detailed characteristics of the study
228 cohort are given in **Table 1**. The overall sex ratio was balanced (19 males and 19 females).
229 Serum collection was performed prior to kidney donation in half of them. The median age at
230 serum collection was 56.5 [45.3-62.9] years. Overall, 29 donors (76.3%) were first-degree
231 related with their recipient. The initial nephropathies of the related recipient predominantly
232 included: diabetic nephropathy (n=5), IgA nephropathy (n=7) and autosomal dominant
233 polycystic kidney disease (n=5). Extensive medical check-up was negative in all donors and
234 all were eligible for kidney donation. Post-operative recovery was straightforward and none of
235 the donors experienced any noticeable complications. None of the donors showed signs of
236 thrombotic microangiopathy following kidney donation.

237

238 *Ex vivo complement activation on endothelial cells in healthy donors*

239 *Ex vivo* complement activation has been investigated in 38 healthy donors. The median
240 H-score_{C3c} was 18.3 [12.6-35.2] and the median H-score_{C5b-9} was 14.2 [10.8-20.9] with
241 heterogenous intensities between donors.

242 To validate the sensitivity of our model in detecting complement activation, we
243 introduced a complement dysregulation condition by adding an anti-FH antibody (OX-24) for
244 each tested serum. This antibody targets the N-terminal domains of FH, which are critical for
245 its binding to C3b. The addition of OX-24 then alters the FH capacity to downregulate the
246 complement alternative pathway and its amplification loop in the supernatant and on the

247 endothelial surface. The addition of OX-24 to sera significantly increased the deposition of C3b
248 and C5b-9 in healthy donors ($p < 0.001$) (**Figure 1. Panels A-C**). This finding illustrates the
249 ability of the complement cascade to become activated within the sera analyzed. Moreover, this
250 also shows that complement activation measured on the HMEC-1 surface is dependent on FH
251 regulatory activity and involves the complement alternative pathway.

252

253 *Ex vivo complement activation on endothelial cells in patients treated with eculizumab show*
254 *efficient blockade of the terminal pathway*

255 Ten patients treated with eculizumab were tested for *ex vivo* complement activation.
256 These patients were treated with C5-blockade for: aHUS (n=6), post-transplant thrombotic
257 microangiopathy (n=2) and progressive C3 glomerulonephritis (n=2). In patients treated with
258 eculizumab, the median C3b/iC3b deposition ($H\text{-score}_{C3c}$) was 17.1 [14.1-23.1] and the median
259 C5b-9 deposition ($H\text{-score}_{C5b-9}$) was 5.2 [4.2-6.0]. The overall intensity of C3b/iC3b and C5b-9
260 deposition was similar between the 10 patients treated with eculizumab and healthy donors
261 ($p = 0.66$ for the C3c and $p = 0.37$ for C5b-9 H-scores, respectively). In patients under C5-
262 blockade, the addition of OX-24 significantly enhanced C3b/iC3b ($p < 0.0020$) but not C5b-9
263 deposition on the endothelial surface ($p = 0.56$) (**Figure 1. Panels D-F**). This confirms the
264 efficient blockade of terminal pathway engagement and the specificity of the measured C5b-9
265 deposition in this model.

266

267 *Complement anaphylatoxins in supernatants and complement deposition on HMEC-1 are*
268 *positively correlated*

269 Addition of OX-24 significantly increased the release of complement anaphylatoxins
270 C3a and C5a in the supernatants (42.1 [31.2-50.9] mg/mL vs 8.4 [5.2-13.0], $p < 0.0001$ and
271 [561-1111] vs 104 [80-143] ng/mL, $p < 0.0001$), providing a sign of the formation of active

11

272 complement C3 and C5 convertases during the incubation time (**Figure 2, Panels A-B**). Signs
273 of activity of the C3 and C5 convertases (release of C3a and C5a in the supernatants were
274 positively correlated ($p < 0.001$, $r^2 0.46$) (**Figure 2, Panel C**).

275 Furthermore, complement activation measured on the solid phase and in supernatants
276 C3a and C3b/iC3b, as well as terminal pathway components C5a and C5b-9 were positively
277 correlated (p -value < 0.001) (**Figure 3**). Nonetheless, the correlation between terminal pathway
278 components C5a and C5b-9 was more accurate than the correlation between C3b/iC3b and C5b-
279 9 ($r^2 0.65$ and $r^2 0.19$, respectively). This substantiates the reliability of C5b-9 measurement on
280 the cell surface.

281

282 *Distinct complement activation profiles amongst healthy donors*

283 Increased complement C3b/iC3b deposition was defined for a $H\text{-score}_{C3c}$ above 50 and
284 increase C5b-9 deposition was defined for a $H\text{-score}_{C5b-9}$ above 30. Thirty-five donors were
285 evaluated for both C3b/iC3b and C5b-9 deposition. One additional donor with an increase in
286 C3b/iC3b deposition could not be tested for C5b-9 deposition (insufficient material).

287 Combined analysis of membrane-bound C3b/iC3b on the endothelial cell surface using
288 these thresholds allowed us to distinguish several complement activation profiles among the
289 tested healthy donors. Overall, 30/35 donors (85.7%) presented both C3c and C5b-9 deposition
290 considered in the normal range. By contrast, 5 donors (14.3%) showed elevated complement
291 deposition on HMEC-1 surface. Four of them had either an isolated increase in C3b/iC3b
292 deposition ($n=1$) or in C5b-9 deposition ($n=3$) (**Figure 4. Panel A**). One donor showed both
293 increased C3b/iC3b and C5b-9 deposits.

294 In condition of complement alternative pathway dysregulation by OX-24, all but 3
295 donors showed both increased C3b/iC3b and C5b-9 deposition on the cell surface above defined
296 thresholds ($p < 0.001$) (**Figure 4. Panel B**).

12

297

298 *Complement alternative pathway genetics.*

299 Genetic sequencing of a panel of alternative pathway genes was performed in 32/38
300 donors (84.2%). Genetic analysis revealed that 7 donors were heterozygous for a rare variant
301 (MAF <1%) in the complement genes (**Table 2 and 3**), two of them carried two rare variants
302 (donors D2, D21) (**Supplemental Table S1**). Seven donors harboured at least one variant with
303 a low frequency (MAF 1-5%), the majority of them (n=5) had a CFB variant. Two donors
304 carried a heterozygous missense variant located in the CFH gene (CFH p.R1210C, MAF
305 0.015% previously described as pathogenic (30,32–36), CFH p.N1050Y, MAF 1.47%) and 3
306 carried a heterozygous variant in the CFI gene (CFI p.A76G, novel, and CFI p.P553S, MAF
307 0.136% in two donors).

308

309 *Identification of different levels of endothelial cell protection amongst healthy donors*

310 The combined analysis of complement activation profile in *our ex vivo* model revealed
311 that 3 of the 5 donors (60%) with increased levels of complement activations fragments detected
312 on HMEC-1 surface, in fact had a variant affecting genes of the complement alternative
313 pathway (**Figure 4**). Two of them were the 2 carriers of CFH variants and the other one had a
314 combination of two rare variants (CFI p.A76G, novel and C3 p.D1457H, MAF 0.036%). The
315 factor I (FI) plasmatic level of the donor with the CFI p.A76G variant was normal. Moreover,
316 the two donors with a CFH variant showed a similar pattern of complement deposition on the
317 endothelial cell surface: both of them showed high levels of C5b-9 deposition ($H\text{-score}_{C5b-9} > 30$)
318 but normal C3b/iC3b deposition. By contrast, C3b/iC3b but not C5b-9 tended to be higher in
319 donors carrying a variant of CFI ($p=0.080$). All the other donors carrying a rare or low
320 frequency variant in the other genes (C3, CFB, CFHR5) had complement deposition measured
321 in the normal range. No variant was identified in the 3 donors with an isolated increased

13

322 C3b/iC3b and in the donor with elevated C5b-9 and C3b/iC3b. No variant was identified in the
323 3 donors whom serum did not activate *ex vivo* following addition of OX-24.

324

325 *Applicability of the model in complement-mediated diseases*

326 We further validated this *ex vivo* complement activation model in a pathological context
327 by testing serum taken from one aHUS patient in acute phase. Genetic analysis revealed a rare
328 pathogenic nonsense variant in the CFH gene (p.R215*, heterozygous), leading to a FH
329 quantitative and functional defect. Study of complement activation fragment deposits in the *ex*
330 *vivo* model demonstrated significant spontaneous deposits of C3 (H-score_{C3c} = 180) and an
331 increase in C5b-9 deposition (H-score_{C5b-9} = 39) (**Supplemental Figure S4**).

332 **Discussion**

333 A complement dysregulation is involved in many pathologies. However, functional
334 models to properly evaluate the precise mechanisms are lacking, particularly when routine
335 complement assessments appear strictly normal. Here, we present a novel *ex vivo* model for
336 studying complement activation, which combines the analysis of C3 and C5b-9 endothelial
337 depositions. This FH-dependent model has allowed us to differentiate distinct *ex vivo* profiles
338 of complement activation and regulation amongst healthy donors. Moreover, this model has
339 unveiled a possible genetic susceptibility in three donors (60%) exhibiting elevated complement
340 deposition.

341 In the proposed model, microvascular endothelial cells (HMEC-1) are exposed to sera
342 from healthy donors. Complement cascade activation spontaneously occurs within the tested
343 serum during incubation, resulting in the generation of complement activation and degradation
344 fragments measurable in the supernatants and on the surface of endothelial cells.

345 In this model, the substantial increase in complement activation fragments either on
346 solid phase or in supernatant following FH inhibition by OX-24 confirms the FH-dependence
347 of the model and experimental conditions conducive to complement alternative pathway
348 activation (37). This pathway plays a pivotal role in complement activation, initiating and
349 amplifying itself within minutes, irrespective of the initial pathway, unless effectively and
350 promptly regulated. Complement activation within the serum generates variable amounts of
351 C3b which deposits on the cell surface. Endothelial cells must then regulate these C3b deposits
352 to prevent complement amplification. This key control step is facilitated by the recruitment of
353 circulating regulators such as FH and FI to the cell surface and by membrane regulators (38).

354 Quiescent endothelial cells serve as a regulatory surface for complement. Remarkably,
355 HMEC-1 express membrane regulators including Membrane Cofactor Protein (MCP, or
356 CD46), Decay-Accelerating Factor (DAF, or CD55) and CD59. This cell line exhibits minimal
357 expression of Complement Receptor 1 (CR1, or CD35) (29). Consequently, this regulatory
358 surface remains consistent across all experimental conditions. The complement activation
359 biomarkers measured on the HMEC-1 surface mirror the overall potential of the complement
360 cascade within the studied sera to activate and regulate. Complement activation on the
361 endothelial cell surface is, therefore, heavily reliant on circulating regulators (e.g. FH and FI)
362 provided by the tested serum.

363 The analysis of complement activation profiles allowed us to distinguish three activation
364 profiles: a balanced activation and regulation profile with normal levels of C3b/iC3b and C5b-
365 9 deposits (85.7%), a profile with predominant C3 deposits (5.7%), and a profile with
366 predominant C5b-9 deposits (8.6%). Interestingly, three patients exhibited remarkably elevated
367 levels of C5b-9 deposits compared to C3 deposits. This activation profile supports the
368 hypothesis of a rapid propensity for the transition from C3 to C5 convertases on the endothelial
369 cell surface in these patients. Noticeably, 2/3 patients with this profile exhibited a variant in the

370 C-terminal region of FH, a region particularly important for the FH regulatory activity on the
371 endothelium. One of these two identified variants, the CFH p.R1210C may increase the
372 susceptibility to develop aHUS, a condition in which terminal pathway components have a
373 substantial role in complement-induced endothelial injury (2,39,40). This variant has been
374 proven as pathogenic in *in vitro* functional studies (33,35,36). The CFH p.R1210C variant
375 considerably alters the FH ability to bind to C3b, to dissociate formed C3 convertases and to
376 inactivate membrane-bound C3b with FI. The presence of the CFH p.R1210C in the healthy
377 donor could have favored the engagement of the terminal pathway and C5b-9 deposition. The
378 CFH p.N1050Y variant was found in another donor. This variant may be protective regarding
379 the susceptibility to develop AMD (41). This variant, classified as a variant of unknown
380 significance (VUS), has, to date, no functional impact identified *in vitro* (42). This does not rule
381 out, however, the possibility of more subtle functional impairments that are not assessed by
382 current functional tests. Conversely, the three patients having a CFI variant tended to have
383 increased C3b/iC3b deposition without increased C5b-9. It is plausible that minor alterations in
384 FI regulatory capacity participates in the delayed elimination of C3b/iC3b from the cell surface.
385 This warrants further investigations.

386 Endothelial models have been previously proposed to explore genetic susceptibility to
387 complement activation. In a recent study (30), relatives of aHUS patients carrying variants in
388 aHUS associated genes exhibited increased C5b-9 deposits on adenosine-diphosphate (ADP)-
389 preactivated HMEC-1 compared to controls. The applicability of our model in detecting genetic
390 susceptibility to complement *ex vivo* activation beyond from CFH and CFI genes requires
391 further clarification.

392 However, it is important to emphasize that interpreting the disparities observed between
393 donors solely based on complement gene variants may offer an incomplete view of the intricate
394 phenomena involved in complement activation and regulation on the endothelial surface. This

395 is exemplified by the observation of donors (n=2) with elevated endothelial deposits, despite
396 the absence of identified genetic susceptibility factors. These observations underscore the
397 complexity of factors influencing cascade activity, with genetic factors being just one of the
398 contributors. This highlights the potential of endothelial models, which provide a dynamic and
399 physiologically relevant perspective on complement cascade function.

400 In conclusion, the novel insights offered by this *ex vivo* complement activation model
401 hold potential for discerning interindividual differences in degrees of endothelial protection
402 against complement activation. This model could be a valuable tool for studying a multitude of
403 complement-linked disorders.

404

405 **Author contributions**

406 The research study was designed by VFB and LR. AD performed the experiments,
407 conducted the data analysis and wrote the original manuscript. AD, MJA, PVM, and VFB
408 collected the biological samples, clinical data, and/or data related to complement biology and
409 genetics. All authors contributed to the conception of the manuscript and approved the final
410 version.

411

412 **Acknowledgements**

413 The authors express their gratitude to Christophe Klein and all the members of the
414 Histology, Cell Imaging and Flow Cytometry (CHIC) platform at the Cordeliers' Research
415 Center (Sorbonne University, Paris, France) for their expertise in cell imaging. Special thanks
416 are extended to Tania Robe-Rybkiné for her invaluable assistance and proficiency in cell
417 culture. The authors thank Audrey Kochman and Sophie Jaeger (Department of Nephrology,
418 Dialysis and Transplantation, University Hospital of Strasbourg) for their technical support.
419 The authors also acknowledge the contributions of all the patients, healthcare professionals and
420 collaborators involved in this study. This research received funding from a grant provided by
421 the *Fondation pour la Recherche Médicale* (FDM202006011155)

422

423

424 **Disclosure**

425 AD has received fees from Alexion Pharmaceuticals for congress travel. SC has
426 received fees from Alexion Pharmaceuticals for advisory boards and congress travel. VF-B has
427 received fees from Alexion Pharmaceuticals, Biocryst, Roche, Apellis, Novartis and Baxter for
428 invited lectures and/or board membership and is the recipient of a research grant from Alexion
429 Pharmaceuticals. All the other authors have no conflict of interest to declare.

430

431

432 **References**

433

- 434 1. Schmidt CQ, et al. Complement and the prothrombotic state. *Blood*. 2022 Mar
435 31;139(13):1954–72.
- 436 2. Blasco M, et al. Complement Mediated Endothelial Damage in Thrombotic
437 Microangiopathies. *Front Med*. 2022;9:811504.
- 438 3. Fremeaux-Bacchi V, et al. Genetics and Outcome of Atypical Hemolytic Uremic
439 Syndrome: A Nationwide French Series Comparing Children and Adults. *Clin J Am Soc
440 Nephrol*. 2013;8(4):554–62.
- 441 4. Fakhouri F, et al. Haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet*. 2017;390(10095):681–96.
- 442 5. Fakhouri F, et al. Thrombotic microangiopathy in aHUS and beyond: clinical clues from
443 complement genetics. *Nat Rev Nephrol*. 2021;17(8):543–53.
- 444 6. Lemaire M, et al. Recessive mutations in DGKE cause atypical hemolytic-uremic
445 syndrome. *Nat Genet*. 2013;45(5):531–6.
- 446 7. Loirat C, et al. Atypical hemolytic uremic syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6(1):60.
- 447 8. Poppelaars F, Thurman JM. Complement-mediated kidney diseases. *Mol Immunol*. 2020
448 Dec;128:175–87.
- 449 9. Gavriilaki E, et al. Advancing therapeutic complement inhibition in hematologic diseases:
450 PNH and beyond. *Blood*. 2022;139(25):3571–82.
- 451 10. Duval A, Frémeaux-Bacchi V. Complement biology for hematologists. *Am J Hematol*.
452 2023;98(S4).
- 453 11. Mahmood U, et al. Monoclonal gammopathy of renal significance triggering atypical
454 haemolytic uraemic syndrome. *Nephrol Carlton Vic*. 2017;22 Suppl 1:15–7.
- 455 12. Timmermans SAMEG, van Paassen P. The Syndromes of Thrombotic Microangiopathy: A
456 Critical Appraisal on Complement Dysregulation. *J Clin Med*. 2021;10(14):3034.
- 457 13. Truedsson L. Classical pathway deficiencies - A short analytical review. *Mol Immunol*.
458 2015;68(1):14–9.
- 459 14. Rosain J, et al. Complement deficiencies and human diseases. *Ann Biol Clin (Paris)*.
460 2014;(3):271–80.
- 461 15. Hageman GS, et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (
462 *HF1/CFH*) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad
463 Sci*. 2005;102(20):7227–32.

19

- 464 16. Pappas CM, et al. Protective chromosome 1q32 haplotypes mitigate risk for age-related
465 macular degeneration associated with the CFH-CFHR5 and ARMS2/HTRA1 loci. *Hum*
466 *Genomics*. 2021;15(1):60.
- 467 17. Rodríguez De Córdoba S. Genetic variability shapes the alternative pathway complement
468 activity and predisposition to complement-related diseases. *Immunol Rev*. 2023;313(1):71–
469 90.
- 470 18. Triebwasser MP, et al. Rare Variants in the Functional Domains of Complement Factor H
471 Are Associated With Age-Related Macular Degeneration. *Investig Ophthalmology Vis Sci*.
472 2015;56(11):6873.
- 473 19. Osborne AJ, et al. Statistical Validation of Rare Complement Variants Provides Insights
474 into the Molecular Basis of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome and C3 Glomerulopathy.
475 *J Immunol*. 2018;200(7):2464–78.
- 476 20. Fakhouri F, Frémeaux-Bacchi V. Monitoring Complement Activation: The New
477 Conundrum in Thrombotic Microangiopathies. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019;14(12):1682–
478 3.
- 479 21. Fakhouri F, et al. How I diagnose and treat atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*.
480 2023;141(9):984–95.
- 481 22. Roumenina LT, et al. Alternative complement pathway assessment in patients with atypical
482 HUS. *J Immunol Methods*. 2011;365(1–2):8–26.
- 483 23. Galbusera M, et al. An Ex Vivo Test of Complement Activation on Endothelium for
484 Individualized Eculizumab Therapy in Hemolytic Uremic Syndrome. *Am J Kidney Dis Off*
485 *J Natl Kidney Found*. 2019;74(1):56–72.
- 486 24. Gastoldi S, et al. An ex vivo test to investigate genetic factors conferring susceptibility to
487 atypical haemolytic uremic syndrome. *Front Immunol*. 2023;14:1112257.
- 488 25. Timmermans SAMEG, et al. C5b9 Formation on Endothelial Cells Reflects Complement
489 Defects among Patients with Renal Thrombotic Microangiopathy and Severe Hypertension.
490 *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(8):2234–43.
- 491 26. Timmermans SAMEG, et al. Diagnostic and Risk Factors for Complement Defects in
492 Hypertensive Emergency and Thrombotic Microangiopathy. *Hypertension*.
493 2020;75(2):422–30.
- 494 27. Palomo M, et al. Complement Activation and Thrombotic Microangiopathies. *Clin J Am*
495 *Soc Nephrol CJASN*. 2019;14(12):1719–32.
- 496 28. Yuan X, et al. Ex vivo assays to detect complement activation in complementopathies. *Clin*
497 *Immunol*. 2020;221:108616.
- 498 29. Meuleman MS, et al. Ex Vivo Test for Measuring Complement Attack on Endothelial Cells:
499 From Research to Bedside. *Front Immunol*. 2022;13:860689.
- 500 30. Gastoldi S, et al. An ex vivo test to investigate genetic factors conferring susceptibility to
501 atypical haemolytic uremic syndrome. *Front Immunol*. 2023;14:1112257.

- 502 31. Vieira-Martins P, et al. Defining the genetics of thrombotic microangiopathies. *Transfus*
503 *Apher Sci.* 2016;54(2):212–9.
- 504 32. Merinero HM, et al. Complete functional characterization of disease-associated genetic
505 variants in the complement factor H gene. *Kidney Int.* 2018;93(2):470–81.
- 506 33. Martinez-Barricarte R, et al. The Complement Factor H R1210C Mutation Is Associated
507 With Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(3):639–46.
- 508 34. Biggs RM, et al. An Evaluation of the Complement-Regulating Activities of Human
509 Complement Factor H (FH) Variants Associated With Age-Related Macular Degeneration.
510 *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2022;63(12):30.
- 511 35. Ferreira VP, et al. The Binding of Factor H to a Complex of Physiological Polyanions and
512 C3b on Cells Is Impaired in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *J Immunol.*
513 2009;182(11):7009–18.
- 514 36. Sánchez-Corral P, et al. Structural and Functional Characterization of Factor H Mutations
515 Associated with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Am J Hum Genet.*
516 2002;71(6):1285–95.
- 517 37. Alsenz J, et al. Structural and functional analysis of the complement component factor H
518 with the use of different enzymes and monoclonal antibodies to factor H. *Biochem J.*
519 1985;232(3):841–50.
- 520 38. Merle NS, et al. Complement System Part I “ Molecular Mechanisms of Activation and
521 Regulation. *Front Immunol* 2015;6.
- 522 39. Leon J, et al. Complement-driven hemolytic uremic syndrome. *Am J Hematol.* 2023;98
523 Suppl 4:S44–56.
- 524 40. Mahajan S, et al. Local complement factor H protects kidney endothelial cell structure and
525 function. *Kidney Int.* 2021;100(4):824–36.
- 526 41. Yu Y, et al. Protective coding variants in CFH and PELI3 and a variant near CTRB1 are
527 associated with age-related macular degeneration†. *Hum Mol Genet.* 2016;25(23):5276–
528 85.
- 529 42. Martín Merinero H, et al. Functional characterization of 105 factor H variants associated
530 with aHUS: lessons for variant classification. *Blood.* 2021;138(22):2185–201.
- 531 43. Xu Y, Volanakis JE. Contribution of the complement control protein modules of C2 in C4b
532 binding assessed by analysis of C2/factor B chimeras. *J Immunol Baltim Md 1950.*
533 1997;158(12):5958–65.
- 534 44. Java A, et al. Functional Analysis of Rare Genetic Variants in Complement Factor I (CFI)
535 using a Serum-Based Assay in Advanced Age-related Macular Degeneration. *Transl Vis*
536 *Sci Technol.* 2020;9(9):37.
- 537 45. Java A, et al. A Multimodality Approach to Assessing Factor I Genetic Variants in Atypical
538 Hemolytic Uremic Syndrome. *Kidney Int Rep.* 2019;4(7):1007–17.

- 539 46. Hallam TM, et al. A novel method for real-time analysis of the complement C3b:FH:FI
540 complex reveals dominant negative CFI variants in age-related macular degeneration. *Front*
541 *Immunol.* 2022;13:1028760.
- 542 47. Akhlaghpour M, et al. Genetic coding variant in complement factor B (CFB) is associated
543 with increased risk for perianal Crohn's disease and leads to impaired CFB cleavage and
544 phagocytosis. *Gut.* 2023;gutjnl-2023-329689.
- 545 48. Marinozzi MC, et al. Complement Factor B Mutations in Atypical Hemolytic Uremic
546 Syndrome—Disease-Relevant or Benign? *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(9):2053–65.
- 547
- 548
- 549

Manuscrit n°1

550 **Legend to figures**

551 **Figure 1. Measurement of complement activation deposition C3b/iC3 and C5b-9 in donors**
552 **and patients under eculizumab**

553 **Panel A.** Representative images of digital slides from the conditions tested. Negative controls
554 include conditions with cells incubated in culture medium without serum (“no serum”) and the
555 immunolabelling control of the primary antibody by an irrelevant antibody (rabbit isotype). The
556 tested serum is incubated with cultured microvascular endothelial cells (HMEC-1) for 60 min
557 to measure C3b/iC3b deposition and for 180 min to detect C5b-9. The addition of OX-24, a
558 monoclonal antibody directed against the N-terminal domains of FH, is used as a condition of
559 complement dysregulation. After incubation, complement activation fragments are revealed by
560 immunofluorescence staining (AF647, **red**). HMEC-1 nuclei are stained with 4',6-diamidino-
561 2-phenylindole (**DAPI**). A positive condition of complement dysregulation is tested in each
562 experiment. All sera from tested donors and patients were performed in five independent
563 experiments. Each condition was performed in duplicate wells in the same experiment. To limit
564 inter-assay variability, one serum from a healthy donor was tested as an internal control in each
565 experiment. Digital slides obtained with the Axioscanner (Zeiss) and Halo® software (x10
566 magnification in Halo®. Further data on inter- and intra-assay variability are shown in
567 **Supplemental Figures S2. Panel B.** Quantitative measurement of complement C3b/iC3b
568 deposition on HMEC-1 surface in healthy donors with or without condition of dysregulation by
569 OX-24. Each circle corresponds to the average of complement deposition measured in
570 duplicates. The addition of OX-24 significantly enhanced iC3b/iC3b deposition on HMEC-1
571 surface ($p < 0.001$), Wilcoxon test. **Panel C.** Quantitative measurement of complement C5b-9
572 deposition on HMEC-1 surface in healthy donors with or without condition of dysregulation by
573 OX-24. The addition of OX-24 significantly enhanced C5b-9 deposition on HMEC-1 surface

23

574 ($p < 0.001$), Wilcoxon test. **Panels D-F.** *Ex vivo* complement activation on HMEC-1 surface of
575 serum taken from patients treated with eculizumab. Complement alternative pathway
576 dysregulation by inhibition of the FH by OX-24 in eculizumab-treated patients induced an
577 increase in C3b/iC3b deposition but not C5b-9 ($p = 0.5566$, Wilcoxon test). *Abbreviations:*
578 AF647: fluorescent labelled antibody from Alexa Fluor®; DAPI: 4',6-diamidino-2-
579 phenylindole; HMEC-1: human microvascular endothelial cells, a human microvascular
580 endothelial cell line of dermal origin; MCDB: HMEC-1 culture medium MCDB131; OX-24:
581 murine monoclonal antibody anti human FH, final concentration $75 \mu\text{g/mL}$.

582 **Figure 2. Complement activation in the supernatants**

583 **Panel A.** Measurement of complement anaphylatoxin C3a in the supernatants collected at 60
584 minutes of incubation, with or without OX-24 (ELISA C3a EIA, Microvue®, Quidel). Each
585 circle corresponds to the average of the concentrations measured in the duplicates of each
586 experimental condition. The dashed lines represent the threshold values for anaphylatoxin
587 elevation. The concentrations are reported in $\mu\text{g/mL}$ of serum. A complement alternative
588 pathway dysregulation by OX-24 significantly enhanced the release of C3a in the supernatants
589 ($p < 0.001$), Wilcoxon test. **Panel B.** Measurement of complement anaphylatoxin C5a in the
590 supernatants collected at 180 minutes of incubation, with or without OX-24 (ELISA C5a EIA,
591 Microvue®, Quidel). The concentrations are reported in ng/mL of serum. A complement
592 alternative pathway dysregulation by OX-24 significantly enhanced the release of C5a in the
593 supernatants ($p < 0.001$), Wilcoxon test. **Panel C.** Anaphylatoxins C3a and C5a in the
594 supernatants are positively correlated (Pearson's correlation coefficient r^2 0.46). The empty
595 circles correspond to the values measured in the supernatants in the reference condition, and
596 the circles with a dot in the middle correspond to the values measured for the anaphylatoxins

597 in the supernatants in the presence of OX-24. *Abbreviations:* OX-24: murine monoclonal
598 antibody anti human FH, final concentration 75 μ g/mL.

599

600 **Figure 3. Correlation of complement activation fragments in the supernatants and**
601 **HMEC-1 surface.**

602 **Panel A.** Correlation of C3 activation fragment: complement anaphylatoxin C3a in the
603 supernatants and C3b/iC3b deposition (H-score_{C3c}) on the cell surface. **Panel B.** Correlation of
604 complement terminal pathway components: complement anaphylatoxin C5a in the supernatants
605 and C5b-9 deposition (H-score_{C5b-9}) on the cell surface. Complement activation on solid phase
606 and in the supernatant is positively correlated (Pearson's correlation coefficient $r^2 = 0.19$ for
607 C3a/H-score_{C3c} and $r^2 = 0.65$ for C5a/H-score_{C5b-9}). Each circle corresponds to the average of the
608 concentrations and complement deposition measured in duplicates. The empty circles
609 correspond to the values measured in the supernatants in the reference condition, and the circles
610 with a dot in the middle correspond to the values measured for the anaphylatoxins in the
611 supernatants in the presence of OX-24. *Abbreviations:* OX-24: murine monoclonal antibody
612 anti human FH, final concentration 75 μ g/mL.

613 **Figure 4. Ex vivo complement activation on endothelial cells reveals distinct complement**
614 **activation profiles.**

615 **Panel A.** Correlation of complement C3b/iC3b and C5b-9 deposition on HMEC-1 surface. We
616 defined as elevated a H-score_{C3c} above 50 and a H-score_{C5b-9} above 30. The grey area represents
617 the values for H-scores considered in the normal range. Each circle corresponds to the average
618 of C3b/iC3b and C5b-9 deposition measured in duplicates. Donors harboring a variant in the
619 CFH gene are highlighted in green (donor (D)2, D2 and D38). Donors with a CFI variant are

25

620 highlighted in red. D3 carried the heterozygous missense variant p.A67G in the CFI and the C3
621 p.D1457H. The two others (D21 and D31) were heterozygous for the CFI p.P553S variant. The
622 two donors carrying a variant affecting the CFH had an isolated increase in C5b-9 deposition
623 on the endothelial cell surface. One out of the three donors with a CFI variant had increased
624 C3b/iC3b deposition. **Panel B.** In condition of alternative pathway dysregulation (OX-24),
625 complement C3b/iC3b and C5b-9 deposition increased for all donors. Complement deposition
626 in condition of FH-inhibition with OX-24 stayed in the normal ranges for 3 donors. The p-value
627 <0.001 corresponds to the Wilcoxon test comparing the H-score measured with and without
628 complement dysregulation. **Panels C-D.** Levels in membrane-bound complement activation
629 fragments measured on HMEC-1 surface according to the presence of variants (MAF<5%) in
630 the complement genes. Groups are compared with an ANOVA. There was a trend for increased
631 C3b/iC3b deposition in donors with a CFI variant and in enhanced C5b-9 deposition in donors
632 with a CFH variant (not significant).

633

634

635

636

637

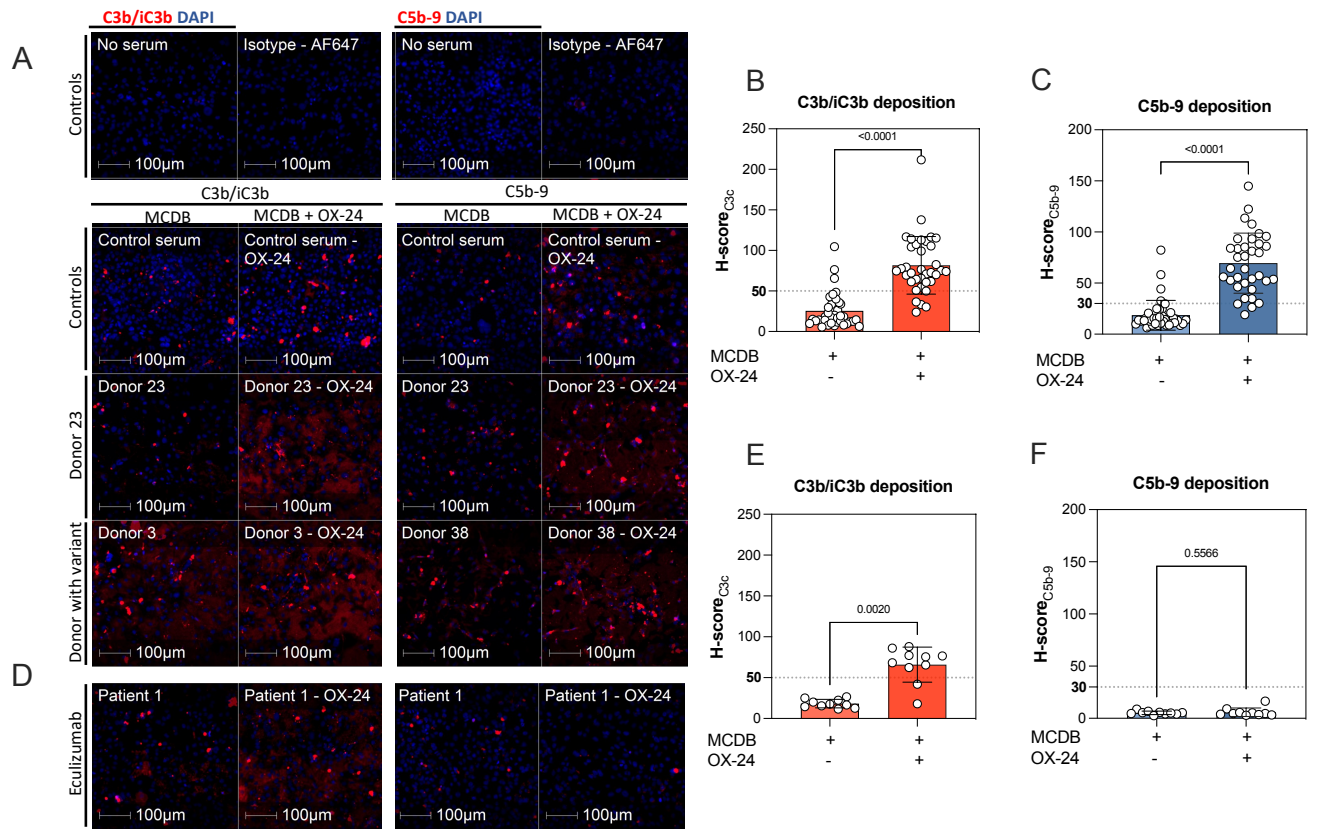


Figure 1

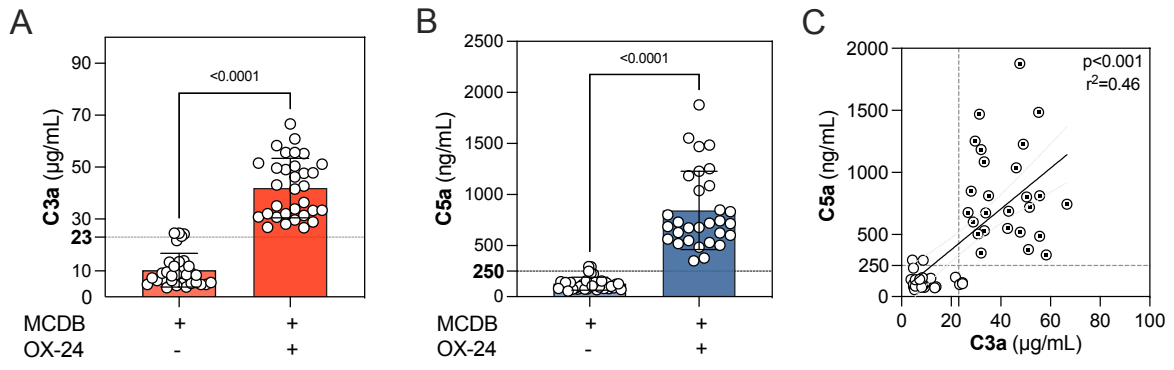


Figure 2

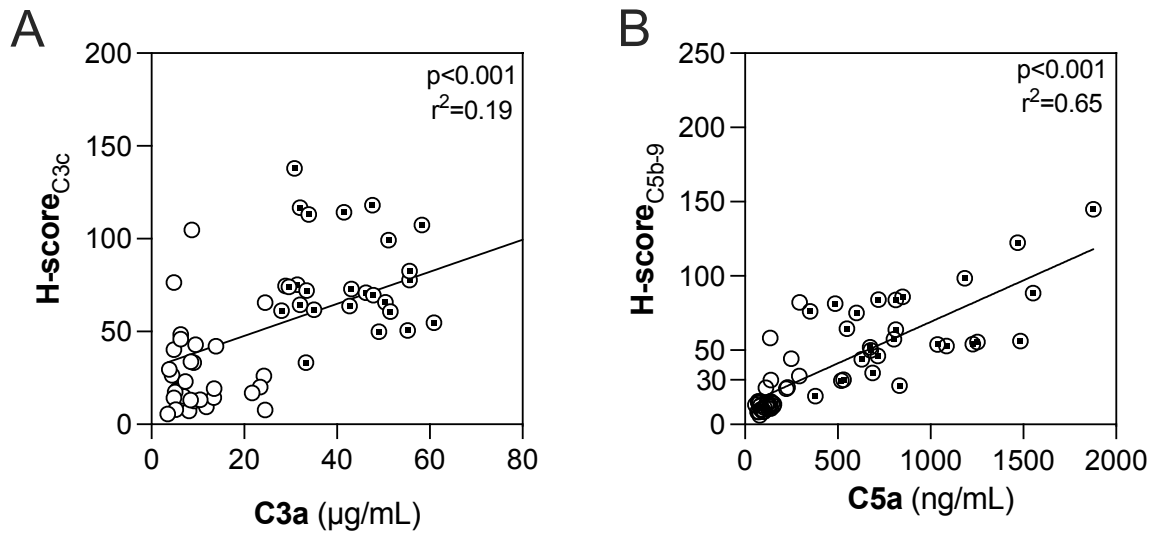


Figure 3

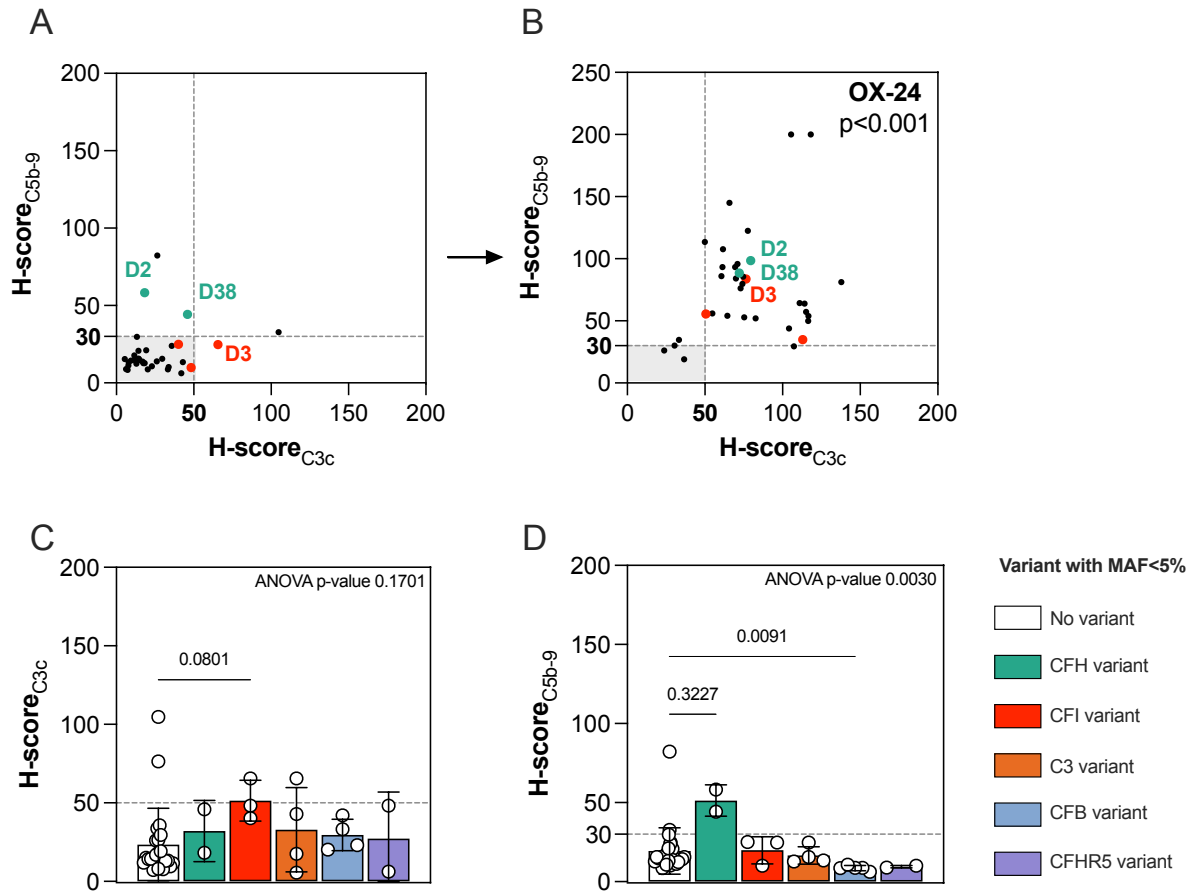


Figure 4

Table 1. Characteristics of the study cohort (n=38)

Healthy donors (n=38)	
Sex, male, n (%)	19 (50.0)
Age at sampling, median [IQR]	56.5 [45.3-62.9]
Time of serum collection, n (%)	
- Prior to donation	19 (50.0)
- After donation, delay (years)	
1 year	7 (18.4)
5 years	5 (13.2)
≥ 10 years	7 (18.4)
Age at donation, years, median [IQR]	53.9 [42.2-63.9]
Relationship with the recipient, n (%)	
- First-degree relatives	29 (76.3)
Donation to a brother/sister	21 (55.3)
Donation to a parent	6 (15.8)
Donation to a child	2 (5.3)
- Unrelated (spouse, friend)	9 (23.7)
If relatives, nephropathy of the recipient, n (%)	
IgA nephropathy	7 (24.1)
Diabetic nephropathy	5 (12.2)
ADPKD	5 (12.2)
Interstitial nephropathy	3 (10.3)
Other glomerulopathies*	4 (13.8)
Others [§]	5 (12.2)

* Other glomerulopathies included: membrano-proliferative glomerulonephritis (n=1), membranous nephropathy (n=1), lupus nephropathy (n=1), focal segmental glomerulosclerosis (n=1). * Other nephropathies included ANCA vasculitis (n=1), Polyarteritis nodosa (n=1), unknown etiology (n=1), nephrectomy for Wilms tumor (n=1) and porphyria (n=1). *Abbreviations:* ADPKD: autosomal dominant polycystic kidney disease, IQR: interquartile range.

Table 2. Description of the complement variants with MAF<1% identified in donors

Donor	Gene	Variant	Transcript	Status	Domain	Allele frequency in GnomAD ^{\$} (%)	Previous <i>in vitro</i> functional studies	Variant classification
D38	CFH	c.3826C>T	p.R1210C	He	SCR20	0.015	Yes, pathogenic (30,34–36)	Pathogenic
D21 D31	CFI	c.1657C>T	p.P553S	He	Light chain SP	0.136	Yes, no impact identified (43–46)	VUS
D3	CFI	c.227C>G	p.A76G#	He	Heavy chain	<i>novel</i>	None	VUS
D3	C3	c.4369G>C	p.D1457H	He	MG8	0.036	None	VUS
D18	C3	c.463A>C	p.K155Q	He	MG2	0.271	None	VUS
D34	C3	c/1909G>C	p.G637R	He	Linking region	<i>0.022</i>	None	VUS
D14	C3	c.1898A>G	p.K633R	He	Linking region	<i>0.046</i>	None	VUS
D21	CFHR5	c.136C>T	p.P46S	He	SCR1	<i>0.659</i>	None	VUS

^{\$}: allele frequency according to the Genome aggregation Database in the overall population (ALL). [#]The FI plasmatic level measured by ELISA was normal in patient's serum. *Abbreviations*: C3: complement C3 gene, CFH: complement factor H gene, CFI: complement factor I gene, GnomAD: Genome aggregation Database, He: heterozygous, MG: macroglobulin domain, SCR: short consensus repeat region, SP: serine-protease domain, VUS: variant of unknown significance.

Supplemental material

Supplemental Figure S1: Experimental principle of *ex vivo* complement activation measurement.

Experimental principle of the measurement of *ex vivo* complement activation on the surface of quiescent cultured human microvascular endothelial cells (HMEC-1) exposed to serum from healthy donors or patients. During incubation, the complement cascade is activated and complement activating fragments C3b/iC3b and C5b-9 are deposited on the endothelial cell surface. After incubation, supernatants are collected for measurement of C3a and C5a activation fragments by ELISA. After incubation, the membrane-bound deposits are revealed by anti-C3c and anti-C5b-9 immunostaining. Quantification was then computerized on digital slides (Axioscanner, Zeiss; Halo® Software, Indica Labs). The results are expressed as an H-score, reflecting the intensity of complement activation on the cell surface. *Abbreviations:* HMEC-1: human microvascular endothelial cells, a human microvascular endothelial cell line of dermal origin. PFA: paraformaldehyde. This figure was created with BioRender.com.

Supplemental Figure S2: Interexperimental variability and intra-experimental reproducibility of the replicates.

Panel A. Interexperimental variability of the reference serum. Each point represents the mean of two duplicates performed on the same plate. Five independent experiments were performed to assess *ex vivo* complement activation in all donors and patients. Some experiments included several duplicate of the reference serum in independent plates. The dashed grey line corresponds to the mean plus 2 standard deviations of all the H-score values measured for all experiments. Any experiment with a H-score above this threshold was not included in the final analysis. The bars in orange represent the positive condition, corresponding to a complement

alternative pathway of the reference serum. A two-fold change increase in complement deposition in the tested serum after addition of OX-24 was considered as a positive response.

Panel B. Bland-Altman plots representing the intra-assay variability of duplicates wells performed in each donor. The reproducibility of duplicates was generally excellent (<20 points of H-score values). In cases of significant discrepancies between measurements, the images of the digital slides were reviewed and corrected for possible artifacts. Additional control conditions included 1) incubation of HMEC-1 with culture medium, 2) immunolabelling controls with i) incubation of the reference serum and revelation of membrane-bound deposition by the secondary antibody without anti-C3c / anti-C5b-9 primary antibody or ii) replacement of the primary antibody by an irrelevant antibody from the same species (“isotype control”). All H-score values measured for these experimental conditions were strictly below <0.1% across all experiments.

Supplemental Figure S3: Kinetic of complement anaphylatoxins C3a and C5a release in supernatants during the incubation

Panel A. Quantification of complement C3a anaphylatoxin levels by ELISA in HMEC-1 supernatants during incubation. Incubation triggers a modest release of C3a anaphylatoxin into the supernatant. The release of C3a anaphylatoxin increases significantly in conditions of alternative complement pathway dysregulation by FH inhibition (OX-24, final concentration 75µg/mL). **Panel B.** C5a levels in HMEC-1 culture supernatants. The introduction of complement dysregulation through FH inhibition using OX-24 leads to an elevated release of C5a in the supernatant, indicating the formation of C5 convertases. The stability of C5a in the supernatant under conditions of complement dysregulation highlights complement regulation (e.g. C3b/C3bBb regulation) on the HMEC-1 cell surface. Kinetic curves were generated from

samples of four donors. The p-value represents ANOVA analysis between groups with and without complement dysregulation.

Supplemental Figure S4: Applicability of the *ex vivo* complement activation model in aHUS patient

Panel A. We tested a serum taken from a patient with atypical hemolytic and uremic syndrome (aHUS) (acute phase) in the *ex vivo* assay. Genetic analysis with next generation sequencing revealed a heterogeneous rare nonsense variant in the CFH gene (p.R215*). This pathogenic variant leading to a premature stop codon strongly impacts the FH complement alternative pathway regulatory activity (quantitative defect and lack of endothelial cell surface anchoring). Incubation of the tested serum showed spontaneous intense C3b/iC3b deposition (no complement dysregulation was added in this experiment) and a moderate spontaneous deposition of C5b-9. Negative controls include conditions with cells incubated in culture medium without serum (“no serum”) and the immunolabelling control of the primary antibody by an irrelevant antibody (rabbit isotype). The tested serum is incubated with cultured microvascular endothelial cells (HMEC-1) for 60 min to measure C3b/iC3b deposition and for 180 min to detect C5b-9. Complement activation fragments (C3b/iC3b and C5b-9) are in **red** and HMEC-1 nuclei are in **blue**. Each condition was performed in duplicate wells. Digital slides obtained with the Axioscanner (Zeiss) and Halo® software (x10 or x20 magnification in Halo®).

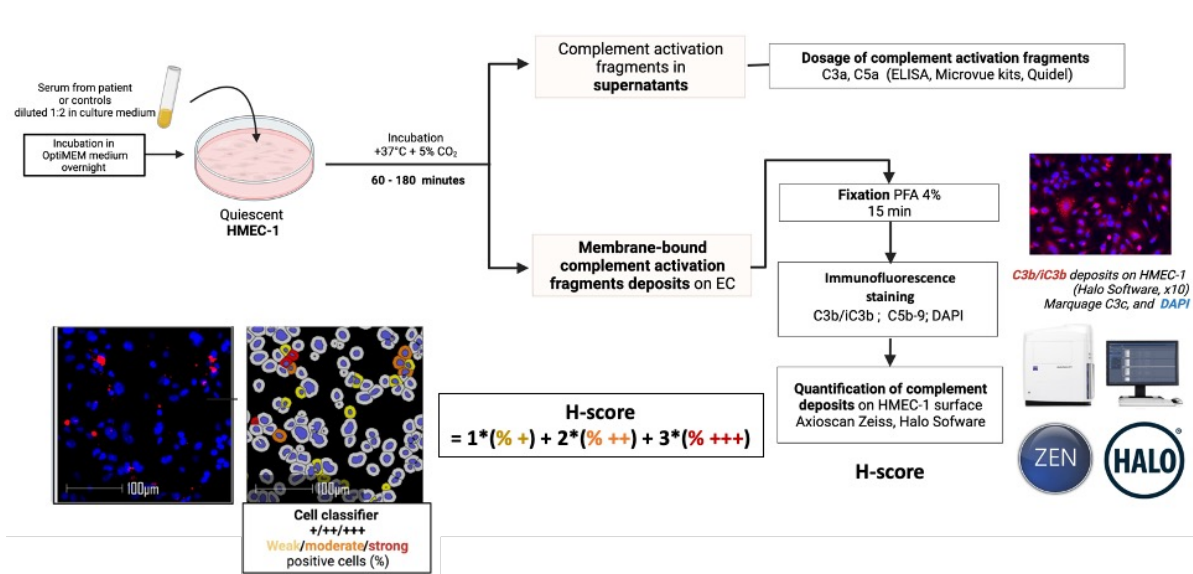
Panel B. The quantification of complement deposition on the HMEC-1 surface induced by the serum from the aHUS patient showed both enhanced C3b/iC3b and C5b-9 deposition.

Abbreviations: AF647: fluorescent labelled antibody from Alexa Fluor®; CFH: complement factor H gene; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; FH: factor H; HMEC-1: human microvascular endothelial cells, a human microvascular endothelial cell line of dermal origin; OX-24: murine monoclonal antibody anti human FH, final concentration 75µg/mL.

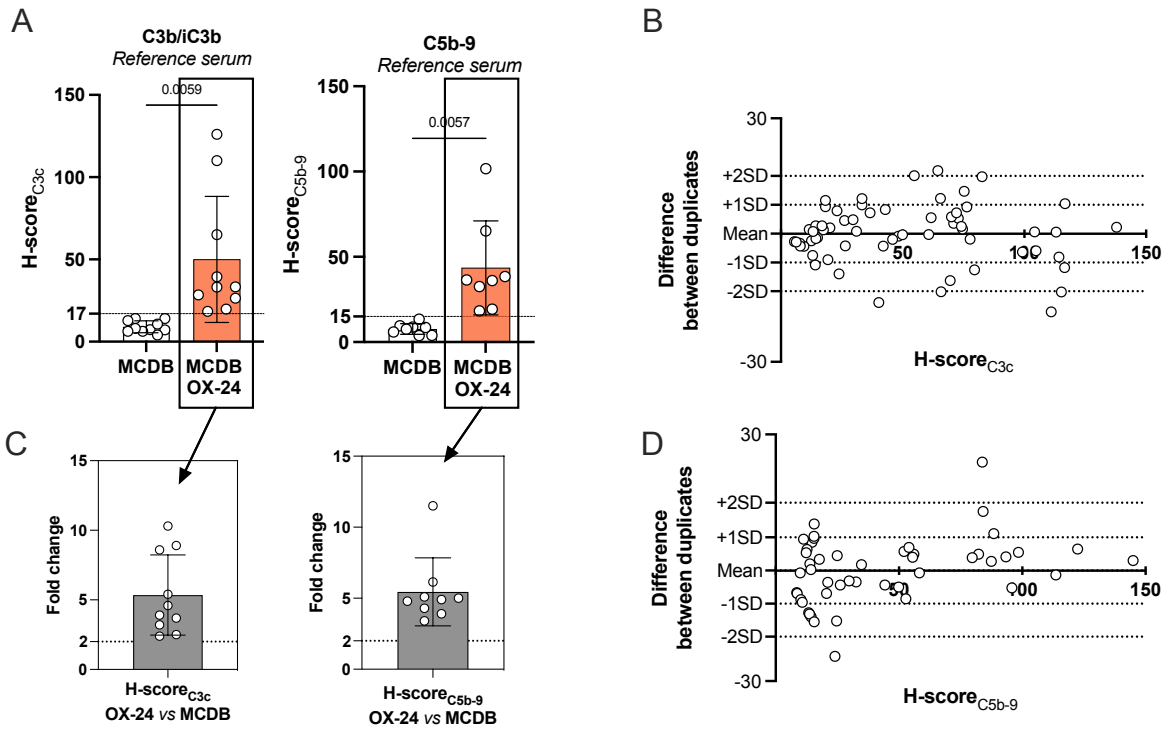
Supplemental Table S1: Complement deposition fragments and complement genetics in each donor

Donor's main characteristics			Complement alternative pathway genetics		Ex vivo complement activation	
Donor	Sex, age	First-degree related to the recipient (yes/no), nephropathy	Variant MAF<1%	Variant MAF1-5%	C3b/iC3b Deposition (H-score <30)	C5b-9 Deposition (H-score <30)
D1	Male, 40 yo	Yes, interstitial nephritis	No	CFB p.K565E CFB p.E566A	42.0	6.2
D2	Female, 50 yo	Yes, Diabetic nephropathy	No	CFH p.N1050Y	18.3	58.3
D3	Female, 36 yo	Yes, Lupus nephropathy	CFI p.A76G C3 p.D1457H	No	65.6	24.7
D4	Female, 44 yo	No	No	No	104.8	32.7
D5	Female, 58 yo	Yes, MPGN	No	No	7.3	8.5
D6	Male, 63 yo	Yes, Porphyria	No	No	26.1	13.9
D7	Female, 77 yo	Yes, IgAN	No	CFB p.G252S	33.3	8.7
D8	Female, 34 yo	Yes, unknown	No	No	18.3	12.8
D9	Female, 65 yo	No	No	No	26.4	82.3
D10	Female, 51 yo	No	No	CFB p.K565E	20.2	8.7
D11	Male, 40 yo	Yes, ADPKD	No	CFB p.G252S	NA	8.5
D12	Female, 53 yo	Yes, Diabetic nephropathy	NA	NA	15.0	14.7
D13	Female, 80 yo	Yes, IgAN	No	No	11.6	17.7
D14	Female, 69 yo	Yes, ADPKD	p.K633R	No	17.5	12.7
D15	Male, 41 yo	Yes, IgAN	No	No	11.9	15.3
D16	Female, 57 yo	Yes, ADPKD	NA	NA	14.3	15.6
D17	Male, 42 yo	Yes, Polyarteritis nodosa	No	No	33.8	10.2
D18	Male, 48 yo	Yes, FSGS	C3 p.K155Q	No	42.9	13.4
D19	Male, 68 yo	Yes, Wilms tumor	No	No	12.5	14.3
D20	Male, 55 yo	Yes, IgAN	No	No	9.5	14.4
D21	Male, 49 yo	No	CFI p.P553S CFHR5 p.P46S	No	48.3	10.0
D22	Male, 58 yo	No	No	No	14.2	20.7
D23	Female, 51 yo	No	NA	NA	14.4	15.6
D24	Male, 41 yo	Yes, IgAN	No	No	35.7	24.0
D25	Male, 27 yo	Yes, interstitial nephritis	No	No	2.0	10.8
D26	Male, 57 yo	Yes, ANCA vasculitis	No	No	13.2	29.8
D27	Female, 62 yo	No	NA	NA	16.9	13.7
D28	Female, 43 yo	Yes, Diabetic nephropathy	No	No	7.8	11.3
D29	Male, 74 yo	Yes, ADPKD	No	No	76.4	NA
D30	Male, 58 yo	Yes, Membranous nephropathy	NA	NA	29.6	15.6
D31	Male, 62 yo	Yes, IgAN	CFI p.P553S	No	40.2	25.0
D32	Female, 57 yo	No	No	No	13.0	12.4
D33	Male, 65 yo	Yes, interstitial nephritis	NA	NA	8.0	13.3
D34	Female, 65 yo	Yes, ADPKD	C3 p.G637R	No	5.5	15.5
D35	Female, 60 yo	No	NA	NA	NA	10.7
D36	Female, 63 yo	Yes, Diabetic nephropathy	No	No	19.3	21.1
D37	Male, 55 yo	Yes, IgAN	No	CFHR5 p.R356H	6.3	8.9
D38	Male, 53 yo	Yes, Diabetic nephropathy	CFH p.R1210C	No	45.9	44.3

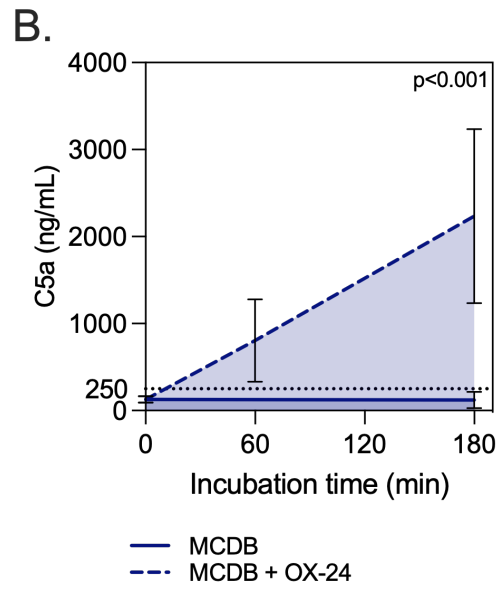
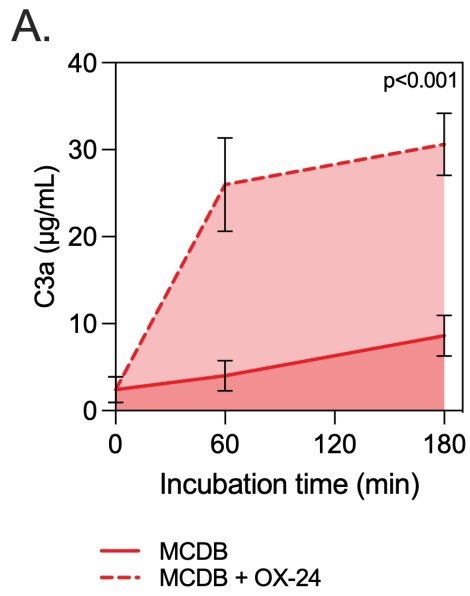
All variants are heterozygous. *Abbreviations:* ADPKD: autosomal dominant polycystic kidney disease, FSGS: focal segmental glomerulosclerosis, MAF: minor allele frequency, yo: years old.



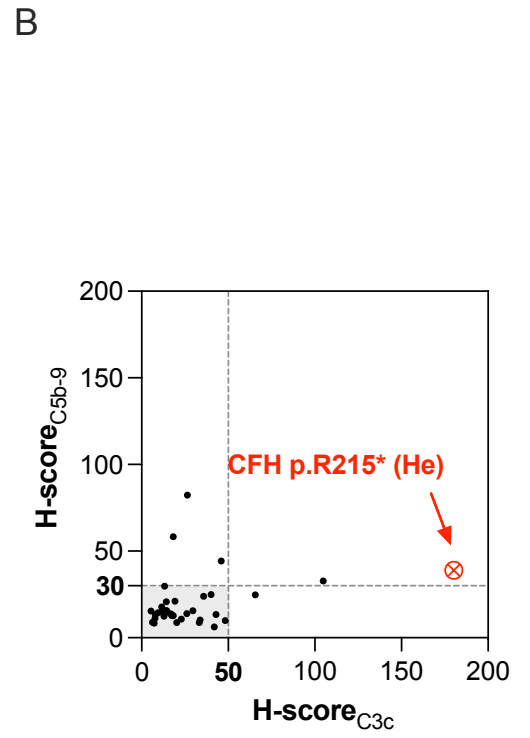
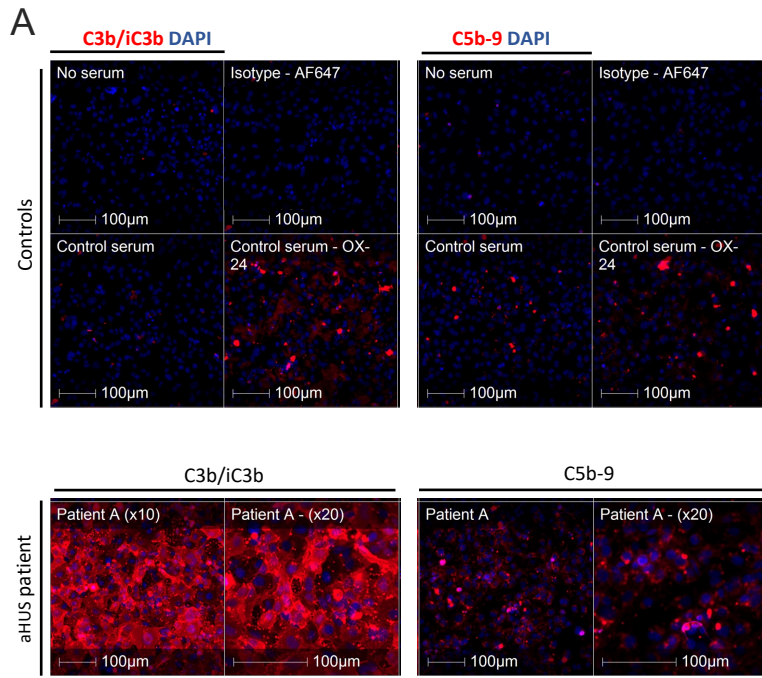
Supplemental Figure S1



Supplemental Figure S2



Supplemental Figure S3



Supplemental Figure S4

4. Profils d'activation *ex vivo* du complément chez les donneurs sains

*Profils d'activation *ex vivo* du complément*

Nous avons mis au point et validé un modèle d'étude de l'activation *ex vivo* du complément à la surface de cellules endothéliales microvasculaires (HMEC-1) quiescentes en culture. Ce modèle FH-dépendant nous a apporté deux informations principales. Premièrement, qu'il existe une **hétérogénéité dans le niveau de dépôts de C3b/iC3b et C5b-9 induits à surface des HMEC-1 chez les donneurs sains**. Secondairement, que le niveau d'activation du complément mesuré en fin d'incubation à la surface endothéliale, dans ce modèle FH-dépendant, est dépendante de l'activité des régulateurs circulants (p.ex. FH, FI) apportés par le sérum testé. Cette hypothèse est renforcée par l'identification de variants génétiques du FH et du FI chez 3 des 6 donneurs présentant des dépôts augmentés dans le modèle endothélial. Ceci suggère une potentielle **part génétique dans la dérégulation** du complément observée à la surface endothéliale chez ces donneurs sains.

Dans notre modèle, la mesure des dépôts de C5b-9 semble plus précise pour l'identification d'une dérégulation du complément. Cependant, il est tout à fait possible qu'une dérégulation isolée des voies initiales de la cascade du complément survienne sans entraîner la formation de dépôts de C5b-9 en raison d'une régulation efficace des convertases et de la voie terminale. L'utilisation conjointe d'un marquage anti-C3c (utilisant un anticorps polyclonal reconnaissant des épitopes communs entre le C3, le C3H₂O, le C3b et le iC3b) permet d'évaluer l'activité des phases initiales d'activation du complément et d'obtenir une vision de l'activité globale de la cascade.

L'analyse en composante principale des biomarqueurs d'activation du complément en surface cellulaire et dans les surnageants nous a permis de définir 3 profils d'activation *ex vivo* du complément (**Figure 32**). La majorité des donneurs présentent un profil d'activation/régulation équilibré (zone grise) tandis que certains présentent une propension plus importante à une induction de dépôts de C3b et à une formation de C3 convertases (zone rouge) et d'autres présentent une activité des C5 convertases plus importante (zone verte).

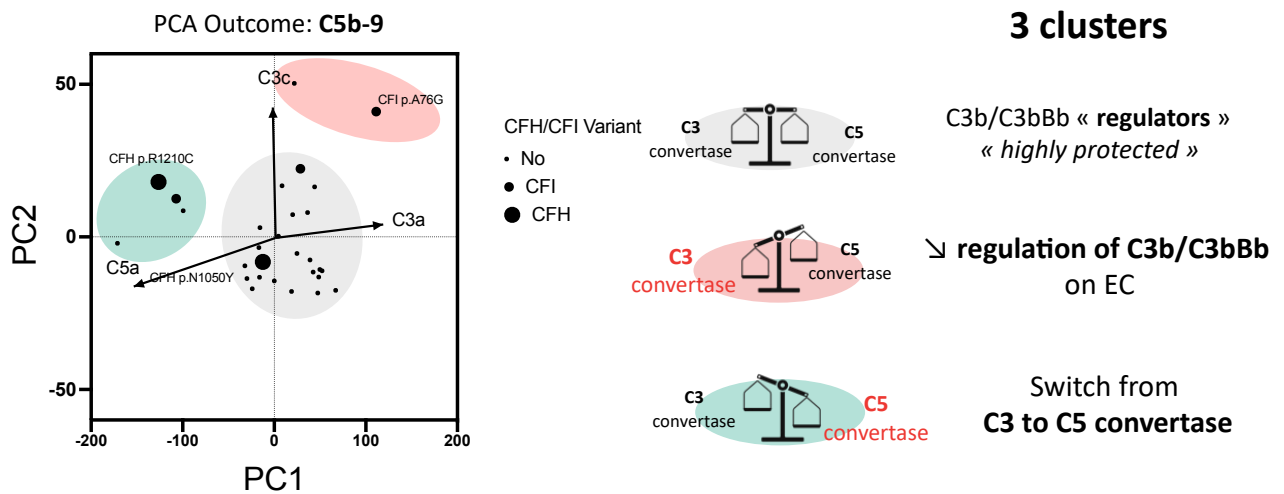


Figure 31. Profils d'activation *ex vivo* du complément chez les donneurs sains: hypothèses

L'analyse en composante principale des biomarqueurs d'activation *ex vivo* du complément (C3a, C5a, dépôts de C3c et de C5b-9) mesurés dans le modèle endothélial permet d'identifier trois clusters de profils d'activation du complément chez les donneurs sains. La majorité des donneurs sains sont localisés dans le cluster gris, avec un équilibre de la balance d'activation et de régulation du complément. Les donneurs présents dans la zone rouge ont des marqueurs d'activité de la C3 convertase (C4a, dépôts de C3b) au premier plan et les donneurs en zone verte ont des signes plus importants de l'activité de la C5 convertase (C5a), suggérant un changement rapide de la C3 vers la C5 convertase. *Abréviations* : PCA : *principal component analysis*, analyse en composante principale. PC : principal component

Les différences subtiles dans l'activité du complément observées à la surface endothéliale en condition ou non de dérégulation de la voie alterne révèlent différents degrés de protection de l'endothélium chez les donneurs sains. Les résultats obtenus dans ce modèle FH-dépendant soutiennent l'hypothèse d'un impact des variants du FH dans la protection efficace de l'endothélium vis-à-vis de l'attaque du complément.

Association des dépôts endothéliaux et des haplotypes du CFH

Les différents haplotypes du FH sont associés à une susceptibilité au développement de pathologies médiées par le complément (GC3, SHUa et DMLA) et pourraient influencer le tropisme tissulaire de ces pathologies.

Nous avons exploré la distribution des haplotypes du *CFH* (combinant les polymorphismes : rs800292, rs1061170, rs375336, rs1065489) chez les donneurs sains en fonction de l'intensité des dépôts mesurés à la surface des cellules endothéliales (**Figure 33**). Les trois donneurs présentant un variant du *CFH* ou du *CFI* avec des dépôts augmentés ont été exclus pour cette analyse. Les donneurs ont ensuite été séparés en deux groupes selon l'intensité médiane des dépôts : C3b/iC3b « hauts » ou « bas » et dépôts de C5b-9 « hauts » ou « bas ». Nous avons observé une tendance à une fréquence des haplotypes du *CFH* différente entre les groupes de patients ($p=0.16$ pour les dépôts de C3b/iC3b et $p=0.13$ pour le C5b-9, χ^2 comparant la distribution globale). L'haplotype H3 (*gtgt*), haplotype « à risque » pour le SHUa, était plus fréquent chez les donneurs avec des dépôts endothéliaux de C5b-9 plus importants (28,6% versus 7,4%, $p=0,036$), suggérant une propension plus importante à l'engagement de la voie terminale du complément chez les donneurs portant cet haplotype. Ces résultats obtenus en population de donneurs sains pourraient soutenir l'hypothèse d'une contribution des haplotypes du *CFH* dans le niveau de régulation du complément à la surface des HMEC-1. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour préciser les mécanismes sous-tendant ces hypothèses.

En conclusion, l'analyse des dépôts de complément induits par le sérum à la surface des cellules endothéliales semble être un test prometteur pour l'évaluation dynamique de l'activation de la cascade du complément. Nous avons donc évalué des sera de patients IgAN dans ce modèle.

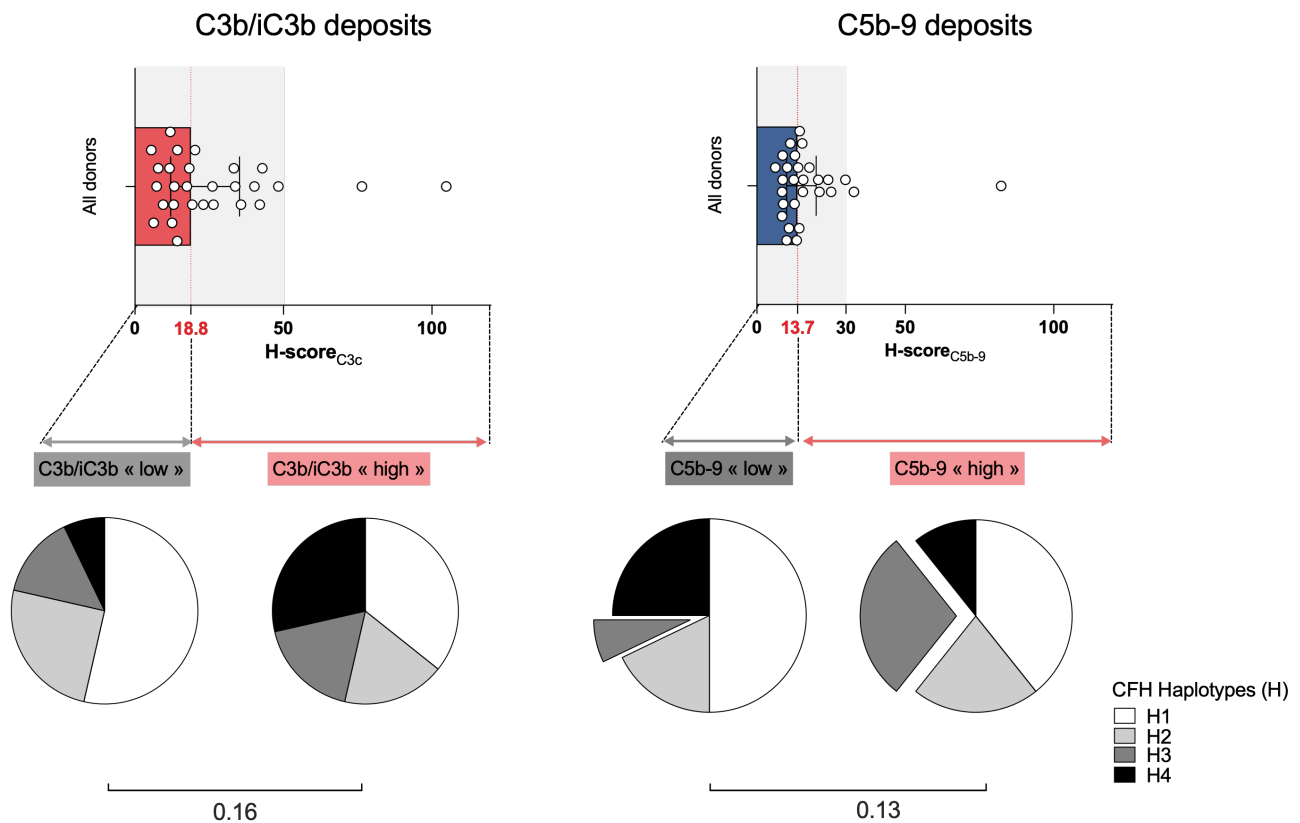


Figure 32. Fréquences des haplotypes du *CFH* selon l'intensité des dépôts de complément endothéliaux

L'analyse porte sur les donneurs sains ayant bénéficié d'une analyse génétique du complément. Les 3 donneurs avec un variant du *CFH* et ou du *CFI* et des dépôts de complément augmentés ont été exclus de l'analyse. Les graphiques en barre représentent la médiane et le rang interquartile des dépôts de C3b/iC3b et de C5b-9 mesurés après l'exposition aux sera de donneurs sains. La valeur médiane des dépôts de C3b/iC3b et de C5b-9 sont indiquées en lignes pointillées rouges. Nous avons comparé répartition des haplotypes du *CFH* entre les groupes de donneurs séparés selon l'intensité médiane des dépôts mesurés à la surface des HMEC-1. Les fréquences globales des 4 haplotypes dominants du *CFH* étaient similaires entre les groupes. La fréquence de l'haplotype H4 (associée à la délétion *CFHR1-CFHR3*) était plus importante chez les donneurs avec des dépôts de C3b/iC3b plus marqués (7,4% versus 28,6%, $p=0,036$). L'haplotype H3, à risque de SHUa, était fréquent chez les donneurs avec des dépôts de C5b-9 plus importants (28,6% versus 7,4%, $p=0,036$). Test du χ^2 .

5. Activation ex vivo du complément chez les patients porteurs d'une IgAN

5.1. Cohortes d'étude

Nous avons testé dans le modèle endothélial des sera provenant de patients transplantés rénaux pour une IgAN (n=41) ou transplantés rénaux pour une autre néphropathie (n=13). Les caractéristiques principales des patients étudiés sont présentées dans le **Tableau 12**.

Les patients IgAN étaient majoritairement des hommes (68,2%), avec un âge médian de 50,9 [44,9-61,1] ans au moment du prélèvement. Il s'agissait d'une première transplantation rénale pour 38 (92,6%) d'entre eux. Le sérum avait été collecté après un délai post-transplantation médian de 38,6 [21,3-103,1] mois. Au total, 25 patients transplantés pour une IgAN (61,0%) avaient présenté une récurrence de la néphropathie initiale sur le greffon. Il n'y avait pas de différence concernant l'âge au prélèvement, le sexe ratio homme/femme, le délai post-transplantation et les paramètres de fonction du greffon entre les patients transplantés pour une IgAN et les patients transplantés pour une autre étiologie.

Tableau 12. Caractéristiques des patients transplantés testés dans le modèle endothélial

	IgAN (n=41)	Autre néphropathie (n=13)	p-value ^s
Age, années	50,9 [44,9-61,1]	54,6 [48,0-67,3]	0,22
Sexe masculin, n (%)	28 (68,2)	8 (61,5)	0,74
Rang de transplantation :			
1	38 (92,6)	13 (100)	>0,99
2	3 (7,3)	0 (0)	
Délai post transplantation, mois	38,6 [21,3-103,1]	48,9 [26,5-84,7]	0,46
Patient immunisé, n (%)	20 (48,7)	5 (38,5)	0,52
Présence d'un DSA, n (%)	9 (21,9)	1 (7,7)	0,25
Traitement immunosuppresseur de maintenance			
Tacrolimus	25 (60,1)	6 (46,2)	--
Ciclosporine	11 (26,2)	2 (15,4)	
mTORi	8 (19,5)	3 (23,1)	
Bélatacept	2 (4,9)	1 (7,7)	
Cellcept	22 (81,5)	10 (76,9)	
Corticoïdes	38 (92,7)	8 (61,5)	
Récidive de la néphropathie initiale, n (%)	25 (60,1%)	--	--
Si oui, délai après transplantation, mois	8,9 [3,3-49,7]	--	--
Créatininémie (µmol/l)	110 [86-140]	134 [112-160]	0,51
Ratio protéinurie/créatininurie (mg/mmol)	20,9 [10,5-41,5]	21,0 [10,2-44,3]	0,96

Comparaison des variables qualitatives par un test exact de Fisher et des variables continues par un test de Mann-Whitney. *Abréviations* : DSA : *donor specific antibody*, anticorps anti-HLA dirigés contre le greffon, mTORi : inhibiteurs de mTOR.

5.2. Activation *ex vivo* du complément à la surface endothéliale

Nous avons comparé l'intensité des dépôts de C3b/iC3b (H-score_{C3c}) et de C5b-9 (H-score_{C5b-9}) induits à la surface des cellules endothéliales quiescentes après exposition à du sérum provenant des patients transplantés rénaux pour une IgAN (n=41) et pour une autre néphropathie (n=13).

Les donneurs sains inclus dans cette analyse correspondaient à la cohorte de donneurs de rein préalablement présentée pour la validation du modèle (n=38), après exclusion des 3 donneurs présentant des dépôts de C3b/iC3b ou de C5b-9 augmentés et un variant du complément (donneurs porteurs des variants hétérozygotes du *CFH* p.N1050Y, *CFH* p.R1210C et *CFI* p.A76G). La cohorte finale des donneurs sains incluait 35 donneurs, dont 32 ont été évalués pour les dépôts endothéliaux de C3b/iC3b et de C5b-9.

Dans le modèle d'activation *ex vivo* du complément, les H-score_{C3c} et H-score_{C5b-9} médians après exposition des HMEC-1 à du sérum provenant de patients IgAN transplantés rénaux étaient de 27,1 [15,8-55,9] et 22,7 [11,9-49,4], respectivement. Les dépôts de C5b-9 étaient plus intenses après exposition des HMEC-1 à du sérum de patients IgAN transplantés rénaux qu'après exposition à du sérum issu des patients transplantés non IgAN (22,7 [11,9-49,4] *versus* 14,8 [9,7-18,6], p=0,012), ou de donneurs sains (22,7 [11,9-49,4] *versus* 13,8 [10,6-16,1], p=0,0015). On note une tendance à une intensité des dépôts de C3b/iC3b augmentée chez les patients transplantés IgAN comparés aux patients transplantés rénaux non IgAN (27,1 [15,8-55,9] *versus* 23,2 [12,2-37,8], p=0,31) et aux donneurs sains (27,1 [15,8-55,9] *versus* 17,5 [12,2-33,6], p=0,069) (**Figure 34**).

L'intensité des dépôts de C3b/iC3b et C5b-9 induits à la surface des cellules endothéliales était similaire entre les patients transplantés non IgAN et les donneurs sains (H-score_{C3c} 17,5 [12,2-33,6] *versus* 23,2 [12,2-37,8], p=0,98, et H-score_{C5b-9} 13,8 [10,6-16,1] *versus* 14,8 [9,7-18,6], p=0,96, respectivement).

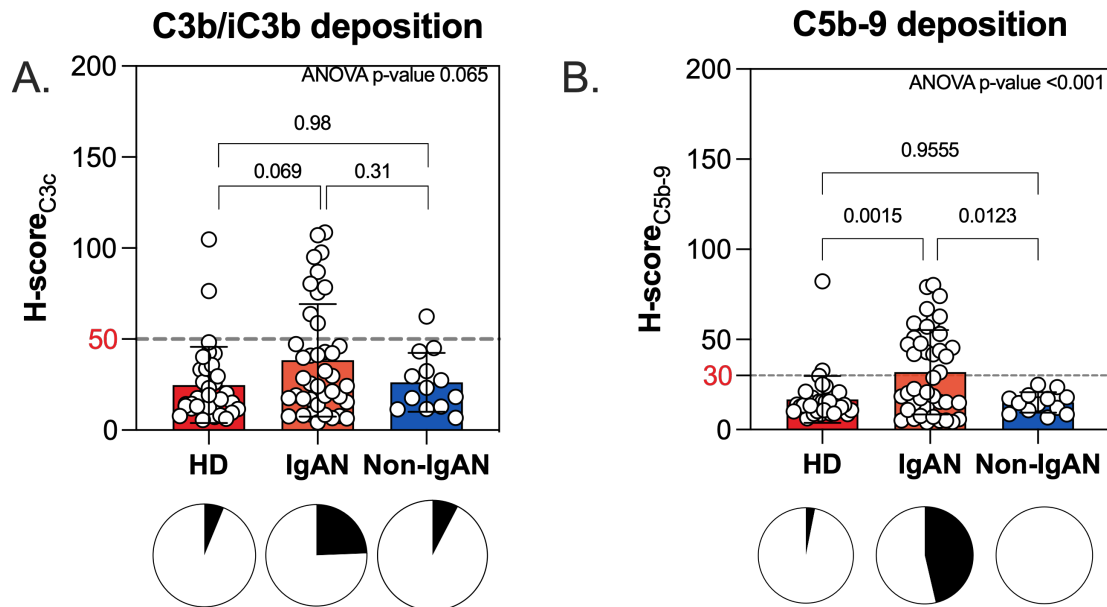


Figure 33. Activation *ex vivo* du complément chez les patients transplantés IgAN

Chaque cercle correspond aux valeurs moyennes de H-score mesurés sur des duplicats. Les résultats correspondent à 8 expérimentations indépendantes, avec l'ajout d'un sérum utilisé comme contrôle interne dans chaque expérimentation. Les valeurs seuils de H-score sont indiquées en rouge. Les proportions de patients ou donneurs ayant des marqueurs d'activation du complément en surface cellulaire considérés comme positifs les valeurs seuils de H-score sont indiquées en noir. La cohorte des donneurs sains correspond à la cohorte utilisée pour la validation du test endothélial après exclusion des trois donneurs présentant un variant du *CFH* ou du *CFI* et des dépôts augmentés. Un donneur sain présentant des dépôts de C3b/iC3b élevés n'a pas été testé pour le C5b-9. Comparaison des groupes par une ANOVA. *Abréviation* : HD : healthy donor, donneur sain (n=35), IgAN : patients avec une néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA transplantés rénaux (n=41), Non-IgAN : patients transplantés rénaux pour une autre étiologie (n=13).

L'ajout d'une condition de dérégulation du complément (inhibition du FH par OX-24) dans le sérum de patients porteurs d'une IgAN (n=26) induisait une augmentation des dépôts de C3b/iC3b et de C5b-9 à la surface des cellules endothéliales (H-score_{C3c} 22 [8-82] *versus* 67 [35-120], p<0,0001 et H-score_{C5b-9} 11 [6-57] *versus* 51[21-89], p<0,0001). L'amplitude de réponse à une dérégulation de la voie alterne du complément par l'OX-24 était similaire chez les patients transplantés pour une IgAN et les donneurs sains (p=0.47 pour le H-score_{C3c}, p=0,12 pour le H-score_{C5b-9}).

5.3. Analyse des profils d'activation *ex vivo* du complément

L'analyse combinée des dépôts endothéliaux de C3b/iC3b et de C5b-9 montre des profils d'activation *ex vivo* du complément différents entre les patients transplantés pour une IgAN comparés aux patients transplantés rénaux non IgAN testés (p<0,001) et aux donneurs sains (p=0,0188).

Au total, 19/41 des patients transplantés IgAN testés (46,3%) présentent une activation *ex vivo* du complément à la surface des HMEC-1 considérée comme augmentée (H-score_{C3c} > 50 et/ou H-score_{C5b-9} >30). Cette proportion est plus importante que celle observée chez les donneurs sains (2/32, 6,3%) ou chez les transplantés rénaux non IgAN (1/13, 7,7%) (**Figure 35**). Parmi les patients transplantés pour une IgAN, 9 patients (22,0%) induisent des dépôts de C5b-9 élevés et 10 patients (24,3%) induisent à la fois des dépôts endothéliaux de C3b/iC3b et de C5b-9 augmentés. Aucun des 13 transplantés rénaux du groupe contrôle ne présentait de H-score_{C5b-9} supérieur à 30.

Nous n'avons pas observé de différence sur les principaux paramètres cliniques (p.ex. délai post transplantation, traitement immunosuppresseur de fond) ou de fonction du greffon entre les patients IgAN transplantés rénaux présentant ou non des dépôts de complément augmentés *ex vivo*.

Chez les patients transplantés IgAN, les H-score_{C3c} et H-score_{C5b-9} étaient positivement corrélés ($p < 0,001$, r^2 0,59). A l'inverse, il n'y avait pas de corrélation entre les H-score_{C3c} et H-score_{C5b-9} chez les donneurs sains ($p=0,26$), ni chez les patients transplantés pour une autre néphropathie ($p=0,80$).

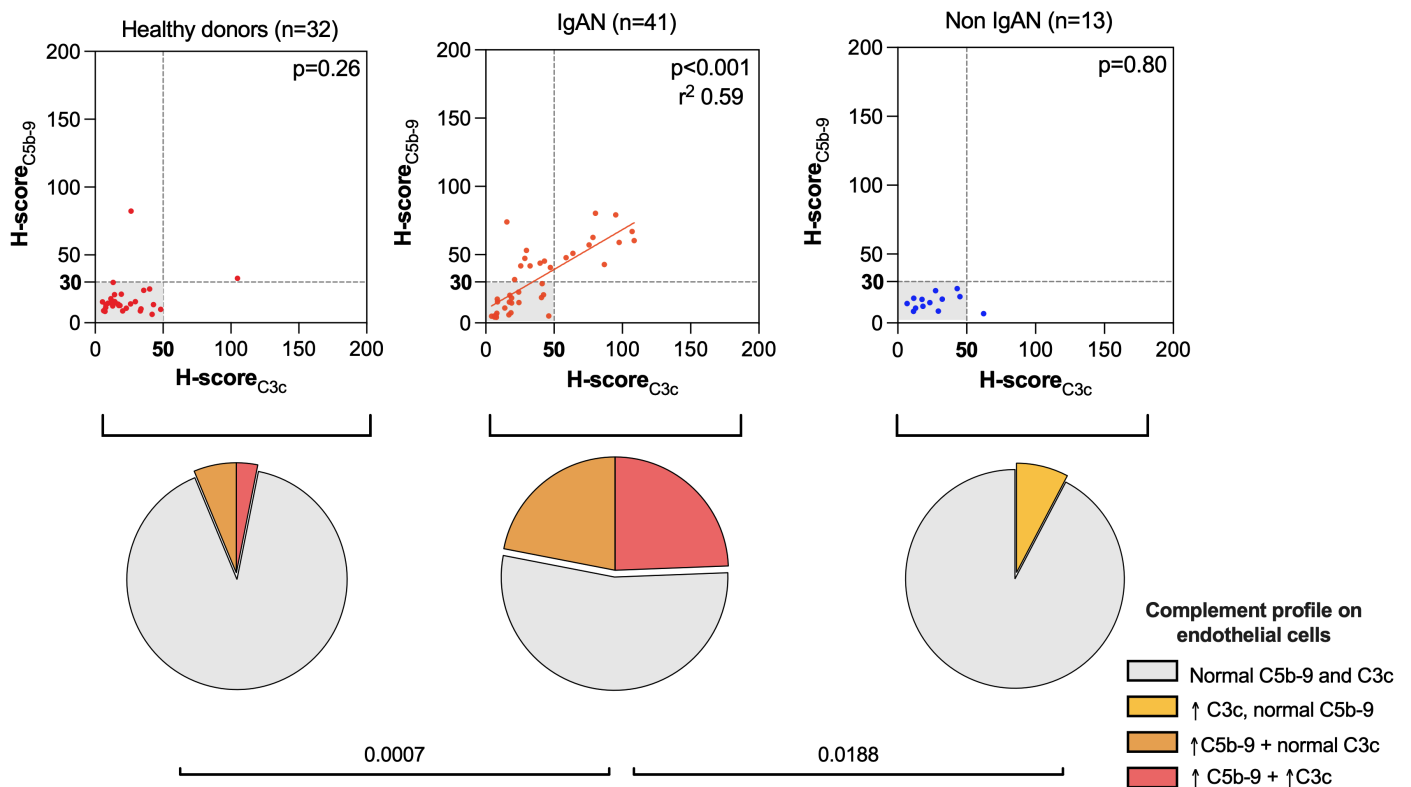


Figure 34. Activation *ex vivo* du complément chez les patients transplantés rénaux pour une IgAN

Corrélation des dépôts de C3b/iC3b et de C5b-9 à la surface des HMEC-1 induits par le sérum des donneurs sains, des patients transplantés pour une IgAN (n=41) ou transplantés rénaux pour une autre néphropathie (n=13). La cohorte des donneurs sains correspond à la cohorte utilisée pour la validation du test endothélial après exclusion des trois donneurs présentant un variant du *CFH* ou du *CFI* et des dépôts augmentés. Un donneur sain présentant des dépôts de C3b/iC3b élevés n'a pas été testé pour le C5b-9, soit une cohorte finale de 32 donneurs sains. La corrélation entre les dépôts de C3b/iC3b et de C5b-9 est évaluée dans chaque groupe par une corrélation de Pearson, avec indication du r^2 . Les profils d'activation du complément sont comparés entre les différents groupes par un Chi² en regroupant les patients présentant au moins un des H-scores supérieurs au seuil (groupes jaune, orange et rose) comparés aux patients présentant des biomarqueurs d'activation du complément dans les valeurs de références (groupe gris). Une valeur de $p < 0.05$ est considérée comme significative.

Ces données suggèrent que chez les patients IgAN testés, le défaut de régulation du dépôt de C3b en quantité importante à la surface des cellules endothéliales permet la formation de C3 convertases (C3bBb) actives puis de C5 convertases, favorisant ainsi l'engagement de la voie terminale du complément. Ces résultats nous permettent d'émettre deux hypothèses.

Premièrement, qu'il existerait chez certains patients transplantés pour une IgAN un **défaut de régulation du C3b/C3bBb** à la surface des cellules endothéliales. Les capacités de régulation du complément à la surface des cellules endothéliales pourraient notamment être impactées par une **susceptibilité génétique** en lien avec des variants portant sur les régulateurs circulants du complément (p.ex. FI, FH et FHR).

Deuxièmement, que la formation de C3/C5 convertases alternes puis l'engagement de la voie terminale serait en lien avec **une activation du complément se produisant dans le sérum des patients IgAN transplantés et générant de grandes quantités de C3b**. Le C3b généré pendant l'incubation se déposerait ensuite en quantité importante à la surface des cellules endothéliales, dépassant ainsi les capacités de régulation du complément par les régulateurs circulants (FI, FH issus du sérum testé) et les régulateurs membranaires des cellules endothéliales.

Pour tester ces hypothèses, nous avons : **1) recherché des facteurs de susceptibilité génétique favorisant une dérégulation du complément à la surface cellulaire** chez les patients porteurs d'une IgAN. Nous avons concentré notre analyse sur les gènes du *CFH* et du *CFHR5* pour deux raisons : **i)** les variants génétiques portant sur ces deux gènes ont précédemment été associés à des pathologies rénales médiées par le complément (IgAN, SHUa et/ou GC3) et **ii)** le *locus* 1q32 contenant les gènes *CFH-CFHR* a été identifié comme *locus* de susceptibilité vis-à-vis du développement de l'IgAN. **2)** Nous avons ensuite recherché des **facteurs favorisant l'activation du complément directement au sein du sérum des patients porteurs d'une IgAN**, en corrélant les dépôts de complément induits à la surface des HMEC-1 par le sérum de patients avec des biomarqueurs d'activité de l'IgAN et les biomarqueurs d'activation du complément plasmatiques.

5.4. Recherche d'une susceptibilité génétique : étude ciblée sur le *CFH* et le *CFHR5*

Nous avons réalisé un séquençage direct des exons des gènes *CFH* et *CFHR5* chez les 41 patients IgAN transplantés étudiés dans le modèle. L'étude génétique du *CFH* a révélé 4 variants du *CFH* chez 3 patients, dont deux variants ultra-rares faux-sens (MAF<0.1%) chez deux patients (*CFH*, p.N516K, hétérozygote et *CFH*, p.G117R, hétérozygote) (**Tableau 13**). Nous avons caractérisé l'impact fonctionnel *in vitro* de ces deux variants. Le variant *CFH* p.G117R était associé à un déficit quantitatif du FH et à un impact fonctionnel majeur *in vitro* sur les capacités de régulation du FH à la surface endothéliale (diminution de la capacité de fixation au C3b, diminution de l'activité cofacteur du FI et diminution de l'activité de dissociation de la C3 convertase alterne). Aucun impact fonctionnel n'a été identifié *in vitro* pour le variant *CFH* p.N516K. Les deux patients porteurs d'un variant ultra-rare faux-sens sur le gène du *CFH* avaient des dépôts de complément augmentés dans le modèle endothélial, avec : des dépôts de C3b/iC3b et de C5b-9 augmentés chez le patient porteur du variant pathogène *CFH* p.G117R, et des dépôts de C5b-9 isolément élevés chez le patient portant le variant hétérozygote du *CFH* p.N516K. Le patient porteur des polymorphismes *CFH* p.S890I et p.V1007L (VUS, association fréquente en population africaine) présentait des dépôts de complément normaux.

Les trois patients portant le polymorphisme du *CFHR5* p.R356H (MAF 1,6%, VUS) avaient des dépôts de C5b-9 augmentés (**Tableau 13**). Un des patients (P22) combinait un variant *CFHR5* p.R356H et un variant rare du *CFH* p.N516K. Les deux patients (P15, P35) étaient porteurs homozygotes de l'haplotype *CFH-H3* (*gtgt*) à risque de SHU atypique. Ces deux patients (P15, P35) ont présenté un tableau de microangiopathie thrombotique biologique et rénale dans les suites post-transplantation (résolu au moment du prélèvement).

Au total, 4/19 (21.1%) des patients transplantés IgAN présentant des dépôts de C5b-9 élevés à la surface des HMEC-1 portaient un variant du *CFH* ou du *CFHR5*. En revanche, l'intensité des dépôts endothéliaux chez les patients porteurs ou non d'un variant était similaire (**Figure 36**).

Tableau 13. Variants identifiés chez les patients IgAN transplantés évalués dans le modèle endothélial

Patient	Gene	Variant	Transcrit	Statut	Domaine protéique	MAF (%) [§]	Classification du variant	H-score _{C3c} (N<50)	H-score _{C5b-9} (N<30)
P22	<i>CFH</i>	c.1546A>T	p.Asn516Lys	He	SCR9	0.030	<i>VUS</i>	47	41 (↑)
P07	<i>CFH</i>	c.349G>A	p.Gly117Arg	He	SCR2	<i>novel</i>	Pathogène*	59 (↑)	48 (↑)
P28	<i>CFH</i>	c.2669G>T	p.Ser890Ile	He	SCR15	2.13	<i>VUS</i>	6	5
	<i>CFH</i>	c.3019G>T	p.V1007Leu	He	SCR17	2.81	<i>VUS</i>		
P15								40	44 (↑)
P35	<i>CFHR5</i>	c.1067G>A	p.Arg356His	He	SCR5	1.62	<i>VUS</i>	76 (↑)	57 (↑)
P22								41	41(↑)

* Variant que nous avons identifié comme pathogène *in vitro*. *Abréviations* : *CFH* : complement factor H gene, *CFHR5* : complement factor H related-protein 5 gene, *SCR* : *short consensus repeat domain*, *VUS* : variant de signification indéterminée.

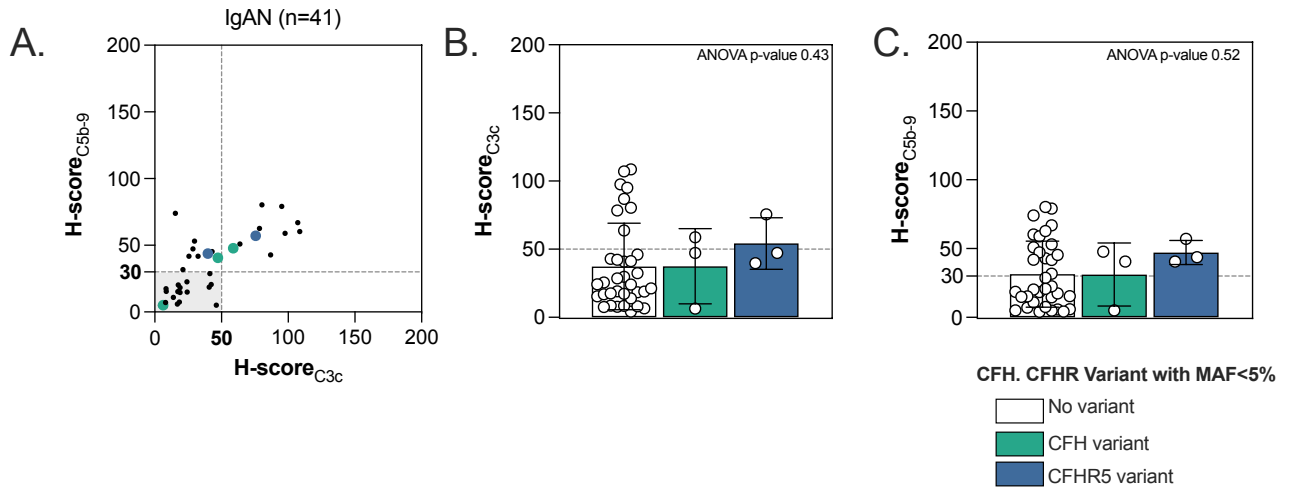


Figure 35. Dépôts de C3b/iC3b et C5b-9 chez les patients IgAN porteurs d'un variant du *CFH* ou du *CFHR5*

Panel A. Corrélation des dépôts de C3b/iC3b et des dépôts de C5b-9 mesurés à la surface des HMEC-1 en fin d'incubation. **Panels B et C.** Intensité des dépôts de C3b/iC3b et de C5b-9 chez les patients transplantés rénaux pour une IgAN selon la présence ou non d'un variant du *CFH* ou de *CFHR5*. Comparaison des groupes par un ANOVA. *Abbréviations :* *CFH* : *complement factor H gene*, *CFHR5* : *complement factor H related protein 5 gene*, *MAF* : *minor allele frequency*, fréquence de l'allèle mineur.

5.5. Recherche de facteurs favorisant l'activation *ex vivo* du complément par le sérum des patients IgAN

Nous avons dosé les biomarqueurs d'activation du complément et d'activité de l'IgAN sur des échantillons de plasmas prélevés à la même date que le sérum testé dans le modèle *ex vivo* chez 26 des 41 patients IgAN transplantés rénaux.

Activation du complément *ex vivo* et biomarqueurs plasmatiques d'activation du complément

Les niveaux plasmatiques de C3, C4 étaient normaux pour l'ensemble des 26 patients analysés, avec des valeurs médianes de 1210 [982-1540] mg/ml pour le C3 et de 281 [235-450] mg/ml pour le C4. Les concentrations plasmatiques de FH, FI et properdine étaient normales. Malgré l'absence de consommation des protéines C3 et C4 au niveau plasmatique, 96% des patients présentaient au moins un marqueur augmenté parmi les fragments d'activation Bb, C3a, C5a et/ou sC5b-9.

Nous avons comparé les concentrations plasmatiques des fragments d'activation du complément chez les patients transplantés IgAN présentant ou non une activation *ex vivo* du complément augmentée (définie comme un $H\text{-score}_{C5b-9} > 30$) dans le modèle endothélial. La concentration de C5a plasmatique était plus importante chez les patients présentant une activation *ex vivo* augmentée du complément à la surface des HMEC-1 (5,4 [2,9-7,6] *versus* 8,0 [6,6-12,5] ng/mL, $p=0,0310$). Ces valeurs restent cependant dans les normes de valeurs de C5a. La discrète élévation du C5a dans le plasma des patients présentant des dépôts de C5b-9 augmentés à la surface des cellules endothéliales suggère la présence de C5 convertases en petites quantités ou modérément actives chez ces patients. Les concentrations plasmatiques des autres biomarqueurs étaient similaires entre les deux groupes (**Figure 37**).

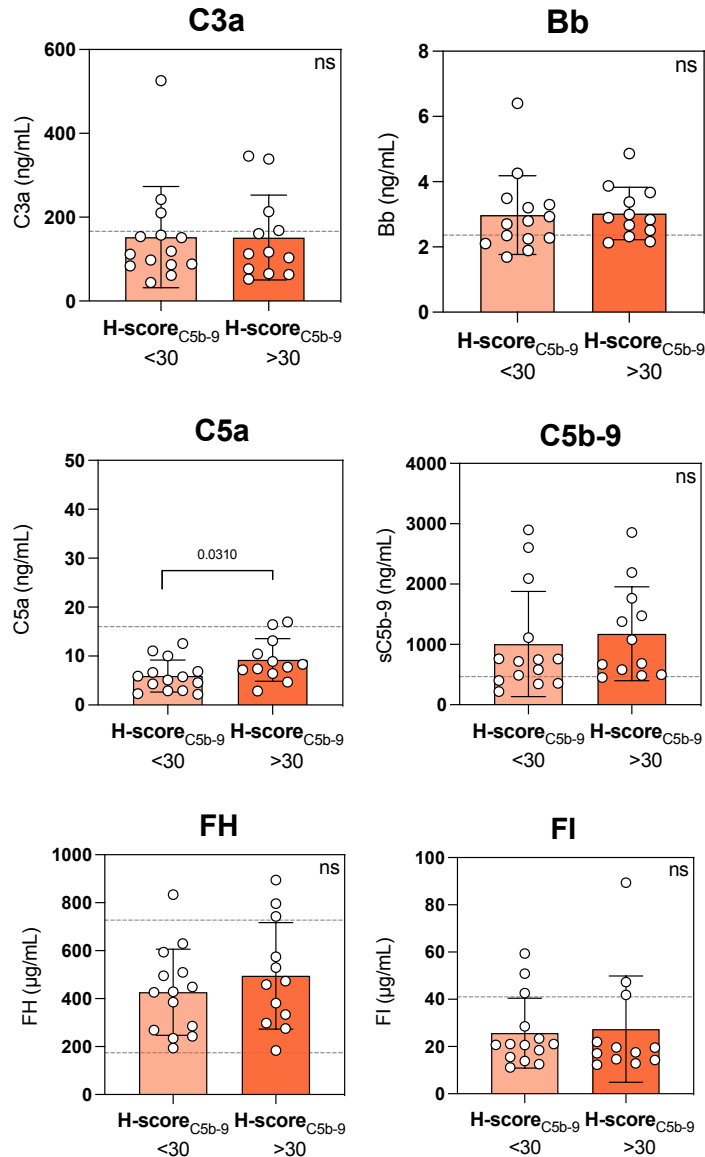


Figure 36. Biomarqueurs d'activation du complément selon l'intensité des dépôts de C5b-9

Les lignes en pointillés indiquent les valeurs de références définies dans un panel de 124 donneurs sains. Les graphiques en barre correspondent à la moyenne et déviation standard. Comparaison des groupes avec un test de Mann-Whitney. *Abréviations* : FH : facteur H, FI : facteur I, sC5b-9 : C5b-9 soluble.

5.6. Corrélation entre l'activation du complément *ex vivo* et les biomarqueurs d'activité de l'IgAN

Nous avons mesuré le taux plasmatique de Gd-IgA1 et le ratio IgA_{totales}:C3 plasmatique comme marqueurs d'activité de l'IgAN chez les 26 patients. Au total, 13 patients (50,0%) présentaient des concentrations plasmatiques de Gd-IgA1 élevées (> 15µg/mL). Les concentrations plasmatiques de Gd-IgA1 étaient similaires chez les patients induisant ou non des dépôts élevés de C5b-9 (H_{-score} >30) à la surface des cellules endothéliales (15,2 [9,8-43.8] µg/mL *versus* 16,7 [12,3-46,9] µg/mL, p=0.98). Nous avons observé une tendance à l'élévation du ratio IgA_{totales}:C3 plasmatique chez les patients induisant des dépôts de C5b-9 élevés dans le modèle endothélial (ratio 2,8 [1,6-4,5] *versus* 1,6 [1,5-2,7], p=0,12).

L'analyse combinée des biomarqueurs d'activation du complément à la surface des cellules endothéliales (H_{-scores}) et des biomarqueurs d'activité de l'IgAN permet de différencier 3 clusters de patients (**Figure 38**). Le cluster 1 regroupe des patients avec des taux de Gd-IgA1 et ratio IgA :C3 faibles et un faible niveau de dépôts de C3b/iC3b et C5b-9 induits à la surface des cellules endothéliales. Aucun de ces patients ne présente de variant du *CFH* ou du *CFHR5*. Le cluster 2 possède des signes d'activité de l'IgAN faibles et des dépôts de C5b-9 isolément élevés à la surface endothéliale. Deux des neuf patients de ce groupe portent un variant du *CFHR5*. Le groupe 3 présente une combinaison de marqueurs d'activité de l'IgAN et un haut niveau de dépôts de C3b/iC3b induits en surface endothéliale avec des profils d'activation de la voie terminale du complément (dépôts de C5b-9) inconstants. Le patient porteur du variant rare hétérozygote pathogène du *CFH* p.G117R présente à la fois des signes d'activité de l'IgAN et une dérégulation du complément à la surface des cellules endothéliales.

Ce modèle d'étude offre une perspective générale de l'activation *ex vivo* du complément. L'association entre l'intensité d'activation *ex vivo* du complément à la surface des cellules endothéliales HMEC-1 et les paramètres d'activité de l'IgAN ne permet donc pas d'établir de lien direct entre ces biomarqueurs. Ces observations nous ont conduit à explorer l'hypothèse selon laquelle les IgA1

présentes dans le sérum des patients (contenant les Gd-IgA1 et potentiellement les complexes immuns) pourraient constituer un trigger de l'activation *ex vivo* de la cascade du complément.

Nous avons ensuite étudié l'intensité de l'activation *ex vivo* du complément d'un sérum de donneur sain enrichi en IgA1 purifiées à partir de patients IgAN ou de donneurs sains.

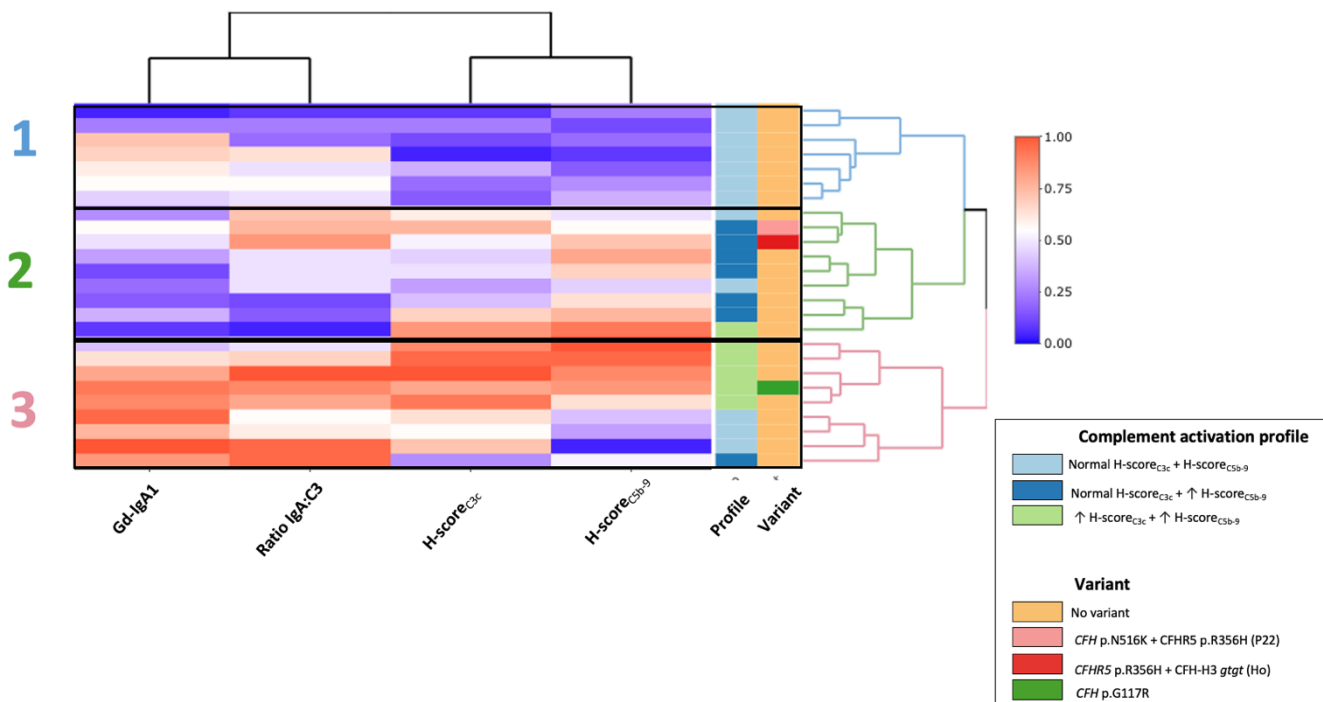


Figure 37. Association du profil d'activation *ex vivo* du complément et des biomarqueurs d'activité de l'IgAN

Heatmap représentant l'association entre les biomarqueurs d'activité de l'IgAN (taux de Gd-IgA1 circulants, ratio IgA totales/C3 et les profils d'activation du complément *ex vivo* dans le modèle endothélial. L'analyse permet de définir 3 clusters de patients. Le cluster 1 regroupe des patients avec des taux de Gd-IgA1 et ratio IgA :C3 faibles et un faible niveau de dépôts de C3b/iC3b et C5b-9 induits à la surface des cellules endothéliales. Aucun de ces patients ne présente de variant du *CFH* ou du *CFHR5*. Le groupe 2 possède des signes d'activité de l'IgAN faibles et des dépôts de C5b-9 isolément élevés à la surface endothéliale. Deux des neuf patients de ce groupe portent un variant de *CFHR5*. Le groupe 3 présente une combinaison de marqueurs d'activité de l'IgAN et un haut niveau de dépôts induits en surface endothéliale. *Abréviations* : *CFH* : *complement factor H gene*, *CFHR5* : *complement factor H related protein 5 gene*, Gd-IgA1 : IgA1 galactose déficiente.

2.4. Étude de l'activation *ex vivo* du complément par les IgA1 purifiées issues de patients ou de donneurs sains.

Nous avons purifié des IgA1 sériques provenant de 15 patients porteurs d'une IgAN et de 8 donneurs sains provenant de l'EFS par chromatographie d'affinité (résine Jacaline). Les SDS-Page avec coloration au Bleu de Coomassie des produits de purification sont montrés dans la **figure 39**. Les profils des SDS-Page étaient similaires entre les produits de purification des IgA1 sériques provenant de patients ou des contrôles, compatible avec la présence d'IgA1 monomériques et dimériques. Nous n'avons pas évalué la présence de complexes immuns de haut poids moléculaire dans les produits de purification.

Activation *ex vivo* du complément à la surface des cellules endothéliales par les IgA1 purifiées

Nous avons testé la capacité d'activation *ex vivo* du complément à la surface d'HMEC-1 par les IgA1 purifiées (150 µg/100 µL de sérum) à partir de sérum de 6 patients IgAN et de 2 donneurs sains. L'objectif était d'identifier si l'enrichissement d'un sérum de donneur sain en IgA1 purifiées issues de patients permettait la formation de C3 convertases et la génération de fragments d'activation du C3.

Les dépôts de C3b/iC3b ont été mesurés après 120 minutes d'incubation (**Figure 40**) et les surnageants de cultures cellulaires ont été collectés en fin d'incubation pour le dosage de l'anaphylatoxine C3a par ELISA (Microvue, Quidel). Une condition de dérégulation de la voie alterne par de l'OX-24 a été ajoutée en condition positive d'activation de la voie alterne du complément.

Le H-score_{C3c} mesuré à la surface des cellules endothéliales était similaire pour le sérum supplémenté en IgA1 provenant de patients ou de donneurs sains ($p=0,99$). L'ajout d'une condition de dérégulation du complément dans le sérum provenant d'un donneur supplémenté en IgA1 de donneur sain induisait une augmentation importante des dépôts de C3b/iC3b ($p<0,001$).

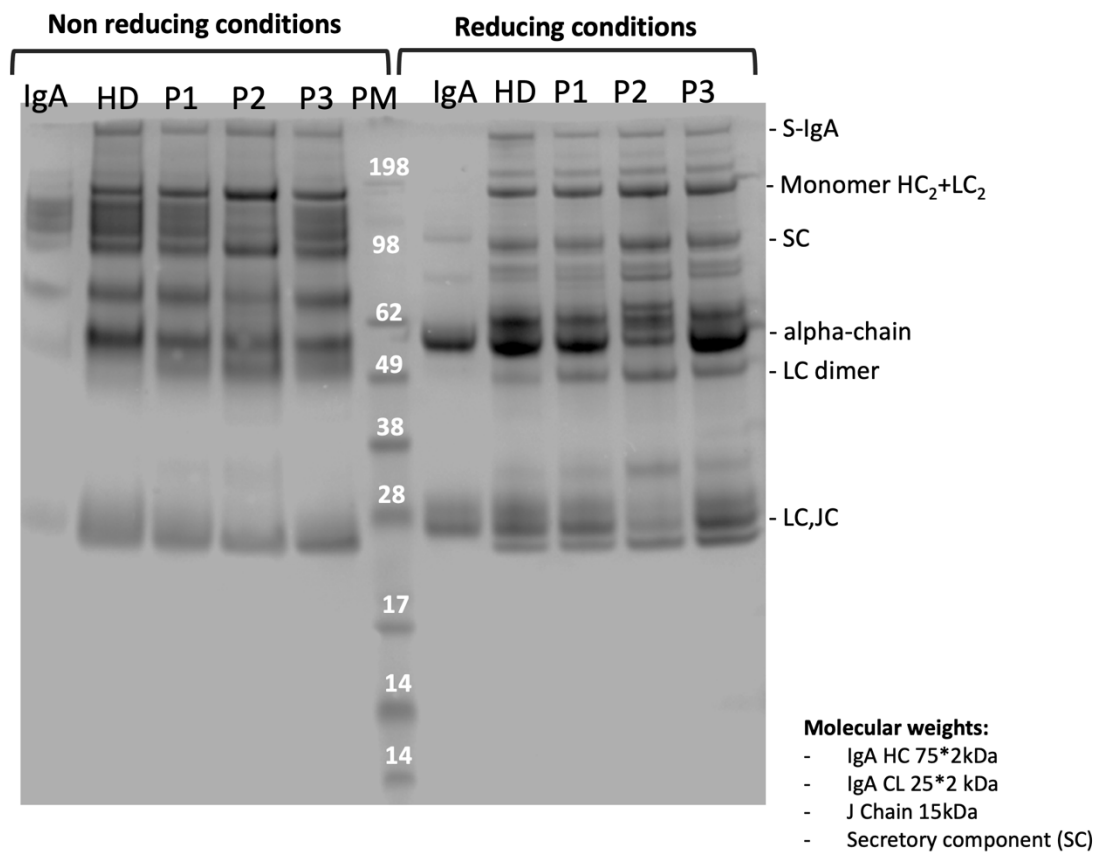


Figure 38. SDS-Page des produits de purification des IgA1 sériques de patients et de donneur sains

Pureté des IgA1 purifiées par chromatographie d'affinité (résine Jacaline) évaluée par SDS-Page 4-12% avec coloration au Bleu de Coomassie en conditions non réductrices (à gauche) et en conditions réductrices (DTT, à droite). Les poids moléculaires (en kDa) sont indiqués en blanc. *Abréviations* : IgA : IgA monomérique commerciale Sigma. HD : produit de purification des IgA1 à partir d'un sérum de donneur sain, P1 : produit de purification des IgA1 à partir d'un sérum de patient porteur d'une IgAN. PM : marqueur de poids moléculaire. HC : heavy chain = alpha chain = chaîne lourde alpha, LC : light chain, chaîne légère, J chain : chaîne J, SC : secretory component, composant sécrétoire, S-IgA : IgA sécrétoires, dimériques.

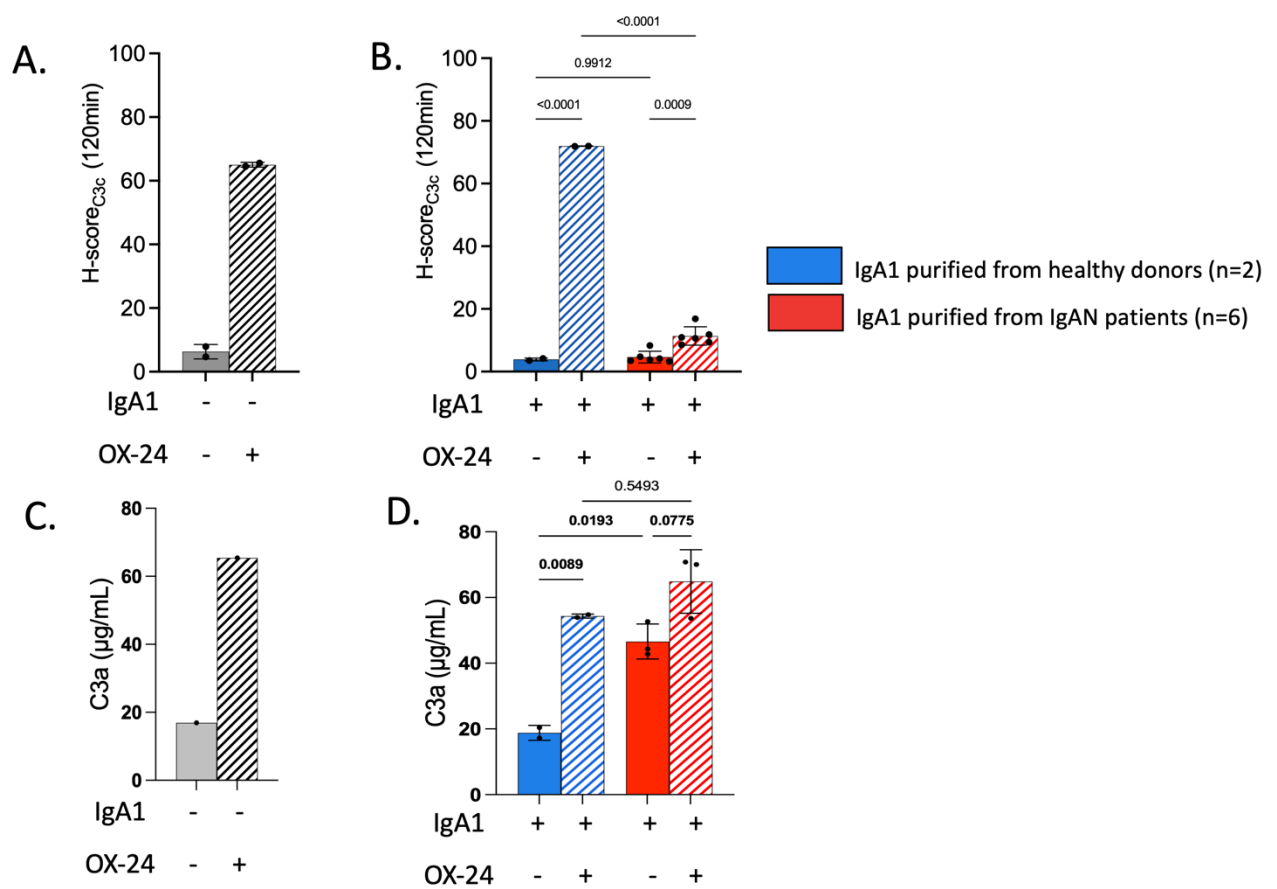


Figure 39. Activation *ex vivo* du complément à la surface des HMEC-1 après incubation avec du sérum de donneur sain supplémenté en IgA1 purifiées

Panels A et B. Mesure des marqueurs des dépôts de C3c à la surface des HMEC-1. Chaque point représente la moyenne de duplicats (n=1 expérimentation). Les conditions en gris sont les conditions contrôles (sérum de donneur sain en présence ou non d'une dérégulation du complément). Les conditions en rouge représentent du sérum du même donneur sain supplémenté en IgA1 provenant de patients. Les conditions en bleu représentent le sérum de donneur sain enrichi en IgA1 purifiées provenant de donneurs sains. **Panels C et D.** Mesure de l'anaphylatoxine C3a libérée dans le surnageant de culture cellulaire par ELISA. *Abbreviations :* IgA1 : immunoglobuline A1 purifiée à partir de patients (rouge) ou de donneurs sains (bleu), 150µg/100µl de sérum. OX-24 : anticorps murin anti-FH humain, utilisé à la concentration finale de 75µg/mL. Les données appariées sont comparées par un test de Wilcoxon. Les groupes sont comparés par un test de Mann Whitney.

De façon surprenante, l'addition d'OX-24 n'entraînait pas de majoration des dépôts de C3b/iC3b induit par le sérum supplémenté en IgA1 provenant de patients. Ce profil était similaire pour les IgA1 des 6 patients testés. En revanche, l'étude de la concentration en C3a dans les surnageants montre une libération plus importante de C3a dans le surnageant des HMEC-1 exposées à du sérum de donneur supplémenté en IgA1 de patients en présence d'IgA1 de donneurs sains ($p=0,0193$).

Cette libération de C3a témoigne de la formation et de l'activité de C3 convertases dans nos conditions expérimentales en présence d'IgA1 de patients, mais pas de contrôles. L'absence d'augmentation des dépôts de C3b détectable dans notre modèle pourrait être compatible avec une activation du complément prenant lieu à la surface des IgA1, jouant alors un rôle de surface activatrice. Ces résultats expérimentaux intéressants restent cependant à confirmer.

Étude de l'activation du complément en phase fluide par les IgA1 purifiées

Nous avons testé la capacité des IgA1 provenant de patients ou de donneurs sains à activer le complément dans le sérum en phase fluide, c'est-à-dire, en l'absence de surface cellulaire. Pour cette expérimentation, des IgA1 purifiées à partir de donneurs sains ($n=8$) ou de patients ($n=15$) ont été ajoutés dans du sérum d'un même donneur sain, aux mêmes concentrations que précédemment et incubées pendant 30 minutes à 37°C. Les anaphylatoxines C3a et C5a sont mesurées en fin d'incubation par ELISA (MicroVue, Quidel). Ces conditions expérimentales permettent l'activation des 3 voies du complément.

L'ajout d'IgA1 purifiées de patients dans du sérum conduit à une libération hétérogène de C3a ($p=0,99$) avec une génération modérée de C5a comparée aux IgA1 de donneurs sains ($p=0,018$). La génération très modérée de C5a est en faveur de la formation de C5 convertases dans les conditions expérimentales (**Figure 41**).

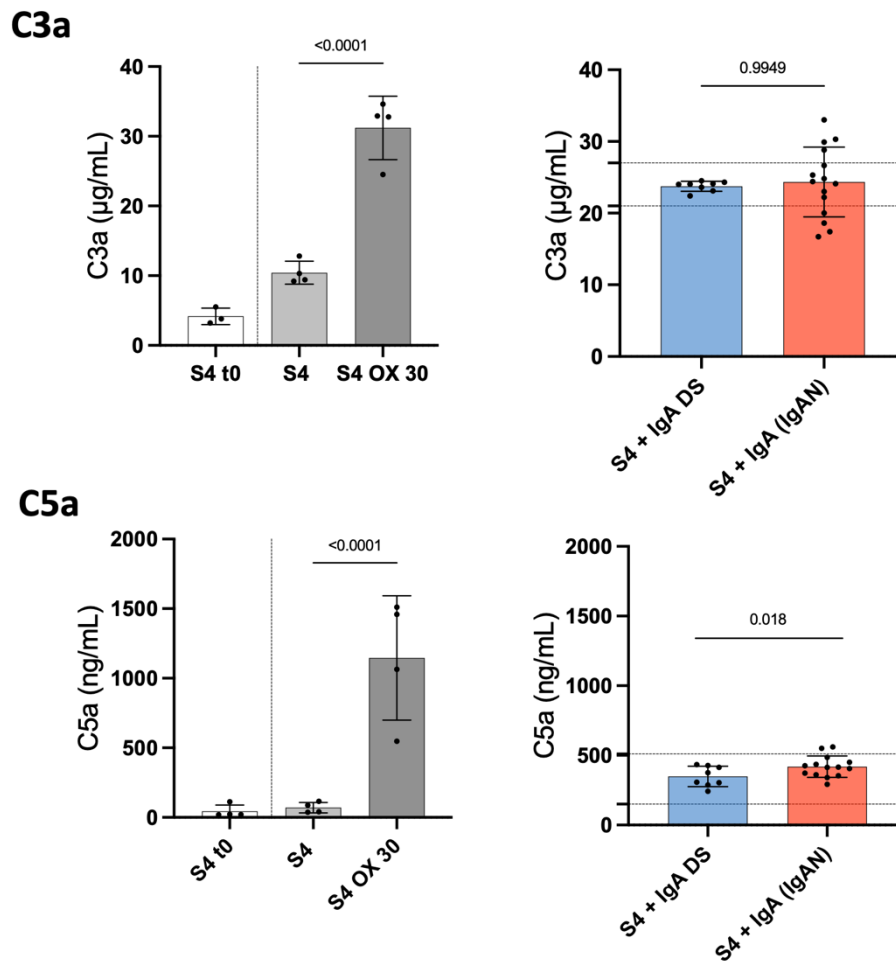


Figure 40. Activation du complément en phase fluide par les IgA1 purifiées de patients ou de donneurs sains

Mesure des anaphylatoxines C3a et C5a par ELISA libérées à 30 minutes d'incubation dans le sérum d'un sain enrichi en IgA1 purifiées de patients ou de donneurs sains. Les conditions en gris sont les conditions contrôles (sérum de donneur sain en présence ou non d'une dérégulation du complément). Les conditions en rouge représentent du sérum du même donneur sain supplémenté en IgA1 provenant de patients. Les conditions en bleu représentent le sérum de donneur sain enrichi en IgA1 purifiées provenant de donneurs sains. Ces résultats sont issus de 3 expérimentations indépendantes. *Abréviations* : IgA1 : immunoglobuline A1 purifiée à partir de patients (rouge) ou de donneurs sains (bleu), 150µg/100µl de sérum. OX : anticorps murin anti-FH humain, utilisé à la concentration finale de 75µg/mL, S4 : sérum du donneur sain n°4, DS : donneur sain. Les données appariées sont comparées par un test de Wilcoxon. Les groupes sont comparés par un test de Mann Whitney.

2.5. Conclusion – Susceptibilité à l'activation *ex vivo* du complément chez les patients IgAN

L'étude de l'activation *ex vivo* du complément dans notre modèle endothélial a permis de révéler une susceptibilité à l'activation du complément chez 19/41 des patients transplantés pour une IgAN testés dans le modèle (46,3%). Les résultats obtenus dans ce modèle complètent les dosages des biomarqueurs plasmatiques d'activation du complément, en apportant une vision dynamique sur « l'activabilité » globale de la cascade du complément dans le sérum des patients.

Nos résultats concernant l'évaluation globale des biomarqueurs d'activation du complément mettent en valeur l'importance de l'activation du complément dans la physiopathologie de l'IgAN : avec la présence de signes d'activation du complément à bas bruit au niveau systémique et/ou une propension à l'activation *ex vivo* à la surface de cellules endothéliales.

Une régulation imparfaite du complément, notamment de la voie alterne, pourrait catalyser l'activation du complément et son impact négatif sur la progression de la néphropathie. L'activation du complément pourrait être d'autant plus importante chez les patients présentant un terrain génétique de susceptibilité à une régulation insuffisante du complément.

Nous avons ensuite exploré l'impact des variant rares et des polymorphismes des gènes impliqués dans l'activation et la régulation du complément à la surface tissulaire chez les patients porteurs d'une IgAN ainsi que l'impact de la génétique du complément sur la susceptibilité vis-à-vis du risque de développement d'une IgAN et sur le pronostic rénal.

Partie 2. Impact de la génétique du complément dans l'IgAN

III – Analyse de la génétique du complément dans l’IgAN

1. Introduction

Nous avons analysé la génétique de six gènes du complément impliqués dans la formation ou la régulation des C3 convertases et/ou précédemment associés à des néphropathies médiées par le complément (*CFH*, *CFI*, *MCP*, *C3*, *CFB* et *CFHR5*) dans une cohorte française de 270 patients porteurs d’une IgAN primitive (260 adultes, 10 enfants). Nous avons mené une analyse génétique extensive **i)** des variants rares du complément, **ii)** des polymorphismes et haplotypes du *CFH* et de *MCP*, **iii)** du nombre de copies des gènes *CFHR1-5*, et de leur impact sur la susceptibilité vis-à-vis du risque de développement d’une IgAN, le phénotype clinique et/ou sur le pronostic rénal des patients.

Nous avons combiné une approche fonctionnelle à l’analyse génétique en testant l’impact des variants rares faux-sens du *CFH* identifiés sur les capacités de régulation du FH *in vitro* en employant de nouveaux tests fonctionnels utilisant la technologie du Luminex®.

2. Méthodes : analyse génétique

2.1 Cohortes d'études

Patients porteurs d'une IgAN

Nous avons étudié 270 patients non apparentés porteurs d'une IgAN issus de deux centres français (Hôpitaux Universitaires de Saint-Étienne, en collaboration étroite avec Pr Nicolas Maillard et Pr Christophe Mariat ; et les Hôpitaux Universitaires de Strasbourg) par séquençage d'un panel de gènes de la voie alterne du complément. Le diagnostic d'IgAN devait être confirmé histologiquement, et basé sur la mise en évidence de dépôts dominants ou codominants d'IgA au niveau du mésangium glomérulaire par immunomarquage effectué en routine.

Les patients porteurs de formes secondaires d'IgAN, en particulier les formes associées à une cirrhose, à des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ou à d'autres maladies auto-immunes, ont été exclus.

Les données cliniques, biologiques et de survie rénale ont été collectées rétrospectivement. Tous les patients ont signé un consentement pour la collecte de données cliniques et biologiques ainsi que pour les tests génétiques (NCT05234463).

Patients porteurs d'une néphropathie médiée par le complément

Nous avons étudié les fréquences des polymorphismes et haplotypes du *CFH* chez les patients porteurs d'une néphropathie médiée par le complément ayant bénéficié d'une exploration génétique au Service d'Immunologie Biologique de l'Hôpital Européen Georges Pompidou (Dr Véronique Frémeaux-Bacchi et Dr Sophie Chauvet, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris) : une cohorte de patients porteurs d'une glomérulonéphrite à dépôts de C3 (GC3) (n=231) et une cohorte de patients porteurs d'un SHU atypique (SHUa) (n=228 adultes).

Population de référence

Les données de GWAS de 503 donneurs d'origine européenne (EUR) issus de la base « 1000 Genomes Phase 3 Project » (1000 Genomes 30X GRCh38)⁴ (294) (1kGe) ont été utilisées comme population de référence pour la comparaison de la distribution allélique des différents polymorphismes étudiés ainsi que des haplotypes. L'extraction des données d'intérêt a été réalisée en étroite collaboration avec l'équipe du Pr Sophie Limou (Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, Inserm, Université de Nantes, Nantes) (Interface Python, outil BCFtools). Brièvement, les données sont téléchargées, filtrées pour les différentes grandes populations (EUR, EAS, AMR, SAS, AFR) et les gènes d'intérêts. Les variants sont ensuite annotés puis filtrés selon leur fréquence (<1% ou ≥1%). Pour ce travail, nous avons porté notre attention sur les variants non synonymes situés dans les régions codantes et les polymorphismes précédemment décrits comme associés à des pathologies médiées par le complément. Nous avons donc exclu les variants situés en zone intergénique, intronique, en régions non traduites (*untranslated regions*, UTR) ainsi que les variants situés en amont ou en aval des gènes d'intérêt (variants down-stream ou up-stream).

⁴ Données accessibles sur: <https://www.internationalgenome.org/data-portal/data-collection/30x-grch38>

2.2. Séquençage génétique

Extraction d'ADN

L'ADN génomique a été extrait à partir d'échantillons de sang total à l'aide de l'extracteur Maxwell® (Promega), selon une procédure standardisée. L'ADN extrait a été quantifié à l'aide du fluoromètre Qubit (dsDNA HS Assay kit, Invitrogen) préalablement aux analyses génétiques.

Séquençage d'un panel ciblé sur les gènes de la voie alterne du complément

Un panel comprenant six gènes de la voie alterne du complément (*CFH*, *CFB*, *CFI*, *MCP*, *C3*, *CFHR5*) associés à des néphropathies médiées par le complément a été analysé par *next generation sequencing* chez 197 patients, comme précédemment décrit (153).

2.3. Polymorphismes et haplotypes

Sélection des polymorphismes d'intérêt et définition des haplotypes

Nous avons porté notre analyse sur différents polymorphismes (SNP) précédemment associés à des néphropathies médiées par le complément (137). Nous avons sélectionné quatre SNP du gène *CFH*: rs800292 c.184G>A p.V62I ; rs1061170 c.1204T>C p.Y402H ; rs3753396 c.2016A>G G672G et rs1065489 c.2808G>T p.E936D (38,48). Ces quatre polymorphismes (rs800292, rs1061170, rs3753396, rs1065489) ont été combinés pour former des haplotypes (H) du gène *CFH*.

Nous avons procédé de manière similaire pour les haplotypes des gènes *MCP* et *CFB* en combinant cinq SNP du gène *MCP* (rs2796267-652A>G ; rs2796268-366A>G ; rs1962149 IVS9-78G>A ; rs859705 IVS12 +638G>A ; rs7144 c.4070T>C) et trois SNP du gène *CFB* (rs4151667 c.26T>A p.L9H ; rs12614 c.94C>T p.R32W ; rs641153 c.95G>A p.R32Q).

L'analyse génétique a été complétée par l'étude de deux polymorphismes supplémentaires ayant été décrits précédemment comme associés à l'IgAN (295,296) : le SNP du *C3* (rs2230199 c.304C>G p.R102G) et le SNP intergénique rs7542235 (chr1:196854483 A>G) dont l'allèle G est transmis en déséquilibre de liaison avec la délétion *CFHR1-CFHR3*.

Nous avons également défini les haplotypes *CFHR1*A* (c.469C, c.475C, c.523G) et *CFHR1*B* (c.469T, c.475G, c.523C) dans le sous-groupe de patients ayant bénéficié d'un séquençage complet du gène *CFHR1*.

Phasing et Imputation des polymorphismes pour la génération d'haplotypes

Les génotypes des différents polymorphismes identifiés dans la cohorte de patients porteurs d'une IgAN, d'une GC3 et d'un SHUa ont été phasés et imputés à l'aide du serveur d'imputation de l'Université du Michigan⁵ (297) et Eagle v2.4, après une étape préalable de contrôle de la qualité du jeu de données. Ces critères comprenaient : moins de 50% de SNP avec des données manquantes pour un même patient et moins de 10% de génotypes manquants pour un polymorphisme donné. La cohorte 1kGe a été utilisée comme panel de référence (apps@1000g-phase-3-v5, version hg19) pour l'imputation des haplotypes de *CFH*, *MCP* et *CFB* dans les cohortes d'étude respectives. L'obtention de données génétiques phasées dans nos populations de patients nous permettait ensuite la définition des haplotypes d'intérêt. Les haplotypes montrant une fréquence de plus de 1% dans la population de référence (1kGe) ou dans la population de patients IgAN ont été analysés.

⁵ Disponible sur : <https://imputationserver.sph.umich.edu>

2.4. Variants rares

Nous avons défini comme ultra-rares les variants présentant une fréquence allélique mineure (MAF) inférieure à 0,1 % dans la population européenne de la base de données *genome Aggregation Database* (gnomAD)⁶ (298). Les variants avec une MAF entre 0,1-1% étaient définis comme rares. Les variants avec une MAF >1 % étaient définis comme des polymorphismes. Les fréquences alléliques et des haplotypes des populations d'étude ont été comparées à celles de la population de référence (1kGe)(294).

Le caractère pathogène potentiel des variants génétiques a été évalué par différents outils. L'impact des variants ultra-rares faux-sens identifiés sur le *CFH* a été étudié fonctionnellement *in vitro*. Les scores des différents algorithmes prédictifs *in silico* des conséquences pathogènes potentielles des différents variants (*Combined Annotation Dependent Depletion*, CADD⁷ (299); *Sorting Intolerant From Tolerant*, SIFT⁸ (300); et *Polymorphism Phenotyping v2*, PolyPhen-2⁹(301)) ont été calculés.

Tous les variants rares ont été classés selon la classification de l'*American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG). Pour la classification des variants, nous nous sommes inspirés de la proposition d'adaptation de la classification pour les variants rares des principaux gènes du complément appliquée au SHUa, récemment publiée¹⁰ (136).

2.5. Nombre de copies de CFH-CFHR par Multiplex Probe Ligation Assay

L'analyse génétique a été complétée par technique de *Multiplex Ligation-dependent Probe-Amplification assay* (MLPA) pour détecter les hybrides *CFH-CFHR* et les variations du nombre de copies des *CFHR1-5* à l'aide du kit SALSA MLPA P236 (MRC Holland) complété par un kit de sondes *CFHR4-*

⁶ Disponible sur : <https://gnomad.broadinstitute.org>

⁷ Calculable sous ce lien : <https://cadd.gs.washington.edu>

⁸ Calculable sous ce lien : <https://sift.bii.a-star.edu.sg>

⁹ Calculable sous ce lien : <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

¹⁰ Disponible sous ce lien : https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41581-021-00424-4/MediaObjects/41581_2021_424_MOESM1_ESM.pdf

CFHR5 maison. Les contrôles étaient des individus avec 2 copies des gènes *CFH* et *CFHR1-5* (n=3), une délétion homozygote *CFHR1-CFHR3* (n=1) ou porteurs d'un hybride *CFH::CFHR1* (n=1).

2.6. Statistiques

La normalité de distribution des variables continues a été testée par un test de Shapiro-Wilk. Les variables de distribution normale sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type (SD) ou de médiane et intervalle interquartile [IQR] le cas échéant. Les caractéristiques des groupes de patients ont été comparées en utilisant un test exact de Fisher pour les variables qualitatives et un test de Student ou un test de Mann-Whitney pour les variables continues, comme indiqué. Les fréquences alléliques et des haplotypes ont été comparées entre les patients et la population de référence avec test exact de Fisher avec le calcul des odds ratios (OR) et des intervalles de confiance à 95% (IC95%). La procédure de Benjamini-Hochberg a été appliquée pour tenir compte des tests multiples. L'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE) des polymorphismes d'intérêt a été évalué dans la population de cas par un test du Chi², avec une valeur de $p > 1.10^{-3}$ (test bilatéral) considérée comme indiquant le respect de l'HWE.

La survie rénale a été définie comme le temps écoulé après le diagnostic jusqu'à la survenue d'une insuffisance rénale terminale (IRCT), définie comme la nécessité de débiter une suppléance rénale (dialyse, transplantation). Nous avons évalué l'association entre les gènes du complément et la survie rénale chez les adultes ayant un DFG_e > 15 mL/min/1,73m² au moment du diagnostic, en utilisant une représentation de Kaplan-Meier avec le test du log-rank. Les données de survie rénale étaient censurées par : **i)** le décès du patient, **ii)** la dernière consultation de suivi, ou **iii)** au plus tard 15 ans après le diagnostic. Nous avons appliqué un modèle de Cox pour l'analyse des facteurs associés à la survie rénale. Les résultats sont exprimés en Hazard Ratio (HR) et intervalles de confiance à 95% (IC95%). Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de R (version 4.2.2) avec le package « *survival* », ainsi que du logiciel GraphPad Prism (version 9.5.1).

3. Méthodes : analyse fonctionnelle des variants recombinants du FH

3.1 Production des variants recombinants du FH (rFH)

Création du plasmide

La séquence ADN de l'ensemble des exons du gène du *CFH* a été synthétisée et clonée dans un vecteur plasmidique (pcDNA3.1(+)) obtenu chez GeneArt® (division de Thermo Scientific, Regensburg, Allemagne) (**Figure 42**). La séquence des codons du gène du *CFH* a été optimisée pour améliorer son expression *in vitro* en lignée humaine Expi293™. La protéine recombinante obtenue correspond au FH entier (1231 acides aminés), que nous avons couplé à un « tag » 6xHis (« His-tag ») à son extrémité carboxylique (C_{ter}) pour faciliter la purification de la protéine. La séquence de la protéine recombinante correspondant au FH de référence ou « wild-type » (rFH-WT) est donnée dans la **Figure 43**.

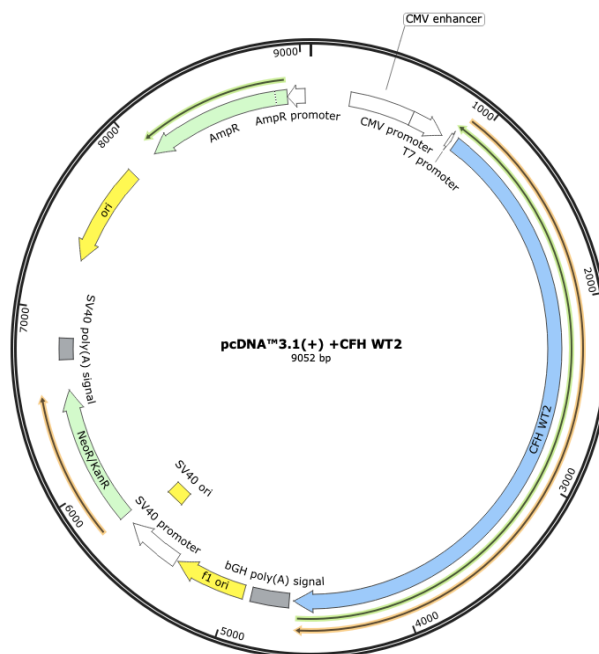


Figure 41. Structure du plasmide pcDNA3.1(+)-CFH-WT-6xHis-Tag

Figure 42. Séquence protéique du FH recombinant utilisé comme référence (rFH-WT)

Le **His-Tag** ajouté à l'extrémité carboxy-terminale de la séquence protéique est indiqué en **gras**. *Codon stop. La séquence protéique du rFH de référence correspond à la séquence de l'haplotype 1 (H1) du *CFH*, correspondant à l'haplotype du *CFH* le plus fréquent dans la population européenne.

MRLLAKIICLMLWAICVAEDCNELPPRRNTEILTGSWSDQTYPEGTQAIYKCRPGYRSLGNVIMVCRKGEWVALNP
LRKCQKRPCGHPGDTDFGTFTLTGGNVFEYGVKAVYTCNEGYQLLGEINYRECDTDGWTNDIPICEVVKCLPVTAPE
NGKIVSSAMEPDREYHFGQAVRFVCSNGYKIEGDEEMHCSDDGFWSKEKPKCVEISCKSPDVINGSPISQKIYKENE
RFQYKCNMGYEYSERGDVCTESGWRPLPSCEEKSCDNPIPNGDYSPLRIKHRTGDEITYQCRNGFYPATRGNTA
KCTSTGWIPAPRCTLKPCDYPDIKHGGLYHENMRRPYFPVAVGKYYSYCCDEHFETPSGSYWDHIHCTQDGWSPA
VPCLRKCYFPYLENGYNQNHGRKFVQKSIDVACHPGYALPKAQTTVTCMENGWSPTPRCIRVKTCSSIDIENGF
ISESQYTYALKEKAKYQCKLGYVTADGETSGSITCGKDGWSAQPTCIKSCDIPVFMNARTKNDFTWFKLNDTLDYEC
HDGYESNTGSTTGSIVCGYNGWSDLPICYERECELPKIDVHLPDRKKDQYKVGEVLKFSCKPGFTIVGPNVQCYH
FGLSPDLPICKEQVQSCGPPPELLNGNVKEKTKEEYGHSEVVEYCNPRFLMKGPNKIQCVDGEWTTLPVCIVEEST
CGDIPELEHGWAQLSSPPYYYGDSVEFNCSSESFTMIGHRSITCIHGVTQLPQCVAIDKLLKCKSSNLIILEEHLKNNK
EFDHNSNIRYRCRGKEGWIHTVCINGRWDPEVNCSMAQIQLCPPPPQIPNSHNMTTTLNYRDGEKVSVLCQENYL
IQEGEEITCKDGRWQSIPLCVEKIPCSQPPQIEHGTINSSRSSQESYAHGTKLSYTCEGGFRISEENETTCYMGKWSSP
PQCEGLPCKSPPEISHGVVAHMSDSYQYGEVYKCFEGFGIDGPAIAKCLGEKWSHPPSCKTDCLSLPSFENAIPM
GEKKDVYKAGEQVYTCATYYKMDGASNVTCINSRWTGRPTCRDTSCVNPPTVQNAIVSRQMSKYPSGERVRY
QCRSPYEMFGDEEVMCLNGNWTEPPQCKDSTGKCGPPPIDNGDITSFPLSVYAPASSVEYQCQNLYQLEGNKRIT
CRNGQWSEPPKCLHPCVISREIMENYNIALRWTAKQKLYSRTGESVEFVCKRGYRLSSRSHLTRTCWDGKLEYPTC
AKRHHHHHH*

Nom variant	Sens	Nom	Séquence 5' => 3'	Tm (°C)
p.Leu3Val	S	CFH-p.3V-a	CATGAGAGTGCCTGGCCAAG	60
	AS	CFH-p.3V-b	CTTGGCCAGCACTCTCATG	60
p.Glu23Lys	S	CFH-p.23K-a	GATGCAATAAGCTGCCTCCT	62
	AS	CFH-p.23K-b	AGGAGGCAGCTTATTGCAATC	62
p.Gly117Arg	S	CFH-p.117R-a	CGAGCGATATCAGCTGCTG	58
	AS	CFH-p.117R-b	CAGCAGCTGATATCGCTCG	58
p.Ala161Ser	S	CFH-p.161S-a	GTGTCCAGCTCCATGGAAC	60
	AS	CFH-p.161S-b	GTTCATGGAGCTGGACAC	60
p.Gln400Glu	S	CFH-p.400E-a	GGCTACAACGAGAACCACGG	64
	AS	CFH-400E-b	CCGTGGTTCTCGTTGTAGCC	64
p.Lys405Asn	S	CFH-p.405N-a	CGGCAGAGAGTTCGTGCAG	62
	AS	CFH-p.405N-b	CTGCACGAACTCTCTGCCG	62
p.Asn516Lys	S	CFH-p.516K-a	GTGTTTCATGAAGGCCCGGAC	64
	AS	CFH-p.516K-b	GTCCGGGCTTCATGAACAC	64
p.Val579Ala	S	CFH-p.579A-a	GTGCACCTGGCGCTGAC	62
	AS	CFH-p.579A-b	GTCAGGCTCCAGGTGCAC	62
p.Gly650Val	S	CFH-p.650V-a	GAGGAATACGTCCACAGCG	62
	AS	CFH-p.650V-b	CGCTGTGGACGTATTCCTC	62
p.Val686Met	S	CFH-p.686M-a	GTGTGTATCTTGAAGAGTCC	62
	AS	CFH-p.686M-b	GGACTCTCCAAGATACACAC	62
p.Arg1072Gly	S	CFH-p.1072G-a	GGCGAGGGCGTCAGATAC	60
	AS	CFH-p.1072G-b	GTATCTGACGCCCTCGCC	60
p.Asp1086Glu	S	CFH-p.1086E-a	TGTTCCGGCAGGAAGAGGT	60
	AS	CFH-p.1086E-b	ACCTCTTCCTCGCCGAACA	60
p.Arg1210Cys	S	CFH-p.1210C-a	CTGAGCAGCTGATCTCACAC	62
	AS	CFH-p.1210C-b	GTGTGAGATCAGCTGCTCAG	62
p.Ser58Ala	S	CFH-p.58S-a	CAGAGCCCTGGGCAACGTG	64
	AS	CFH-p.58S-b	CACGTTGCCAGGGCTCTG	64
p.Val174Ile	S	CFH-p.174I-a	CCAGGCCATCAGATTCTGTG	60
	AS	CFH-p.174I-b	CACGAATCTGATGGCCTGG	60
p.Met823Ile	S	CFH-p.823I-a	CACAACATCACCACCACACTG	62
	AS	CFH-p.823I-b	CAGTGTGGTGGTGTGTGTG	62
p.Ile868Asn	S	CFH-p.868N-a	GTGGAAAAGAACCCTGCAG	62
	AS	CFH-p.868N-b	CTGCAGGGTTCTTTTCCAC	62
p.Thr880Ser	S	CFH-p.880S-a	GAGCACGGCAGCATCAATAG	60
	AS	CFH-p.880S-b	CTATTGATGCTGCCGTGCTC	60
p.Phe960Ser	S	CFH-p.960S-a	CAAGTGCTCCGAAGGCTTCGG	62
	AS	CFH-p.960S-b	CCGAAGCCTTCGGAGCACTTG	62
p.Asp1119Gly	S	CFH-p.1119G-a	GACAACGGCGGTATCACCAGC	64
	AS	CFH-p.1119G-b	GCTGGTGATACC GCCGTGTC	64

Tableau 14. Amorces utilisées pour la génération de FH mutants (rFH) par mutagenèse dirigée

Abréviations : AS : antisens, S : sens, Tm° : température d'hybridation

Production de facteur H recombinant (rFH)

Les variants ultra-rares non-synonymes du *CFH* (MAF <0,1 %) identifiés chez les patients IgAN et chez les individus du panel de référence (1kGe) ont été produits de façon recombinante pour une étude fonctionnelle *in vitro*. La mutagenèse dirigée pour la génération des différents variants du *CFH* a été réalisée à l'aide du kit de mutagenèse du kit Clone Tech®, selon les instructions données par le fabricant. Chaque mutagenèse a été confirmée par séquençage Sanger. La liste des mutants générés par mutagenèse dirigée et les amorces utilisées sont présentées dans le **tableau 14**.

Les plasmides ont été amplifiés en *Escherichia coli* Top¹⁰ (Clone Tech®), purifiés (kits Mini, Maxiprep, Ozyme®) puis produits dans le système Expi293™ (lignée humaine, Thermofisher®) selon la procédure indiquée par les fournisseurs. Le plasmide de référence pcDNA3.1(+)*CFH*-WT-His-Tag était transfecté lors de chaque expérimentation de production. Les surnageants ont été collectés au 6^{ème} jour après la transfection, correspondant au pic de production de notre protéine recombinante.

Après collection, les surnageants sont immédiatement centrifugés à +4°C, puis filtrés séquentiellement (de 5 µm à 0,2 µm) et conservés à -80°C jusqu'à la purification de la protéine recombinante secrétée.

Les protéines rFH marquées par un tag 6xHis ont été purifiées à partir des surnageants avec une résine de purification His-Tag (cOmplete™ His-Tag Purification Resin, Roche®) à +4°C dans des conditions natives suivant la procédure indiquée. La concentration de chaque fraction d'élution était estimée par mesure de l'absorbance à 280 nm en spectrophotométrie (NanoDrop 2000). Un gel SDS-Page 4-12% avec coloration au Bleu de Coomassie était ensuite réalisé pour estimer la pureté et la concentration en FH des différentes fractions d'élution. Les fractions d'élution (1mL) présentant la plus grande pureté et quantité de rFH ont été poolées pour chaque variant (3-4 fractions en moyenne) et dialysées pendant une nuit dans du PBS/- à +4°C (4kDa, 2mL). La concentration de rFH dans les surnageants, les fractions d'élution et les produits finaux de purification a été mesurée par un ELISA

"maison" (protocole décrit dans la section suivante). La pureté et la taille du produit final rFH ont été évaluées par un gel SDS-PAGE 4-12% dans des conditions non réductrices avec une coloration au bleu de Coomassie. Des aliquots de chaque protéine rFH produite sont conservés à -80°C jusqu'à l'exploration fonctionnelle.

Mesure de la concentration de rFH dans les surnageants d'Expi293™ (ELISA)

La concentration de rFH dans le produit final de purification et dans les surnageants d'Expi293™ a été mesurée par un ELISA "maison". Pour ce faire, des plaques 96 puits (Thermo Scientific™ Nunc™) sont coatées avec un anticorps polyclonal anti-FH (A312, Quidel) à 3,3 µg/mL dans du tampon PBS 1X (50 µL/puit), et incubées une nuit à +4°C. Après 1 heure de blocage à +37°C dans du PBS – BSA 1% (50 µL/puit), les plaques sont lavées (3 x 300 µL) avec du PBS-Tween 0,1%. Les surnageants d'Expi293™ (collectés 6 jours après la transfection) et les produits de purification des différents rFH sont dilués au 1:50 000 dans du PBS-BSA 1% (50 µL/puit) et incubés pendant 1 heure à +37°C. La gamme de standards correspond à du FH purifié commercial (A137, CompTech®) dilué en cascade dans du PBS-BSA 1%, avec des concentrations finales de 100 à 3,1 ng/mL. Le contrôle blanc correspond à 50 µL de PBS-BSA 1%. Toutes les conditions sont testées en duplicats. Après l'incubation, les plaques sont lavées avec du PBS-Tween 0,1% (3 x 300 µL/puits), puis incubées avec 50 µL d'anticorps polyclonal anti-FH biotinylé "maison" à 2 µg/mL (A312, Quidel) pendant 1 heure à +37°C. Après lavage, l'anticorps lié est rendu visible après 30 minutes d'incubation à +37°C avec de la streptavidine (Agilent Technologies), suivie de 50 µL de dihydrochlorure d'o-phénylènediamine (OPD) dilué dans du substrat 1X (Sigma Aldrich®). La réaction colorimétrique est arrêtée avec 25 µL d'HCl 3N et les densités optiques (OD) sont lues immédiatement sur un lecteur de microplaques à 490 nm.

Un déficit quantitatif d'expression du rFH est défini comme une concentration dans les surnageants d'Expi293™ inférieure à la moyenne moins deux écarts types (SD) de la concentration du rFH-WT de référence, contrôlée dans une deuxième production indépendante de rFH.

3.1. Tests fonctionnel des rFH *in vitro*

Test 1. Capacité de fixation du FH au C3b (ELISA)

La capacité de liaison au C3b de chaque variant recombinant rFH a été mesurée par un ELISA "maison", adapté du protocole publié par Martin Merinero, *et al.* (302)(Figure 44). Des plaques 96 puits (Thermo Scientific™ Nunc™) sont coatées par **i**) 50 µL de C3b purifié à 5 µg/mL (A114, CompTech®) dilué dans du PBS-/- ou **ii**) par du PBS-/- (côté de plaque « non-coaté ») pendant une nuit à + 4°C. Après 1 heure de blocage dans une solution de Tris-NaCl-Tween-BSA 1% (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,2 % Tween 20, 1 % BSA) à température ambiante (TA), les plaques sont lavées (3 x 150 µL) avec une solution de Tris-NaCl-Tween. Ensuite, 100 µL de dilutions en cascade de chaque variant recombinant rFH et du rFH-WT dans du Tris-NaCl-Tween-BSA 1 % sont incubées pendant 1 heure à TA. Le contrôle blanc consiste en 100 µL de solution tampon Tris-NaCl-Tween-BSA 1%. Chaque condition est déposée en triplicats en zone de plaque coatée en C3b et en zone non coatée pour évaluer la liaison non spécifique du rFH sur la plaque. Après l'incubation, les plaques sont lavées avec une solution de Tris-NaCl-Tween (3 x 300 µL) et incubées avec 50 µL d'anticorps polyclonal anti-FH biotinylé "maison" à 1,5 µg/mL (A312, Quidel) pendant 1 heure à +37°C. Après une autre étape de lavage, l'anticorps anti-FH biotinylé lié est révélé après l'addition de streptavidine (Agilent Technologies) et d'OPD (Sigma Aldrich®). La réaction colorimétrique est arrêtée avec 25 µL de HCl 3N et les OD sont lues immédiatement sur un lecteur de plaques ELISA à 490 nm. La capacité de fixation au C3b pour chaque variant rFH est évaluée par deux expérimentations indépendantes. Les valeurs d'OD des zones non coatées sont soustraites pour corriger la liaison non spécifique des rFH sur la plaque.

La concentration relative de rFH-WT nécessaire pour se lier à 50% du C3b immobilisé (BD₅₀) est calculée pour chaque expérimentation. La concentration BD₅₀ de référence correspond à la moyenne ± 2 écarts-types (SD) de l'ensemble des BD₅₀ calculées pour le rFH-WT, soit une valeur de BD₅₀ considérée comme normale entre 0,30 et 1,70 ng/mL. La concentration de rFH nécessaire pour obtenir

la même liaison que 50 % du C3b immobilisé par la protéine rFH-WT (BD₅₀) est calculée pour chaque variant. Un variant avec un BD₅₀ > 1,70 ng/mL est considéré comme pathogène.

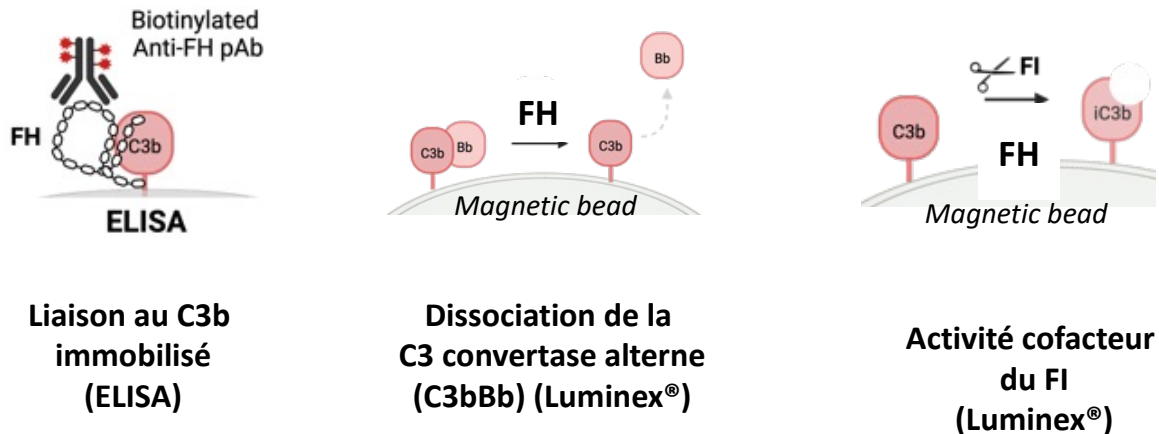


Figure 43. Évaluation fonctionnelle des variants du FH *in vitro*

Représentation schématique des trois principales fonctions régulatrices du complément évaluées pour les différents variants du recombinants du FH. *Abréviations* : C3bBb : C » convertase alterne. FH : facteur H, FI : facteur I, pAb : anticorps polyclonal.

Test 2. Activité de dissociation de la C3 convertase alterne (C3bBb)

Principe global

L'activité de dissociation (DAA) de la C3 convertase alterne C3 (C3bBb) est évaluée à l'aide de la technologie Luminex® (**Figure 45**). Le principe de cette expérimentation consiste en la formation d'une C3 convertase alterne (C3bBb) de longue demi-vie (C3bBb-Nickel) sur des billes magnétiques. Ces convertases alternes stables sont formées puis incubées avec les variants rFH. En cas de variant fonctionnel, le rFH dissocie la C3 convertase en C3b (restant sur la bille) et Bb (libéré dans le tampon de dilution). La quantité de C3bBb résiduelle en fin d'expérimentation est révélée par un anticorps anti-Bb néoépitope. Si le variant est fonctionnel, la quantité de C3bBb résiduelle est attendue nulle.

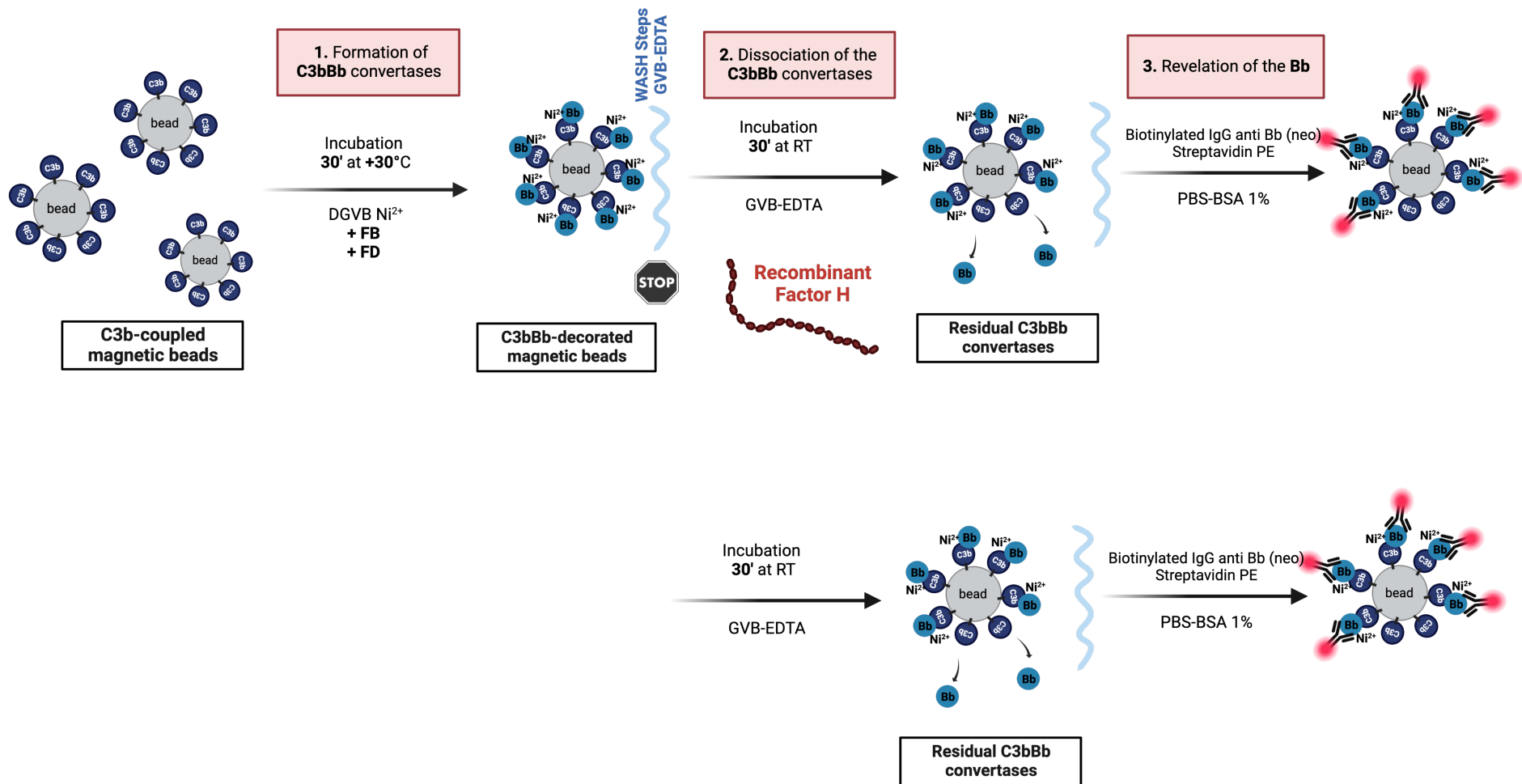


Figure 44. Mesure de l'activité de dissociation de la C3bBb convertase par le FH par Luminex®

Abréviations : Bb : fragment d'activation du FB après clivage par la FD, C3bBb : C3 convertase alterne, FB : facteur B, FD : facteur D.

Protocole expérimental

Du C3b purifié (A114, CompTech®) est couplé de manière covalente à des billes magnétiques (Bio-Rad) selon la procédure indiquée par les fournisseurs. Les billes-C3b sont ensuite stockées à +4°C et en opacité jusqu'à leur utilisation. Les billes-C3b sont mises en suspension puis diluées dans du DGVB-Ni²⁺ (2,5% de dextrose, solution tampon Veronal 1X, 1% de gélatine, 10 mM de nickel Ni²⁺) à une concentration finale de 8 10⁵ billes/mL, puis incubées pendant 30 minutes à +37°C sous agitation et opacité avec 300 ng/mL de FB purifié (CompTech®) et 100 ng/mL de FD purifié (CompTech®) pour la formation de convertases C3bBb sur les billes. La concentration optimale de FB nécessaire pour la formation de convertases C3bBb sur les billes magnétiques a été déterminée précédemment lors d'une expérience indépendante avec une dose-réponse de FB. Les billes-C3b incubées avec du FB (mais sans FD) correspondent au contrôle C3bB (témoin proconvertase). Après l'incubation, les billes sont réparties dans une plaque 96 puits (Thermo Scientific™) (~4000 billes dans 50 µL dans chaque puit), lavées avec du GVB-EDTA (Veronal Buffer Saline, VBS 1X, 1% de gélatine, 40 mM d'acide éthylènediaminetétraacétique EDTA, 3 x 150 µL, sur support magnétique) pour arrêter la formation des convertases C3bBb. Après trois étapes de lavage avec du GVB-EDTA (3 x 150µL sur support magnétique), les billes sont incubées avec un anticorps IgG biotinylé anti-Bb néoépitope (A712, Quidel®, 1:400) et de la streptavidine phycoérythrine (PE) (L008432, Bio-Rad, 1:100) dilués dans du PBS-BSA pendant 15 minutes à température ambiante et sous agitation. Les anticorps secondaires non liés sont éliminés par trois autres étapes de lavage dans du PBS-Tween-BSA-0,1% et les billes sont resuspendues dans 50 µL de PBS-Tween-BSA-0,1% et lues extemporanément sur le lecteur Luminex (Bio-Plex® 200 System, Bio-Rad). Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence moyenne (MFI) qui reflète les convertases C3bBb résiduelles présentes à la surface des billes après la période de dissociation. La condition positive est représentée par la MFI des C3bBb résiduelles après une dissociation spontanée (incubation sans rFH, condition en triplicat). La condition de référence correspond aux C3bBb résiduelles après dissociation par le rFH-WT (conditions en triplicat). Les variants recombinants de FH (rFH) sont considérés comme pathogènes si leur activité de dissociation

de la C3bBb est réduite, correspondant à une MFI de C3bBb résiduelles supérieure à la moyenne + 2 SD de la MFI de la condition de référence (rFH-WT).

Test 3. Activité cofacteur du FI

Principe global

L'activité cofacteur du FI des rFH est évaluée par technique Luminex® (**Figure 46**). Le principe de cette expérimentation consiste à préincuber les billes C3b en présence de FI et rFH. Durant cette préincubation, le C3b à la surface des billes est dégradé en iC3b par le FI et son cofacteur FH. Les billes-iC3b sont ensuite inutilisables pour la formation de C3 convertases C3bBb. En cas d'activité cofacteur du rFH préservée, la quantité de C3bBb formées en fin d'expérimentation est attendue nulle.

Protocole expérimental

Le C3b purifié (A114, CompTech®) est couplé de manière covalente à des billes magnétiques (Bio-Rad) selon la procédure du fabricant. Les billes-C3b sont ensuite stockées à +4°C et en opacité jusqu'à leur utilisation. Les billes-C3b sont placées en suspension puis diluées dans du DGVB⁺⁺ (2,5 % de dextrose, VBS 1X, 1 % de gélatine, 0,15 mM de Ca²⁺, 0,5 mM de Mg²⁺) à une concentration finale de 8 10⁵ billes/mL. Après resuspension, les billes-C3b sont réparties dans une plaque à 96 puits (Thermo Scientific™) (~4000 billes dans 50 µL / dans chaque puit) et incubées pendant 30 minutes à +30°C sous agitation et en opacité avec ou sans FI purifié (50 ng/puit, A138, CompTech®) et/ou rFH (100 ng/puit) dilués dans du DGVB⁺⁺. Pendant ces étapes d'incubation, le C3b à la surface des billes magnétiques est clivé et inactivé par le FI et le FH en iC3b. Après l'incubation, les billes sont lavées dans du DGVB⁺⁺ (3 x 150 µL/puit) pour arrêter le clivage protéolytique du C3b par le FI et le FH. Après le lavage, du FB (1000 ng, CompTech®) et du FD (10 ng, CompTech®) dilués dans du DGVB⁺⁺ sont ajoutés dans chaque puit. Les convertases C3bBb se forment pendant 30 minutes sous agitation. Après l'incubation, la formation de la convertase C3bBb est arrêtée par l'ajout de GVB-EDTA, suivi de trois étapes de lavage avec du

GVB-EDTA (3 x 150 µl, sur support magnétique). Enfin, les billes sont incubées avec un anticorps IgG biotinylé anti-Bb néoépitope (A712, Quidel®, 1:400) et de la streptavidine PE (L008432, Bio-Rad, 1:100) dilués dans du PBS-BSA 0,1% pendant 15 minutes à TA et sous agitation. Les anticorps secondaires non liés sont éliminés par trois autres étapes de lavage dans du PBS-Tween-BSA-0,1% et les billes sont resuspendues dans 50 µL de PBS-Tween-BSA-0,1% pour être immédiatement lues sur le lecteur Luminex (Bio-Plex® 200 System, Bio-Rad). Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence moyenne (MFI) qui reflète la quantité de convertases C3bBb formées à la surface des billes. La condition positive est représentée par la MFI résultant de la formation de C3bBb après préincubation avec FI en l'absence de rFH. La condition de référence est la quantité de convertases C3bBb formées après préincubation en présence de FI et le rFH-WT (condition en triplicat). Les variants recombinants de FH (rFH) sont considérés comme pathogènes si la quantité de C3bBb formée après préincubation avec FI et du rFH testé est supérieure à la moyenne + 2 SD de la MFI obtenue pour le rFH-WT.

2.4. Classification des variants

Les variants ont été considérés comme "pathogènes" s'ils présentaient un défaut d'expression protéique (déficit quantitatif) et/ou un déficit dans au moins deux tests fonctionnels. Les variants recombinants du FH qui présentaient une altération dans une seule fonction régulatrice du FH étaient classés comme ayant un "impact mineur".

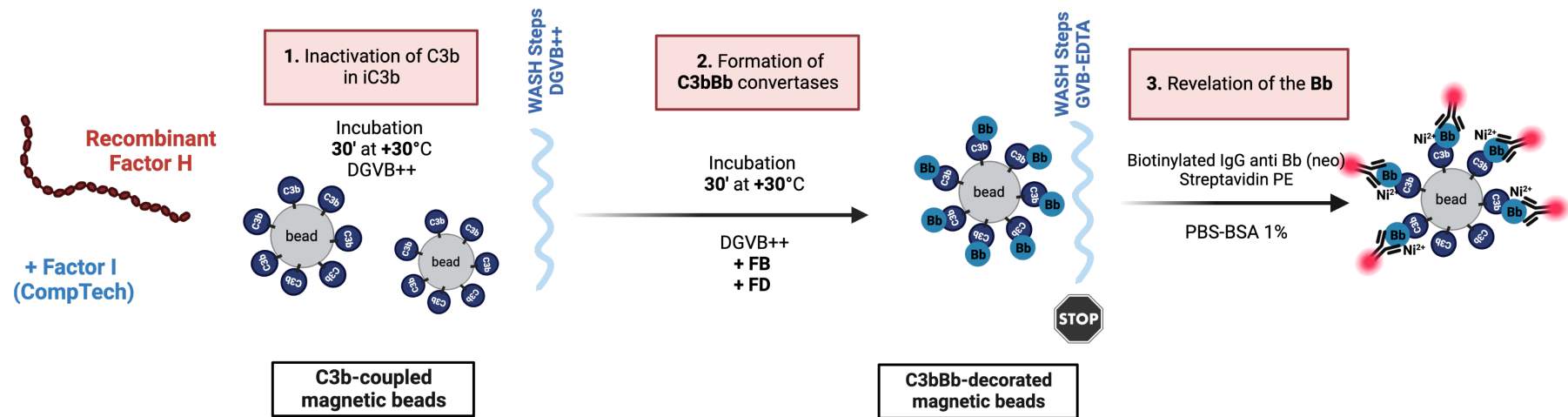


Figure 45. Mesure de l'activité cofacteur du FI du FH par Luminex®

Abréviations : Bb : fragment d'activation du FB après clivage par la FD, C3bBb : C3 convertase alterne, FB : facteur B, FD : facteur

4. Données en population générale

4.1. Variants rares

Parmi les 503 donneurs de la population 1000 Genomes Phase 3 (1kGe) d'origine Européenne, **91/503 individus (18,1%) portent au moins un variant rare (MAF<1%)** non-sens, faux-sens ou frame-shift sur l'ensemble des 6 gènes *CFH*, *CFI*, *MCP*, *C3*, *CFHR5* et/ou *CFB*. Au total, 16 donneurs (3,2 %) portent au moins deux variants rares : 13 ont 2 variants (2,6%), 2 ont 3 variants (0,4%) et 1 porte 4 variants). Dans cette population de donneurs, les variants rares portent essentiellement sur le gène du *CFHR5* (44/503, 8,7%), avec 2,6% des individus portant des variants perte de fonction (variant non-sens, frame-shift) aboutissant à un déficit quantitatif protéique partiel en FHR5. Dix-Huit donneurs (3,6%) ont un variant rare du *CFH*. A l'inverse, les variants rares faux-sens de *MCP* ne concernent que 0,4% de la population (2 individus).

Si l'on considère les variants ultra-rares (MAF <0,1%), **44/503 individus (8,9%) portent au moins un variant ultra-rare** sur au moins l'un des six gènes. Seulement deux donneurs combinent deux variants ultra-rares (0,4%). Neuf donneurs (1,8%) présentent un variant ultra-rare du *CFH*, dont 1 donneur porte un variant du *CFH* prouvé pathogène *in vitro* (*CFH*, p.D1119G) (**Tableau 15**).

Selon la classification de l'ACMG, **6 donneurs (1,2%) ont un variant ultra-rare considéré comme pathogène** sur le *CFH* (0,2%), le *CFI* (0,2%), *MCP* (0,2%) ou le *CFHR5* (0,8%).

Tableau 15. Répartition des variants rares des 6 gènes du complément dans la population européenne de référence

Gene	MAF (%)	Variants, n (%)	Variants pathogènes selon l'ACMG n (%)
<i>CFH</i>	<1	18/503 (3.6)	
	<0.1	9/503 (1.8)	1/503 (0.2)
<i>CFI</i>	<1	19/503 (3.8)	
	<0.1	8/503 (1.6)	1/503 (0.2)
<i>CFB</i>	<1	17/503 (3.6)	
	<0.1	5/503 (0.99)	0/503 (0)
<i>C3</i>	<1	19/503 (3.6)	
	<0.1	12/503 (2.4)	0/503 (0)
<i>MCP (CD46)</i>	<1	2/503 (0.4)	
	<0.1	2/503 (0.4)	1/503 (0.2)
<i>CFHR5</i>	<	1	44/503 (8.7)
		Frame-shift or nonsense variant	13/503 (2.6)
		Missense variant	34/503 (6.8)
	<	0.1	11/503 (2.2)
		Frame-shift or nonsense variant	3/503 (0.6)
		Missense variant	9/503 (1.8)

Abréviations : 1kGe : population 1000 Genomes d'origine Européenne, ACMG : classification de l'American College of Medical Genetics ; MAF : fréquence de l'allèle mineur.

4.2. Polymorphismes et haplotypes

Les fréquences des polymorphismes étudiés dans les gènes *CFH*, *CFB*, *MCP* et *C3* sont présentées dans le **Tableau 16**. Les SNP en rose correspondent aux polymorphismes combinés pour la formation des haplotypes du *CFH*, *CFB* et *MCP*.

Les quatre polymorphismes du *CFH* (rs800292, rs1061170, rs3753396 et rs1065489) s'organisent en 4 haplotypes majeurs (>97% des haplotypes), numérotés selon leur ordre de fréquence (**Tableau 17**). Dans la population de référence, l'haplotype du *CFH-H1* (*gcag*, haplotype « à risque de DMLA ») est le plus fréquent. Soixante-treize donneurs (14,5%) portent cet haplotype sous la forme homozygote. L'haplotype « à risque de SHUa », *CFH-H3* *gtgt* est le troisième haplotype le plus fréquent. Cet haplotype est porté sous la forme homozygote chez 2,0% de la population générale.

L'haplotype *MCP* *ggaac* (*MCP-H2*) à risque de SHUa est le deuxième haplotype de *MCP* le plus fréquent. Cet haplotype est porté sous la forme homozygote chez 79 donneurs (15,7%). Aucun donneur ne porte l'association des haplotypes *MCP* *ggaac* et le *CFH-H3* *gtgt* sous la forme homozygote.

L'observation des fréquences respectives de ces variations génétiques (variants rares, polymorphismes et haplotypes) en population générale soulignent la diversité des anomalies génétiques du complément. Ces données montrent que la présence isolée d'anomalies génétiques ou d'haplotypes « à risque » n'est pas automatiquement pathologique.

Tableau 16. Fréquence des polymorphismes étudiés dans la population de référence

Gene	rsID	Transcrit	Protéine	Allèle a/b	MAF	1kGe (n=503)		
						a/a n (%)	a/b n (%)	b/b n (%)
CFH	rs800292	c.184G>A	p.V62I	G/A	0.260	269 (53.5)	206 (41.0)	28 (5.6)
CFH	rs1061170	c.1204T>C	p.Y402H	C/T	0.362	216 (42.9)	210 (41.7)	77 (15.3)
CFH	rs3753396	c.2016A>G	p.G672G	A/G	0.176	340 (67.6)	149 (29.6)	14 (2.8)
CFH	rs1065489	c.2807G>T	p.E936D	G/T	0.177	339 (67.3)	150 (29.8)	14 (2.8)
Intergénique*	rs7542235	1:196854483 A>G	--	A/G	0.192	329 (65.4)	155 (30.8)	19 (3.8)
MCP	rs2796267	-652A>G	--	A/G	0.391	194 (38.6)	225 (44.7)	84 (16.7)
MCP	rs2796268	-366A>G	--	A/G	0.398	182 (36.2)	242 (48.1)	79 (15.7)
MCP	rs1962149	IVS9 -78G>A	--	G/A	0.397	183 (36.4)	241 (47.9)	79 (15.7)
MCP	rs859705	IVS12 +638G>A	--	G/A	0.392	185 (36.8)	242 (48.1)	76 (15.1)
MCP	rs7144	c.4070T>C	--	T/C	0.395	183 (36.4)	243 (48.3)	77 (15.3)
CFB	rs4151667	c.26T>A	p.L9H	T/A	0.047	458 (91.1)	43 (8.55)	2 (0.40)
CFB	rs12614	c.94C>T	p.R32W	C/T	0.133	374 (74.4)	124 (24.7)	5 (0.99)
CFB	rs641153	c.95G>A	p.R32Q	G/A	0.086	422 (83.9)	75 (14.9)	6 (1.19)
C3	rs2230199	c.304 C>G	p.R102G	C/G	0.275	282 (56.1)	165 (32.8)	56 (11.1)

* polymorphisme intergénique dont l'allèle G est associé en déséquilibre de liaison avec la délétion CFHR1-CFHR3.

Tableau 17. Fréquence et distribution des haplotypes du CFH dans la population générale.

Haplotype	rs800292	rs1061170	rs3753396	rs1065489	Fréq.	Nombre de porteurs, n (%)		
	c.184G>A, p.V62I	c.1204T>C, p.Y402H	c.2016A>G, p.G672G	c.2807G>T, p.E936D		Ho	He	Non porteurs
H1	G	C	A	G	0,352	73 (14,5)	208 (41,4)	222 (44,1)
H2	A	T	A	G	0,240	27 (5,4)	187 (37,2)	289 (57,5)
H3	G	T	G	T	0,164	10 (2,0)	145 (28,8)	176 (3,5)
H4	G	T	A	G	0,223	24 (4,8)	176 (3,5)	303 (6,1)
H5	A	C	A	G	0,009	0 (0,0)	9 (1,8)	494 (98,2)
Autres haplotypes					0,013	0 (0,0)	13 (2,6)	490 (99,2)

5. Génétique du complément chez les patients porteurs d'une IgAN

5.1. Cohorte d'étude

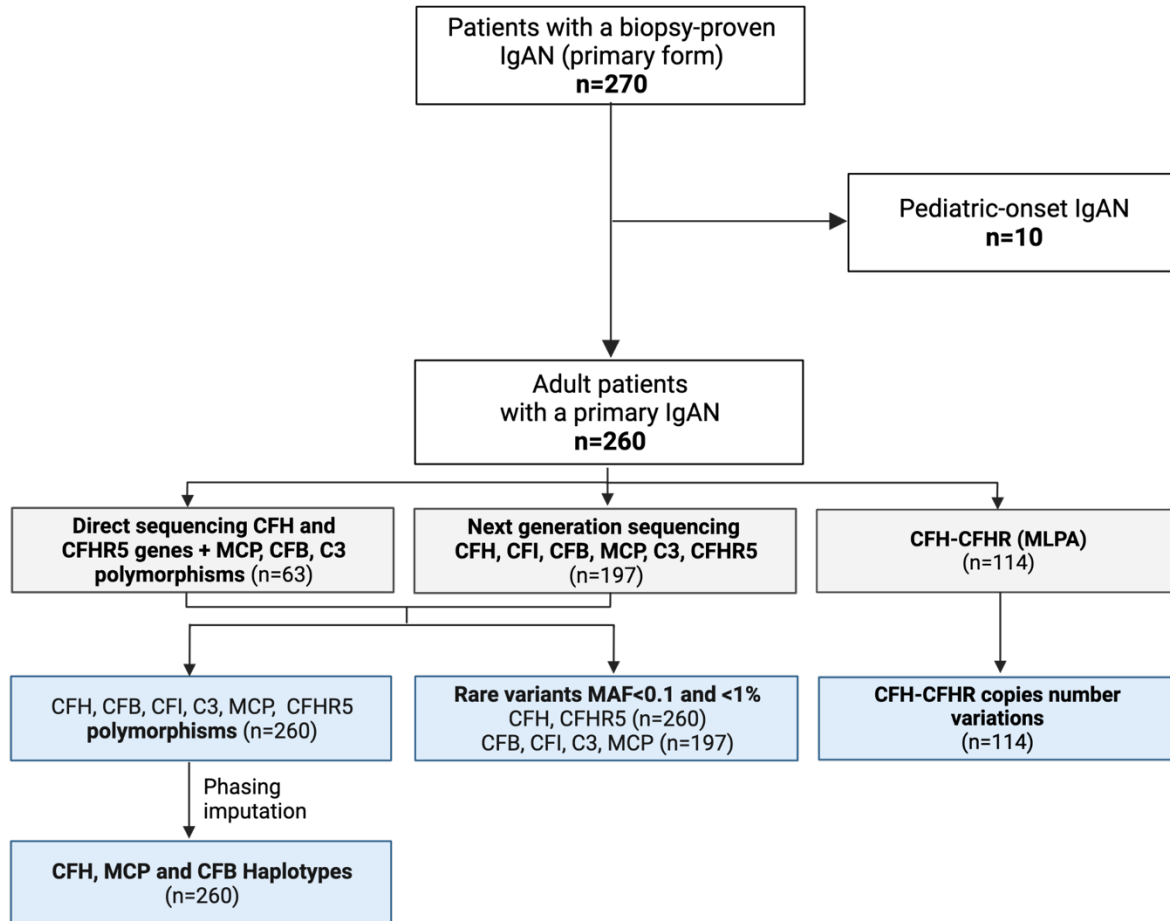


Figure 46. Étude génétique des patients porteurs d'une IgAN primitive

Abréviations : CFB : gènes du facteur B, CFH : gène du facteur H, CFI : gène du facteur I, CFHR5 : gène de la protéine associée au facteur H 5, MAF : fréquence de l'allèle mineur, MCP : membrane cofacteur protéine (ou CD46).

Un total de 270 patients IgAN ont bénéficié d'une étude de la génétique du complément, dont 10 patients avec une IgAN de début pédiatrique et 260 patients ayant développé une IgAN à l'âge adulte (**Figure 47**). Ces patients ont été étudiés soit par *next generation sequencing* pour les 6 gènes (CFH, CFI, CFB, MCP, C3 et CFHR5) (n=197), soit par séquençage Sanger des gènes *CFH* et *CFHR5* (n=63). Cent quatorze patients de cette cohorte ont été additionnellement étudiés pour le nombre de copies d'exons des gènes du locus *CFH-CFHR1-5* par MLPA.

Le groupe de patients adultes (n=260) était principalement composé d'hommes (80,4%). L'âge médian au moment du diagnostic était de 42,2 [31,4-55,8] ans. Au moment de la présentation initiale, 196 patients (78,1%) porteurs d'une IgAN étaient hypertendus, et présentaient un débit de filtration glomérulaire estimé (DFGe) médian de 42,0 [19,0-61,0] mL/min/1,73m². Parmi eux, 32 patients (12,3%) avaient un DFGe inférieur à 15 mL/min/1,73m². Le rapport protéine/créatinine urinaire médian au diagnostic (UPCR) était de 1,88 [0,79-3,50] g/g. Une hématurie microscopique ou macroscopique a été observée chez 104 patients (75,4%). Quatre-vingt-un patients (38,6%) ont reçu des stéroïdes, associés à un traitement immunosuppresseur chez 11 patients (5,3%).

Le suivi médian était de 15,8 [9,2-22,5] ans après le diagnostic. Notre cohorte regroupait des formes d'IgAN globalement sévères : 194 patients (74,6 %) ont évolué vers une IRCT au cours du suivi, avec une survie rénale médiane de 7,4 [5,2-8,7] années. Au cours du suivi, 164 patients (63,1 %) ont été transplantés et 36 patients (10,0 %) sont décédés. Dans l'analyse univariée, les facteurs associés à la survie rénale 15 ans après le diagnostic de l'IgAN comprenaient : le sexe masculin, le DFGe, un degré de protéinurie, la présence d'une hypertension et les paramètres histologiques (score MEST-C : M1, T1-2, C1-2) lors de la première biopsie rénale.

5.2. Variants rares des *CFH/CFHR5* : une balance déséquilibrée ?

Variants ultra-rares du *CFH*

Au total, 33 patients IgAN portaient au moins un variant sur les 6 gènes du complément. Tous sont portés sous la forme hétérozygote. Si l'on considère les patients IgAN évalués pour l'ensemble de ces 6 gènes (n=197), la prévalence estimée des variants ultra-rares est de 15,7%. Cette **prévalence est augmentée** par rapport à la population de référence (30/197, 15,7% vs 44/503, 8,9%, p=0,0121).

L'augmentation de la fréquence des variants du complément chez les patients était principalement portée par une **prévalence augmentée des variants ultra-rares du *CFH*** (12/260 patients 4,6 % contre 9/503, 1,8 % contrôles, p=0,034). La prévalence des variants ultra-rares dans les cinq autres gènes n'était pas statistiquement différente entre les patients et les contrôles.

La présence d'un variant portant sur le *CFH* ou sur les autres gènes étudiés n'était pas associée au phénotype clinique au diagnostic, ni à la survie rénale.

En revanche, la localisation de ces variants est particulière. Premièrement, ces variants sont principalement situés dans les **domaines fonctionnels du FH** (53% des variants) qui sont importants pour son interaction avec le C3b/C3d et son activité de régulation du complément (**Figures 47 et 48**). Parmi les 11 variants faux-sens identifiés, 7 sont localisés dans les domaines N_{ter} et C_{ter} du FH et un variant (p.L3V) est localisé dans le peptide signal. Deuxièmement, nous avons identifié un cluster atypique de variants (5 variants : p.Q400E, p.K405N, p.N516K, p.V579A et p.G650V) localisés en zone centrale (SCR6-11) du FH. Deux de ces 5 variants (p.N516K et p.G650V) sont partagés entre les patients et les contrôles.

L'étude fonctionnelle *in vitro* des variants recombinant a permis de prouver une altération des capacités de régulation du FH pour 5/11 variants du *CFH* (45,5%). Deux de ces variants sont fortement pathogènes (p.G117R, nouvellement identifié, et p.1210C, connu pathogène) et trois montrent des capacités fonctionnelles modérément altérées (p.E23K, p.A161S, p.D1086E) (**Figures 49 et 50**). Le variant p.G117R est également associé à un déficit quantitatif du FH *in vivo*.

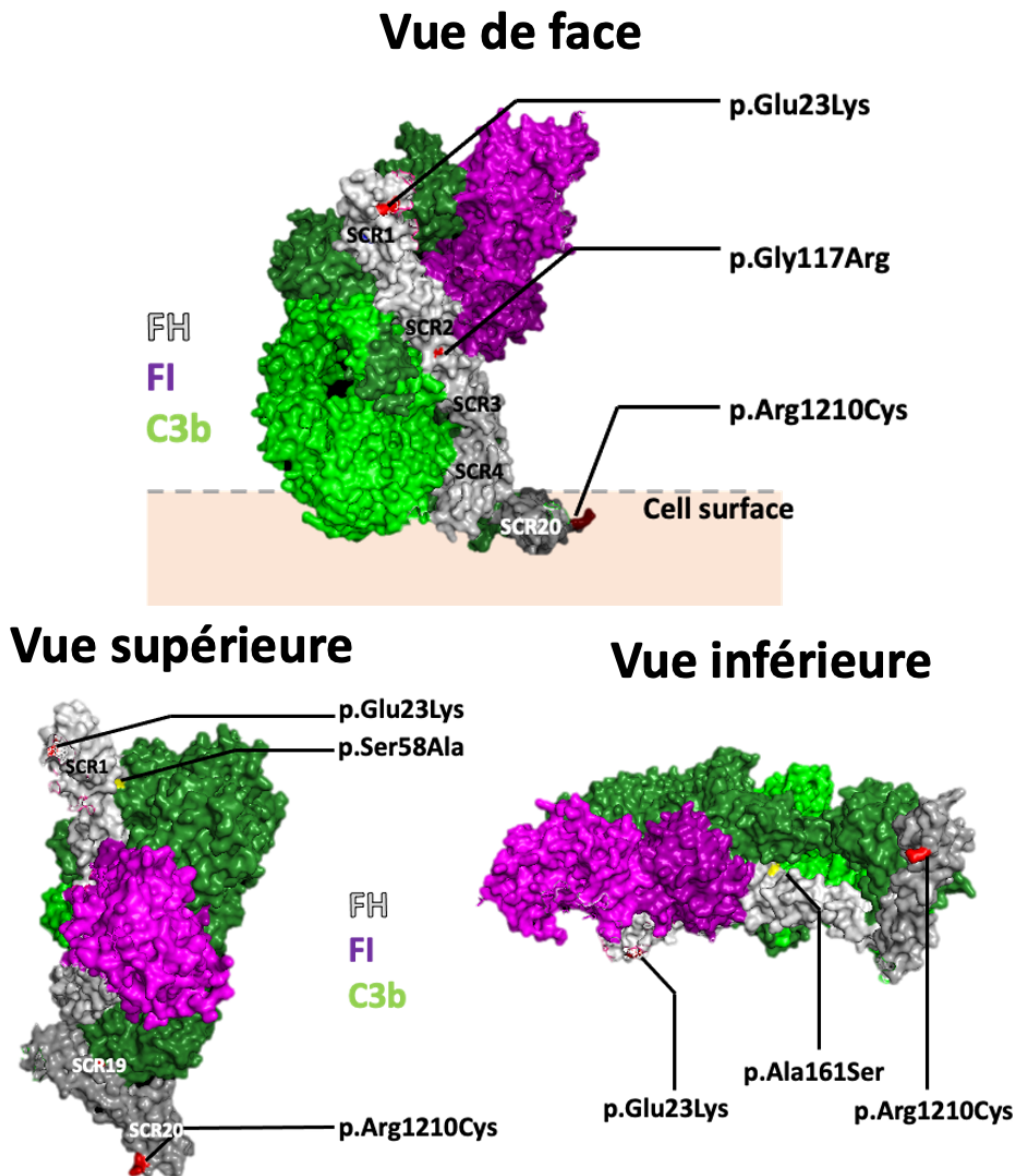


Figure 47. Variants du SCR1-4 et SCR19-20 du *CFH* identifiés chez les patients porteurs d'une IgAN

Vue du complexe **facteur H (FH)** / **Facteur I (FI)** et **C3b**. Seuls les SCR1-4 et les SCR19-20 du FH sont représentés. Parmi les variants identifiés dans ces domaines, le variant p.R1210C est situé dans le domaine d'ancrage du FH aux polyanions membranaires. Les variants p.E23K, p.A58S, p.G117R, p.A161S sont localisés dans les zones d'interaction entre le FH et le C3b et/ou le FI. *Abréviations* : FH : facteur H, FI : facteur I.

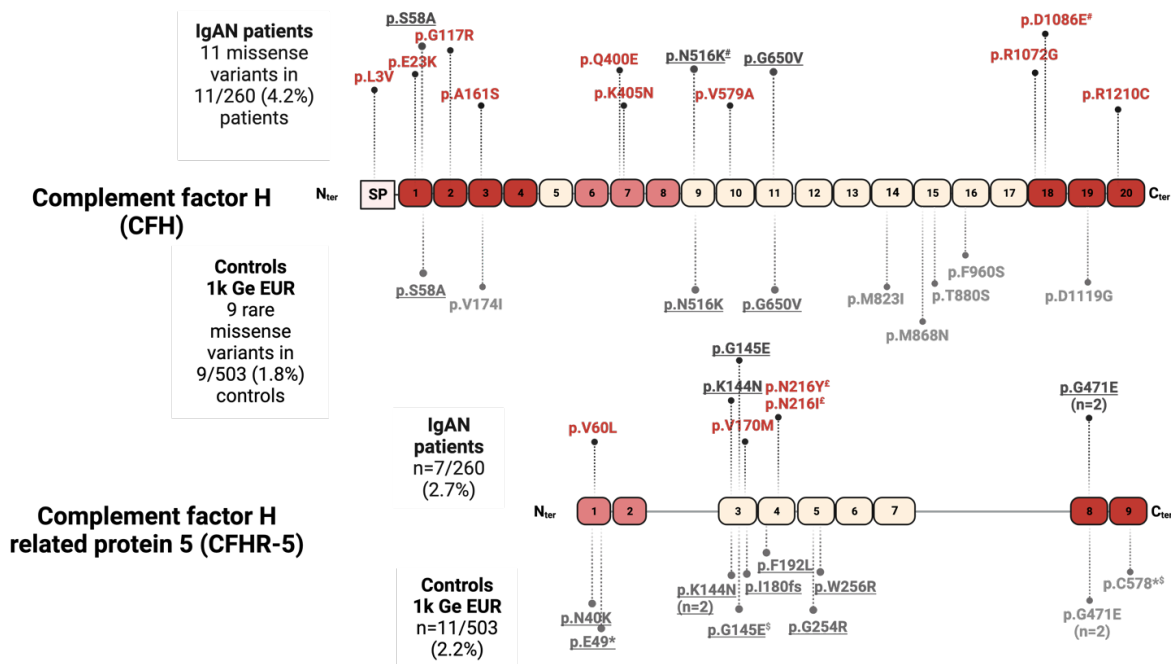
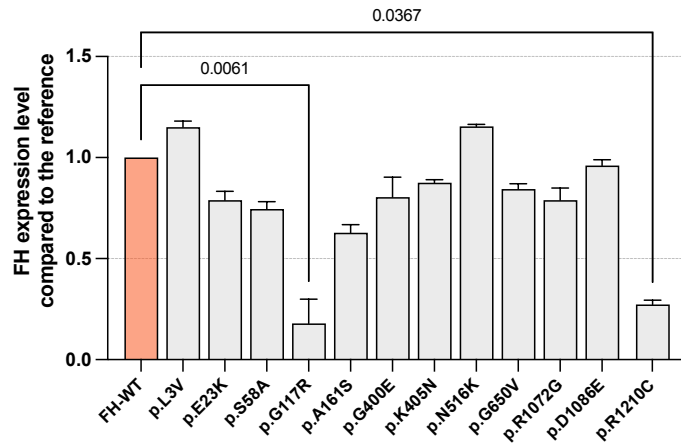


Figure 48. Localisation des variants faux-sens, non-sens et frameshift du *CFH* (MAF<0,1%) et du *CFHR5* (MAF<1%) chez les patients et les contrôles

Les variants en rouge sont retrouvés exclusivement chez les patients IgAN. Les variants en gris sont retrouvés chez les donneurs du panel de référence 1kGe EUR ou partagés entre les patients IgAN et les contrôles.
Abréviations : 1kGe EUR : cohorte européenne 1000 Genomes Phase 3 Project. *CFH* : gène du facteur H; *CFHR5* : gène de la protéine associée facteur H 5. IgAN : néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA.

A.



B.

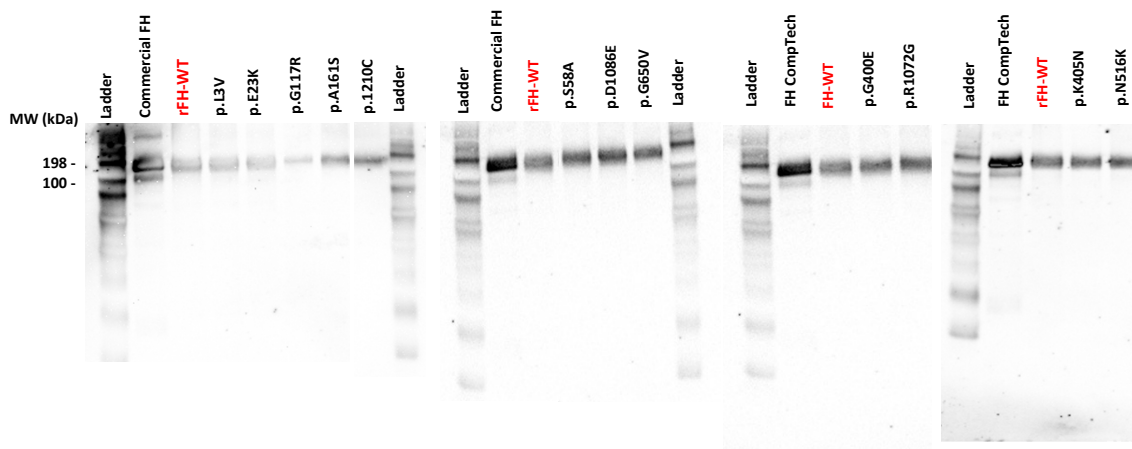


Figure 49. Production de facteur H recombinant (rFH) par les Expi293™

Panel A. Concentrations de rFH dans les surnageants de culture cellulaire des Expi293™ collectés 6 jours après la transfection. Tous les variants sont exprimés de façon recombinante dans les surnageants de culture cellulaire. La production est diminuée pour deux variants (p.G117R et p.R1210C). Un seul de ces deux variants (p.G117R est associé à un déficit quantitatif *in vivo*. **Panel B. Western blot du FH des différents variants produits de façon recombinante.** Il n'existe pas de protéine rFH tronquée. *Abbreviations* : FH : facteur H, rFH : facteur H recombinant, rFH-WT : FH wild type, facteur H recombinant de référence, MW : molecular weight, poids moléculaire en kDa.

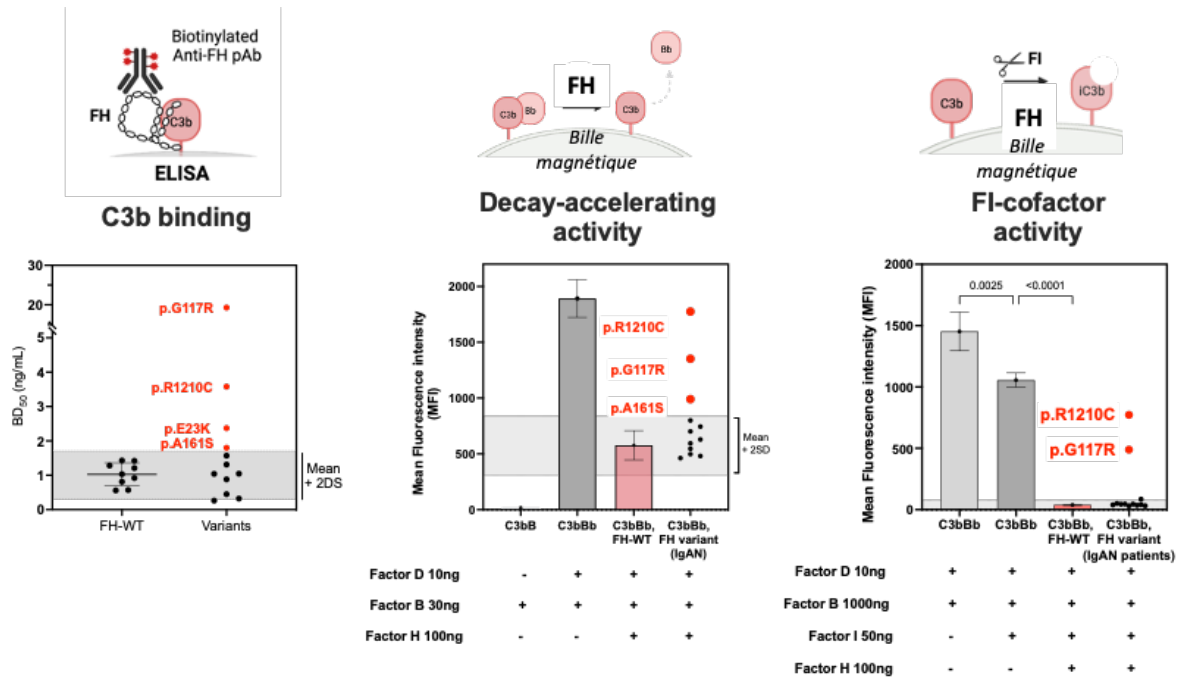


Figure 50. Tests fonctionnels des variants recombinants du FH (rFH)

Trois fonctions de régulation du complément du FH ont été testées *in vitro*. La fixation au C3b a été mesurée par ELISA, l'activité de dissociation de la C3 convertase alterne et l'activité cofacteur du FI ont été évaluée par la technique du Luminex®. Les valeurs normales sont indiquées en zones grises et correspondent aux valeurs moyennes obtenues pour le rFH-WT (triplicats). **Quatre variants p.G117R, p.A161S, p.R1210C, p.E23K** (en rouge) ont une diminution de fonction de régulation du complément *in vitro* et **sont donc classés comme pathogènes**. Un variant additionnel p.D1086E montre une capacité de fixation au C3b très discrètement altérée. **Abréviations** : BD₅₀ : concentration nécessaire (en fold change) pour obtenir une liaison de 50% du C3b immobilisé par le rFH de référence ; rFH : facteur H recombinant, rFH-WT : facteur H wild type ou rFH de référence.

Variants rares MAF <1% du *CFHR5*

De façon notable aucun des 260 patients IgAN ne portait de variant de *CFHR5* avec une MAF<1% susceptible d'entraîner un déficit quantitatif protéique partiel de FHR5 (variant non-sens, ou frame-shift) alors que ces variants étaient présents chez 2,6% de la population contrôle ($p=0,006$) (**Figure 49**). Nos données appuient l'hypothèse qu'un déficit partiel en FHR5 pourrait conférer une protection modérée vis à vis du risque du développement d'une IgAN.

5.3. La délétion *CFHR1-CFHR3*

Dans notre cohorte d'IgAN sévères, la présence de l'haplotype *CFH-H4* et du polymorphisme intergénique rs7542235-G, tous les deux associés à la délétion *CFHR1-R3* avaient une prévalence similaire entre les patients et les contrôles ($p=0,388$). Quinze patients (5,8%) étaient porteurs homozygotes du rs7542235-G. Ce polymorphisme et l'haplotype *CFH-H4* n'étaient pas associés à la survie rénale dans notre cohorte de formes sévères.

Dans le sous-groupe de 114 patients IgAN transplantés rénaux étudié par MLPA, 5 patients (4,3%) portaient une délétion *CFHR1-R3* homozygote et 20 patients étaient hétérozygotes pour la délétion *CFHR1-CFHR3* (17,5%) (**Figure 51**). Cinq patients (4,3%) portaient une délétion *CFHR1-CFHR4* hétérozygote, combinée à une délétion *CFHR1-R3* chez deux patients.

Un patient présentait 3 copies de *CFHR1* et 3 copies de *CFHR3* (*rouge, figure 3*). Ce patient, sans variant rare identifié sur les 6 gènes du complément étudiés, a présenté un table de MAT biologique et rénale avec une hypertension artérielle maligne au moment du diagnostic.

Aucun hybride *CFH:CFHR* n'a été détecté.

Dans ce sous-groupe de patients, on observe une tendance à une survie rénale altérée pour en présence de deux copies de *CFHR1* ($p=0.10$), sans différence entre les haplotypes *CFHR1**A et *CFHR1**B.

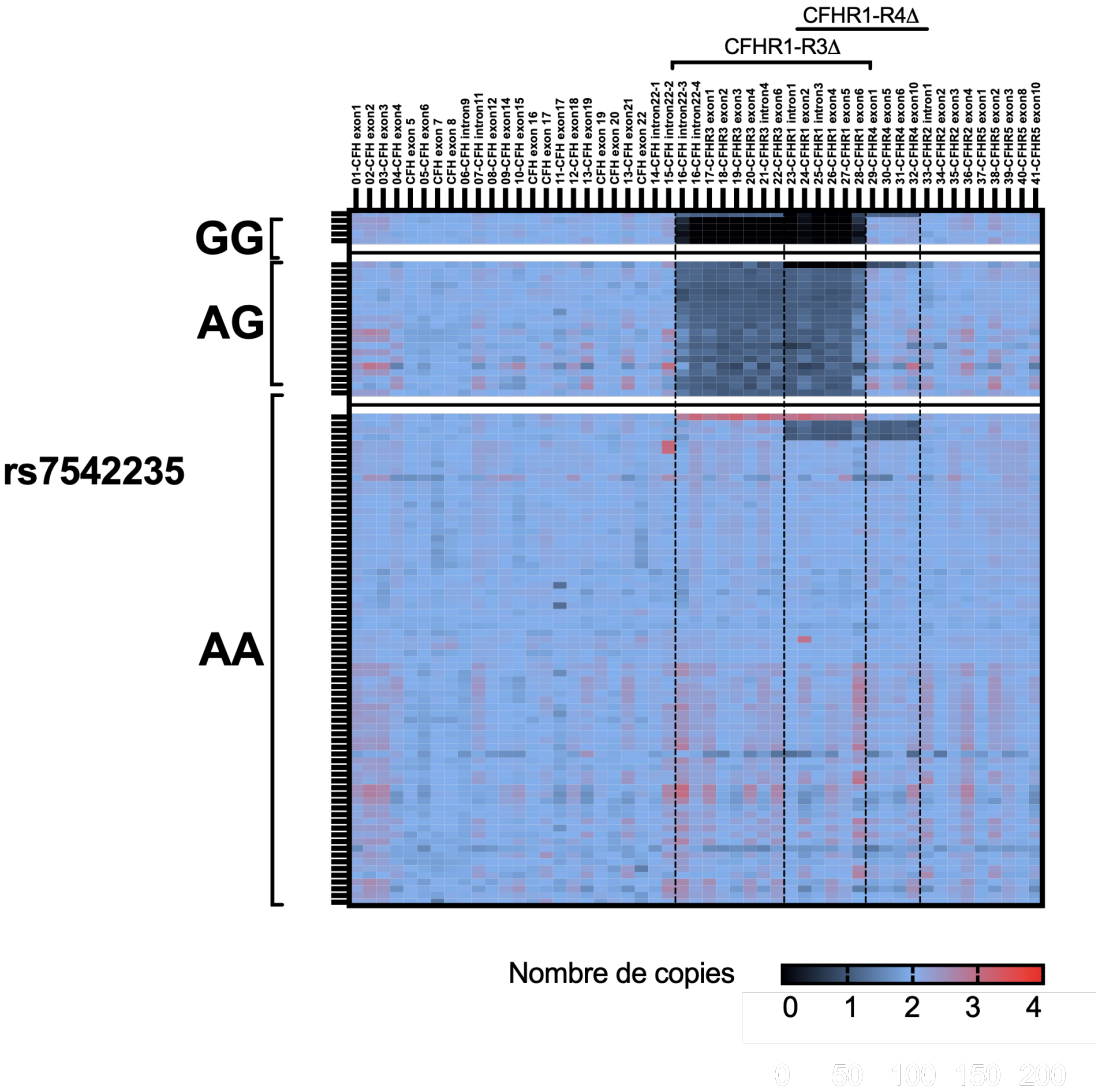


Figure 51. Nombre de copie des gènes *CFH*, *CFHR1-5* étudié par MLPA
 Abréviations : MLPA : multiplex ligation-dependent assay, Δ CFHR1-R3: délétion *CFHR1-CFHR3*, Δ CFHR1-R4: délétion *CFHR1-CFHR4*

5.4. Les haplotypes du CFH influent sur la susceptibilité au développement d'une IgAN sévère

Identification d'un haplotype protecteur CFH-H2

L'analyse de la fréquence des haplotypes du *CFH* combinant les 4 polymorphismes (rs800292, rs1061170, rs3753396 et rs1065489) a permis d'identifier l'haplotype du *CFH-H2* comme un haplotype protecteur vis-à-vis de la susceptibilité au développement d'une IgAN. En modèle dominant (un seul haplotype suffit pour conférer un pouvoir protecteur), l'haplotype *CFH-H2* contenant le polymorphisme *CFH* p.V62I est protecteur avec un OR de 0,52 [0,34-0,79] ($p=0,034$) (**Tableau 18**). Les haplotypes *CFH-H3 gtgt* et *CFH-H4 gtag* (en déséquilibre de liaison avec la délétion CFHR1-R3) sont neutres pour l'IgAN.

Traits génétiques communs entre 3 néphropathies médiées par le complément : IgAN, GC3 et SHUa

Nous avons comparé la fréquence des haplotypes du *CFH* et *CFHR* en combinant trois polymorphismes (rs800292 p.V62I, rs1061170 p.Y402H et le polymorphisme intergénique rs7542235, dont l'allèle G est associé à la délétion *CFHR1-R3*) dans 3 cohortes de néphropathies médiées par le complément (**Tableau 19**). L'étude des haplotypes *CFH-CFHR* chez les patients porteurs d'une IgAN (n=260), d'une GC3 (n=231) ou d'un SHUa (n=228) permet d'identifier des traits génétiques communs entre ces trois pathologies.

L'haplotype h2 (ATA) contenant le polymorphisme p.V62I est retrouvé protecteur dans les trois pathologies. En revanche, l'haplotype h1 (GTA, sans délétion *CFHR1-R3*), à risque pour le développement d'une GC3, est protecteur pour le SHUa et neutre pour l'IgAN. L'haplotype h3 (GTA, en l'absence de délétion *CFHR1-R3*) est à risque pour le SHUa et pour l'IgAN (OR 1,47 [1,15-1,88], p=0,0022). Cet haplotype est neutre pour la GC3.

Nos résultats marquent l'existence de traits génétiques partagés dans le locus *CFH-CFHR* entre les patients IgAN porteurs d'une forme sévère et les patients porteurs d'un SHUa. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que la génétique du *CFH* pourrait influencer la susceptibilité au développement de formes sévères d'IgAN. Dans notre cohorte de 260 patients, ces différents haplotypes n'étaient pas retrouvés associés au pronostic rénal.

Le rôle précis de la balance des différents haplotypes du *CFH* dans la modulation de la susceptibilité au développement de ces trois néphropathies n'est pas encore caractérisé.

Tableau 18. Fréquence des haplotypes du *CFH* chez les patients porteurs d'une IgAN (n=260) et le panel de référence (n=503)

Haplotype <i>CFH</i>		Modèle					
		Additif		Dominant		Récessif	
		OR [IC 95%]*	p-value*	OR [IC 95%]*	p-value*	OR [IC 95%]*	p-value*
H1	GCAG	1.05 [0.39-3.00]	0.918	0.53 [0.34-0.86]	0.068	1.29 [0.40-3.01]	0.495
H2	ATAG	0.88 [0.33-2.56]	0.869	0.52 [0.34-0.79]	0.034	1.10 [0.32-2.55]	0.869
H3	GTGT	1.47[0.53-4.31]	0.703	0.95 [0.62-1.45]	0.869	2.78 [0.53-4.31]	0.167
H4	GTAG	1.24 [0.46-3.56]	0.869	0.78 [0.51-1.20]	0.494	1.68 [0.46-3.56]	0.388
H5	ACAG	2.42 [0.58-10.6]	0.495	1.58 [0.54-4.59]	0.654	2.56 [0.57-10.6]	0.259

Les 5 haplotypes du *CFH* présents avec une fréquence supérieure à 1% dans la population de référence ou chez les patients sont analysés dans des modèles additifs, dominants et récessifs (modèle régression logistique prenant en compte le sexe en covariable). * Une correction des valeurs du p a été appliquée pour tenir compte des comparaisons multiples. Les polymorphismes ou associations de polymorphismes caractérisant les différents haplotypes sont présentés en rouge. *Abréviations* : *CFH* : gène du facteur H, H : haplotype, OR : odds ratio.

Tableau 19. Distribution des haplotypes des *CFH-CFHR* entre 3 néphropathies médiées par le complément

				Contrôles (n=503)	GC3 (n=231)			IgAN (n=260)			aHUS (n=228)		
CFH Haplotype	V62I	Y402H	Délétion CFHR1/R3	Freq.	Freq.	OR [IC95%]	p-value*	Freq.	OR [IC95%]	p-value*	Freq.	OR (IC95%)	p-value*
H1	G	C	No	0,351	0,435	1,4 [1.14-1.78]	0.0020	0,338	0,94 [0,75-1,18]	0,6494	0.241	0.58 (0.46-0.76)	<0.0001
H2	A	T	No	0,239	0,149	0.56 [0.42-0.75]	<0.001	0,170	0,65 [0,50-0,86]	0.0020	0.167	0.63 (0.48-0.85)	0.002
H3	G	T	No	0,211	0,245	1.3 [0.95-1.80]	0.1138	0,282	1,47 [1,15-1,88]	0,0022	0.390	2.40 (1.88-3.05)	<0.0001
H4	G	T	Yes	0,176	0,130	0.69 [0.50-0,96]	0.026	0,166	0,67 [0,70-1,24]	0,6679	0.186	1.07 (0.80-1.43)	0.63

5.5. L'haplotype *MCP ggaac* comme facteur de risque indépendant de progression de l'IgAN

La fréquence des variants rares, des polymorphismes et des haplotypes de *MCP* était globalement similaire entre les patients et la population de référence. Ces données soutiennent l'hypothèse que la génétique de *MCP* n'influence pas la susceptibilité vis-à-vis du développement d'une IgAN.

En revanche, nous avons identifié que **l'haplotype *MCP ggaac* porté sous la forme homozygote impacte fortement le pronostic rénal des patients porteurs d'une IgAN**. En analyse multivariée (modèle de Cox) prenant en compte l'âge, le sexe, le DFGe, le degré de protéinurie, l'hypertension artérielle et les paramètres histologiques (score MEST-C) de la biopsie initiale, porter **l'haplotype *MCP ggaac* homozygote est un facteur de risque indépendant de progression de la néphropathie**. L'haplotype *MCP ggaac* homozygote multiplie le risque d'évolution vers l'IRCT 15 ans après le diagnostic par **2,83 [1,73-5,67] (p<0,001)**.

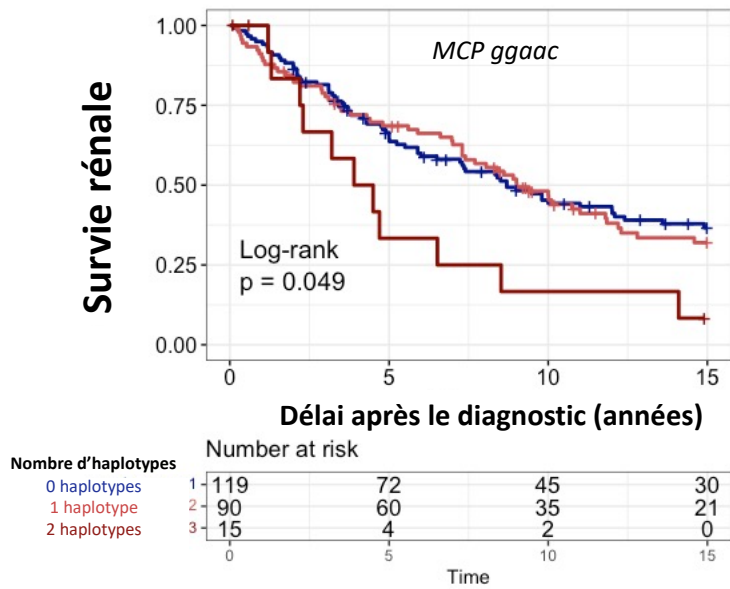


Figure 52. Probabilité de survie rénale en fonction du nombre d'haplotypes de *MCP ggaac*

Représentation Kaplan-Meier de la probabilité de survie rénale (années) après le diagnostic initial de l'IgAN chez les patients ayant un débit de filtration glomérulaire estimé (DFGe) supérieur à 15 mL/min/1,73m² au moment du diagnostic selon le nombre d'haplotypes *MCP ggaac*. Le nombre d'haplotypes *MCP ggaac* était corrélé à une survie rénale altérée (log-rank p-value 0,049), en particulier sous la forme homozygote (p-value 0,015).

5. Manuscrit 2

1

1 **Complement Genetics impacts IgA Nephropathy Outcomes**

2

3

4 Anna Duval^{1,2}, Nicolas Maillard³, Paula Vieira-Martins⁴, Martin Morin⁵, Axelle Durand⁵, Julia
5 Roquigny¹, Maxime Lecerf¹, Sophie Chauvet¹, Jérôme Olagne^{2,5}, Sophie Limou⁶, Bruno Moulin², Lubka
6 Roumenina¹, Christophe Mariat³, Sophie Caillard², Véronique Frémeaux-Bacchi^{1,2}.

7

8 1 Centre de Recherche des Cordeliers, Inserm UMR_S1138, Paris, France.

9 2 Department of Nephrology Dialysis and Transplantation, University Hospital of Strasbourg,
10 Strasbourg, France.

11 3 Department of Nephrology Dialysis and Transplantation, University Hospital of Saint Etienne, Saint
12 Etienne, France.

13 4 Service d'immunologie biologique, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique-
14 Hôpitaux de Paris, Paris, France.

15 5 Department of Pathology, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France.

16 6 Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, Inserm, Université de Nantes, Nantes,
17 France.

18 **Corresponding author:** Dr Anna Duval, Department of Nephrology Dialysis and Transplantation,
19 University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France. ORCID ID: 0000-0002-6432-881X.

20 anna.duval@inserm.fr

21 Running title: Complement genetics in IgAN

22 Abstract word count: 220; text word count: 3830

23 Number of tables:4 figures:5; box:1

24 Supplementary materials & supplementary methods.

25 **Abbreviations:**

- 26 1kGe: 1000 Genomes Project
- 27 ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics
- 28 aHUS: atypical Hemolytic and Uremic syndrome
- 29 AMD: age-related macular degeneration
- 30 AP: alternative pathway
- 31 CADD: Combined Annotation Dependent Depletion
- 32 CFB: complement Factor B gene
- 33 *CFH*: complement Factor H gene
- 34 *CFI*: complement Factor I gene
- 35 *CFHRI-5*: complement Factor H related protein 1 to 5 genes
- 36 *CFHRI-R3Δ*: complement Factor H related proteins 1 and 3 genes deletion
- 37 DAA: decay accelerating activity
- 38 EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
- 39 eGFR: estimated glomerular filtration rate
- 40 eQTL: expression quantitative trait locus
- 41 FB: Factor B
- 42 FH: Factor H
- 43 *FHR1-5*: Factor H related proteins 1 to 5
- 44 FI: Factor I
- 45 Gd-IgA1: galactose-deficient Immunoglobulin A1
- 46 GnomAD: genome Aggregation Database
- 47 GTEx: Genotype-Tissue Expression Portal
- 48 H: haplotype
- 49 HWE: Hardy-Weinberg equilibrium
- 50 IgAN: Immunoglobulin A nephropathy

- 51 IQR: interquartile range
- 52 LP: lectin pathway
- 53 MAF: minor allele frequency
- 54 MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
- 55 MCP: membrane cofactor protein (CD46)
- 56 MFI: mean fluorescence intensity
- 57 ngs: next generation sequencing
- 58 rFH: recombinant FH
- 59 rFH-WT: recombinant FH wild type, reference FH protein
- 60 SCR: short consensus repeats
- 61 SNP(s): single nucleotide polymorphism(s)
- 62 TMA: thrombotic microangiopathy
- 63 UPCR: urine protein-to-creatinine ratio
- 64 GWAS: genome-wide association study

65 **Abstract**

66

67 **Background.** Complement activation plays a role in the severity of IgA nephropathy (IgAN). Indeed,
68 genome-wide association studies have identified a susceptibility locus for IgAN in the *CFH-CFHR*
69 genes. However, the relationship between complement genetics and the progression of IgAN is not
70 established. **Methods.** We sequenced 260 adults with a primary IgAN by *next-generation sequencing*
71 of the *CFH*, *CFI*, *CFB*, *MCP*, *C3* and *CFHR5* genes. The frequencies of rare variants (MAF<0.1%) and
72 *CFH*, *MCP* and *CFB* haplotypes were compared with the European population from the 1000 Genomes
73 Phase 3 Project. Functional studies were performed on recombinant full-length FH variants *in*
74 *vitro*. **Results.** Genetic analysis revealed a higher prevalence of rare *CFH* non-synonymous variants in
75 patients with IgAN compared to controls (4.6% versus 1.8%, p=0.034). *In vitro* studies showed impaired
76 complement regulatory activity for 4 variants. The *CFH-H2* haplotype was protective regarding to IgAN
77 susceptibility (OR 0.52 [0.34-0.79], p=0.034, dominant model). Moreover, multivariate analysis
78 revealed that the homozygous MCP *ggaac* haplotype was an independent risk factor for end-stage-renal
79 disease 15 years after diagnosis (HR 2.83 [1.20-6.68]). **Conclusion.** Our study shed light on the dual
80 role of complement genetics in IgAN. While the *CFH-H2* haplotype is identified as a protective factor
81 against IgAN susceptibility, homozygosity for the *MCP ggaac* haplotype accelerates the progression of
82 the nephropathy.

83

84

85

86 **Keywords:** IgA nephropathy, genetics, complement, haplotypes, factor H, MCP

87

88

89 Introduction

90 IgA nephropathy (IgAN) is a common type of autoimmune glomerulonephritis worldwide and
91 a frequent cause of renal failure (1–3). Although the diagnosis of IgAN is based on the identification of
92 (co)dominant IgA deposits in the glomerular mesangium, it is now well established that this nephropathy
93 forms a highly heterogeneous family of clinical manifestations, histological patterns and renal outcomes
94 (1,4,5). In addition, the prevalence, presentation, and course of IgAN vary significantly between
95 different geographical regions and ethnic populations. Asians have the highest prevalence, followed by
96 Europeans, while this condition is uncommon in patients of African descent (2,6–10). These variations
97 suggest the involvement of genetic and environmental factors in the susceptibility, the risk of
98 progression and the final phenotype of IgAN (2,4,6–8,11–18).

99 A growing body of evidence has highlighted the role of complement system activation in the
100 intricate pathogenesis of IgAN and its impact on kidney damage (4,19–24). Specifically, the
101 complement alternative and lectin pathways (AP and LP) play a prominent role in IgAN. The
102 complement system (AP, LP) occurs in the kidney tissue due to the deposition of pathological galactose-
103 deficient IgA1 (Gd-IgA1)-containing immune complexes (4,25,26). Detection of mesangial C3b/iC3b
104 and Gd-IgA1 co-deposition in the glomerular mesangium in over 90% of patients, serves as a key
105 indicator of complement activation (27–29). To prevent inadvertent self-harm caused by complement
106 activation in the kidneys, maintaining strict control over C3b deposition and avoid the complement AP
107 self-amplification becomes paramount. Individual ability to manage exposure to a complement trigger
108 may be influenced by a genetic predisposition modulating the capacity to effectively downregulate
109 complement activity in the long term.

110 Genome-wide association studies (GWAS) have reinforced the hypothesis that complement
111 genetics may influence the susceptibility to IgAN in European and Asian populations, by identifying a
112 susceptibility locus on 1q32 comprising *CFH* and *CFHR* genes (13,14,18,30). The Factor H (FH) is a
113 glycoprotein encoded by the *CFH* gene and serves as the primary regulator of the complement AP,
114 functioning both in the circulation and on the cell surface (31,32). This circulating protein prevents the
115 formation of alternative C3 convertases by binding to C3b, acting as a competitor for factor B (FB)
116 binding to C3b. In addition, FH facilitates the rapid decay of formed AP convertases on the cell surface

117 and acts as a cofactor for Factor I (FI) proteolytic inactivation of C3b into iC3b. Complement factor H
118 related proteins 1-5 (FHR1-5) are similar to FH in structure, but lack C3b regulatory activity (33). These
119 proteins are thought to function as competitors to complement regulation by FH on cell surfaces with
120 increased density of C3b/C3d deposits and to finely adjust complement activity (33–36). The potential
121 importance of the delicate balance between FH/FHR in IgAN has been raised by the discovery of a top
122 signal single nucleotide polymorphism (SNP) (rs6677604, intronic) in linkage disequilibrium with a
123 *CFHRI-3* deletion (*CFHRI-R3Δ*) which may confer a protective effect against susceptibility to IgAN
124 (13,14,30,37,38). However, the connection between complement AP genetics and the progression of
125 IgAN has not been clearly established yet (12,37,39–42). To address this, our objective was to
126 investigate the impact of complement genetics on renal outcomes in a French cohort of patients with
127 IgAN.

128

129 **Methods**

130 ***Study participants***

131 Unrelated patients with a biopsy-proven IgAN from two French centers (University Hospital of
132 Saint Etienne and University Hospital of Strasbourg) were included for sequencing of a panel of
133 complement alternative pathway genes. The diagnosis of IgAN was defined on the basis of predominant
134 or codominant IgA deposition in the glomerular mesangium identified by routine immunostaining.
135 Patients with secondary forms of the nephropathy – including cirrhosis, chronic inflammatory bowel
136 disease, or other coexisting autoimmune condition – or a pediatric-onset IgAN were excluded. Clinical,
137 biological and renal/graft survival data were collected retrospectively. All patients signed an informed
138 consent for clinical and biological data collection and genetic testing (NCT05234463).

139 ***Complement genetics***

140 Genomic DNA was extracted from whole blood using standard procedures. All coding regions
141 from a panel of six complement genes (*CFH*, *CFB*, *CFI*, *MCP*, *C3*, *CFHR5*) associated with a
142 complement-mediated kidney diseases were analyzed by or *next generation sequencing* (n=197) as
143 previously described (43–45). The cohort was completed with 63 patients who underwent Sanger

144 sequencing of the relevant polymorphisms and of the coding sequences of *CFH* and *CFHR5*. Variants
145 with a minor allele frequency (MAF) below 0.1% in the European population from the genome
146 Aggregation Database (gnomAD) were considered as rare and variants with a MAF between 0.1-1%
147 were termed as “low frequency variants” (46). Single nucleotide changes with a MAF above 1% were
148 defined as single polymorphisms (SNPs). All rare and low frequency variants were classified according
149 to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) classification (47). Allele and
150 haplotype frequencies were compared with the reference population of European descent from the 1000
151 Genomes Project Phase 3 (1000 Genomes 30x GRCh38, n=503) (48).

152

153 ***Analysis of complement polymorphisms and phasing for haplotype definition***

154 Four SNPs in the *CFH* gene were studied (rs800292 c.184G>A p.V62I; rs1061170 c.1204T>C
155 p.Y402H; rs3753396 c.2016A>G G672G and rs1065489 c.2808G>T p.E936D) and combined to form
156 *CFH* haplotypes (H) (38,49). We proceeded similarly for *MCP* and *CFB* haplotypes by combining five
157 polymorphisms in the *MCP* gene (rs2796267-652A>G; rs2796268 -366A>G9/7/23 11:27:00 PM;
158 rs1962149 IVS9 -78G>A, rs859705, IVS12 +638G>A; rs7144, c.4070T>C) and three polymorphisms
159 in the *CFB* gene (rs4151667 c.26T>A p.L9H; rs12614 c.94C>T p.R32W; rs641153 c.95G>A p.R32Q)

160 Two additional SNPs were included in this study: one in the *C3* gene (rs2230199 c.304C>G
161 p.R102G) and one intergenic (rs7542235 chr1:196854483 A>G) to tag the *CFHR1-R3A*.

162 Data phasing was performed in the IgAN cohort using the Michigan imputation server (50) and
163 Eagle v2.4. The pre-phasing quality control criteria for dataset required over 90% of genotyped data per
164 SNP and over 50% of available SNP data for a given individual. The 1000 Genomes Project Phase 3
165 cohort (1kGe) was used as a reference panel (reference panel: apps@1000g-phase-3-v5, build GRCh38)
166 for the phasing of *CFH*, *MCP* and *CFB* haplotypes. All haplotypes with a frequency above 1% are
167 displayed.

168 ***Functional study of identified CFH rare variants***

169 *CFH* rare missense variants (MAF <0.1%) identified in IgAN patients were considered for
170 recombinant protein production. Full-length His-tagged FH-variants were produced and tested

171 functionally *in vitro* for C3b binding (ELISA), alternative C3 convertase (C3bBb) decay-accelerating
172 activity (DAA) and FI-cofactor activity with new functional assays using the Luminex® technology.
173 Details about the methods of recombinant FH production (rFH) and functional assays are provided in
174 *Supplemental methods*. The functionality of each rFH variant was compared with a reference
175 recombinant FH protein (rFH “wild type”, rFH-WT). Variants were considered as “pathogenic” if they
176 displayed a quantitative and/or functional defect in at least two of the functional assays (defined as a
177 functional capacity outside the mean \pm 2 standard deviations (SD) of the function of rFH-WT).
178 Recombinant FH variants that exhibited a slight decrease in one FH regulatory function were classified
179 as having a “minor impact”.

180 ***Statistical analysis***

181 *Genetic exploration*

182 Deviation from the Hardy Weinberg Equilibrium (p -value $> 1.10^{-3}$) was evaluated using a Chi-
183 square test in IgAN population. Allele and haplotypes frequencies and distribution were compared
184 between patients and controls using a logistic regression model using gender as a covariate. Benjamini-
185 Hochberg procedure was applied for correcting multiple testing. A corrected p -value less than 0.05 was
186 considered as statistically significant.

187 *Analysis of clinical data and renal survival*

188 Normality distribution of continuous variables was tested by Shapiro-Wilk. Normally
189 distributed variables are expressed in mean \pm standard deviation (SD) and non-normally distributed
190 variables are expressed in median and interquartile range [IQR]. The characteristics were compared
191 between groups using the Fisher exact test for the qualitative variables and the Mann-Whitney U test for
192 quantitative variables. Renal survival corresponded to the time between the IgAN diagnosis and the
193 occurrence of end-stage renal disease (ESRD) defined as the requirement of renal replacement therapy
194 (dialysis or kidney transplantation). Renal survival was censored at time of patient’s death, last follow-
195 up or 15 years after the diagnosis. Cox proportional hazard models have been performed to analyze the

196 factors associated with renal survival at 15 years, expressed in hazard ratios (HR) and 95% confidence
197 intervals (CI_{95%}). Variables associated with renal survival with a p-value <0.1 in univariate analysis were
198 included in the multivariate Cox model. All statistical analyses were performed with R (version 4.2.2)
199 with the survival package and GraphPad Prism software (version 9.5.1).

200 **Results**

201

202 *Characteristics of the study population*

203

204 A total of 270 IgAN patients were studied for complement genes sequencing. Among them, 10
205 patients (3.7%) had a pediatric-onset IgAN (**Figure 1**). The characteristics and outcomes of these 10
206 patients can be found in **Tables S1-S3**. The adult IgAN group (n=260) was predominantly composed of
207 male individuals (male/female ratio 209/51, 80.4%) (**Table 1**). The median age at diagnosis was 42.2
208 [31.4-55.8] years. At the time of initial presentation, 196 patients (78.1%) with IgAN had hypertension,
209 with a median eGFR of 42.0 [19.0-61.0] mL/min/1.73m² (32 patients (12.3%) had an eGFR below 15
210 mL/min/1.73m²) and a urine protein-to-creatinine ratio (UPCR) of 1.88 [0.79-3.50] g/g. Microscopic or
211 gross hematuria was observed in 104 patients (75.4%). Eighty-one patients (38.6%) received steroids,
212 completed by immunosuppressants courses in 11 patients (5.3%).

213 Detailed histological data of the diagnostic kidney biopsy was available in 199 patients (76.5%).
214 Overall, 167 biopsies (83.9%) met the criteria for Oxford 2016 MEST-C score classification. Mesangial
215 proliferation (M1) accompanied IgA immune deposition in 40.1% of biopsy specimens. Crescentic
216 forms (C1, C2) were found in 22.8% of biopsy specimens (**Table 1**).

217 *Renal outcomes*

218 Patients were followed during a median of 15.8 [9.2-22.5] years after the diagnosis. In our series,
219 194 patients (74.6%) evolved to ESRD during the follow-up, with a median renal survival of 7.4 [5.2-
220 8.7] years and a median eGFR slope of -1.2 [-2.3 -- -0.10] mL/min/1.73m²/year (**Figure S1**). During the
221 follow-up, 164 patients (63.1%) underwent kidney transplantation, at 46.8 [36.0-57.9] years. Sixty-

222 seven transplant recipients (40.9%) displayed a histological recurrence of IgAN in the graft, with 26 of
223 them (38.8%) being diagnosed in the first year following kidney transplantation. Twenty-six patients
224 (10.0%) died during the follow-up with a median age of 74.3 [68.4-78.3] years and a median delay of
225 16.6 [8.6-23.7] years after the diagnosis. Among them, 24/26 (92.3%) have previously reached ESRD.
226 In univariate analysis, factors associated with renal survival 15 years after the diagnosis of IgAN
227 included: male gender, a reduced eGFR at the time of diagnosis, a high degree of proteinuria, the
228 presence of hypertension, the eGFR slope and MEST-C score parameters (M1, T1-2, C1-2) at first
229 kidney biopsy (**Table S4**).

230

231 *Complement CFH, MCP and CFB polymorphisms and haplotypes frequencies*

232

233 The genotype and allelic frequencies of all tested SNPs of the *CFH*, *CFB*, *MCP* and *C3* genes
234 are presented in **supplemental Table S5**. All polymorphisms followed HWE expectations.

235 *CFH* Haplotypes (H) were differentially distributed between patients and controls ($p=0.495$)
236 (**Table 2**). In a dominant model adjusting for sex, the *CFH-H2* haplotype was protective against IgAN
237 susceptibility (OR 0.52 [0.34-0.79], $p=0.034$) (**Table 3**). By contrast, the *CFH-H3* and the *CFH-H4* (in
238 linkage disequilibrium with *CFHR1-R3* deletion) were neutral for IgAN. Other complement haplotypes
239 in the *MCP* and *CFB* were not associated with IgAN susceptibility (**Table 4**, **Table S6**).

240 However, in patients with an eGFR above 15 ml/min/1.73m² at diagnosis, having the
241 homozygous *MCP ggaac* haplotype was associated with reduced kidney survival (HR 2.85 [1.73-5.67],
242 $p<0.001$) (**Figure 2**). No association was found between different *CFH* or *CFB* haplotypes and renal
243 survival in IgAN patients (**Figures 3 and S2**).

244

245

246 *Rare non-synonymous variants in the six complement genes*

247

248 Overall, 33 patients with IgAN were identified to carry at least one rare missense variant in any
249 of the six studied genes (*CFH*, *CFI*, *MCP*, *CFB*, *C3* and *CFHR5*) (**Table 5, Figure 3**). When considering
250 the 197 patients sequenced for all the 6 complement genes, the proportion of patients with IgAN with at
251 least one rare non-synonymous variant (MAF <0.1%) in any of the six genes was higher than the one
252 observed in the reference panel (30/197, 15.7% vs 44/503, 8.9%, $p=0.0121$). Three individuals carried
253 two rare variants (MAF<0.1%): two patients had rare variants in both *CFH* and *C3* genes and one patient
254 had two rare variants in the *CFHR5* gene.

255 The observed difference in rare variants prevalence between patients and controls mainly
256 concerned the *CFH* gene, with an increased proportion of IgAN patients harboring a rare *CFH* variant
257 (one splice-site and 11 missense variants) compared to the reference panel (12/260, 4.6% versus 9/503,
258 1.8%, $p=0.034$). Two rare *CFH* variants were shared between the adult IgAN patients and the reference
259 panel (*CFH*. p.S58A and p.G650V) (**Figure 4, panel A**). The prevalence of variants with MAF<0.1%
260 in the five other genes were similar between patients and controls (**Table S7-9**).

261 Remarkably, we noticed a notable disparity in the nature of *CFHR5* variants between IgAN
262 patients and the control group (**Figure S3, panel A**). Importantly, none of the 260 studied IgAN patients
263 from our cohort carried a nonsense nor frameshift rare or low frequency *CFHR5* variant which would
264 result in a deficiency in the FHR5 levels. However, these specific variants were present in the control
265 group (0/260, 0% versus 13/503, 2.6%, $p=0.006$) (**Table S7**).

266 At the time of diagnosis, there were no discernible clinical or histological differences between
267 patients with or without rare variant(s) in the six studied genes at the diagnosis (**Tables S10-11**).

268

269

270 *Comprehensive study of CFH rare missense variants*

271

272 We conducted further studies on the 11 rare *CFH* missense variants identified in adult IgAN
273 patients. We extended the functional analysis by including two additional rare *CFH* missense variants
274 identified in patients with pediatric-onset IgAN (p.1086E and p.N516K) (**Table S2**). Overall, two rare
275 missense *CFH* variants were newly described (p.G117R and p.D1086E).

276 The majority of rare *CFH* missense variants identified in IgAN patients were located within FH
277 functional domains that are crucial for FH regulatory activity and anchoring on the cell surface (9/13,
278 69.2% versus 3/9, 33.3%, $p=0.19$). These variants were found in the short consensus repeat (SCR)
279 domains 1-4 ($n=4$), in SCR6-8 ($n=2$) and in the SCR18-20 ($n=3$). One variant was situated within the
280 signal peptide (*CFH* p.L3V). The remaining variants were in the mid-region of FH, specifically in the
281 domains SCR9-11 whose functions are not fully characterized. No rare variant was identified in the
282 SCR12-17 domains of FH (**Figure 4, panel A**).

283 Among the 13 rare missense variants found in IgAN patients, only six have been previously
284 studied functionally *in vitro*: one has been described as pathogenic (*CFH* p.R1012C)(51–55), no
285 functional impact was found for two variants (p.L3V, p.G650V)(51,56,57) while the previous functional
286 explorations of three variants yielded conflicting results (p.A161S, p.S58A, p.N516K)(51,55,57–60)
287 (**Table S12**).

288 Overall, twelve *CFH* variants were recombinantly produced for *in vitro* functional
289 characterization. Two recombinant FH variants (rFH) (p.G117R and p.R1210C) were generated with a
290 below-average yield. The patient who was heterozygous for the p.G117R variant exhibited plasma FH
291 levels in the lower range of normal values, indicating a potential quantitative defect in FH production.
292 *In vitro* functional assessment of *CFH* rare missense variants revealed impaired FH regulatory activity
293 *in vitro* for 6/13 (46.2%) rFH variants. Four variants (p.E23K, p.A161S, p.D1086E, p.N516K) displayed
294 a minimal functional impairment and two variants (p.G117R and p.R1210C) were identified as
295 pathogenic (**Figure 4, panel B**).

296 *Association of complement genetics and renal survival*

297

298 In a multivariate Cox proportional hazards model, the presence of homozygous *MCP ggaac*
299 haplotypes was identified as independent risk factor for the development of ESRD at 15 years after the
300 diagnosis in adult IgAN patients (HR: 2.83, 95% CI 1.20-6.68, p=0.018). Rare variants in the 6
301 complement genes were not associated with renal survival.

302

Manuscrit 2

303

304 **Discussion**

305 The pathogenesis of IgAN is intricated and influenced by the interplay of multiple genes and
306 environmental factors, collectively affecting the development and/or the progression of the nephropathy
307 and modifying the final phenotype (13). Our study presents a comprehensive analysis of six complement
308 genes involved in the formation of alternative C3 convertases (*C3*, *CFB*) and the regulation of cell
309 surface C3b deposition (*MCP*, *CFI*, *CFH*, *CFHR5*) in a French cohort of adult patients with IgAN. Our
310 findings shed light on the significant role of complement genetics in IgAN. Specifically, we identified
311 a protective *CFH* haplotype (*CFH-H2*), which reduces susceptibility to IgAN. Conversely, we found
312 that individuals with the homozygous *MCP ggaac* haplotype face an elevated risk of end-stage renal
313 disease (ESRD) 15 years after diagnosis, with their risk being 2.83 times higher. Additionally, we
314 observed an increased prevalence of rare missense *CFH* variants in 4.6% of patients, although these
315 variants did not affect renal survival. The key findings from our study are summarized in **Box 1**.

316 In our IgAN cohort, we consistently observed a lower renal survival rate compared to previous
317 reports (1,61–64), underscoring the severity of our patient population. Hence, it is plausible that the
318 increased prevalence of rare *CFH* variants in our cohort is primarily linked to the overall severity of the
319 nephropathy rather than being a direct susceptibility factor for the development of IgAN. However,
320 precise conclusions about this discovery are restrained by the absence of appropriate control population
321 in this study.

322 Previous studies have demonstrated that *CFH* haplotypes can influence the susceptibility to
323 complement-mediated diseases such as age-related macular degeneration (AMD) and atypical hemolytic
324 and uremic syndrome (aHUS)(65–67). In our cohort, we observed a lower prevalence of the *CFH-H2*
325 haplotype in patients with IgAN compared to the reference panel, suggesting a potential protective effect
326 against IgAN susceptibility. Notably, this haplotype has been associated with protection against aHUS
327 and AMD (65–69) and includes the FH-62^{11c} which may enhance FH regulatory activity (moderate
328 increases in C3b binding and in FI-cofactor activity compare to the FH-62^{Val})(70). Conversely, *CFH*-

329 *HL* (“at-risk” of AMD) and *CFH-H3* (“at risk” of aHUS) were neutral for IgAN susceptibility. The
330 *CFH-H4* haplotype and rs7542235-G, which are in linkage disequilibrium with *CFHR1-R3Δ*, were not
331 found to be associated with IgAN susceptibility or progression in our cohort.

332 Few studies have investigated the impact of rare *CFH/CFHR* variants on the phenotype or renal
333 prognosis of patients with IgA nephropathy (40,71,72). In a Spanish cohort, five patients with low FH
334 levels were identified to have rare variants (MAF <0.1%) in complement AP regulatory genes (four had
335 rare *CFH* variants, one had a *CFI* variant)(40). Four of these patients showed signs of thrombotic
336 microangiopathy (TMA) during the follow-up period. In a separate Asian cohort of 94 IgAN cases with
337 arteriolar microangiopathic lesions, 56 patients (59.6%) were found to harbor rare variants (MAF
338 <0.01%) in complement-related genes (72). Notably, in this study, the variants were predominantly
339 found in *CFHR2*, 3 and 5 genes (6/59, 10.2% of patients carrying a variant) whereas only one patient
340 carried a rare variant in the *CFH* gene (p.P606H). In our cohort, patients with a rare *CFH* missense
341 variant did not exhibit any discernible clinical or histological differences compared to non-carriers at
342 the time of diagnosis. Moreover, the rare *CFH* missense variants identified were located in domains that
343 are crucial for FH regulatory activity on C3b (SCR1-4, SCR18-20)(57,65). Additionally, a cluster of
344 variants was found in the mid-region of FH, a region with limited known functions (72,73). This region
345 potentially plays a role in maintaining the FH conformation for effective C3b binding while interacting
346 with polyanions on cell surface (74–76). As the functional tests employed in this study primarily
347 evaluated the known activities of FH, the possibility of another functional impact specific to IgAN of
348 these mid-region variants cannot be ruled out. The overrepresentation of rare *CFH* variants combined
349 with the lower frequency of *CFHR5* variants leading to FHR5 deficiency found in our cohort support
350 the notion that rare variants affecting the balance of FH/FHR (FHR5 notably) might intensify
351 complement activation triggered by the Gd-IgA-IC in IgAN (39,41,73,77–79).

352 In our study, membrane cofactor protein (MCP, or CD46) genetics has been identified as another
353 risk factor for developing ESRD. The gene for MCP, a transmembrane complement regulatory protein,
354 is situated in the complement regulatory locus (1q32) (65,68). MCP is expressed in nearly all nucleated
355 cells, including mesangial and endothelial cells (65). It serves as a cofactor for proteolytic inactivation

356 of C3b and C4b by serum FI. Consequently, MCP assumes a crucial role as a regulator of all three
357 complement pathways on the cell surface (31,32,80).

358 *MCP ggaac* haplotype comprise five SNPs, including two SNPs (rs2796267-G and rs2796268-
359 G) located in the *MCP* promotor. One *in vitro* study suggested that the combination of these two
360 polymorphisms in promotor could negatively influence the *MCP* transcription level and, possibly, the
361 expression level of MCP on cell surface (68). In a cohort of 157 patients with IgAN from European
362 centers of the VALIGA network, Coppo, *et al.* (81) showed that patients with progressive IgAN (defined
363 by annual eGFR decline greater than $-0.41 \text{ mL/min/1.73m}^2$) displayed a lower *MCP* expression in
364 peripheral blood cells. Interestingly, *MCP* expression was not correlated with eGFR at sampling but
365 with a faster annual loss of eGFR. This suggests that a defect in *MCP* transcription, and subsequent
366 impaired control of complement activation, may accelerate the decline of renal function. Unfortunately,
367 the absence of genetic information and protein-level data on *MCP* expression in the kidney in the
368 aforementioned study hinders us from establishing a direct link between *MCP* expression on peripheral
369 blood cells and its potential impact on complement regulation efficiency at the glomerular level.

370 *MCP ggaac* haplotype has been associated with aHUS(47,69), particularly when combined with
371 a causative variant in another complement AP gene (65,82). In our study, the frequency of *ggaac*
372 haplotypes was similar between patients and controls, and rare *MCP* variants were not overexpressed in
373 our cohort with severe forms of IgAN. These findings emphasize that *MCP* genetics may not influence
374 the susceptibility to develop IgAN, but *MCP ggaac* haplotype may accelerate the eGFR decline after
375 the onset of IgAN. Noteworthy, MCP (CD46) acts at the interface of innate and adaptive immunity (83).
376 The multiple roles of MCP in the immune response to invading pathogens, the modulation of immune
377 signal and immune response as well as intracellular functions let us speculate that the role of MCP and
378 IgAN pathogenesis might possibly not be limited to complement regulatory functions.

379 Our study has several limitations. First, the unique severity of our cohort makes it challenging
380 to generalize the findings to the broader population of European patients with IgAN. Therefore, it is
381 essential to validate the genetic associations in a larger, independent IgAN cohort, encompassing various

382 severity profiles. Second, we could not establish any genotype-phenotype correlation for rare variants.
383 Conducting additional functional *in vitro* studies on complement haplotypes and rare variants outside
384 the *CFH* gene is necessary to understand their precise role in IgAN.

385 In conclusion, our results highlight the potential role of complement genetics in creating a
386 polygenic complotype that modifies the individual response to a complement trigger (i.e. Gd-IgA1-
387 containing immune complexes) and accelerates the progression of IgAN.

Manuscrit 2

388 **Disclosure statement**

389 AD has received fees from Alexion Pharmaceuticals for congress travel. SC received fees from
390 Alexion for advisory boards and congress travel. VF-B has received fees from Alexion Pharmaceuticals,
391 Biocryst, Roche, Apellis, Novartis and Baxter for invited lectures and/or board membership and is the
392 recipient of a research grant from Alexion Pharmaceuticals. The other authors have no conflicts of
393 interest to report.

394

395

396

Manuscript 2

397 Data sharing statement

398 The genetic data from the reference population panel “1000 Genomes Project 30X on GRCh38”
399 are shared via the International Genome Sample Resource (IGSR) portal (48) at:
400 <https://www.internationalgenome.org/data-portal/data-collection/30x-grch38>.

401 Minor allele frequencies (MAF) from variants of the European population from the Genome
402 Aggregation Database (GnomAD) (46) are available from: <https://gnomad.broadinstitute.org>.

403 The Michigan Imputation Server (50) is available from: <https://imputationserver.sph.umich.edu>.

404 The IgAN cohort dataset supporting the findings of this study is available on reasonable request
405 from the corresponding author AD.

406

407

408 **References**

- 409 1. Pitcher D, Braddon F, Hendry B, Mercer A, Osmaston K, Saleem MA, et al. Long-Term
410 Outcomes in IgA Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2023 Apr 13 [cited 2023 May
411 13]; Publish Ahead of Print. Available from:
412 <https://journals.lww.com/10.2215/CJN.000000000000135>
- 413 2. Willey CJ, Coppo R, Schaefer F, Mizerska-Wasiak M, Mathur M, Schultz MJ. The incidence
414 and prevalence of IgA nephropathy in Europe. *Nephrol Dial Transplant*. 2023 May 8;gfac082.
- 415 3. Wyatt RJ, Julian BA. IgA Nephropathy. *N Engl J Med*. 2013 Jun 20;368(25):2402–14.
- 416 4. Duval A, Caillard S, Frémeaux-Bacchi V. The complement system in IgAN: mechanistic
417 context for therapeutic opportunities. *Nephrol Dial Transplant*. 2023 Jun 29;gfac140.
- 418 5. Trimarchi H, Barratt J, Cattran DC, Cook HT, Coppo R, Haas M, et al. Oxford Classification
419 of IgA nephropathy 2016: an update from the IgA Nephropathy Classification Working Group.
420 *Kidney Int*. 2017 May;91(5):1014–21.
- 421 6. Zhang H, Barratt J. Is IgA nephropathy the same disease in different parts of the world? *Semin*
422 *Immunopathol*. 2021 Oct;43(5):707–15.
- 423 7. Yeo SC, Goh SM, Barratt J. Is immunoglobulin A nephropathy different in different ethnic
424 populations? *Nephrology*. 2019 May;nep.13592.
- 425 8. Zhang Z, Zhang Y, Zhang H. IgA Nephropathy: A Chinese Perspective. *Glomerular Dis*. 2021
426 Oct 12;2(1):30–41.
- 427 9. Liu ZH. Nephrology in China. *Nat Rev Nephrol*. 2013 Sep;9(9):523–8.
- 428 10. Geddes CC. A tricontinental view of IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Aug
429 1;18(8):1541–8.
- 430 11. Li M, Wang L, Shi DC, Foo JN, Zhong Z, Khor CC, et al. Genome-Wide Meta-Analysis
431 Identifies Three Novel Susceptibility Loci and Reveals Ethnic Heterogeneity of Genetic Susceptibility
432 for IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2020 Dec;31(12):2949–63.
- 433 12. Gharavi AG, Kiryluk K, Choi M, Li Y, Hou P, Xie J, et al. Genome-wide association study
434 identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nat Genet*. 2011 Apr;43(4):321–7.
- 435 13. Kiryluk K, Sanchez-Rodriguez E, Zhou XJ, Zanoni F, Liu L, Mladkova N, et al. Genome-
436 wide association analyses define pathogenic signaling pathways and prioritize drug targets for IgA
437 nephropathy. *Nat Genet* [Internet]. 2023 Jun 19; Available from: <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01422-x>
- 438 14. Kiryluk K, Li Y, Scolari F, Sanna-Cherchi S, Choi M, Verbitsky M, et al. Discovery of new
439 risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens. *Nat*
440 *Genet*. 2014 Nov;46(11):1187–96.
- 441 15. Kiryluk K, Li Y, Moldoveanu Z, Suzuki H, Reily C, Hou P, et al. GWAS for serum galactose-
442 deficient IgA1 implicates critical genes of the O-glycosylation pathway. Myers AJ, editor. *PLOS*
443 *Genet*. 2017 Feb 10;13(2):e1006609.
- 444 16. Shi M, Ouyang Y, Yang M, Yang M, Zhang X, Huang W, et al. IgA Nephropathy
445 Susceptibility Loci and Disease Progression. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018 Sep 7;13(9):1330–8.
- 446 17. Monteiro RC. Recent advances in the physiopathology of IgA nephropathy. *Néphrologie*
447 *Thérapeutique*. 2018 Apr;14:S1–8.
- 448 18. Kiryluk K, Li Y, Sanna-Cherchi S, Rohanizadegan M, Suzuki H, Eitner F, et al. Geographic
449 Differences in Genetic Susceptibility to IgA Nephropathy: GWAS Replication Study and Geospatial
450 Risk Analysis. McCarthy MI, editor. *PLoS Genet*. 2012 Jun 21;8(6):e1002765.
- 451 19. Cheung CK, Dormer JP, Barratt J. The role of complement in glomerulonephritis—are novel
452 therapies ready for prime time? *Nephrol Dial Transplant*. 2022 Oct 28;gfac296.
- 453 20. Tesar V, Radhakrishnan J, Charu V, Barratt J. Challenges in IgA Nephropathy Management:
454 An Era of Complement Inhibition. *Kidney Int Rep*. 2023 Jun;S2468024923013554.
- 455 21. Poppelaars F, Faria B, Schwaeble W, Daha MR. The Contribution of Complement to the
456 Pathogenesis of IgA Nephropathy: Are Complement-Targeted Therapies Moving from Rare Disorders
457 to More Common Diseases? *J Clin Med*. 2021 Oct 14;10(20):4715.
- 458 22. Floege J, Daha MR. IgA nephropathy: new insights into the role of complement. *Kidney Int*.
459 2018 Jul;94(1):16–8.
- 460 23. Maillard N, Wyatt RJ, Julian BA, Kiryluk K, Gharavi A, Frémeaux-Bacchi V, et al. Current

- 462 Understanding of the Role of Complement in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2015
 463 Jul;26(7):1503–12.
- 464 24. Medjeral-Thomas NR, O'Shaughnessy MM. Complement in IgA Nephropathy: The Role of
 465 Complement in the Pathogenesis, Diagnosis, and Future Management of IgA Nephropathy. *Adv*
 466 *Chronic Kidney Dis*. 2020 Mar;27(2):111–9.
- 467 25. Barratt J, Lafayette RA, Zhang H, Tesar V, Rovin BH, Tumlin JA, et al. IgA nephropathy: the
 468 lectin pathway and implications for targeted therapy. *Kidney Int*. 2023 May;S0085253823003952.
- 469 26. Cheung CK, Dormer JP, Barratt J. The role of complement in glomerulonephritis—are novel
 470 therapies ready for prime time? *Nephrol Dial Transplant*. 2022 Oct 28;gfac296.
- 471 27. Wu L, Liu D, Xia M, Chen G, Liu Y, Zhu X, et al. Immunofluorescence deposits in the
 472 mesangial area and glomerular capillary loops did not affect the prognosis of immunoglobulin a
 473 nephropathy except C1q:a single-center retrospective study. *BMC Nephrol*. 2021 Dec;22(1):43.
- 474 28. Xie M, Zhu Y, Wang X, Ren J, Guo H, Huang B, et al. Predictive prognostic value of
 475 glomerular C3 deposition in IgA nephropathy. *J Nephrol* [Internet]. 2022 Jul 4 [cited 2022 Oct 14];
 476 Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s40620-022-01363-4>
- 477 29. Chiu YL, Lin WC, Shu KH, Fang YW, Chang FC, Chou YH, et al. Alternative Complement
 478 Pathway Is Activated and Associated with Galactose-Deficient IgA1 Antibody in IgA Nephropathy
 479 Patients. *Front Immunol*. 2021 Jun 10;12:638309.
- 480 30. Gharavi AG, Kiryluk K, Choi M, Li Y, Hou P, Xie J, et al. Genome-wide association study
 481 identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nat Genet*. 2011 Apr;43(4):321–7.
- 482 31. Merle NS, Church SE, Frémeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I –
 483 Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol* [Internet]. 2015 Jun 2 [cited
 484 2023 Jul 19];6. Available from:
 485 <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00262/abstract>
- 486 32. Duval A, Frémeaux-Bacchi V. Complement biology for hematologists. *Am J Hematol*
 487 [Internet]. 2023 May [cited 2023 May 13];98(S4). Available from:
 488 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.26855>
- 489 33. Skerka C, Chen Q, Frémeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement factor H related
 490 proteins (CFHRs). *Mol Immunol*. 2013 Dec;56(3):170–80.
- 491 34. Renner B, Laskowski J, Poppelaars F, Ferreira VP, Blaine J, Antonioli AH, et al. Factor H
 492 related proteins modulate complement activation on kidney cells. *Kidney Int*. 2022 Dec;102(6):1331–
 493 44.
- 494 35. Papp A, Papp K, Uzonyi B, Cserhalmi M, Csincsi ÁI, Szabó Z, et al. Complement Factor H-
 495 Related Proteins FHR1 and FHR5 Interact With Extracellular Matrix Ligands, Reduce Factor H
 496 Regulatory Activity and Enhance Complement Activation. *Front Immunol*. 2022 Mar 22;13:845953.
- 497 36. Cserhalmi M, Papp A, Brandus B, Uzonyi B, Józsi M. Regulation of regulators: Role of the
 498 complement factor H-related proteins. *Semin Immunol*. 2019 Oct;45:101341.
- 499 37. Xie J, Kiryluk K, Li Y, Mladkova N, Zhu L, Hou P, et al. Fine Mapping Implicates a Deletion
 500 of *CFHR1* and *CFHR3* in Protection from IgA Nephropathy in Han Chinese. *J Am Soc Nephrol*. 2016
 501 Oct;27(10):3187–94.
- 502 38. Zhu L, Zhai YL, Wang FM, Hou P, Lv JC, Xu DM, et al. Variants in Complement Factor H
 503 and Complement Factor H-Related Protein Genes, *CFHR3* and *CFHR1*, Affect Complement
 504 Activation in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2015 May;26(5):1195–204.
- 505 39. Jullien P, Laurent B, Claisse G, Masson I, Dinic M, Thibaudin D, et al. Deletion Variants of
 506 *CFHR1* and *CFHR3* Associate with Mesangial Immune Deposits but Not with Progression of IgA
 507 Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2018 Feb;29(2):661–9.
- 508 40. Tortajada A, Gutiérrez E, Goicoechea de Jorge E, Anter J, Segarra A, Espinosa M, et al.
 509 Elevated factor H-related protein 1 and factor H pathogenic variants decrease complement regulation
 510 in IgA nephropathy. *Kidney Int*. 2017 Oct;92(4):953–63.
- 511 41. Zhu L, Zhai YL, Wang FM, Hou P, Lv JC, Xu DM, et al. Variants in Complement Factor H
 512 and Complement Factor H-Related Protein Genes, *CFHR3* and *CFHR1*, Affect Complement
 513 Activation in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2015 May;26(5):1195–204.
- 514 42. Hou W, Shi S, Zhou X, Wang S, Cai Q, Chen P, et al. Complement factor H variants are
 515 associated with microangiopathy lesions in IgA nephropathy. *Int Immunopharmacol*. 2022
 516 Nov;112:109234.

- 517 43. Vieira-Martins P, El Sissy C, Bordereau P, Gruber A, Rosain J, Fremeaux-Bacchi V. Defining
518 the genetics of thrombotic microangiopathies. *Transfus Apher Sci.* 2016 Apr;54(2):212–9.
- 519 44. Zuber J, Frimat M, Caillard S, Kamar N, Gatault P, Petitprez F, et al. Use of Highly
520 Individualized Complement Blockade Has Revolutionized Clinical Outcomes after Kidney
521 Transplantation and Renal Epidemiology of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *J Am Soc*
522 *Nephrol.* 2019 Dec;30(12):2449–63.
- 523 45. Fremeaux-Bacchi V, Fakhouri F, Garnier A, Bienaimé F, Dragon-Durey MA, Ngo S, et al.
524 Genetics and Outcome of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: A Nationwide French Series
525 Comparing Children and Adults. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013 Apr 5;8(4):554–62.
- 526 46. Chen S, Francioli LC, Goodrich JK, Collins RL, Kanai M, Wang Q, et al. A genome-wide
527 mutational constraint map quantified from variation in 76,156 human genomes [Internet]. *Genetics*;
528 2022 Mar [cited 2023 Aug 27]. Available from:
529 <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.03.20.485034>
- 530 47. Fakhouri F, Frémeaux-Bacchi V. Thrombotic microangiopathy in aHUS and beyond: clinical
531 clues from complement genetics. *Nat Rev Nephrol.* 2021 Aug;17(8):543–53.
- 532 48. Byrska-Bishop M, Evani US, Zhao X, Basile AO, Abel HJ, Regier AA, et al. High-coverage
533 whole-genome sequencing of the expanded 1000 Genomes Project cohort including 602 trios. *Cell.*
534 2022 Sep;185(18):3426–3440.e19.
- 535 49. Yang X, Sun J, Gao Y, Tan A, Zhang H, Hu Y, et al. Genome-Wide Association Study for
536 Serum Complement C3 and C4 Levels in Healthy Chinese Subjects. Gojobori T, editor. *PLoS Genet.*
537 2012 Sep 13;8(9):e1002916.
- 538 50. Das S, Forer L, Schönherr S, Sidore C, Locke AE, Kwong A, et al. Next-generation genotype
539 imputation service and methods. *Nat Genet.* 2016 Oct;48(10):1284–7.
- 540 51. Biggs RM, Makou E, Lauder S, Herbert AP, Barlow PN, Katti SK. An Evaluation of the
541 Complement-Regulating Activities of Human Complement Factor H (FH) Variants Associated With
542 Age-Related Macular Degeneration. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2022 Nov 29;63(12):30.
- 543 52. Martinez-Barricarte R, Pianetti G, Gautard R, Misselwitz J, Strain L, Fremeaux-Bacchi V, et
544 al. The Complement Factor H R1210C Mutation Is Associated With Atypical Hemolytic Uremic
545 Syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2008 Mar;19(3):639–46.
- 546 53. Ferreira VP, Herbert AP, Cortés C, McKee KA, Blaum BS, Esswein ST, et al. The Binding of
547 Factor H to a Complex of Physiological Polyanions and C3b on Cells Is Impaired in Atypical
548 Hemolytic Uremic Syndrome. *J Immunol.* 2009 Jun 1;182(11):7009–18.
- 549 54. Sánchez-Corral P, Pérez-Caballero D, Huarte O, Simckes AM, Goicoechea E, López-Trascasa
550 M, et al. Structural and Functional Characterization of Factor H Mutations Associated with Atypical
551 Hemolytic Uremic Syndrome. *Am J Hum Genet.* 2002 Dec;71(6):1285–95.
- 552 55. Gastoldi S, Aiello S, Galbusera M, Breno M, Alberti M, Bresin E, et al. An ex vivo test to
553 investigate genetic factors conferring susceptibility to atypical haemolytic uremic syndrome. *Front*
554 *Immunol.* 2023 Feb 9;14:1112257.
- 555 56. Lokki AI, Ren Z, Triebwasser M, Daly E, FINNPEC, Perola M, et al. Identification of
556 complement factor H variants that predispose to pre-eclampsia: A genetic and functional study. *BJOG*
557 *Int J Obstet Gynaecol.* 2023 May 8;1471-0528.17529.
- 558 57. Martín Merinero H, Zhang Y, Arjona E, del Angel G, Goodfellow R, Gomez-Rubio E, et al.
559 Functional characterization of 105 factor H variants associated with aHUS: lessons for variant
560 classification. *Blood.* 2021 Dec 2;138(22):2185–201.
- 561 58. Merinero HM, García SP, García-Fernández J, Arjona E, Tortajada A, Rodríguez de Córdoba
562 S. Complete functional characterization of disease-associated genetic variants in the complement
563 factor H gene. *Kidney Int.* 2018 Feb;93(2):470–81.
- 564 59. Wong EKS, Hallam TM, Brocklebank V, Walsh PR, Smith-Jackson K, Shuttleworth VG, et
565 al. Functional Characterization of Rare Genetic Variants in the N-Terminus of Complement Factor H
566 in aHUS, C3G, and AMD. *Front Immunol.* 2021 Jan 14;11:602284.
- 567 60. Madden I, Roumenina LT, Langlois-Meurinne H, Guichoux J, Llanas B, Frémeaux-Bacchi V,
568 et al. Hemolytic uremic syndrome associated with Bordetella pertussis infection in a 2-month-old
569 infant carrying a pathogenic variant in complement factor H. *Pediatr Nephrol.* 2019 Mar;34(3):533–7.
- 570 61. Barbour SJ, Espino-Hernandez G, Reich HN, Coppo R, Roberts ISD, Feehally J, et al. The
571 MEST score provides earlier risk prediction in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2016 Jan;89(1):167–75.

- 572 62. D'Amico G. Natural history of idiopathic IgA nephropathy: Role of clinical and histological
573 prognostic factors. *Am J Kidney Dis.* 2000 Aug;36(2):227–37.
- 574 63. Knoop T, Vikse BE, Svarstad E, Leh S, Reisaeter AV, Bjørneklett R. Mortality in Patients
575 With IgA Nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 2013 Nov;62(5):883–90.
- 576 64. Le W, Liang S, Hu Y, Deng K, Bao H, Zeng C, et al. Long-term renal survival and related risk
577 factors in patients with IgA nephropathy: results from a cohort of 1155 cases in a Chinese adult
578 population. *Nephrol Dial Transplant.* 2012 Apr 1;27(4):1479–85.
- 579 65. Rodríguez De Córdoba S. Genetic variability shapes the alternative pathway complement
580 activity and predisposition to complement-related diseases. *Immunol Rev.* 2023 Jan;313(1):71–90.
- 581 66. Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI, et al. A
582 common haplotype in the complement regulatory gene factor H (*HF1/CFH*) predisposes individuals
583 to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci.* 2005 May 17;102(20):7227–32.
- 584 67. Pappas CM, Zouache MA, Matthews S, Faust CD, Hageman JL, Williams BL, et al.
585 Protective chromosome 1q32 haplotypes mitigate risk for age-related macular degeneration associated
586 with the *CFH-CFHR5* and *ARMS2/HTRA1* loci. *Hum Genomics.* 2021 Dec;15(1):60.
- 587 68. Esparza-Gordillo J, Jorge EGD, Buil A, Berges LC, López-Trascasa M, Sánchez-Corral P, et
588 al. Predisposition to atypical hemolytic uremic syndrome involves the concurrence of different
589 susceptibility alleles in the regulators of complement activation gene cluster in 1q32. *Hum Mol Genet.*
590 2005 Mar 1;14(5):703–12.
- 591 69. De Córdoba SR, De Jorge EG. Translational Mini-Review Series on Complement Factor H:
592 Genetics and disease associations of human complement factor H. *Clin Exp Immunol.* 2007 Dec
593 7;151(1):1–13.
- 594 70. Tortajada A, Montes T, Martínez-Barricarte R, Morgan BP, Harris CL, De Cordoba SR. The
595 disease-protective complement factor H allotypic variant Ile62 shows increased binding affinity for
596 C3b and enhanced cofactor activity. *Hum Mol Genet.* 2009 Sep 15;18(18):3452–61.
- 597 71. Zhai YL, Meng SJ, Zhu L, Shi SF, Wang SX, Liu LJ, et al. Rare Variants in the Complement
598 Factor H-Related Protein 5 Gene Contribute to Genetic Susceptibility to IgA Nephropathy. *J Am Soc
599 Nephrol.* 2016 Sep;27(9):2894–905.
- 600 72. Li J, Guo L, Shi S, Zhou X, Zhu L, Liu L, et al. The Role of Complement in Microangiopathic
601 Lesions of IgA Nephropathy. *Kidney Int Rep.* 2022 Jun;7(6):1219–28.
- 602 73. Tortajada A, Gutiérrez E, Goicoechea de Jorge E, Anter J, Segarra A, Espinosa M, et al.
603 Elevated factor H-related protein 1 and factor H pathogenic variants decrease complement regulation
604 in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2017 Oct;92(4):953–63.
- 605 74. Morgan HP, Schmidt CQ, Guariento M, Blaum BS, Gillespie D, Herbert AP, et al. Structural
606 basis for engagement by complement factor H of C3b on a self surface. *Nat Struct Mol Biol.* 2011
607 Apr;18(4):463–70.
- 608 75. Blaum BS, Hannan JP, Herbert AP, Kavanagh D, Uhrin D, Stehle T. Structural basis for sialic
609 acid-mediated self-recognition by complement factor H. *Nat Chem Biol.* 2015 Jan;11(1):77–82.
- 610 76. Blaum BS. The lectin self of complement factor H. *Curr Opin Struct Biol.* 2017 Jun;44:111–8.
- 611 77. Malik TH, Gitterman DP, Lavin DP, Lomax-Browne HJ, Hiemeyer EC, Moran LB, et al.
612 Gain-of-function factor H-related 5 protein impairs glomerular complement regulation resulting in
613 kidney damage. *Proc Natl Acad Sci.* 2021 Mar 30;118(13):e2022722118.
- 614 78. Medjeral-Thomas NR, Lomax-Browne HJ, Beckwith H, Willicombe M, McLean AG,
615 Brookes P, et al. Circulating complement factor H-related proteins 1 and 5 correlate with disease
616 activity in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2017 Oct;92(4):942–52.
- 617 79. Gómez Delgado I, Sánchez-Corral P. Contribution of functional and quantitative genetic
618 variants of Complement Factor H and Factor H-Related (FHR) proteins on renal pathology. *Nefrol
619 Engl Ed.* 2022 May;42(3):280–9.
- 620 80. Liszewski MK, Atkinson JP. Membrane cofactor protein (MCP; CD46): deficiency states and
621 pathogen connections. *Curr Opin Immunol.* 2021 Oct;72:126–34.
- 622 81. Coppo R, Peruzzi L, Loiacono E, Bergallo M, Krutova A, Russo ML, et al. Defective gene
623 expression of the membrane complement inhibitor CD46 in patients with progressive immunoglobulin
624 A nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2019 Apr 1;34(4):587–96.
- 625 82. Arjona E, Huerta A, Goicoechea De Jorge E, Rodríguez De Córdoba S. Familial risk of
626 developing atypical hemolytic-uremic syndrome. *Blood.* 2020 Sep 24;136(13):1558–61.

- 627 83. Peruzzi L, Coppo R, Cocchi E, Loiacono E, Bergallo M, Bodria M, et al. The switch from
628 proteasome to immunoproteasome is increased in circulating cells of patients with fast progressive
629 immunoglobulin A nephropathy and associated with defective CD46 expression. *Nephrol Dial*
630 *Transplant.* 2021 Jul 23;36(8):1389–98.
631
- 632
- 633

Manuscrit 2

634 **Acknowledgements**

635 This work was found by a grant from the *Fondation pour la Recherche Médicale*
636 (FDM202006011155) that supported this work. We would like to thank Tania Robe-Rybkiné for her
637 precious technical help in generating recombinant FH mutants. The authors thank the patients,
638 paramedical staff and all collaborators who have participated in this work.
639

Manuscrit 2

640 **Legend to figures:**

641

642 **Figure 1: Flow chart of the study cohort**

643 In total, 270 patients were genetically analysed, of which 260 were adults included in the final analysis.
 644 Among these 260 patients, 197 were studied using a next-generation sequencing panel targeting six
 645 genes involved in the activation or regulation of the complement system (*CFH*, *CFI*, *CFB*, *C3*, *MCP*,
 646 *CFHR5*), while 63 others were genotyped for *CFH* and *CFHR5* genes (all exons) and the relevant
 647 polymorphisms in *CFH*, *CFB*, *MCP*, and *C3* genes by Sanger sequencing. Haplotypes of *CFB*, *CFH*,
 648 and *MCP* were defined for the entire population. Moreover, MLPA was conducted on 114 patients from
 649 the cohort to detect copy number variations of the *CFH-CFHR* locus genes. *Abbreviations:* IgAN: IgA
 650 nephropathy, *CFB*: complement factor B gene, *CFH*: complement factor H gene, *CFHR5*: complement
 651 factor H related protein 5; MAF: minor allele frequency, *MCP*: membrane cofactor protein gene, or
 652 *CD46*; MLPA: multiplex probe ligation assay.
 653

654 **Figure 2. Renal survival (years) after the diagnosis in adult patients with IgAN according to the**655 ***CFH* haplotype (n=260)**

656 Kaplan-Meier representation of the probability of renal survival (years) after the initial diagnosis of IgA
 657 nephropathy (IgAN) in patients with an estimated glomerular filtration rate (eGFR) above
 658 15mL/min/1.73m² at diagnosis according to *CFH* haplotypes. No correlation was found with renal
 659 survival.
 660

661 **Figure 3. Association of homozygous *MCP ggaac* haplotype and renal survival in IgAN patients**

662 Kaplan-Meier representation of the probability of renal survival (years) after the initial diagnosis of IgA
 663 nephropathy (IgAN) in patients with an estimated glomerular filtration rate (eGFR) above
 664 15mL/min/1.73m² at diagnosis according to the number of *MCP-H2 ggaac* haplotypes. The number of
 665 *MCP ggaac* haplotypes correlated with a poor renal survival in IgAN patients (Log rank test p-value
 666 0.049), particularly when homozygous (Log rank test p-value 0.015).
 667
 668

669 **Figure 4. Functional study of identified rare missense *CFH* variants in IgAN patients**

670 **Panel A.** Summary of *CFH* rare missense variants identified in IgAN patients (n=260) and in the
 671 reference panel (1kGe) (n=503). Variants shared between IgAN patients and 1kGe controls are shown
 672 in grey. Variants exclusively found in IgAN patients are shown in red. **Panels B-D.** Rare *CFH* missense
 673 variants were produced recombinantly (rFH) and studied *in vitro*. All recombinant FH mutants were
 674 expressed by Expi293TM cells. There was no truncated protein. A functional defect was defined as having
 675 a functional capacity outside the range of the mean \pm 2 standard deviations (SD) (corresponding to the
 676 grey area) of the function of the wild-type recombinant Factor H (rFH-WT). Variants were classified as
 677 "pathogenic" if they exhibited a quantitative defect or functional defect in at least two of the functional
 678 assays. The four identified variants considered as "pathogenic" or "minor impact" are highlighted in
 679 red. **Panel B. FH binding to the C3b measured by ELISA assay.** BD₅₀ corresponds to the
 680 concentration fold of rFH mutant needed to reach similar binding to C3b compared to the reference rFH-
 681 WT. Three variants (p.G117R, p.R1210C and p.E23K) showed a marked decrease in C3b binding *in*
 682 *vitro*. One variant (p.A161S) displayed a minimal impairment in C3b binding. **Panel C.** FH decay

683 accelerating activity. Measurement of the capacity of rFH variants to dissociate an alternative C3
684 convertase (C3bBb) formed on beads using the Luminex® technology. Three *CFH* variants: p.R1210C,
685 p.G117R and p.A161S impacted the capacity of FH to dissociate C3 convertases formed on beads. **Panel**
686 **D. FI-cofactor activity.** Measurement of FH capacity to act as a FI-cofactor for C3b inactivation into
687 iC3b. Two rFH variants strongly impacted the FI-cofactor activity of FH (p.G117R, p.R1210C). The
688 methods employed for the functional analysis are detailed in *Supplementary materials*.
689
690
691

Manuscrit 2

697
698
699**Table 1. Patients baseline characteristics at time of IgAN diagnosis (n=260)**

	IgAN patients (n=260)
At diagnosis	
Male, n (%)	209 (80.4)
Age (years), median [IQR]	42.2 [31.4-55.7]
SBP (mmHg), median [IQR]	150 [130-160]
DBP (mmHg), median [IQR]	85 [80-100]
Hypertension, n (%)	196 (78.1)
Serum creatinine level (μmol/L), median [IQR]	160 [116-295]
eGFR at diagnosis (mL/min/1.73m ²), median [IQR]	42.0 [19.0-61.0]
Stage of CKD, n (%)	
eGFR <15 mL/min/1.73m ²	32 (12.3)
eGFR 15-30 mL/min/1.73m ²	93 (40.8)
eGFR 30-60 mL/min/1.73m ²	77 (33.8)
eGFR >60 mL/min/1.73m ²	58 (25.4)
Proteinuria (g/g), median [IQR]	1.88 [0.79-3.50]
Hematuria [§] , n (%)	104 (75.4)
RAS inhibitors, n (%)	94 (51.1)
Steroids and/or immunosuppressants, n (%)	92 (35.4)
ESRD during follow-up, n (%)	194 (74.6)
Age at ESRD (years), median [IQR]	46.5 [36.2-59.9]
Delay between the diagnosis and ESRD (years), median [IQR]	3.9 [1.0-9.3]
ESRD < 5 years after the diagnosis, n (%)	112 (57.7)
Biopsy meeting criteria for MEST-C score at diagnosis, n (%)	
Glomerular sclerosis (%), mean (SD)	27.9 (25.0)
Mesangial hypercellularity - M1, n (%)	67 (40.1)
Endocapillary hypercellularity - E1, n (%)	45 (26.9)
Segmental Glomerulosclerosis - S1, n (%)	118 (70.7)
Tubular atrophy / interstitial fibrosis (T0 / T1 /T2), n (%)	67 (39.6) / 61 (36.1) / 41 (24.3)
Fibrocellular or cellular crescents (C≥1), n (%)	38 (22.8)
Glomerular staining	
IgA / IgG /IgM positive*, n (%)	199 (100) / 16 (8.2) / 63 (32.4)
C3 / C1q positive, n (%)	185 (93.4) / 15 (7.8)
At first kidney transplantation (KT)	
Kidney transplantation (KT), n (%)	164 (63.1)
Age at first KT (years), median [IQR]	46.8 [36.0-57.9]
IgAN recurrence after KT, n (%)	67 (40.9)
Delay of recurrence after KT (months), median [IQR]	34.5 [20.3-49.8]

700 Data are medians [interquartile range] or percentages when indicated. [§]Micro or gross
701 hematuria. *Abbreviations:* DBP: diastolic blood pressure; E1: Endocapillary hypercellularity;
702 eGFR: estimated glomerular filtration rate according to the MDRD formula; ESRD: end-stage
703 renal disease; IgAN: IgA nephropathy; KT: kidney transplantation; IQR: interquartile range;
704 M1: mesangial hypercellularity; RAS: renin angiotensin system; SBP: systolic blood pressure;
705 S1: Segmental glomerulosclerosis; SD: standard deviation; T1-T2: tubular atrophy/interstitial
706 fibrosis.
707

Table 2. Distribution of *CFH* haplotypes in IgAN patients compared to the reference panel.

CFH Haplotype	rs800292	rs1061170	rs3753396	rs106542235	Haplotypes frequency				
	c.184G>A, p.V62I	c.1204T>C, p.Y402H	c.2016A>G, p.G672G	c.2807G>T, p.E938D	Reference panel (n=503)	IgAN patients (n=259) [§]	OR [95% CI]	Adjusted p-value*	Global distribution p-value [‡]
H1	G	C	A	G	0.352	0.342	0.96 [0.76-1.20]	0.734	0.0495
H2	A	T	A	G	0.240	0.183	0.73 [0.56-0.95]	0.114	
H3	G	T	G	T	0.164	0.199	1.27 [0.96-1.67]	0.204	
H4	G	T	A	G	0.223	0.245	1.13 [0.89-1.45]	0.403	
H5	A	C	A	G	0.009	0.013	2.18 [0.89-5.25]	0.204	
Other <i>CFH</i> haplotypes					0.013	0.012	0.61 [0.26-1.54]	0.403	

A set of four single nucleotide polymorphisms (SNPs) were selected for *CFH* haplotypes imputation. The reference panel corresponds to the population of European descent from the 1000 Genomes Project Phase 3 (1kGe controls, n=503). All haplotypes with a frequency above 1% are displayed. The SNPs or association of SNPs exclusively found in these haplotypes are highlighted in red *Haplotypes frequencies are compared between IgAN patients and the reference panel with a Fisher's exact test with the calculation of odds ratio (OR) and IC95%. Benjamini-Hochberg procedure has been applied for multiple testing. § One IgAN patient did not meet the quality criteria for *CFH* haplotype imputation. ‡ The global distribution of *CFH* haplotypes was compared using a Chi-square-test between patients with IgAN and the reference panel, with a p-value <0.05 considered as statistically significant. *Abbreviations*: *CFH*: complement factor H gene; CI: confidence interval; IgAN: IgA nephropathy; OR: odds ratio; SNPs: single nucleotide polymorphisms.

Table 3. Study of CFH haplotypes in additive, dominant and recessive genetic models

CFH-Haplotype	Model						
	Additive		Dominant		Recessive		
	OR [95% CI]*	Adjusted p-value*	OR [95% CI]*	Adjusted p-value*	OR [95% CI]*	Adjusted p-value*	
H1	GCAG	1.05 [0.39-3.00]	0.918	0.53 [0.34-0.86]	0.068	1.29 [0.40-3.01]	0.495
H2	ATAG	0.88 [0.33-2.56]	0.869	0.52 [0.34-0.79]	0.034	1.10 [0.32-2.55]	0.869
H3	GTGT	1.47 [0.53-4.31]	0.703	0.95 [0.62-1.45]	0.869	2.78 [0.53-4.31]	0.167
H4	GTAG	1.24 [0.46-3.56]	0.869	0.78 [0.51-1.20]	0.494	1.68 [0.46-3.56]	0.388
H5	ACAG	2.42 [0.58-10.6]	0.495	1.58 [0.54-4.59]	0.654	2.56 [0.57-10.6]	0.259

The five CFH haplotypes with a frequency above 1% in either IgAN patients and in the reference panel were analyzed in additive, dominant and recessive models using logistic regression analysis with gender as a covariate. Benjamini-Hochberg procedure has been applied for multiple testing. The SNPs or association of SNPs exclusively found in these haplotypes are highlighted in red. *Abbreviations*: CFH: complement factor H gene; CI: confidence interval; IgAN: IgA nephropathy; SNPs: single nucleotide polymorphisms; OR: odds ratio.

Table 2. Distribution of MCP Haplotypes in IgAN patients and in the reference panel.

MCP Haplotype	rs2796267	rs2796268	rs1962149	rs859705	rs7144	Haplotypes frequency				
	-652A>G	-366A>G	IVS9 -78G>A	IVS12 +638G>A	c.4070T>C	Reference panel (n=1006)	IgAN patients (n=510) [§]	OR [95% CI]	Adjusted p-value*	Global distribution p-value [£]
MCP-H1	A	A	G	G	T	0.540	0.537	0.99 [0.80-1.23]	0.957	0.0380
MCP-H2	G	G	A	A	C	0.328	0.294	0.74 [0.60-0.93]	0.061	
MCP-H3	A	G	A	A	C	0.063	0.725	1.17 [0.77-1.79]	0.639	
MCP-H4	G	A	G	G	T	0.059	0.073	1.23 [0.81-1.90]	0.624	
	Other					0.010	0.029	2.20 [0.98-5.11]	0.251	

A set of five single nucleotide polymorphisms (SNPs) were selected for MCP haplotypes imputation. The reference panel corresponds to the population of European descent from the 1000 Genome Project Phase 3 (1kGe controls, n=503). All haplotypes with a frequency above 1% are displayed. Minor alleles found in these haplotypes are highlighted in red. *Haplotypes frequencies are compared between IgAN patients and the reference panel with a Fisher's exact test with the calculation of odds ratio (OR) and IC95%. Benjamini-Hochberg procedure has been applied for multiple testing. § five IgAN patients did not met the quality criteria for MCP haplotype imputation with the Michigan Imputation server. £ The global distribution of MCP haplotypes was compared using a Chi-square-test between patients with IgAN and the reference panel, with a p-value <0.05 considered as statistically significant. *Abbreviations*: CI: confidence interval; IgAN: IgA nephropathy; MCP: membrane cofactor protein; OR: odds ratio; SNPs: single nucleotide polymorphisms.

Table S6. Classification of rare non-synonymous variants (MAF<0.1%) in the six main complement genes in IgAN patients and in 1kGe

controls

Variant classification according to the ACMG ⁴⁰	5 genes (CFI, C3, MCP, CFB and CFHR5)				CFH gene	
	IgAN patients, n (%)	1kGe, n (%)	p-value*	IgAN patients, n (%)	1kGe, n (%)	p-value*
No variant	176 (89.3)	468 (93.0) ^f	0.121	248 (95.4)	494 (98.2)	0.034
≥1 rare Variant	21 (10.7)	35 (7.0)		12 (4.6)	9 (1.8)	
Likely pathogenic /Pathogenic	4 (2.3) [#]	5 (1.0)	0.278	4 (1.5)	1 (0.2)	0.049
Uncertain significance	17 (8.6) [#]	30 (6.0) ^{\$}	0.239	8 (3.1)	8 (1.6)	0.189

Rare non-synonymous variants in the six complement genes previously associated with complement-mediated diseases (*CFH*, *CFI*, *MCP*, *C3*, *CFB* and *CFHR5*) identified in IgAN patients and controls have been classified according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)⁴⁰. The frequencies of rare variants in the *MCP*, *CFI*, *C3*, *CFHR5* and *CFB* genes were calculated in the patients evaluated by next generation sequencing (n=197). The frequency of rare non-synonymous *CFH* variants were evaluated in the entire cohort (n=260). # One patient carries 2 VUS in the *CFHR5* gene, one other patient carries one VUS in the *C3* gene and one likely pathogenic *CFH* rare missense variant. \$ one donor carries 2 VUS on the *C3* gene. £ 5 donors carry two rare complement variants. *Chi-square test, a p-value <0.05 is considered as statistically significant. *Abbreviations*: 1kGe: 1000 Genomes Phase 3 population of European descent; ACMG: Variant classification according to the American College of Medical Genetics and Genomics; IgAN: IgA nephropathy; *MCP*: membrane cofactor protein gene, or *CD46*; VUS: variants of unknown significance.

Box1. Key messages

- 1. Activation of the complement system is a contributor to the severity and progression of IgA nephropathy (IgAN).**
- 2. Complement lectin and alternative pathways are key players in the pathogenesis of IgAN.**
- 3. In our French cohort of patients with IgAN:**
 - a) The *CFH*-H2 haplotype, protective against AMD and aHUS may be protective against IgAN susceptibility,
 - b) The prevalence of rare *CFH* variants (MAF<0.1%) was increased in patients compared to the reference panel,
 - c) Rare *CFH* variants were notably situated in FH regulatory domains.
- 4. *MCP ggaac* haplotype was an independent risk factor for developing ESRD at 15 years after diagnosis,**

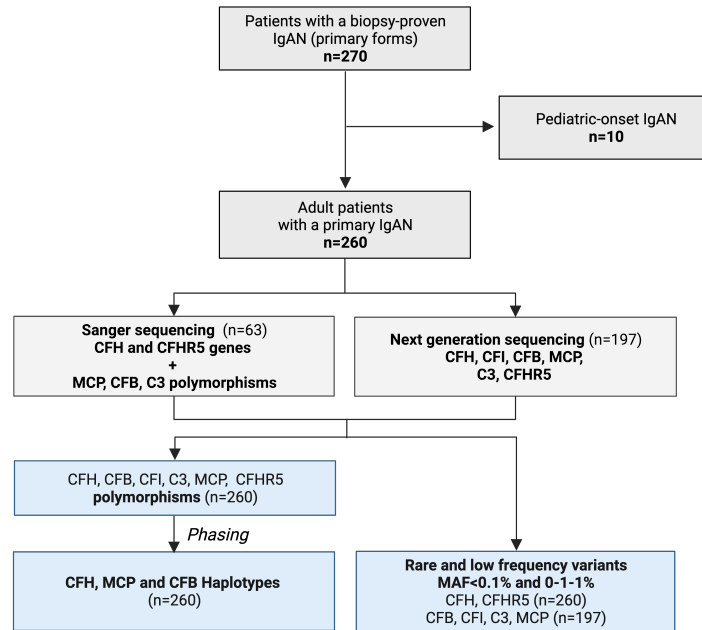


Figure 1.

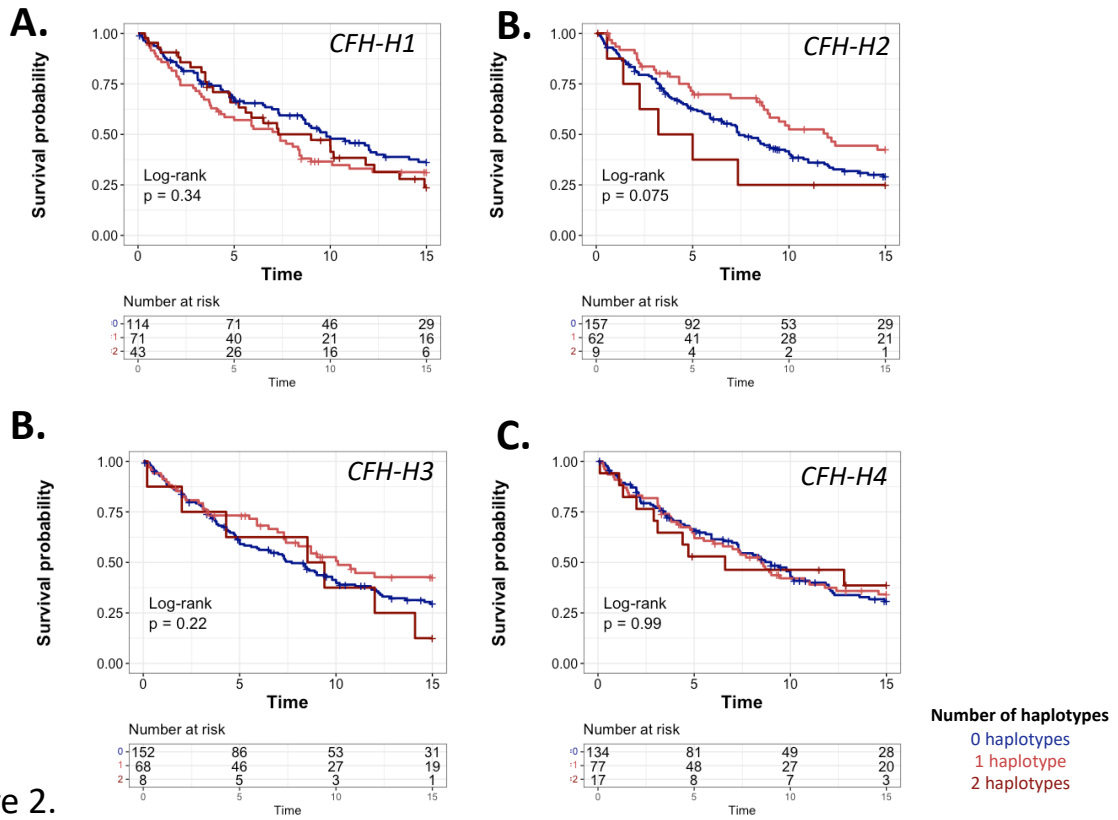


Figure 2.

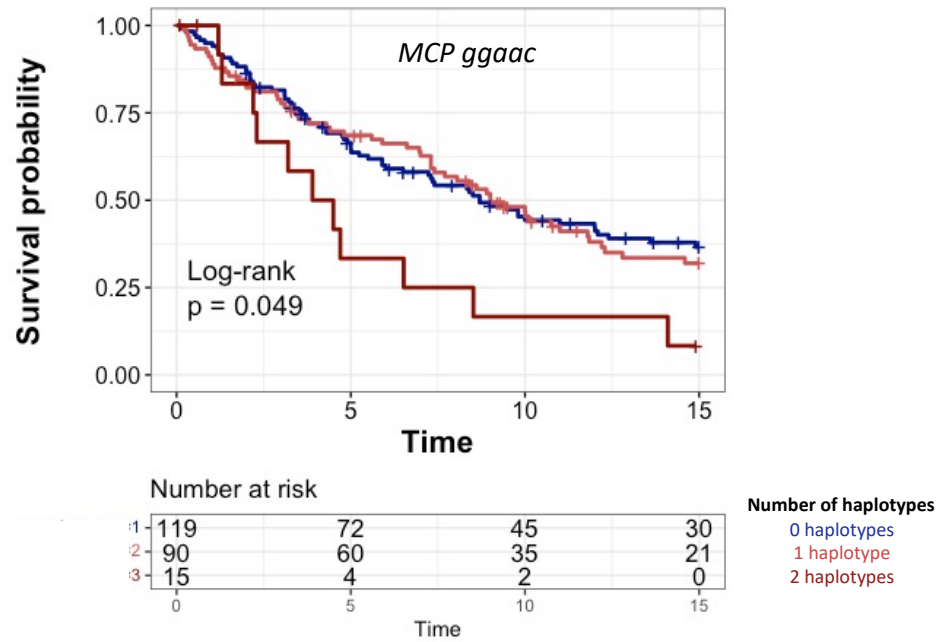


Figure 3.

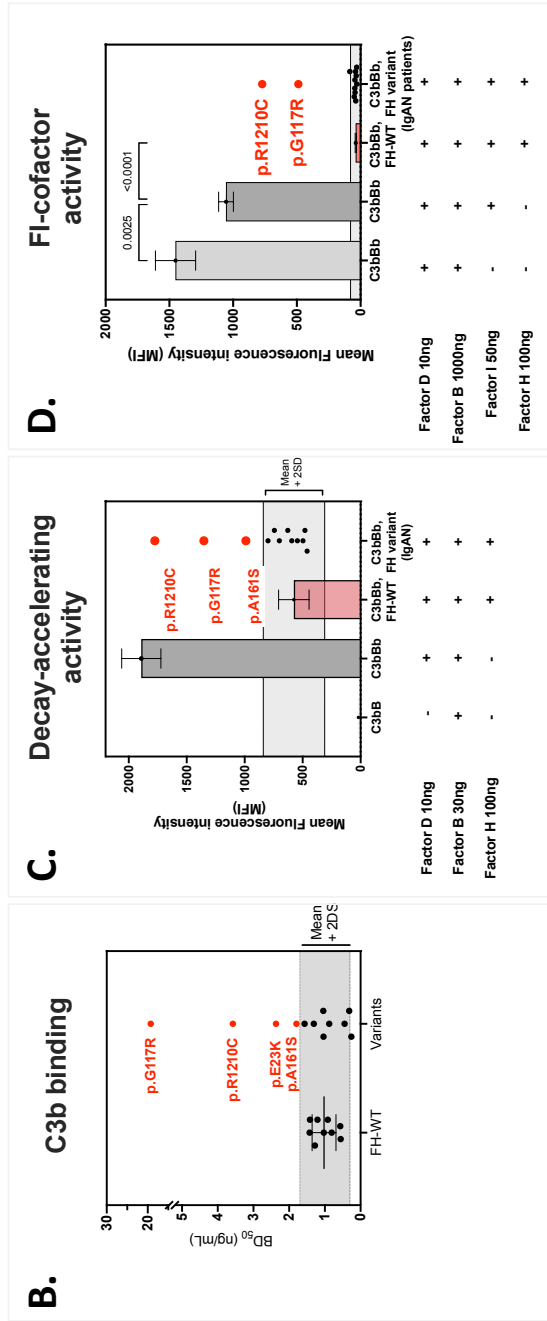
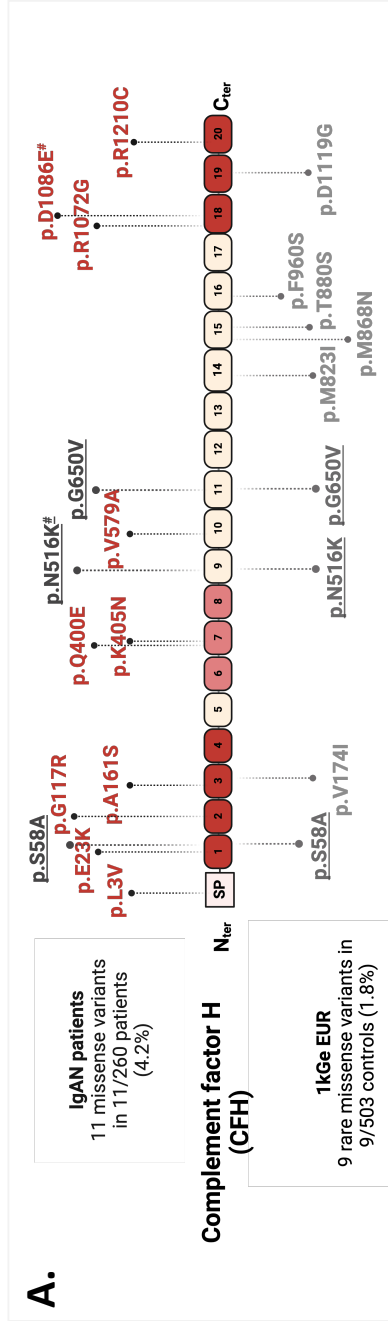


Figure 4.

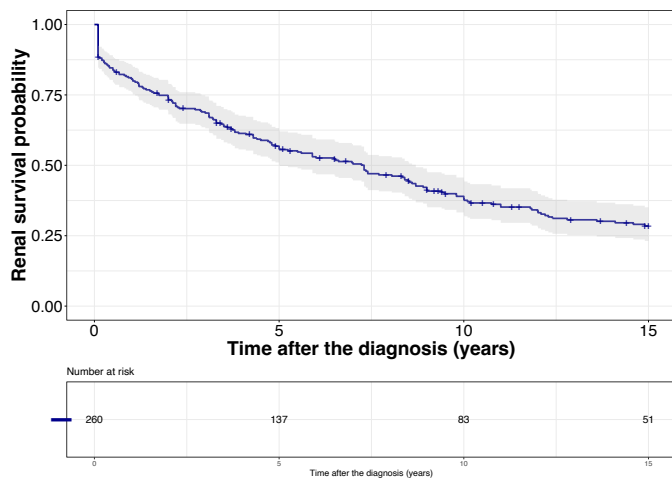
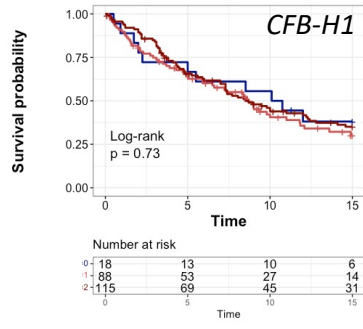
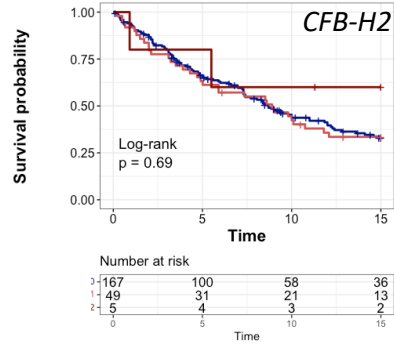


Figure S1. Time to end-stage renal disease (years) after the diagnosis in adult IgAN patients (n=260)

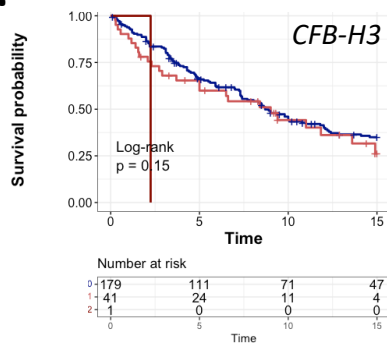
A.



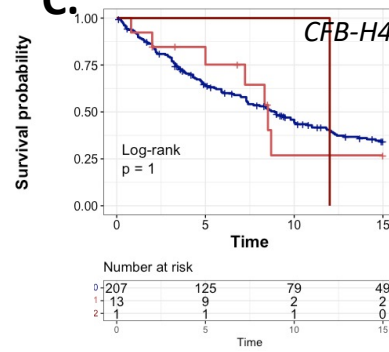
B.



B.



C.



Number of haplotypes
 0 haplotypes
 1 haplotype
 2 haplotypes

Figure 2.

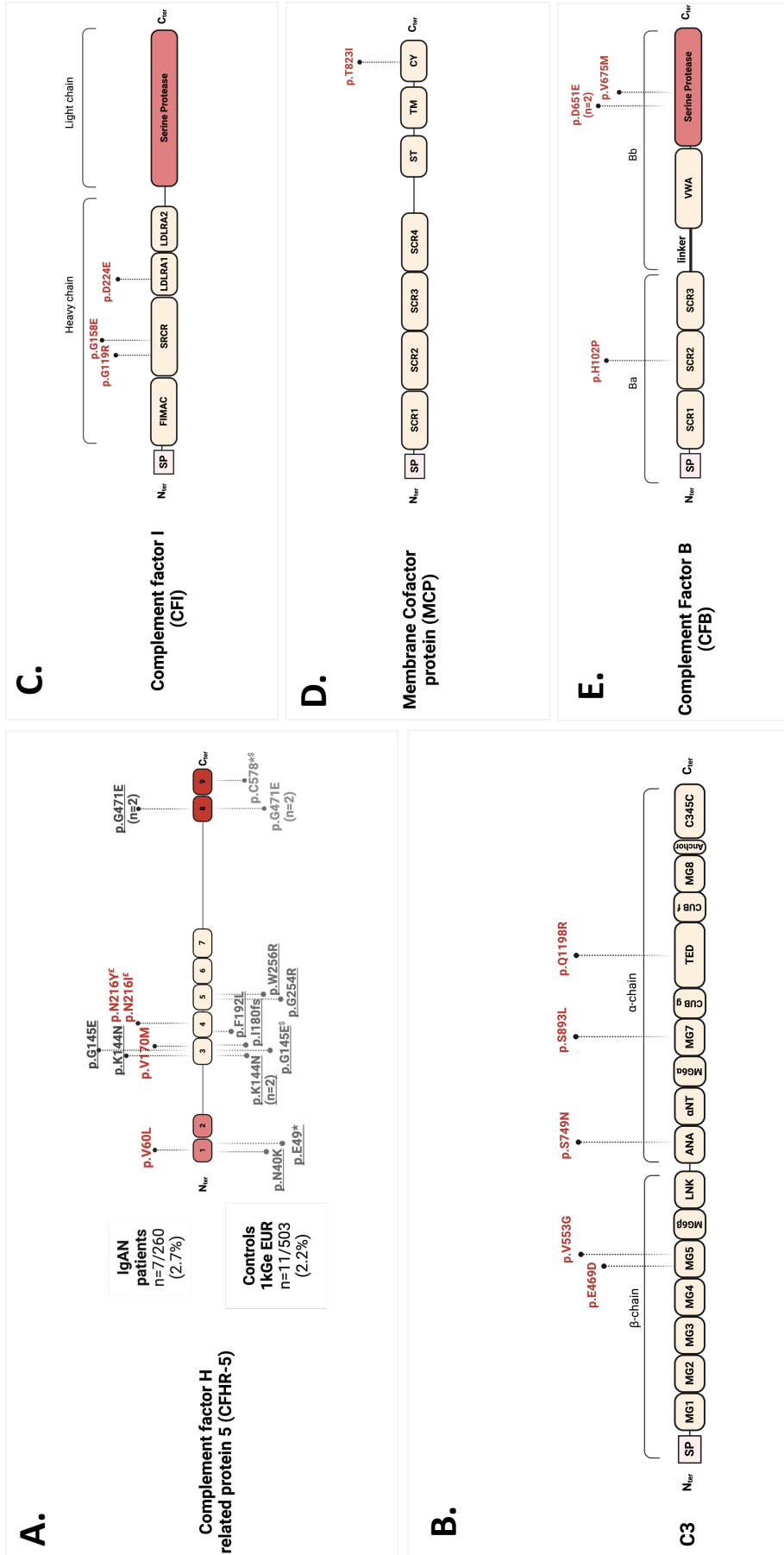


Figure S3.

1

1

2

Supplemental methods

3

4 **1. Full-length recombinant FH (rFH) production**

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

Codon-optimized DNA coding region of full-length C-terminal His-tagged FH (rFH-WT) was synthesized and cloned into a mammalian plasmid vector (pcDNA3.1(+) plasmid) purchased in GeneArt (division of Thermo Fisher Scientific, Regensburg, Germany). Site-directed mutagenesis was performed according to the manufacturers' instructions (site-directed Mutagenesis kit, Clone Tech®) to generate recombinant FH mutants (rFH). The mutagenesis was confirmed by Sanger sequencing. Plasmids were amplified in *Escherichia coli* (Clone Tech®), purified (Mini, Maxiprep kits, Ozyme®) and produced in Expi293™ system (ThermoFisher®). Supernatants were collected at day 6, immediately centrifuged at +4°C, sequentially filtered (from 5µm to 0.2µm) and stored at -80°C until purification. His-tagged rFH proteins were purified from supernatants with a His-Tag purification resin (cOmplete™ His-Tag Purification Resin, Roche®) at +4°C under native conditions following indicated procedure. Elution fractions (1mL) with the highest purity and amount of rFH estimated on SDS-Page 4-12% gel were pooled together and dialysed overnight in PBS-/- at +4°C. The concentration of rFH in supernatants, in elution fractions and in final products of purification was assessed by an "in-house" ELISA (protocol described in the following section). The purity and length of rFH final product was evaluated on SDS-PAGE 4-12% gel in non-reducing conditions with Coomassie Blue staining. Aliquots of each produced rFH protein are stored at -80°C until functional exploration. The amino-acid sequence of FH wild-type protein (rFH-WT) and the list of the mutants generated by site-directed mutagenesis are provided at the end of supplemental materials section (**Figure S1 and Table S15**).

1

1 2. Quantitative study of rFH variants (ELISA)

2 The rFH concentration in the final product of purification and supernatants was
3 measured by a “in house” ELISA. Briefly, 96-wells immuno plates (Thermo Scientific™
4 Nunc™) are coated with 50µL of 3.3µg/mL anti-FH polyclonal antibody (A312, Quidel) in
5 phosphate-buffered saline (PBS) -/- overnight at +4°C. After 1 hour blocking in 50µL PBS-
6 bovine-serum albumin (BSA) 1% at +37°C, plates are washed (3 x 150µL) in PBS-Tween 0.1%.
7 Supernatants from Expi293™ (collected at day 6) and rFH products are diluted 1:50,000 in
8 PBS-BSA 1% (final volume 50µl) and incubated 1 hour at +37°C. Standards are purified FH
9 (A137, CompTech®) diluted in PBS-BSA1% from 100 to 3.1 ng/mL final concentrations.
10 Blank control is 50 µL PBS-BSA 1%. All conditions are tested in duplicate. After incubation,
11 plates are washed in PBS-Tween 0.1% (3 x 300 µL/well), and incubated with 50 µL of “in
12 house” biotinylated anti-FH polyclonal antibody at 2 µg/mL (A312, Quidel) 1 hour at +37°C.
13 After washing, the antibody bound is made visible after 30 minutes incubation at +37°C with
14 Streptavidin (Agilent technologies) followed by 50 µl o-phenylenediamine dihydrochlorhyde
15 (OPD) diluted in 1X Substrate (Sigma Aldrich®). Colorimetric reaction is stopped with 25 µL
16 3N HCl and the optical densities (OD) are read immediately on a microplate reader at 490 nm.
17 Quantitative defect in rFH expression was defined as a concentration in Expi293™ supernatants
18 lower than the mean less two standard deviations (SD) from the reference rFH-WT
19 concentration in two independent rFH production experiments. The rFH level of production in
20 Expi293™ supernatant is presented in **Figure S6**.

21

22

1 3. Functional study of rFH variants

2

3 3.1. C3b binding assay (ELISA)

4 The capacity of each rFH variant to bind C3b is measured by a “in house” ELISA assay,
5 adapted from Martin Merinero, *et al.* (1). For this assay, 96-well immuno plates (Thermo
6 Scientific™ Nunc™) are coated with 50µL of 5µg/mL purified C3b (A114, CompTech®) in
7 PBS-/- or PBS-/- (uncoated plate) overnight at +4°C. After 1 hour blocking in Tris-NaCl-
8 Tween-BSA (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.2% Tween 20, 1% BSA) at room
9 temperature (RT), plates are washed (x3) in Tris-NaCl-Tween. Then, 100 µl of serial dilutions
10 of each rFH variant and rFH-WT in Tris-NaCl-Tween-BSA1% are incubated 1 hour at room
11 temperature (RT). Blank control is Tris-NaCl-Tween-BSA1% alone. Non-specific binding of
12 each rFH to ELISA plate is evaluated in non-C3b-coated wells. All conditions are tested in
13 triplicate in two independent experiments. After incubation, plates are washed in Tris-NaCl-
14 Tween (x3), and incubated with 50µL of 1.5µg/mL “in house” biotinylated anti-FH polyclonal
15 antibody (A312, Quidel) 1 hour at +37°C. After another washing step, the anti-FH bound
16 antibody is made visible after addition of streptavidin (Agilent technologies) and o-
17 phenylenediamine dihydrochlorhyde (OPD) (Sigma Aldrich®). Colorimetric reaction is
18 stopped with 25µL 3N HCl and the OD are read immediately on a microplate reader at 490 nm.
19 The relative amount of rFH needed to provide the same binding of 50 % immobilized C3b by
20 the rFH-WT protein (BD₅₀) is calculated for each variant. BD₅₀ value is considered as normal
21 between 0.30 and 1.70 ng/mL, corresponding to the mean BD₅₀ ± 2 standard deviations (SD)
22 of rFH-WT.

23

24

1 **3.2. C3bBb decay-accelerating activity (DAA) (Luminex® assay)**

2 The alternative C3 convertase (C3bBb) decay-accelerating activity (DAA) is assessed
3 using the Luminex® technology. Purified C3b (A114, CompTech®) is covalently coupled on
4 magnetic beads (Bio-Rad) according to the manufactures' procedure and stored at +4°C until
5 utilization. C3b-coated beads are resuspended, diluted in DGVB-Ni²⁺ (2.5% Dextrose, Veronal
6 Buffer saline 1X, 1% gelatine, 10mM Nickel) at final concentration of 8.10⁵ beads/mL, and
7 incubated 30 minutes at +37°C under agitation and opacity with 300 ng/mL of purified FB
8 (CompTech®) and 100 ng/mL of FD (CompTech®) for the formation of C3bBb convertases
9 on beads. The optimal concentration of FB needed for the formation of C3bBb convertases on
10 magnetic bead has been previously determined in an independent FB dose-response
11 experiment. C3b-coupled beads incubated with FB (without FD) corresponds to the C3bB
12 (proconvertase) control. After incubation, the beads are distributed in a 96-well plate (Thermo
13 Scientific™) (~4000 beads in 50µL / in each well), washed with GVB-EDTA (Veronal Buffer
14 saline 1X, 1% gelatine, 40mM ethylenediaminetetraacetic acid, 3x150µl on magnetic support)
15 to stop the formation of C3bBb convertases. After three wash steps with GVB-EDTA (3x150µl
16 on magnetic support), the beads are incubated with a biotinylated IgG anti-Bb neopeptide
17 (A712, Quidel®, 1:400) and streptavidin PE (L008432, Bio-Rad, 1:100) diluted in PBS-BSA
18 15' at RT and under agitation. Unbound secondary antibodies are eliminated by three other
19 washing steps in PBS-BSA-0.1% Tween and resuspended in 50µl PBS-BSA-0.1% Tween for
20 immediate lecture on the Luminex reader (Bio-Plex® 200 System, Bio-Rad). Results are
21 expressed in mean fluorescence intensity (MFI) which reflects the residual C3bBb convertases
22 that remain on the surface of the beads after the dissociation time. The positive condition is the
23 MFI from residual C3bBb dissociated spontaneously (without rFH, mean of triplicate wells).
24 The reference condition is the residual C3bBb convertases after dissociation with the rFH-WT
25 (triplicate conditions). Recombinant variants of FH (rFH) are considered pathogenic if their

1 DAA activity is reduced, corresponding to a residual C3bBb MFI above the mean + 2 SD of
2 the MFI from the reference condition (rFH-WT).

3

4 **3.3. FI-cofactor activity (Luminex® assay)**

5 Purified C3b (A114, CompTech®) is covalently coupled on magnetic beads (Bio-Rad)
6 according to the manufactures' procedure and stored at +4°C until utilization. C3b-coated beads
7 are resuspended, diluted in DGVB++ (2.5% Dextrose, Veronal Buffer saline 1X, 1% gelatine,
8 0.15 mM Ca²⁺, 0.5 mM Mg²⁺) at final concentration of 8.10⁵ beads/mL. After suspension, the
9 C3b coated beads are distributed in a 96-well plate (Thermo Scientific™) (~4000 beads in 50µL
10 / in each well) an incubated 30 min at +30°C under agitation and opacity with or without
11 purified FI (50 ng/well, A138, CompTech®) and/or rFH (100 ng/well) diluted in DGVB++.
12 During this incubation steps, the C3b coated on magnetic beads may be cleaved and inactivated
13 by the FI and the FH into iC3b. After incubation, the beads are washed in DGVB++ (3 x 150
14 µL/well) to stop the proteolytic cleavage of C3b by FI and FH. After washing, FB 1000ng and
15 FD 10ng diluted in DGVB++ are added in each well. C3bBb convertases are formed at 30'
16 during 30min under agitation. After incubation, the formation of C3bBb convertase is stopped
17 by the addition of GVB-EDTA, followed by three wash steps with GVB-EDTA (3 x 150 µl on
18 magnetic support). Finally, the beads are incubated with a biotinylated IgG anti-Bb neoepitope
19 (A712, Quidel®, 1:400) and streptavidin PE (L008432, Bio-Rad, 1:100) diluted in PBS-BSA
20 15' at RT and under agitation. Unbound secondary antibodies are eliminated by three other
21 washing steps in PBS-BSA-0.1% Tween and resuspended in 50µl PBS-BSA-0.1% Tween for
22 immediate lecture on the Luminex reader (Bio-Plex® 200 System, Bio-Rad). Results are
23 expressed in mean fluorescence intensity (MFI) which reflects the amount of C3bBb
24 convertases formed on the surface of the beads. The positive condition is represented by the
25 MFI resulting from the formation of C3bBb after preincubation with FI in the absence of rFH.

6

1 The reference condition is the amount of C3bBb convertases formed after preincubation with
2 FI and rFH-WT (triplicate conditions). Recombinant variants of FH (rFH) are considered
3 pathogenic if the amount of C3bBb formed after preincubation with FI and tested rFH is above
4 the mean + 2SD of the MFI from the reference condition (rFH-WT).

5

6 *4. FH plasmatic level in patients with IgAN*

7 FH plasmatic levels from patients carrying a rare CFH missense variant was measured by a
8 Multiplex ELISA (A900, Quidel Ortho®) on EDTA-plasma samples collected during patient follow-up
9 – when available – according to the manufacturers' instructions. Normal range (175 – 545 µg/mL) for
10 this assay has been previously validated in 124 healthy controls.

11

12 *Supplemental references:*

13 (1) Martín Merinero H, Zhang Y, Arjona E, *et al.* Functional characterization of 105 factor H
14 variants associated with aHUS: lessons for variant classification. *Blood.* 2021 Dec
15 2;138(22):2185-2201.

6

Supplemental materials

Supplemental figures:

Figure S1. Time to end-stage renal disease (years) after the diagnosis in adult patients with IgAN (n=260)

Figure S2. Time to end-stage renal disease after the diagnosis (years) in adult patients with IgAN according to the CFB haplotype (n=260)

Figure S3. Mapping of rare variants (MAF<0.1%) identified in CFB, CFI, MCP, C3 and CHF5 in patients with IgAN

Summary of *CFHR5* (Panel A), *C3* (Panel B), *CFI* (Panel C), *CFB* (Panel D), and *MCP* (Panel E) rare missense variants identified in IgAN patients (n=260 for *CFHR5* variants, n=197 for *C3*, *CFB*, *CFI* and *MCP* variants). Variants shared between IgAN patients and 1kGe controls are shown in grey. All variants of *CFI* were found within the heavy chain of FI, particularly in the SRCR domain (domain of interaction with C3b). *CFI* p.G119R and p.K73fs variants are associated with a quantitative FI defect and classified as potentially pathogenic. *Abbreviations*: 1kGe: 1000 Genomes Phase 3 population of European descent; ANA: anaphylatoxin domain, corresponding to C3a; *CFB*: complement factor B gene; CCP: complement control protein repeat; *CFI*: complement factor I gene; FI: factor I; IgAN: IgA nephropathy; LDLR: Low-Density Lipoprotein Receptor 1; MAF: minor allele frequency; MG: macroglobulin domain; SCR: short complement regulator domain; SP: signal peptide; SRCR: Scavenger Receptor Cysteine-Rich, TED: thioester containing domain, TM: transmembrane.

	Patients with pediatric-onset IgAN (n=10)
At diagnosis	
Male, n (%)	6 (60.0)
Age (year), median [IQR]	15.9 [12.0-17.0]
SBP (mmHg), median [IQR]	135 [127-142]
DBP (mmHg), median [IQR]	75 [67-82]
Hypertension, n (%)	6 (60.0)
Serum creatinine level ($\mu\text{mol/L}$), median [IQR]	115 [71.0-172]
eGFR (mL/min/1.73m^2), median [IQR]	90 [40.0-120.0]
Proteinuria (g/g), median [IQR]	2.4 [1.7-2.9]
Hematuria [§] , n (%)	4/5 (80.0)
RAS inhibitors, n (%)	5 (50.0)
Steroids, n (%)	4/8 (50.0)
ESRD, n (%)	10 (100)
Age at ESRD (years), median [IQR]	22.1 [19.2-40.2]
Delay after the diagnosis (years), median [IQR]	8.4 [3.0-23.5]
ESRD < 5 years after the diagnosis, n (%)	4 (40.0)
At first kidney transplantation (KT)	
First kidney transplantation, n (%)	10 (100)
Age at first (years), median [IQR]	23.3 [21.2-40.4]
Recurrence after transplantation, n (%)	8 (80.0)
Delay of recurrence (months), median [IQR]	112 [25 - 130]

Table S1. Clinical characteristics of patients with a pediatric-onset IgAN (n=10)

Data are medians (interquartile range) or percentages when indicated. [§]Microscopic or gross hematuria. *Abbreviations:* CKD: chronic kidney disease; DBP: diastolic blood pressure, eGFR: estimated glomerular filtration rate MDRD, ESRD: end stage renal disease, KT: kidney transplantation, IQR: interquartile range, RAS: renin angiotensin system inhibitors, SBP: systolic blood pressure.

Table S2. Characteristics at diagnosis and outcomes of patients with a pediatric-onset IgAN carrying a *CFH* rare missense variant

Patient	<i>CFH</i> Variant (MAF<0.1%)	Other variant (MAF<1%)	<i>CFHR1-R3</i> deletion	<i>CFH</i> -Haplotypes	<i>MCP</i> -Haplotypes	Age Sex (y/o)(M/F)	eGFR (mL/min/1.73m ²)	UPCR (g/g)	HU	Biopsy at diagnosis	Initial therapeutic strategy	ESRD	Delay ESRD or last FU (years)
SCT	P.D1086E (He)	No	No	H1:H2	agaac:agaac	11 M	N/A	N/A	N/A	N/A	CS	Yes	34.4
HUE	p.N516K (He)	No	No	H1:H3	aaggf:aaggf	17 M	30	1.5	Yes	15% glomerulosclerosis M1, E0, S1, T0, C0 IgA (3+), C3 (3+), C1q (0), IgG (3+), IgM (3+)	RAS	Yes	27

CFH rare variants (MAF<0.1%) identified in adults IgAN patients (n=260). No rare frameshift nor nonsense variant was found in IgAN patients. *Normal ranges shown in parenthesis corresponds to the mean concentration and/or mean fluorescence intensity of the reference rFH-WT protein. Abnormal values are presented in bold. BD₅₀ corresponds to the concentration fold of rFH mutant needed to reach similar binding to C3b compared to the reference rFH-WT. Further details on the experiments performed are given in the *Supplemental methods*. *Abbreviations*: 1kGe: 1000 Genome Phase 3 population of European descent; *CFH*: complement factor H; *CFHR1-R3*: complement factor H related proteins 1 and 3; CS: corticosteroids; CY: cyclophosphamide; eGFR: estimated glomerular filtration rate (mL/min/1.73m²); ESRD: end-stage renal disease; FU: follow-up, he: heterozygous; HU: hematuria; IgAN: IgA nephropathy; MAF: minor allele frequency; MEST-C: Oxford 2016 MEST-C score; MCP: membrane cofactor protein; M/F: male/female; RAS: renin-angiotensin system inhibitors; UPCR: urine protein-to-creatinine ratio (g/g) at diagnosis.

Table S3. Detailed complement rare and low frequency variants found in pediatric-onset IgAN patients (n=10)

Patient	rsID	Gene	Protein Domain	Transcript	Status	Protein	MAF GnomAD (%)	CADD score	PolyPhen-2 class (score)	SIFT (score)	Quantitative defect	<i>in vitro</i> functional studies	Previous disease association	ACMG Criteria	Proposed variant classification
HUE	rs147403664	CFH	SCR9	c.1546A>T	He	p.N516K	0.030	18.49	Probably damaging (1.000)	Damaging (0.02)	No	Conflicting results ^{*5, 37}	C3G ¹⁹ , AMD ^{19, 22} , aHUS ¹⁹ Reported in one case of IgAN with TMA ²³	PM1/2	VUS
SCT	novel	CFH	SCR18	c.3258T>A	He	p.D1086E	novel	0.009	Benign (0.00)	Tolerated (1.00)	No	No impact identified [*]	None	PM2	VUS
G235	rs145975787	CFH	SCR16	c.2867C>T	He	p.G956M	0.001704	14.99	Probably damaging (0.960)	Tolerated (0.38)	No	Yes, no impact identified ⁵	aHUS	-	VUS
G235, P94	rs117793540	C3	ANA β-chain	c.2203C>T	He	p.R735W	0.2551	22.6	Probably damaging (1.000)	Damaging (0.00)	No	None	aHUS ³⁴	-	VUS
P94	rs139017763	CFHR5	SCR5	c.832G>A	He	p.G278S	0.9796	23.1	Probably damaging (0.999)	Tolerated (0.14)	No ³⁰	None	Reported in cases with MPGN, DDD and C3G ^{26, 30}	-	VUS

Rare (MAF<0.1%) and low frequency (MAF0.1-1%) variants found in the 10 patients with a pediatric-onset IgAN. * Results or variant classification from the current study. *Abbreviations*: IkGe: 1000 Genome Phase 3 population of European descent; ACMG: Variant classification according to the American College of Medical Genetics and Genomics; aHUS: atypical Hemolytic and Uremic Syndrome; AMD: age-related macular degeneration; ANA: anaphylatoxin domain, corresponding to C3a; C3G: C3 glomerulonephritis; CFH: complement factor H gene; CADD: Combined Annotation Dependent Depletion; He: heterozygous; IgAN: IgA nephropathy; MAF: minor allele frequency; MPGN: membranoproliferative glomerulonephritis; PM: moderate evidence supporting the pathogenicity from a complement gene variant; Polyphen-2: Polymorphism Phenotyping version 2; rsID: variant identifier (rs number), SCR: short complement regulator domain; SIFT: Sorting Intolerant From Tolerant; TMA: thrombotic microangiopathy; VUS: variant of unknown significance.

1 **Table S4. Factors associated with ESRD at 15 years after the diagnosis**

2

Variables	Number in analysis	Univariate analysis			Multivariate analysis		
		HR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value*
Age at diagnosis (years)	260	1.00	[0.99-1.01]	0.389	0.98	[0.97-1.00]	0.058
Male sex	260	1.53	[1.01-2.33]	0.044	1.24	[0.68-2.29]	0.480
Hypertension	260	3.43	[2.16-5.43]	<0.001	0.93	[0.47-1.86]	0.844
eGFR at diagnosis (/5mL/min/1.73m ²)	260	0.76	[0.73-0.80]	<0.001	0.82	[0.76-0.89]	<0.001
Proteinuria (/1g/g)	260	1.31	[1.23-1.39]	<0.001	1.15	[1.03-1.29]	0.017
MEST-score at first biopsy							
Mesangial proliferation (M1)	167	2.39	[1.63-3.54]	<0.001	1.95	[1.24-3.08]	0.004
Endocapillary proliferation (E1)	167	1.36	[0.73-0.90]	0.147			
Segmental sclerosis (S1)	167	1.21	[0.83-1.86]	0.385			
Interstitial fibrosis (T1-T2)	167	2.92	[2.25-3.77]	<0.001	1.49	[1.01-2.20]	0.047
Crescents (C1-2)	167	1.90	[1.24-2.90]	0.003	1.00	[0.97-1.03]	0.997
Complement genetics							
<i>Polymorphisms and haplotypes</i>							
<i>CFH-H1</i>							
	0	129	1.00	--	--		
	1	84	1.40	[1.00-1.95]	0.051		
	2	126	1.15	[0.76-1.74]	0.517		
<i>CFH-H2</i>							
	0	175	1.00	--	--		
	1	73	0.73	[0.54-1.08]	0.130		
	2	11	1.28	[0.62-2.61]	0.505		
<i>CFH-H3</i>							
	0	169	1.00	--	--		
	1	79	0.81	[0.58-1.14]	0.234		
	2	2	1.38	[0.72-2.63]	0.329		
<i>CFH-H4</i>							
	0	184	1.00	--	--		
	1	63	0.81	[0.58-1.14]	0.234		
	2	12	1.38	[0.72-2.63]	0.329		
<i>rs7542235 (CFHR1-R3 deletion)</i>							
	AA	175	1.00	--	--		
	AG	69	1.19	[0.84-1.70]	0.325		
	GG	15	0.91	[0.42-1.95]	0.809		
<i>MCP ggaac haplotype</i>							
	0	128	1.00	--	--	1.00	--
	1	104	1.16	[0.84-1.61]	0.325	1.01	[0.84-1.61]
	2	24	2.85	[1.73-4.67]	<0.001	2.83	[1.20-6.68]
<i>rs2230199 (C3 p.R102G)</i>							
	CC	167	1.00	--	--		
	GC	82	1.17	[0.85-1.62]	0.335		
	GG	11	1.63	[0.82-3.21]	0.161		
<i>Rare variants (MAF <0.1%)</i>							
Rare missense CFH variant (MAF<0.1%)		260	1.08	[0.56-2.1]	0.789		
Rare variant (MAF<0.1%) in the 5 other complement genes		197	1.11	[0.68-1.80]	0.679		

3

4 *Abbreviations:* DBP: diastolic blood pressure, eGFR: estimated glomerular filtration rate
5 according to the MDRD formula, ESRD: end stage renal disease; RAS: renin angiotensin
6 system inhibitors, SBP: systolic blood pressure.

7

8

1 **Table S5. Hardy Weinberg equilibrium of studied polymorphisms in the *CFH*, *CFB*, *C3* and *MCP* genes in IgAN patients (n=260)**

2

Gene	rsID	Allele a/b	MAF	a/a n (%)	a/b n (%)	b/b n (%)	HWE p-value*
<i>CFH</i>	rs800292	G/A	0.210	164 (64.3)	75 (29.4)	16 (6.3)	0.44
	rs1061170	T/C	0.369	118 (46.3)	86 (33.7)	51 (20.0)	0.01
	rs3753396	A/G	0.209	157 (63.1)	80 (32.1)	12 (4.8)	0.96
	rs1065489	G/T	0.212	161 (62.6)	83 (32.3)	13 (5.1)	0.85
<i>Intergenic</i>	rs7542235 [§]	A/G	0.192	175 (67.3)	70 (26.9)	15 (5.8)	0.39
	rs2796267	A/G	0.390	95 (39.6)	103 (42.9)	42 (17.5)	0.59
<i>MCP</i>	rs2796268	A/G	0.370	93 (38.4)	119 (49.2)	30 (12.4)	0.84
	rs1962149	G/A	0.380	94 (37.6)	122 (48.8)	34 (13.6)	0.93
<i>MCP</i>	rs859705	G/A	0.382	97 (38.0)	121 (47.5)	37 (14.5)	>0.99
	rs7144	T/C	0.375	94 (37.9)	122 (49.2)	32 (12.9)	0.85
<i>CFB</i>	rs4151667	T/A	0.037	227 (89.4)	15 (5.9)	2 (0.79)	0.33
	rs12614	C/T	0.122	197 (77.5)	52 (20.5)	5 (1.97)	0.26
<i>CFB</i>	rs641153	G/A	0.112	198 (78.0)	55 (21.7)	1 (0.39)	0.56
	rs2230199	C/G	0.200	167 (64.2)	82 (31.5)	11 (4.2)	0.97

3 *The Hardy Weinberg equilibrium (HWE) analyses for each single nucleotide polymorphism were calculated by a Chi-square test. A p-value >
4 1.10⁻³ is considered as consistent with HWE in this population of cases. § The SNP rs7542235-G is in linkage disequilibrium with the *CFHR1*-
5 *CFHR3* deletion. *Abbreviations*: a: major allele; b: minor allele; *CFB*: complement factor B; *CFH*: complement factor H gene; HWE: Hardy
6 Weinberg equilibrium; MAF: minor allele frequency, SNP: single nucleotide polymorphism.

1
2
3
4Table S6. *CFB* haplotypes distribution in IgAN patients and in the reference panel.

<i>CFB</i> Haplotype	rs4151667	rs12614	rs641153	Haplotypes frequency					
	c.26T>A p.L9H	c.94C>T p.R32W	c.95G>A p.R32Q	Reference panel (n=1006)	IgAN patients (n=520)	OR [95% CI]	p- value*	Adjusted p-value*	Global distribution p-value [£]
<i>CFB</i> -H1	T	C	G	0.734	0.727	0.98 [0.76- 1.23]	0.806	0.806	0.400
<i>CFB</i> -H2	T	T	G	0.133	0.125	0.93 [0.67- 1.28]	0.686	0.806	
<i>CFB</i> -H3	T	C	A	0.086	0.111	1.32 [0.92- 1.87]	0.137	0.548	
<i>CFB</i> -H4	A	C	G	0.047	0.038	0.80 [0.47- 1.35]	0.505	0.806	

5

6 The reference panel corresponds to the population of European descent from the 1000 Genomes
7 Project Phase 3 (1kGe controls, n=503). Minor alleles exclusively found in these haplotypes
8 are highlighted in red. *Haplotypes frequencies are compared between IgAN patients and the
9 reference panel with a Fisher's exact test with the calculation of odds ratio (OR) and IC95%.
10 Benjamini-Hochberg procedure has been applied for multiple testing. £ The global distribution
11 of *CFB* haplotypes was compared using a Chi-square-test between patients with IgAN and the
12 reference panel, with a p-value <0.05 considered as statistically significant. *Abbreviations:*
13 *CFB*: complement factor B gene; H: haplotype; minor allele frequency; rsID: variant identifier
14 (rs number).

15
16
17

1 **Table S7. Missense, frameshift or splice-site variants in the complement genes in the IgAN cohort (n=260) and in the reference panel**
 2 **(n=503)**

Gene	Non synonymous variants			Pathogenic or Likely pathogenic		
	MAF (%)	IgAN patients, n (%)	p-value	IgAN patients, n (%)	1kGe controls, n (%)	p-value
CFH	<1	18/260 ³ (6.9)	0.047	4/260 (1.5)	1/503 (0.2)	0.049
	<0.1	12/260 (4.6)	0.034			
	<1	11/197 (5.6)	0.302			
CFI	<0.1	4/197 (2.0)	0.746	2 (0.8)	1/503 (0.2)	0.193
	<1	13/197 (6.6)	0.108			
CFB	<0.1	4/197 (2.0)	0.278	0/197 (0)	0/503 (0)	--
	<1	7/197 (3.6)	>0.99			
	<0.1	5/197 (2.5)	>0.99	0/197 (0)	0/503 (0)	--
C3	<1	1/197 (0.5)	>0.99			
	<0.1	1/197 (0.5)	>0.99	0/ (0)	1/503 (0.2)	--
	<1	18/260 (6.9)	0.406	1/260 (0.4)	13/503 (2.6)	0.006
MCP (CD46)	Frame-shift or nonsense variant	0/260 (0)				
	Missense variant	18/260 (6.9)	0.013			
	< 0.1	7/260 (2.7)	0.802	1/260 (0.4)	3/503 (0.6)	>0.99
CFHR5	Frame-shift or nonsense variant	0/260 (0)				
	Missense variant	7/260 (2.7)	0.263			
	< 0.1	9/503 (1.8)				

4 Frequency of non-synonymous variants (MAF<0.1% and <1%) in the six complement genes identified in IgAN patients (n=260 for CFH and
 5 CFHR5 genes, n=197 for CFB, CFI, MCP, C3 genes) and in the reference population (1000 Genome Phase 3 population of European descent,
 6 n=503). Complement variants are considered as pathogenic if they meet at least one of the following criteria: i) functional *in vitro* study proving
 7 the functional impairment of the final protein, ii) variant associated with a quantitative defect, iii) predicted as potentially damaging *in silico*,
 8 defined as a CADD PHRED C-score > 15. Variant frequencies are compared with a fisher exact test.* One 1kGe donor has two heterozygous rare
 9 variants in the CFHR5 gene: one nonsense variant (p.C568*) and one missense variant (p.G145E). \$ 48 variants with MAF <1% were found in 44
 10 1kGe donors: one donor carry one homozygous frame-shift variant (p.E153fs), two donors carry one frame-shift variant and one missense variant,
 11 one donor carry one nonsense variant and one missense variant. *Abbreviations:* 1kGe: 1000 Genome Project Phase 3 population of European
 12 descent; CFB: complement factor B gene; CFH: complement factor H gene; CFHR5: complement factor H related protein 5 gene; CFI: complement
 13 factor I gene; IgAN: IgA nephropathy; MAF: minor allele frequency; MCP: membrane cofactor protein (CD46).

14

Table S8. Detailed complement rare variants (MAF<0.1%) found in IgAN patients

Patient	rsID	Gene	Protein Domain	Transcript	Status	Protein	MAF GnomAD*(%)	CAD score	PolyPhen-2 class (score)	SIFT (score)	Quantitative defect	<i>in vitro</i> functional studies	Previous disease association	ACMG Criteria	Proposed variant classification
R47	rs139254423	CFH	SP	c.7C>G	He	p.L3V	0.024	11.46	Probably damaging (0.91)	Tolerated (0.06)	No	No impact identified*1,2	PE ² , AMD ^{1,19,22}	PM2	VUS
D246	rs774019952	CFH	Splice-site	c.59-4G>T	He	--	<0.0001	0.030	N/A	N/A	N/A	None	None	PM2	VUS
B126	rs764932801	CFH	SCR1	c.67G>A	He	p.E23K	0.0004	15.79	Benign (0.102)	Tolerated (0.07)	No	Minor impact*	None	PM1/2, PS3	Likely pathogenic
HOT	rs141336681	CFH	SCR1	c.172T>G	He	p.S58A	0.014	19.03	Benign (0.065)	Damaging (0.04)	No	Conflicting results*1,19	C3G ¹⁹ , AMD ^{19,22} , aHUS ¹⁹	PM1/2	VUS
BOS	novel	CFH	SCR2	c.349G>A	He	p.G117R	novel	32	Probably damaging (1.000)	Damaging (0.02)	Yes*	Pathogenic*	None	PM1/2, PS3	Pathogenic
L248	rs777300338	CFH	SCR3	c.481G>T	He	p.A161S	0.0092	10.07	Benign (0.09)	Tolerated (0.17)	No	Minor impact*3-5	AMD ¹⁸ , aHUS ¹⁹	PM1/2, PS3	Likely pathogenic
C197	novel	CFH	SCR7	c.1198C>G	He	p.Q400E	novel	0.002	Benign (0.001)	Tolerated (0.73)	No	No impact identified*	None	PM1/2	VUS
J75	rs199705026	CFH	SCR7	c.1215G>T	He	p.K405N	0.0004	0.003	Benign (0.006)	Tolerated (0.12)	No	No impact identified*	AMD ²¹ ,	PM1/2	VUS
L126	rs201411537	CFH	SCR10	c.1736T>C	He	p.V579A	0.011	0.626	Benign (0.351)	Tolerated (0.2)	No	None	None	PM1/2	VUS
P439	rs143237092	CFH	SCR11	c.1949G>T	He	p.G650V	0.02	0.184	Benign (0.174)	Tolerated (0.2)	No	No impact identified*1,5	C3G ¹⁹ , AMD ^{19,22} , aHUS ¹⁹	PM1/2	VUS
P218	rs763248314	CFH	SCR18	c.3214A>G	He	p.R1072G	0.0025	20.7	Probably damaging (0.99)	Tolerated (0.12)	No	No impact identified*	None	PM2	VUS
P31	rs121913059	CFH	SCR20	c.3628C>T	He	p.R1210C	0.015	0.181	Benign (0.02)	Tolerated (0.05)	No*	Pathogenic*1,8,37	C3G ¹⁹ , AMD ^{18,19,20,22} , aHUS ¹⁹	PS3/4, PM1/2	Pathogenic
P377	rs1560546604	CFI	FIMAC, heavy chain	c.111delA	He	p.K37fs	<0.0001	N/A	N/A	N/A	Yes	None	None	PM1/2, PVS1	Pathogenic
VAS	rs141853578	CFI	SRCR, heavy chain	c.355G>A	He	p.G119R	0.08519	23	Probably damaging (0.977)	Tolerated (0.14)	Yes ^{10,11,12,25,26}	Pathogenic ¹⁴	C3G ¹² , AMD ^{10,11,13,14,15,22} , aHUS ^{16,17}	PS3	Pathogenic
S264	novel	CFI	SRCR, heavy chain	c.473G>A	He	p.G158E	novel	3.644	Probably damaging (0.977)	Damaging (0.000)	No ^{#12}	None	None	PM2/5	VUS

B148	novel	CFI	LDLRA1, heavy chain	c.672T>A	He	p.D224E	novel	0.038	(1,000) Benign (0.000)	Tolerated (0.81)	N/A	None	None	PM2	VUS
D31	rs77856679 3	CFB	Serine protease (Bb)	c.2023G> A	He	p.V675M	0.001548	27.1	Probably damagin g (0.878)	Damagin g (0.00)	N/A	None	None	PM1/2	VUS
B124 D246	rs4151660	CFB	Serine protease (Bb)	c.1953T> G	He	p.D651E	<0.0001	0.096	Benign (0.000)	Tolerated (0.44)	N/A	None	None	PM1/2	VUS
D223	novel	CFB	SCR2 (Ba)	c.305A>C	He	p.H102P	novel	5.902	Possibly damagin g (0.581)	Damagin g (0.02)	N/A	Possible Jc3b binding ^{24,25}	None	PM2	VUS
L248	rs11569422	C3	MG5 β-chain	c.1407G> C	He	p.E469D	0.02090	0.008	Benign (0.000)	Tolerated (0.77)	N/A	None	None	PM2	VUS
MIS	novel	C3	MG5 β-chain	c.1658T> G	He	p.V553G	novel	25.0	Probably damagin g (1.000)	Damagin g (0.00)	N/A	None	None	PM2	VUS
A128	novel	C3	ANA β-chain	c.2246G> A	He	p.S749N	novel	25.3	Benign (0.047)	Tolerated (0.16)	N/A	None	None	PM2	VUS
J75	rs74550398 0	C3	MG7 α-chain	c.2678C> T	He	p.S893L	0.006492	25.6	Probably damagin g (1.000)	Damagin g (0.01)	N/A	None	None	PM2	VUS
D345	rs37297641 9	C3	TED (C3d) α-chain	c.3593A> G	He	p.Q1198 R	<0.0001	7.687	Probably damagin g (0.789)	Tolerated (0.86)	N/A	None	None	PM2	VUS
S135	rs14680376 7	MCP (CD46)	CY (Cytosolic part)	c.1148C> T	He	p.T383I	0.09917	5.315	Benign (0.001)	Damagin g (0.03)	N/A	None	None	PM2	VUS
J63	rs37064185 6	CFHR 5	SCR1 Dimerizati on domain	c.178G>C	He	p.V60L	0.004396	7.037	Benign (0.044)	Tolerated (0.27)	N/A	None	None	PM1/2	VUS
DOE	rs20107345 7	CFHR 5	SCR3 Binding to ECM, C3b	c.508G>A	He	p.V170M	0.008535	22.5	Probably damagin g (0.999)	Damagin g (0.01)	N/A	Yes, Jc3b binding ^{31,32}	Reported in cases with aHUS and IgAN ⁴⁶	PM1/2 PS3	Likely pathogenic
R15	rs18151132 7	CFHR 5	SCR3 Binding to ECM, C3b	c.432A>T	He	p.K144N	0.09829	7.309	Benign (0.058)	Damagin g (0.00)	No ³⁰	None	Reported in cases with MPGN and C3G ²⁸	PM1/2	VUS
C512	rs57960694	CFHR 5	SCR3	c.434G>A	He	p.G145E	0.09514	0.001	Benign (0.007)	Tolerated (1.00)	N/A	None	Reported in one patient with IgAN ³²	PM1/2	VUS
J38	rs13883414 5	CFHR 5	SCR4	c.646A>T	He	p.N216Y	0.01862	20.5	Probably damagin g (0.927)	Damagin g (0.04)	N/A	None	None	PM1/2	VUS

J38	rs14748826 7	CFHR 5	SCR4	c.647A>T	He	p.N216I	0.01862	15.30	Probably damagin g (1,000)	N/A	None	None	PM1/2	VUS
C369, D29	rs14443820 0	CFHR 5	SCR8	c.1412G> A	He	p.G471E	0.09759	19.23	Probably damagin g (0,975)	N/A	None	None	PM1/2	VUS

Complement rare missense, nonsense and frameshift variants (MAF<0.1%) identified in IgAN patients (n=260) among complement genes.

* Results of variant classification from the current study. # Novel missense change at an amino acid residue where a different missense change determined to be pathogenic has been previously identified (CFH p.G158R). *Abbreviations*: 1kGe: 1000 Genome Phase 3 population of European descent; ACMG: Variant classification according to the American College of Medical Genetics and Genomics; aHUS: atypical Hemolytic and Uremic Syndrome; AMD: age-related macular degeneration; ANA: anaphylatoxin domain, corresponding to C3a; C3G: C3 glomerulonephritis, complement factor B gene; CFH: complement factor H gene, CFHR1-R3; complement factor H related protein 1 and 3 genes, CFI: complement factor I gene; CADD: Combined Annotation Dependent Depletion, CUB: C1r/C1s, Uegf, Bmp1' domain; ECM: extracellular matrix; He: heterozygous; IgAN: IgA nephropathy, LDLR: Low-Density Lipoprotein Receptor class A1; MAF: minor allele frequency; MG: macroglobulin domain; MPGN: membranoproliferative glomerulonephritis; PE: preeclampsia; PM/S: moderate/strong evidence supporting the pathogenicity from a complement gene variant; Polyphen-2: Polymorphism Phenotyping version 2; rsID: variant identifier (rs number), SCR: short complement regulator domain; SIFT: Sorting Intolerant From Tolerant; SP: signal peptide; SRCR: Scavenger Receptor Cysteine-Rich; TED: thioester containing domain; TMA: thrombotic microangiopathy; VUS: variant of unknown significance.

Table S9. Detailed low frequency variants (MAF 0.1-1%) found in adult IgAN patients

Patient (total number)	rsID	Gene	Protein Domain	Transcript	Status	Protein	MAF GnomAD*(%)	CADD score	PolyPhen-2 class (score)	SIFT (score)	Quantitative defect	<i>in vitro</i> functional studies	Previous disease association	ACMG Criteria	Variant classification
MEF, C512, BAS, OUL, OUH (n=5)	rs5152299*	CFH	SCR15	c.2669G>T	He	p.S890I	0.1412	7.147	Benign (0.012)	Tolerated (0.08)	No	Yes, no impact identified ³⁵	AMD, DDD, aHUS	--	VUS
MEF, C512, BAS, OUL, OUH (n=5)	rs5343399*	CFH	SCR17	c.3019G>T	He	p.V1007L	0.1526	3.345	Benign (0.000)	Tolerated (1.00)	No	Yes, no impact identified ³⁵	AMD, DDD, aHUS	PM1	VUS
STA	rs149474608	CFH	SCR16	c.2850G>T	He	p.Q850H	0.5979	14.24	Probably Damaging (0.809)	Damaging (0.00)	No	Yes, conflicting results ^{5,9,36}	aHUS	--	VUS
J75	rs145975787	CFH	SCR16	c.2867C>T	He	p.G956M	0.1704	14.99	Probably damaging (0.960)	Tolerated (0.38)	No	Yes, no impact identified ⁴⁵	aHUS	--	VUS
P439 (He) S135 (Ho) (n=2)	rs112534524	CFI	SRCR Heavy chain	c.782G>A	He (1) Ho (1)	p.G261D	0.1920	12.9	Benign (0.075)	Tolerated (0.14)	No ^{10,25,26,27}	Yes, no impact identified ^{25,26,28,38}	AMD ²⁵ , aHUS ³⁸	--	VUS
S135 (n=1)	rs74817407	CFI	Serine protease Light chain	c.1217G>A	He	p.R406H	0.1333	9.029	Probably damaging (0.877)	Damaging (0.00)	No ^{10,25,26,27}	Yes, conflicting results ^{25,26,27,33}	aHUS ³³ , AMD ^{25,26}	PM1	VUS
JOM, LED, B501 (n=2)	rs41278047	CFI	Serine protease Light chain	c.1322A>G	He	p.K441R	0.2369	0.047	Benign (0.007)	Tolerated (0.82)	No ^{10,25,26,27}	Yes, no impact identified ^{25,26,27}	AMD ^{25,26}	PM1	VUS
D328, ROV (n=2)	rs113460688	CFI	Serine protease Light chain	c.1657C>T	He	p.P553S	0.2675	17.56	Benign (0.254)	Tolerated (0.52)	No ^{10,25,26,27}	Yes, no impact identified ^{25,26,27,33}	aHUS ³³ , AMD ^{25,26}	PM1	VUS
H27, B151, B195, B247, C3, C463, N45, P64, S265, C188 (n=10)	rs45484591	CFB	Serine protease (Bb)	c.1697A>C	He	p.E566A	0.9747	1.127	Benign (0.0)	Tolerated (0.96)	No ²⁹	Yes, minor impact (C3b deposition on activated HUVEC) ²⁹	Reported in cases with aHUS ²⁹	PM1	VUS
D328, D266 (n=2)	rs117793540	C3	ANA β-chain	c.2203C>T	He	p.R735W	0.2551	22.6	Probably damaging (1.000)	Damaging (0.00)	No	None	aHUS ³⁴	--	VUS
TAR, D236, A128, G312, HEN, B632 (n=6)	rs12097550	CFHR5	SCR1	c.136C>T	He	p.P46S	0.6271	0.007	Benign (0.044)	Damaging (0.00)	No ³⁰	None	Reported in cases with MPGN, DDD and C3G ^{29,30}	PM1	VUS
P218, D53, P454, R73, D266 (n=5)	rs139017763	CFHR5	SCR5	c.832G>A	He	p.G278S	0.9796	23.1	Probably damaging (0.999)	Tolerated (0.14)	No ³⁰	None	Reported in cases with MPGN, DDD and C3G ^{29,30}	--	VUS

Complement missense, nonsense and frameshift variants (MAF 0.1-1%) identified in adults IgAN patients (n=260) in the 5 studied complement genes. *The CFH p.S890I and CFH p.V1007L variants are found associated. These segregated variants are found with a MAF 2-3% in sub-Saharan African and African-American populations and are probably benign. *Abbreviations*: kGe: 1000 Genome Phase 3 population of European descent;

ACMG: Variant classification according to the American College of Medical Genetics and Genomics; aHUS: atypical Hemolytic and Uremic Syndrome; AMD: age-related macular degeneration; ANA: anaphylatoxin domain, corresponding to C3a; C3G: C3 glomerulonephritis, CFB: complement factor B gene; CCP: complement control protein repeat; CFH: complement factor H gene, CFI: complement factor I gene; CADD: Combined Annotation Dependent Depletion, DDD: dense deposits disease; He: heterozygous; Ho: homozygous; IgAN: IgA nephropathy; HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells; LDLR: Low-Density Lipoprotein Receptor 1; MAF: minor allele frequency; MG: macroglobulin domain; MPGN: membranoproliferative glomerulonephritis; Polyphen-2: PM/S: moderate/strong evidence supporting the pathogenicity from a complement gene variant; Polymorphism Phenotyping version 2; rsID: variant identifier (rs number); SCR: short complement regulator domain; SIFT: Sorting Intolerant From Tolerant; SP: signal peptide; SRCR: Scavenger Receptor Cysteine-Rich, TED: thioester containing domain; TMA: thrombotic microangiopathy; VUS: variant of unknown significance.

Table S10. Characteristics at diagnosis and outcomes of adult IgAN patients carrying a rare missense or splice-site CFH variant (n=12)

Patient	CFH Variant (MAF<0.1%)	Other variant (MAF<1%)	CFHR1-R3 deletion	CFH Haplotypes	MCP ggaac haplotypes	Age (yo)	Sex (M/F)	eGFR (mL/min/1.73m ²)	UPCR (g/g)	HU	Biopsy at diagnosis	Initial therapeutic strategy	ESRD	Delay ESRD or last FU (years)
R47	p.L3V (He)	No	No	H3:H4	No	65	M	25	N/A	N/A/M0, E0, S0, T1, C0	18% glomerulosclerosis IgA (1+), C3 (1+), C1q (0), IgG (0), IgM (0.5+)	RAS, CS	Yes	8.7
B126	p.E23K (He)	No	He	H3:H4	No	49	F	21	5.0	No Mx, Ex, Sx, Tx, C1	50% glomerulosclerosis IgA (1+), C3 (1+), C1q (0), IgG (0), IgM (0.5+)	CY, CS, RAS	Yes	5.5
HOT	p.S58A (He)	No	No	H1:H3	He	42	M	20	N/A	N/A	N/A	RAS	Yes	1.8
BOS	p.G117R (He)	No	He	H2:H4	He	48	F	60	2.1	Yes M1, E1, S1, T0, C1	0% glomerulosclerosis IgA (2+), C3 (2+), C1q (0), IgG (0), IgM (1+)	RAS	Yes	14.5
L248	p.A161S (He)	C3 p.E469D (He)	No	H1:H2	No	46	M	26	2.8	Yes M0, E0, S1, T2, C0	50% glomerulosclerosis IgA (1+), C3 (1+), C1q (1+), IgG (0), IgM (0.5+)	N/A	Yes	4.2
C197	p.Q400E (He)	No	No	H1:H3	He	59	M	51	0.2	N/A/M0, E0, S0, T0, C0	9% glomerulosclerosis IgA (2+), C3 (2+), C1q (0), IgG (0), IgM (1+)	--	No	10
J75	p.K405N (He)	C3 p.S893L (He) CFH p.G956M (He)	No	H1:H1	He	72	M	61	1.3	Yes M0, E0, S1, T1, C0	36% glomerulosclerosis IgA (2+), C3 (0+), C1q (0), IgG (0), IgM (1+)	RAS	Yes	5.6
L126	p.V579A (He)	No	No	H1:H1	Ho	59	M	25	0.2	No M0, E0, S0, T1, C0	46% glomerulosclerosis IgA (1+), C3 (0.5+), C1q (0), IgG (0), IgM (0)	N/A	Yes	3.9
P439	p.G650V (He)	CFI p.p.G261D (He)	No	H1:H1	Ho	55	M	53	1.2	Yes M0, E0, S1, T0, C0	33% glomerulosclerosis IgA (1+), C3 (1+), C1q (0), IgG (0), IgM (0)	N/A	No	0.8
P218	p.R1072G (He)	CFHR5 p.G278S (He)	He	H2:H3	No	20	F	84	1.2	N/A/M1, E0, S1, T0, C0	28% glomerulosclerosis IgA (1+), C3 (1+), C1q (0), IgG (0), IgM (1+)	N/A	Yes	20.7
P31	p.R1210C (He)	No	He	H2:H3	No	56	M	34	2.3	N/A/M0, E0, S1, T1, C0	85% glomerulosclerosis IgA (1+), C3 (1+), C1q (0), IgG (0), IgM (0)	CY, CS, RAS	Yes	5.6
D246	CFHex2 c.59-4G>T (He)	CFB p.D651E (He)	He	H1:H4	He	20	M	42	1.8	Yes M1, E1, S1, T0, C1	0% glomerulosclerosis IgA (2+), C3 (1+), C1q (0), IgG (0), IgM (0)	CS	Yes	8.9

CFH rare variants (MAF<0.1%) identified in adults IgAN patients (n=260). No rare frameshift nor nonsense variant was found in IgAN patients.

*Normal ranges shown in parenthesis corresponds to the mean concentration and/or mean fluorescence intensity of the reference rFH-WT protein. Abnormal values are presented in bold. BD₅₀ corresponds to the concentration fold of rFH mutant needed to reach similar binding to C3b compared to the reference rFH-WT. Further details on the experiments performed are given in the *Supplemental methods*. *Abbreviations*: IkGe: 1000 Genome

Phase 3 population of European descent; CFH: complement factor H; CFHR1-R3: complement factor H related proteins 1 and 3; CS: corticosteroids; CY: cyclophosphamide; eGFR: estimated glomerular filtration rate (mL/min/1.73m²); ESRD: end-stage renal disease; FU: follow-up; He: heterozygous; Ho: homozygous; HU: hematuria; IgAN: IgA nephropathy; MAF: minor allele frequency; MEST-C: Oxford 2016 MEST-C score; MCP: membrane cofactor protein; M/F: male/female; RAS: renin-angiotensin system inhibitors; UPCR: urine protein-to-creatinine ratio (g/g) at diagnosis.

Table S11. Patients baseline characteristics according to the presence of a rare variant MAF<0.1% in the *CFH*, *CFI*, *CFB*, *MCP*, *C3* and/or *CFHR5* genes.

Clinical parameters at diagnosis	No variant identified (n=163)	Rare variant MAF<0.1%		p-value
		5 genes* (n=21)	CFH gene (n=12)	
Male, n (%)	127 (77.9)	20 (95.2)	9 (75.2)	0.166
Age (years), median [IQR]	46.2 [34.4-59.3]	41.9 [30.0, 46.7]	55.6 [42.6-60.8]	0.136
SBP (mmHg), median [IQR]	150 [130-166]	145 [140-150]	140 [135-155]	0.761
DBP (mmHg), median [IQR]	85 [80-100]	80 [80-94]	80 [74-90]	0.454
Hypertension, n (%)	111 (70.7)	15 (78.9)	8 (72.7)	0.718
Serum creatinine level (μmol/L), median [IQR]	145 [105-244]	173 [133-550]	190 [123-228]	0.272
eGFR (mL/min/1.73m ²), median [IQR]	49.0 [22.0-65.0]	37.5 [11.3, 54.8]	38.5 [25.8-54.8]	0.429
Stage of CKD, n (%)				
eGFR <15 mL/min/1.73m ²	14 (8.6)	1 (4.8)	0 (0)	0.798
eGFR 15-30 mL/min/1.73m ²	52 (34.9)	8 (40.0)	4 (33.3)	
eGFR 30-60 mL/min/1.73m ²	49 (32.9)	7 (35.0)	2 (16.7)	
eGFR >60 mL/min/1.73m ²	48 (32.2)	5 (25.0)	6 (50.0)	
Proteinuria (g/g), median [IQR]	1.61 [0.69-3.55]	2.0 [1.0, 3.7]	1.35 [0.69-2.21]	0.504
Hematuria [§] , n (%)	59 (75.6)	8 (100.0)	6 (85.7)	0.242
RAS inhibitors, n (%)	52 (41.3)	4 (30.8)	6 (60.0)	0.363
Steroids and/or immunosuppressants, n (%)	63 (42.6)	9 (42.9)	5 (41.7)	0.919
ESRD during the follow-up period n (%)	106 (65.0)	13 (61.9)	10 (83.3)	0.412
Age at ESRD (years), median [IQR]	53.0 [39.5-64.1]	46.0 [43.2, 54.2]	61.9 [43.2-67.6]	0.238
Delay after the diagnosis (years), median [IQR]	4.6 [2.0-9.8]	1.2 [0.56, 10.1]	5.6 [4.5-8.6]	0.420
ESRD < 5 years after the diagnosis, n (%)	57 (53.8)	8 (61.5)	4 (40.0)	0.581
Biopsy meeting criteria for MEST-C score at diagnosis, n (%)	107 (65.6)	16 (76.2)	10 (83.3)	
Glomerular sclerosis (%), mean (SD)	26.9 (24.0)	28.4 (26.6)	35.5 (24.3)	0.551
Mesangial hypercellularity - M1, n (%)	25 (23.4)	6 (37.5)	3 (30.0)	0.470
Endocapillary hypercellularity - E1, n (%)	30 (28.3)	4 (25.0)	2 (20.0)	0.822
Segmental Glomerulosclerosis - S1, n (%)	75 (69.4)	12 (75.0)	7 (70.0)	0.893
Tubular atrophy / interstitial fibrosis (T), n (%)				
0	55 (50.5)	3 (18.8)	5 (50.0)	0.148
1	34 (31.2)	7 (43.8)	4 (40.0)	
2	20 (18.3)	6 (37.5)	1 (10.0)	
Fibrocellular or cellular crescents (C≥1), n (%)	22 (17.0)	4 (25.0)	3 (27.2)	0.746
Glomerular staining				
IgG positive, n (%)	5 (3.7)	2 (11.8)	0 (0)	0.315
IgM positive, n (%)	41 (29.9)	8 (47.1)	4 (40.0)	0.673
C3 positive, n (%)	106 (92.0)	20 (94.6)	10 (90.9)	0.376
C1q positive, n (%)	9 (6.6)	2 (11.8)	1 (10.0)	0.731

* variants identified in the *C3*, *MCP*, *CFB*, *CFHR5* or *CFI* genes. Data are means (±SD) or medians (interquartile range), or percentages when indicated. [§]Micro or gross hematuria. *Abbreviations*: DBP: diastolic blood pressure; E1: Endocapillary hypercellularity; eGFR: estimated glomerular filtration rate according to the MDRD formula; ESRD: end-stage renal disease; KT: kidney transplantation; IQR: interquartile range; M1: mesangial hypercellularity; RAS: renin angiotensin system inhibitors; S1: Segmental glomerulosclerosis; SBP: systolic blood pressure; SD: standard deviation; T1-T2: tubular atrophy/interstitial fibrosis.

Table S12. Functional analysis of identified FH variants found in IgAN patients and in the reference panel

Cohort	CFH missense variants identified in IgAN patients and controls											In vitro functional study					Variant classification	
	rsID	FH Domain	Transcript	Protein	MAF Gnomad _E (%)	FH level in plasma (175 – 545 µg/mL)	Variant produced recombin antly	Expression level* (fold change of rFH-WT, 0.44-1.55)	C3b binding (BD ₅₀)* (0.30-1.70 ng/mL)	C3bBb DAA* (MFI, 310-840)	FI-cofactor activity* (MFI, N<80)	This study	Previous in vitro studies	Variant classification				
														Pathogenic	Pathogenic			
IgAN	rs139254423	SP	c.7C>G	p.L3V	0.024	N/A	Yes	1.15	0.88	462	31	No impact identified	No impact identified ^{1,2}					
IgAN	rs754932801	SCR1	c.67G>A	p.E23K	0.0004	N/A	Yes	0.79	2.37 (↓)	800	39	Minor impact	None					
IgAN	N/A	SCR2	c.349G>A	p.G117R	novel	184	Yes	0.18 (↓)	19.3 (↓)	1353 (↓)	489 (↓)	Pathogenic	None					
IgAN	rs777300338	SCR3	c.481G>T	p.A161S	0.0092	N/A	Yes	1.08	1.80	991	85 (↓)	Minor impact	Conflicting results ³⁻⁵					
IgAN	N/A	SCR7	c.1198C>G	p.Q400E	novel	N/A	Yes	0.80	0.32	546	45	No impact identified	None					
IgAN	rs199705026	SCR7	c.1215G>T	p.K405N	0.0004	N/A	Yes	0.88	0.45	629	45	No impact identified	None					
IgAN	rs201411537	SCR10	c.1736T>C	p.V579A	0.011	N/A	No	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	None					
IgAN	rs763248314	SCR18	c.3214A>G	p.R1072G	0.0025	N/A	Yes	0.79	0.36	595	51	No impact identified	None					
IgAN ^S	N/A	SCR18	c.3258T>A	p.D1086E	novel	631	Yes	0.96	1.99 (↓)	498	36	Minor impact	None					
IgAN	rs121913059	SCR20	c.3628C>T	p.R1210C	0.015	N/A	Yes	0.27 (↓) ^y	3.58 (↓)	1776 (↓)	773 (↓)	Pathogenic	Pathogenic ^{1,6-8,37}					
1kGe IgAN	rs141336681	SCR1	c.172T>G	p.S58A	0.014	523	Yes	0.75	1.57	481	31	No impact identified	Conflicting results ^{1,9}					
1kGe IgAN ^S	rs147403664	SCR9	c.1546A>T	p.N516K	0.030	381	Yes	1.16	1.04	702	46	No impact identified	Conflicting results ^{5,37}					
1kGe IgAN	rs143237092	SCR11	c.1949G>T	p.G650V	0.02	N/A	Yes	0.84	1.41	745	41	No impact identified	No impact identified ^{1,5}					
1kGe	rs200751706	SCR3	c.520G>A	p.V174I	<0.001	N/A	Yes	0.93	0.38	950	N/A	No impact identified	None					
1kGe	rs199963716	SCR14	c.2469G>A	p.M823I	0.0008	N/A	Yes	0.70	0.22 (↑)	411	N/A	No impact identified	None					
1kGe	rs547338983	SCR15	c.2603T>A	p.L868N	0.002	N/A	Yes	1.15	1.57	504	N/A	No impact identified	None					
1kGe	rs186711438	SCR15	c.2639C>G	p.T880S	0.0008	N/A	Yes	0.93	0.33	N/A	N/A	No impact identified	None					
1kGe	rs115722139	SCR16	c.2879T>C	p.F960S	0.004	N/A	Yes	0.50	0.96	554	N/A	No impact identified	No impact identified ⁵					
1kGe	rs575109631	SCR19	c.3356A>G	p.D1119G	0.02	N/A	Yes	1.61	0.48	708	N/A	No impact identified	Pathogenic ^{5,9}					

CFH rare missense variants (MAF<0.1%) identified in IgAN patients (n=260) and in the reference panel (1000 Genome Phase 3 population of European descent) (n=503) were produced recombinantly (rFH) and studied functionally *in vitro*. Variants shared between IgAN patients and controls are given with a grey background. *In vitro* functional studies included: the evaluation of *ex vivo* complement activation induced by the serum from patients carrying a rare missense FH variant (heterozygous), § variant found in a patient with a pediatric-onset IgAN, £ minor allele frequencies of identified variants in the population of European descent, # CFH p.R1012C is not associated with a quantitative defect *in vivo*. *Normal ranges are shown in parenthesis and correspond to the mean concentration and/or mean fluorescence intensity +/- 2 standard deviations of the values measured for the reference rFH-WT protein. Abnormal values are presented in bold. BD₅₀ corresponds to the concentration of rFH mutant needed to reach similar binding to C3b compared to the reference rFH-WT. Further details on the experiments performed are given in the *Supplemental methods. Abbreviations*: ↑: increased regulatory functions or increased concentration; ↓: decreased regulatory function or decreased concentration; 1kGe: 1000 Genome Phase 3 population of European descent; CADD: Combined Annotation Dependent Depletion; C3bBb: alternative C3 convertase; DAA: C3 convertase decay-accelerating activity; IgAN: IgA nephropathy; MAF: minor allele frequency; MFI: mean fluorescence intensity; N: normal range; rFH: recombinant FH; rFH-WT: reference rFH; rsID: variant identifier (rs number).

1

2 *Supplemental references:*

- 3 (1) Biggs RM, Makou E, Lauder S, et al. An Evaluation of the Complement-Regulating Activities of Human
4 Complement Factor H (FH) Variants Associated With Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis*
5 *Sci.* 2022;63(12):30.
- 6 (2) Lokki AI, Ren Z, Triebwasser M, et al. Identification of complement factor H variants that predispose to pre-
7 eclampsia: A genetic and functional study. *BJOG.* 2023. doi: 10.1111/1471-0528.17529 (*ahead of print*).
- 8 (3) Wong EKS, Hallam TM, Brocklebank V, et al. Functional Characterization of Rare Genetic Variants in the N-
9 Terminus of Complement Factor H in aHUS, C3G, and AMD. *Front Immunol.* 2021;11:602284.
- 10 (4) Madden I, Roumenina LT, Langlois-Meurinne H, et al. Hemolytic uremic syndrome associated with Bordetella
11 pertussis infection in a 2-month-old infant carrying a pathogenic variant in complement factor H. *Pediatr Nephrol.*
12 2019;34(3):533-537.
- 13 (5) Merinero HM, Zhang Y, Arjona E, et al. Functional characterization of 105 factor H variants associated with
14 aHUS: lessons for variant classification. *Blood* 2021;138(22): 2185–2201.
- 15 (6) Martinez-Barricarte R, Pianetti G, Gautard R, et al. European Working Party on the Genetics of HUS. The
16 complement factor HR1210C mutation is associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol.*
17 2008;19(3):639-46.
- 18 (7) Ferreira VP, Herbert AP, Cortés C, et al. The binding of factor H to a complex of physiological polyanions and
19 C3b on cells is impaired in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Immunol.* 2009;182(11):7009-7018.
- 20 (8) Sánchez-Corral P, Pérez-Caballero D, Huarte O, et al. Structural and functional characterization of factor H
21 mutations associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Am J Hum Genet.* 2002;71(6):1285-95.
- 22 (9) Merinero HM, García SP, García-Fernández J, et al. Complete functional characterization of disease-associated
23 genetic variants in the complement factor H gene. *Kidney Int.* 2018;93(2):470-481.
- 24 (10) Kavanagh D, Yu Y, Schramm EC, et al. Rare genetic variants in the CFI gene are associated with advanced
25 age-related macular degeneration and commonly result in reduced serum factor I levels. *Human Molecular*
26 *Genetics.* 2015;ddv091.
- 27 (11) Hallam TM, Marchbank KJ, Harris CL, et al. Rare Genetic Variants in Complement Factor I Lead to Low FI
28 Plasma Levels Resulting in Increased Risk of Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*
29 2020;61(6):18.
- 30 (12) Zhang Y, Goodfellow RX, Ghiringhelli Borsa N, et al. Complement Factor I Variants in Complement-
31 Mediated Renal Diseases. *Front Immunol.* 2022;13:866330.
- 32 (13) Bonyadi M, Norouzi N, Babaei E, et al. Association of polymorphisms of complement factor I rs141853578
33 (G119R) with age-related macular degeneration in Iranian population. *Int Ophthalmol.* 2019;39(3):551–6.
- 34 (14) Van De Ven JPH, Nilsson SC, Tan PL, et al. A functional variant in the CFI gene confers a high risk of age-
35 related macular degeneration. *Nat Genet.* 2013;45(7):813–7.
- 36 (15) Yu Y, Triebwasser MP, Wong EKS, et al. Whole-exome sequencing identifies rare, functional CFH variants
37 in families with macular degeneration. *Human Molecular Genetics.* 2014;23(19):5283–93.
- 38 (16) Fakhouri F, Roumenina L, Provot F, et al. Pregnancy-Associated Hemolytic Uremic Syndrome Revisited in
39 the Era of Complement Gene Mutations. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(5):859–67.

- 1 (17) Maga TK, Nishimura CJ, Weaver AE, et al. Mutations in alternative pathway complement proteins in
2 American patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Hum Mutat.* 2010;31(6):E1445–60.
- 3 (18) Duvvari MR, Saksens NTM, van de Ven JPH, et al. Analysis of rare variants in the CFH gene in patients with
4 the cuticular drusen subtype of age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 2015;21:285–92.
- 5 (19) Geerlings MJ, Volokhina EB, de Jong EK, et al. Genotype-phenotype correlations of low-frequency variants
6 in the complement system in renal disease and age-related macular degeneration. *Clin Genet.* 2018;94(3–4):330–
7 8.
- 8 (20) Raychaudhuri S, Iartchouk O, Chin K, et al. A rare penetrant mutation in CFH confers high risk of age-related
9 macular degeneration. *Nat Genet.* 2011;43(12):1232–6.
- 10 (21) Prosser BE, Johnson S, Roversi P, et al. Structural basis for complement factor H–linked age-related macular
11 degeneration. *Journal of Experimental Medicine.* 2007;204(10):2277–83.
- 12 (22) Geerlings MJ, De Jong EK, Den Hollander AI. The complement system in age-related macular degeneration:
13 A review of rare genetic variants and implications for personalized treatment. *Molecular Immunology.*
14 2017;84:65–76.
- 15 (23) Manenti L, Rossi GM, Pisani I, et al. IgA nephropathy and atypical hemolytic uremic syndrome: a case series
16 and a literature review. *J Nephrol.* 2022;35(4):1091–100.
- 17 (24) Hourcade DE, Wagner LM, Oglesby TJ. Analysis of the Short Consensus Repeats of Human Complement
18 Factor B by Site-directed Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry.* 1995;270(34):19716–22.
- 19 (25) Xu Y, Volanakis JE. Contribution of the complement control protein modules of C2 in C4b binding assessed
20 by analysis of C2/factor B chimeras. *J Immunol.* 1997;158(12):5958–65.
- 21 (26) Java A, Baciù P, Widjajahakim R, et al. Functional Analysis of Rare Genetic Variants in Complement Factor
22 I (CFI) using a Serum-Based Assay in Advanced Age-related Macular Degeneration. *Trans Vis Sci Tech.*
23 2020;9(9):37.
- 24 (27) Hallam TM, Cox TE, Smith-Jackson K, et al. A novel method for real-time analysis of the complement
25 C3b:FH:FI complex reveals dominant negative CFI variants in age-related macular degeneration. *Front Immunol.*
26 2022;13:1028760.
- 27 (28) Seddon JM, Rosner B, De D, et al. Rare Dysfunctional Complement Factor I Genetic Variants and Progression
28 to Advanced Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology Science.* 2023;3(2):100265.
- 29 (29) Marinozzi MC, Vergoz L, Rybkine T, et al. Complement Factor B Mutations in Atypical Hemolytic Uremic
30 Syndrome—Disease-Relevant or Benign? *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(9):2053–65.
- 31 (30) Garam N, Cserhalmi M, Prohászka Z, et al. FHR-5 Serum Levels and CFHR5 Genetic Variations in Patients
32 With Immune Complex-Mediated Membranoproliferative Glomerulonephritis and C3-Glomerulopathy. *Front*
33 *Immunol.* 2021;12:720183.
- 34 (31) Papp A, Papp K, Uzonyi B, et al. Complement Factor H-Related Proteins FHR1 and FHR5 Interact With
35 Extracellular Matrix Ligands, Reduce Factor H Regulatory Activity and Enhance Complement Activation. *Front*
36 *Immunol.* 2022;13:845953.
- 37 (32) Zhai YL, Meng SJ, Zhu L, et al. Rare Variants in the Complement Factor H-Related Protein 5 Gene
38 Contribute to Genetic Susceptibility to IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(9):2894–905.
- 39 (33) Java A, Pozzi N, Love-Gregory LD, et al. A Multimodality Approach to Assessing Factor I Genetic Variants
40 in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Kidney International Reports.* 2019;4(7):1007–17.

- 1 (34) Frémeaux-Bacchi V, Miller EC, Liszewski MK, et al. Mutations in complement C3 predispose to development
2 of atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2008;112(13):4948–52.
- 3 (35) Tortajada A, Pinto S, Martínez-Ara J, et al. Complement factor H variants I890 and L1007 while commonly
4 associated with atypical hemolytic uremic syndrome are polymorphisms with no functional significance. *Kidney*
5 *International*. 2012;81(1):56–63.
- 6 (36) Mohlin FC, Nilsson SC, Levart TK, et al. Functional characterization of two novel non-synonymous
7 alterations in CD46 and a Q950H change in factor H found in atypical hemolytic uremic syndrome patients.
8 *Molecular Immunology*. 2015;65(2):367–76.
- 9 (37) Gastoldi S, Aiello S, Galbusera M, et al. An ex vivo test to investigate genetic factors conferring susceptibility
10 to atypical haemolytic uremic syndrome. *Front Immunol*. 2023;14:1112257.
- 11 (38) Nilsson SC, Karpman D, Vaziri-Sani F, et al. A mutation in factor I that is associated with atypical hemolytic
12 uremic syndrome does not affect the function of factor I in complement regulation. *Molecular Immunology*.
13 2007;44(8):1835–44.
- 14 (39) Fang CJ, Frémeaux-Bacchi V, Liszewski MK, et al. Membrane cofactor protein mutations in atypical
15 hemolytic uremic syndrome (aHUS), fatal Stx-HUS, C3 glomerulonephritis, and the HELLP syndrome. *Blood*.
16 2008;111(2):624–32.
- 17 (40) Fakhouri F, Frémeaux-Bacchi V. Thrombotic microangiopathy in aHUS and beyond: clinical clues from
18 complement genetics. *Nat Rev Nephrol*. 2021;17(8):543–53.
- 19 (41) Neumann HPH. Haemolytic uraemic syndrome and mutations of the factor H gene: a registry-based study of
20 German speaking countries. *Journal of Medical Genetics*. 2003;40(9):676–81.
- 21 (42) Akhlaghpour M, Haritunians T, More SK, et al. Genetic coding variant in complement factor B (CFB) is
22 associated with increased risk for perianal Crohn’s disease and leads to impaired CFB cleavage and phagocytosis.
23 *Gut*. 2023;gutjnl-2023-329689.
- 24 (43) Narendra U, Pauer GJT, Hagstrom SA. Genetic analysis of complement factor H related 5, CFHR5, in patients
25 with age-related macular degeneration. *Mol Vis*. 2009;15:731–6.
- 26 (44) Monteferrante G, Brioschi S, Caprioli J, et al. Genetic analysis of the complement factor H related 5 gene in
27 haemolytic uraemic syndrome. *Molecular Immunology*. 2007;44(7):1704–8.
- 28 (45) Roshanipour N, Laleh MG, Bonyadi M, et al. Role of complement factor B rs4151667 (L9H) polymorphisms
29 and its interactional role with CFH Y402H and C3 rs2230199 (R102G) risk variants in age-related macular
30 degeneration: a case control study. *BMC Ophthalmol*. 2020;20(1):323.
- 31 (46) Li J, Guo L, Shi S, et al. The Role of Complement in Microangiopathic Lesions of IgA Nephropathy. *Kidney*
32 *International Reports*. 2022;7(6):1219–28.

6. Conclusion

La cartographie génétique de cette cohorte française montre les multiples facettes de la génétique du complément dans l'IgAN en révélant la présence de certains haplotypes protecteurs vis-à-vis de la susceptibilité (haplotype *CFH-H2*) au développement de l'IgAN tandis que l'haplotype *ggaac* de *MCP*, sous la forme homozygote, constitue un facteur de risque indépendant d'évolution vers l'insuffisance rénale terminale, multipliant par 2,83 le risque de développer une insuffisance rénale terminale (IRCT) 15 ans après le diagnostic.

Discussion

La pathogenèse de l'IgAN est complexe et influencée par l'interaction de multiples gènes et de facteurs environnementaux, qui affectent collectivement le développement et la progression de la néphropathie et influencent le phénotype final (10). La contribution précise du complément dans cette complexité est mal comprise.

Nos résultats positionnent une dérégulation du complément comme un facteur clé dans la susceptibilité au développement d'une IgAN et dans la progression de la néphropathie. Ainsi, nos données confirment que l'IgAN constitue un exemple de pathologie chronique en lien avec une dérégulation du complément, et notamment de la voie alterne. Dans ce travail, nous avons montré **i)** qu'il existait des signes d'activation du complément d'intensité modérée (C3a et Bb élevés) détectables au niveau plasmatique chez 48,3% des patients IgAN transplantés; **ii)** que dans 46% des cas, le sérum de patients IgAN transplantés est capable d'induire des dépôts de C5b-9 à la surface des cellules endothéliales en culture ; **iii)** que la génétique des régulateurs du complément (*CFH*, *MCP*) modifie la susceptibilité vis-à-vis du risque de développement d'une IgAN sévère et/ou impacte la progression de la néphropathie.

L'IgAN est actuellement décrite comme une glomérulonéphrite auto-immune, avec la formation de Gd-IgA1-IC dont l'accumulation dans le mésangium provoque la néphropathie (1). Des modèles murins et cellulaires soutiennent que l'activation du complément provoquée par le dépôt de Gd-IgA1-IC au contact des cellules mésangiales joue un rôle dans le pouvoir pathogène des complexes immuns au niveau tissulaire (217,227,247,252,303). En revanche, les éléments en faveur d'une activation du complément prenant directement place dans la circulation sont extrêmement limités et reposent le plus souvent sur des données *in vitro* anciennes, non reproduites (234,238) ou sur des

arguments indirects (p.ex. ratio IgA:C3 augmenté, C3 plasmatique subnormal, présence de C3b/iC3b dans les complexes immuns purifiés) (217,231,304–307).

Notre étude est la première qui a évalué de manière combinée un large panel de fragments d'activation du complément chez des patients porteurs d'une IgAN, apportant une vision globale de l'activation de la cascade du complément. Dans ce travail réalisé chez une population de patients porteurs d'une IgAN transplantés rénaux (n=87) ou non (n=20) prélevés au cours de leur suivi, nous avons montré que des signes d'activation du complément (en particulier C3a et Bb) étaient détectables dans la circulation chez 48,3% des patients malgré l'absence de consommation du C3 ou du C4 plasmatiques. Le C3a constitue le produit du clivage du C3 par les C3 convertases. Dans la circulation, cette petite molécule (9 kDa) est rapidement inactivée par des carboxypeptidases en C3a des-Arg (également mesuré). Le Bb est libéré suite à la dissociation de C3bBb survenue spontanément ou facilitée par l'action des régulateurs du complément (FH, CD55). Par conséquent, ces biomarqueurs reflètent une activation du complément dont le point de départ pourrait être systémique (à la surface des complexes immuns dans la circulation) mais également refléter l'intensité de l'activation du complément au niveau tissulaire rénal (308,309). La contribution respective de ces mécanismes est actuellement inconnue. La sécrétion de C3 par les cellules mésangiales en réponse aux complexes immuns apporte une contribution supplémentaire (227).

Les données publiées concernant les fragments d'activation du complément au niveau plasmatique chez les patients IgAN (308,310–313) sont peu nombreuses et sont restreintes à l'exploration d'un ou deux biomarqueurs d'activation du complément.

Les concentrations plasmatiques des produits du clivage du C3 (C3a, C3b/iC3b, C3dg) (252,269,314–316), C4a (311,314), C5a (252,310,317), Ba (310,317) et Bb (318)¹¹ ont été décrites comme élevées chez les patients porteurs d'une IgAN ou d'une IgAVN, avec une association

¹¹ Abstract présenté au 57^{ème} congrès de l'ERA-EDTA, 2020. Abstract disponible [ici](#).

inconstante aux paramètres cliniques ou histologiques (252). Le sC5b-9 plasmatique, mesuré chez quelques patients, apparaît normal (312,319).

Dans une cohorte européenne¹², le Bb était discrètement augmenté chez les patients IgAN et IgAVN (n=98) comparé au groupe contrôle « sans néphropathie médiée par le complément » (n=17), sans association avec les paramètres cliniques ni histologiques (318). Une étude taïwanaise (317) a montré une concentration de Ba plasmatique plus importante chez les patients porteurs d'une IgAN (n=98) comparé aux patients porteurs d'une hyalinose segmentaire et focale (n=25) ou aux contrôles indemnes de néphropathie (n=42) appariés sur l'âge. Le Ba était corrélé au degré de protéinurie, inversement corrélé au DFGe chez les patients (317) et corrélé au degré de fibrose tubulo-interstitielle (MEST-C score $T \geq 1$) (310).

Dans ces cohortes, les concentrations plasmatiques de C5a, bien plus importantes que dans notre cohorte d'étude, étaient associées au taux de Gd-IgA1 mais pas au degré de protéinurie ni au DFGe (317). Dans une autre cohorte chinoise, Zhang, *et al.* (252) ont montré des concentrations élevées de C3a et de C5a chez 30 patients porteurs d'une IgAN primitive, comparé aux donneurs sains (n=10), sans association avec les paramètres histologiques.

Nous n'avons pas observé d'élévation franche du C5a chez les patients de notre cohorte, avec un profil similaire entre les patients transplantés rénaux et non transplantés. Il est tout à fait possible que la temporalité et l'intensité de l'activation du complément dans notre cohorte soit différente, les prélèvements étant réalisés durant le suivi des patients, en l'absence de manifestation clinique franche de leur néphropathie. Le C5a est une puissante anaphylatoxine dont les récepteurs (C5aR1 ou CD88, et C5aR2) sont exprimés à la surface des cellules rénales (p.ex. cellules endothéliales, mésangiales) et de nombreuses cellules immunitaires (p.ex. neutrophiles, monocytes et macrophages). L'engagement de l'axe C5a/C5aR1 contribue à l'inflammation et à la fibrose glomérulaire (320) ainsi qu'à la génération

¹² Abstract présenté au 57^{ème} congrès de l'ERA-EDTA, 2020, disponible [ici](#).

de lésions endothéliales et d'une prolifération extracapillaire (68,250,252). L'élévation du C5a dans la cohorte taïwanaise pourrait être en lien avec la sévérité du tableau clinique (313), avec une prévalence élevée des formes d'IgAN extracapillaires (environ 30% des patients), une protéinurie importante (2,7 g/g) et la présence de syndromes néphrotiques (317).

L'étude combinée des biomarqueurs C3a, Bb et sC5b-9 nous a permis d'identifier un profil de patients activateurs forts du complément (cluster 4, 18,4% des patients), un profil de patients activateurs plus faibles (cluster 3, 36,8% des patients), un profil de patients non activateurs (cluster 1, 17,2% des patients) et un profil avec un sC5b-9 augmenté sans marqueur d'activité ou de dissociations de C3 convertases (cluster 2, 27,6% des patients). Ce dernier profil avec une dissociation des marqueurs des C3 et des C5 convertases montre toute la complexité de l'interprétation isolée du sC5b-9, non toujours associé aux dépôts tissulaires de C5b-9 (319). Ce biomarqueur d'interprétation difficile apparaît ici comme non spécifique d'une pathologie à complexes immuns (également observé chez les patients transplantés polykystiques) (321–323).

Nos résultats montrent des marqueurs prédominant de C3 convertases (y compris alternes), globalement régulées, générant des quantités limitées de C3a. L'élévation modérée du C3a et du Bb, sans augmentation significative du C5a observée chez les patients (transplantés ou non) positionne l'IgAN comme une pathologie de dérégulation du complément principalement dépendante de la voie alterne du complément et de la régulation de sa boucle d'amplification. Récemment, Barratt J, *et al.*¹³ ont rapporté une diminution du Bb plasmatique de 23% à 3 mois chez les patients traités par iptacopan 200 mg 2 fois par jour. Les résultats obtenus dans ce travail ouvrent la perspective de l'utilisation du Bb pour le ciblage des patients qui bénéficieraient le plus de l'iptacopan (cluster 4) et, potentiellement, pour leur suivi thérapeutique.

¹³ Abstract présenté au *World Congress of Nephrology 2023*, disponible [ici](#).

La cellule endothéliale, à l'interface entre les Gd-IgA1-IC présents dans la circulation et le mésangium, constitue la première ligne de défense contre l'activation du complément. Pour la première fois dans un modèle *ex vivo*, j'ai pu montrer que les sera de 46% des patients IgAN déposent du complément sur les cellules endothéliales. De plus, la corrélation positive des dépôts de C3b/iC3b et de C5b-9 induits par le sérum des patients à la surface des cellules endothéliales révèle une vulnérabilité face aux C3 convertases formées, facilitant la génération de C5 convertases.

Les données fonctionnelles obtenues dans ce modèle montrent toute la complexité de l'activation du complément *ex vivo* par le sérum. En effet, les dépôts endothéliaux mesurés reflètent la capacité globale de la cascade du complément à s'amplifier dans le sérum et/ou à la surface des cellules endothéliales. Les paramètres impliqués dans le degré d'activation du sérum sont multiples et intriqués et dépendent notamment de la quantité de C3b générée durant l'incubation et de la capacité des régulateurs circulants apportés par le sérum à contrôler efficacement les dépôts de C3b et de C3bBb en surface cellulaire. La réponse endothéliale consécutive aux dépôts de complément, identique entre nos conditions expérimentales, constitue un contributeur additionnel dans le contrôle efficace de l'activation du complément *in vivo*.

Dans le modèle d'étude, les dépôts de C3b/iC3b étaient associés aux taux de Gd-IgA1 les plus élevés. De plus, l'incubation de produits de purification d'IgA1 issus de sera de patients au contact des cellules endothéliales induisait une libération de C3a dans le surnageant significativement augmentée par rapport aux IgA1 purifiées de donneurs sains, sans augmentation significative des dépôts de C3b/iC3b à la surface des cellules endothéliales. Ces résultats illustrent l'importance majeure des régulateurs tissulaires (MCP, CR1) dans la protection cellulaire en cas d'attaque du complément. Mais de manière intéressante, en l'absence de ces régulateurs cellulaires (phase fluide), l'incubation des produits de purification contenant les IgA1 (et potentiellement les Gd-IgA1 et Gd-IgA1-IC) issus de patients facilitent la formation de C5 convertases.

Bien que la mécanistique exacte de l'activation du complément par ces produits de purification nécessite d'être précisée, ces résultats renforcent l'idée que les Gd-IgA1-IC contenus dans la circulation des patients pourraient constituer un catalyseur de l'activation du complément en phase fluide, jouant alors un rôle de surface activatrice (324). L'identification en western blot et en spectrométrie de masse de molécules de C3b/iC3b en quantité abondante et plus importante au sein des Gd-IgA1-IC de très haut poids moléculaires purifiés à partir de sera de patients (n=10) comparé aux contrôles (n=10) fournit un argument indirect renforçant cette hypothèse (217). La liaison de C3b aux complexes immuns circulants ou tissulaires serait propice à la formation de C3bBb et à l'amplification du complément en l'absence de régulation rapide et efficace. Au total, nos données appuient que dans l'IgAN, il existe 3 principaux partenaires jouant un rôle dans le degré d'activation du complément : les complexes immuns, la cellule endothéliale (notamment glomérulaire) et la cellule mésangiale.

En condition d'équilibre, cette activation du complément est globalement contrôlée *in vivo* dans la circulation chez les patients à l'étape du C3b et des C3 convertases (C5a plasmatique normal dans notre cohorte). De plus, les signes biologiques d'activation systémique intense du complément (consommation du C3 et du C4, signes de microangiopathie thrombotique) sont généralement absents chez les patients IgAN (266,325).

Des facteurs additionnels telles qu'une augmentation de la synthèse des Gd-IgA1-IC, une infection ou une transplantation rénale peuvent provoquer une augmentation de l'activation du complément. Ce surcroît d'activation du complément peut être rapidement autolimité. Mais, chez les patients ayant une régulation du complément génétiquement plus faible, ces triggers peuvent entraîner un emballement de la cascade, devenant rapidement incontrôlable et accélérant la progression de la néphropathie (272).

Cavero, *et al.* (326) ont montré que parmi les patients présentant une HTA maligne, le développement d'un tableau de MAT biologique associé était plus fréquemment rencontré chez les patients porteurs d'une IgAN comparé aux autres glomérulopathies. Dans cette étude, des variants

portant sur les gènes du complément ou associés au complément ont été identifiés chez 4 des 7 patients ayant bénéficié d'une étude génétique. Ceci souligne l'importance d'un terrain génétique de susceptibilité sous-tendant le développement de formes particulières d'IgAN associées à un phénotype de MAT. Notamment, un patient portait l'haplotype de *MCP ggaac* homozygote, connu comme associé au SHUa et également retrouvé chez les patients les plus sévères de notre cohorte. De façon intéressante, chez ce patient, l'haplotype *MCP ggaac* homozygote était combiné à un variant rare du *CFHR4* (p.S233T, VUS). A ce jour, aucun variant du *CFHR4* n'a été démontré comme associé à une maladie rénale. Ces observations illustrent toute la complexité de l'interprétation de la combinaison des anomalies génétiques et de leurs effets cumulatif.

La contribution d'un terrain génétique dans les formes d'IgAN sévères développant un tableau de microangiopathie thrombotique biologique ou d'une HTA maligne est appuyée par l'identification de variants génétiques portant principalement sur les gènes *CFH* et *CFHR* (12,14–16,269,270,272) et plus rarement *CFI* (16,269) ou *C3* (269). La contribution directe d'autres variants des gènes du complément (*CR1*, *CR2*), de la voie des lectines (*FCN*) ou encore de la cascade de coagulation identifiés chez des patients IgAN avec un tableau de MAT, n'est pas établie (269).

Ces observations confortent l'hypothèse d'une vulnérabilité particulière des patients IgAN présentant un terrain génétique de susceptibilité altérant la capacité de régulation du complément au développement d'une amplification incontrôlée du complément et d'un phénotype de MAT. Les patients pourraient montrer une vulnérabilité particulière face à un trigger intensifiant l'activation du complément, potentiellement accélérée par les Gd-IgA1-IC.

Dans notre cohorte regroupant des formes sévères, les patients porteurs d'un variant rare du *CFH* ne présentaient aucune différence clinique ou histologique perceptible par rapport aux non-porteurs au moment du diagnostic, et aucun ne présentait de tableau de MAT. Ces observations montrent qu'il n'existe pas de règle sur une atteinte rénale universelle chez les patients partageant des traits génétiques avec le SHUa. Ces données soulignent l'importance d'autres facteurs contributifs

dans le phénotype clinique et histologique, en particulier les facteurs intervenant dans la réponse tissulaire (endothéliale, mésangiale) face à l'agression ainsi que de l'intensité et de la nature du trigger activant le complément.

L'ensemble de ces observations suggère que l'activation du complément n'est pas nécessaire à l'initiation de la maladie. L'activation du complément arrive plus tard, avec les dépôts mésangiaux de C3b en réponse aux dépôts de complexes immuns pathologiques. L'intensité des dépôts de C3b est elle-même corrélée au déclin de la fonction rénale (267). Chez les patients, l'activation du complément est présente de manière chronique (ou intermittente, répétée) au niveau tissulaire rénal. Un déséquilibre subtil de la régulation du complément, responsable d'un excès d'activation, même minime, peut être délétère. Avec le temps, ces petites différences contribuent *in fine* à la progression de la néphropathie. La question de l'impact de la génétique du complément dans l'IgAN sur le pronostic rénal des patients est cependant débattue.

Nous avons montré une prévalence des variants ultra-rares du *CFH* (MAF < 0,1%) plus importante chez les patients IgAN que dans la population de référence (4,6 % des patients vs. 1,8 %, des contrôles $p=0,034$). Cette prévalence observée des variants rares du *CFH* dans notre cohorte reste bien moins importante que celle observée dans le SHUa (20-30%), avec une prévalence plus proche de celle observée dans d'autres pathologies médiées par le complément comme l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) ou encore la DMLA (environ 4-5%). Ceci montre l'absence d'impact (ou l'impact très limité) des variants du *CFH* dans l'émergence de l'IgAN.

Mais, la localisation de ces variants était particulière. Les variants rares du *CFH* étaient situés dans des domaines importants pour l'activité régulatrice du C3b par le FH (SCR1-4, SCR18-20), avec un groupe additionnel de variants situés dans la région centrale du FH, une région aux fonctions encore peu connues.

Les tests fonctionnels utilisés dans notre étude évaluaient les trois fonctions connues du FH, principalement portées par les domaines N_{ter} et C_{ter}. La région centrale du FH possède des sites de liaison à de nombreux ligands, notamment aux glycosaminoglycanes et à la CRP (71). Des données *in vitro* récemment communiquées lors de l'ICW 2023¹⁴ soutiennent que la structure compacte de la région centrale du FH jouerait un rôle pour son maintien en position « ouverte », permettant sa liaison efficace au C3b membranaire en interagissant avec des polyanions présents en surface cellulaire (327). Un impact fonctionnel des variants de la région centrale spécifique de l'IgAN ne peut donc être formellement exclu.

Nous n'avons pas identifié de variant rare (MAF<1%) faux-sens ou frame-shift du *CFHR5* chez les patients IgAN. Ces variants aboutissant à un déficit quantitatif protéique partiel sont cependant présents chez 2-3 % de la population générale. A ce jour, uniquement des gains de fonction de *CFHR5* ont été décrits comme associés à des pathologies. Nos données appuient l'hypothèse qu'un déficit partiel en FHR5 pourrait conférer une protection modérée vis-à-vis du risque du développement d'une IgAN. La surreprésentation de variants rares du *CFH* combinée à la fréquence plus faible des variants de *CFHR5* conduisant à un déficit de FHR5 dans notre cohorte, soutient l'idée d'un déséquilibre très subtil de la balance FH/FHR (notamment FHR5) dans l'IgAN. Ce déséquilibre pourrait intensifier l'activation du complément déclenchée par les complexes immuns Gd-IgA-IC dans l'IgAN, en particulier au niveau tissulaire. Néanmoins, il est important de préciser que la forte ségrégation des variants situés au sein du locus *CFH-CFHR1-5* ne permet pas d'éliminer un effet combiné de plusieurs polymorphismes associés. Le rôle précis des variations génétiques des *CFHR1-5* reste ainsi à préciser.

Nous avons démontré une prévalence diminuée de l'haplotype *CFH-H2* chez les patients porteurs d'une IgAN par rapport au groupe de référence. Pour la première fois, nous montrons que cet haplotype est associé à un effet protecteur vis-à-vis de la susceptibilité de développer une IgAN,

¹⁴ Abstract présenté lors du congrès ICW 2023 (international complement workshop 2023) par Christoph Schmidt.

notamment sévère. Cet haplotype associé à une protection contre le SHUa et l'AMD (137) comprend le FH_{62I} (sans le FH_{402H}) qui présenterait une capacité de fixation au C3b et une activité cofacteur du FI augmentée par rapport au FH_{62V} (161). Par conséquent, cet haplotype conférerait une régulation du complément plus efficace sur le long terme. A l'inverse, l'haplotype *CFH-H4* et le polymorphisme rs7542235-G, tous les deux en déséquilibre de liaison avec *CFHR1-R3Δ*, n'ont pas été associés à la susceptibilité ou à la progression de l'IgAN dans notre cohorte de formes globalement sévères.

L'étude de *MCP* n'a pas montré de prévalence augmentée des variants rares portant sur ce gène, ni de modification de la fréquence des haplotypes chez les patients IgAN. Ces observations soulignent l'hypothèse que *MCP* n'est pas un facteur de susceptibilité vis-à-vis du risque de développement d'une IgAN.

En revanche, nous avons identifié l'haplotype *MCP ggaac* comme un facteur de risque indépendant de progression de la néphropathie. Les patients porteurs homozygotes avaient un risque d'évolution vers l'IRCT à 15 ans multiplié par 2,83. *MCP* est un régulateur majeur des trois voies du complément, exprimé sur presque toutes les cellules nucléées, y compris sur les cellules mésangiales et les cellules endothéliales. La compréhension actuelle de l'impact de cet haplotype situé au sein du promoteur de *MCP* et de son impact sur le niveau d'expression protéique est limitée à une seule étude *in vitro* (164). Cette étude publiée en 2005 et non reproduite à ce jour, montre une diminution de l'expression de 25% du gène de la luciférase situé en aval d'un promoteur contenant les polymorphismes rs2796267-G et rs2796268-G (« GG », retrouvé dans l'haplotype *MCP ggaac*) comparé au promoteur contenant les rs2796267-A et rs2796268-A (« AA », retrouvé dans l'haplotype *MCP aaggt*). Deux études présentent des données de transcriptomique pour *MCP* dans l'IgAN (328,329), aucune de ces études ne rapporte de donnée génétique. Dans la cohorte de 157 patients issus des centres européens du réseau VALIGA, Coppo *et al.* (328) ont montré que les patients avec une forme d'IgAN progressive (définie comme un déclin annuel du DFGe d'au moins -0,41 mL/min/1,73m²) présentaient une diminution d'expression de *MCP* dans les cellules mononucléées de

sang périphérique (PBMC). Ces données ne sont pas disponibles dans notre cohorte. Il est par conséquent actuellement difficile d'établir un lien direct entre l'expression de *MCP* dans les PBMC, son expression et sa fonction de régulation du complément au niveau glomérulaire et les données génétiques.

MCP est le premier régulateur des C3 convertases classiques et alternes au niveau tissulaire. L'identification de ce nouveau facteur pronostique renforce l'importance d'une activation du complément prenant place au niveau tissulaire, avec la contribution d'une activation pouvant être issue des trois voies du complément, en particulier de la voie des lectines. Les multiples rôles de MCP au carrefour des trois voies d'activation du complément, mais aussi dans la modulation des signaux et de la réponse immunitaires aux pathogènes ainsi que ses fonctions intracellulaires (330) nous laissent entrevoir que le rôle de MCP dans l'IgAN pourrait s'étendre bien au-delà des fonctions régulatrices du complément.

Il convient de néanmoins de souligner la taille de notre cohorte (260 patients) limitante pour voir l'émergence d'autres facteurs génétiques contributifs, d'autant plus dans un contexte plurifactoriel.

Nos résultats mettent en lumière l'émergence de plusieurs facteurs génétiques se regroupant en un complotype polygénique complexe. Une susceptibilité génétique sous-tend l'émergence de l'IgAN. Les traits génétiques du complément interviennent plus tardivement dans la maladie, en modifiant la réponse individuelle face à un déclencheur chronique du complément (p.ex. Gd-IgA1-IC) et en accélérant la progression de l'IgAN.

Perspectives

L'identification de variants génétiques faux-sens ultra-rares du gène *CFH* chez les patients avec une IgAN de formes sévères et l'influence défavorable de l'haplotype homozygote *MCP ggaac* sur la survie rénale renforce l'idée de traits génétiques partagés entre le SHUa et l'IgAN. Cependant, le raisonnement porté pour le SHUa n'est pas directement transposable aux pathologies multifactorielles d'évolution chronique comme l'IgAN. Dans le SHUa, il existe une composante génétique forte du complément, avec une forte prévalence des variants ultra-rares des gènes de la voie alterne, ayant un impact majeur sur le phénotype clinique. Notre approche génétique globale a montré que dans l'IgAN, il s'agit plutôt d'une combinaison de variants rares et de polymorphismes, ayant un effet additif sur le long terme.

Un **premier objectif** sera de recruter un nombre plus important de patients IgAN avec une plus grande diversité de formes cliniques afin de confirmer ce message. Nous emploierons un panel étendu à plus de 40 gènes du complément ou associés au complément (« panel complome »), en étudiant plus spécifiquement les gènes *CFHR1-5*, de la voie des lectines, des récepteurs et régulateurs du complément et de la glycosylation des immunoglobulines chez des patients IgAN (cohorte ICONE, NCT05234463) et chez les patients présentant un tableau clinique fort d'activation du complément avec un phénotype de MA(T) associé à l'IgAN (cohorte MAT-IgA). L'accumulation des données génétiques permettra de mieux préciser l'impact cumulatif des variations génétiques (complotypes) et leur impact sur la prédisposition ou la résistance vis-à-vis du développement de l'IgAN et le phénotype clinique.

Un **second objectif** sera de caractériser les conséquences de l'haplotype de *MCP ggaac* sur l'expression protéique au niveau membranaire. Nous commencerons par l'étude de l'expression de

MCP sur les granuleux en cytométrie de flux et corrèlerons ces niveaux d'expression avec les résultats de génétique.

Dans ce travail, nous avons identifié un cluster de variants localisés en zone centrale du FH (SCR7-14). L'impact fonctionnel de ces variants sur l'activité régulatrice du rFH est encore peu étudié. Le **troisième objectif** sera de continuer l'étude des variants recombinants du FH produits en développant un nouveau test fonctionnel plus proche de la physiologie, évaluant directement la liaison du FH à la surface des cellules endothéliales glomérulaires et des cellules mésangiales en culture.

Enfin, des données récemment présentées lors du congrès ICW 2023¹⁵ ont montré un FHR4 augmenté chez les patients IgAN présentant une forme sévère (331). Le **quatrième objectif** sera de doser les FHR au niveau plasmatique dans notre cohorte et de corrélérer ces résultats avec la clinique.

L'émergence de biomarqueurs d'activation du complément dans l'IgAN est aujourd'hui indispensable pour le ciblage des patients qui bénéficieraient le plus des thérapies ciblant le complément. Une étude large des biomarqueurs plasmatiques permettra de répondre au mieux à ces besoins (NCT05234463).

¹⁵ Abstract présenté lors du congrès ICW 2023 (international complement workshop 2023) par Kevin Marshbank

Conclusions

L'IgAN est une néphropathie multifactorielle dans laquelle une activation et une régulation imparfaite du complément sont deux facteurs contributifs. Nos résultats ont mis en avant l'émergence d'un haplotype de régulation du complément comme protecteur (*CFH-H2*) et de l'effet délétère de l'haplotype *MCP ggaac* homozygote dans l'IgAN. Nos résultats soulignent qu'un déséquilibre modéré dans la régulation du complément en lien avec une susceptibilité génétique constitue, à long terme, un facteur de risque pour la progression de la néphropathie.

L'apport sur le plan génétique et fonctionnel de ce travail apporte des éléments sur l'implication du complément dans l'IgAN et offre des pistes potentielles pour des interventions thérapeutiques.

Bibliographie

1. Duval A, Caillard S, Frémeaux-Bacchi V. The complement system in IgAN: mechanistic context for therapeutic opportunities. *Nephrol Dial Transplant*. 2023 Jun 29;gfad140.
2. Poppelaars F, Faria B, Schwaeble W, Daha MR. The Contribution of Complement to the Pathogenesis of IgA Nephropathy: Are Complement-Targeted Therapies Moving from Rare Disorders to More Common Diseases? *J Clin Med*. 2021 Oct 14;10(20):4715.
3. Floege J, Daha MR. IgA nephropathy: new insights into the role of complement. *Kidney Int*. 2018 Jul;94(1):16–8.
4. Maillard N, Wyatt RJ, Julian BA, et al. Current Understanding of the Role of Complement in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Jul;26(7):1503–12.
5. Daha MR, van Kooten C. Role of complement in IgA nephropathy. *J Nephrol*. 2016 Feb;29(1):1–4.
6. Tesař V, Radhakrishnan J, Charu V, Barratt J. Challenges in IgA Nephropathy Management: An Era of Complement Inhibition. *Kidney Int Rep*. 2023 Jun;S2468024923013554.
7. Cheung CK, Dormer JP, Barratt J. The role of complement in glomerulonephritis—are novel therapies ready for prime time? *Nephrol Dial Transplant*. 2022 Oct 28;gfac296.
8. Gharavi AG, Kiryluk K, Choi M, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nat Genet*. 2011 Apr;43(4):321–7.
9. Xie J, Kiryluk K, Li Y, et al. Fine Mapping Implicates a Deletion of CFHR1 and CFHR3 in Protection from IgA Nephropathy in Han Chinese. *J Am Soc Nephrol*. 2016 Oct;27(10):3187–94.
10. Kiryluk K, Sanchez-Rodriguez E, Zhou XJ, et al. Genome-wide association analyses define pathogenic signaling pathways and prioritize drug targets for IgA nephropathy. *Nat Genet*. 2023 Jun;55:1091–1105.
11. Jia M, Zhu L, Zhai Y, et al. Variation in complement factor H affects complement activation in immunoglobulin A vasculitis with nephritis. *Nephrology*. 2020 Jan;25(1):40–7.
12. Schmitt R, Krmar RT, Kristoffersson A, et al. IgA nephropathy associated with a novel N-terminal mutation in factor H. *Eur J Pediatr*. 2011 Jan;170(1):107–10.
13. Hou W, Shi S, Zhou X, et al. Complement factor H variants are associated with microangiopathy lesions in IgA nephropathy. *Int Immunopharmacol*. 2022 Nov;112:109234.
14. Zhai YL, Meng SJ, Zhu L, et al. Rare Variants in the Complement Factor H-Related Protein 5 Gene Contribute to Genetic Susceptibility to IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2016 Sep;27(9):2894–905.
15. Guzzo G, Sadallah S, Fodstad H, et al. Case Report: A Rare Truncating Variant of the CFHR5 Gene in IgA Nephropathy. *Front Genet*. 2021;12:529236.

16. Tortajada A, Gutiérrez E, Goicoechea de Jorge E, et al. Elevated factor H-related protein 1 and factor H pathogenic variants decrease complement regulation in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2017 Oct;92(4):953–63.
17. Zhu L, Zhai YL, Wang FM, et al. Variants in Complement Factor H and Complement Factor H-Related Protein Genes, CFHR3 and CFHR1, Affect Complement Activation in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2015 May;26(5):1195–204.
18. Medjeral-Thomas NR, Lomax-Browne HJ, Beckwith H, et al. Circulating complement factor H-related proteins 1 and 5 correlate with disease activity in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2017 Oct;92(4):942–52.
19. Zhu L, Guo W yi, Shi S fang, et al. Circulating complement factor H-related protein 5 levels contribute to development and progression of IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2018 Jul;94(1):150–8.
20. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I: Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol.* 2015 Jun;6:262.
21. Kareem S, Jacob A, Mathew J, et al. Complement: Functions, location and implications. *Immunology.* 2023 May 24;imm.13663.
22. Conigliaro P, Triggianese P, Ballanti E, et al. Complement, infection, and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol.* 2019 Sep;31(5):532–41.
23. Kareem S, Jacob A, Mathew J, et al. Complement: Functions, location and implications. *Immunology.* 2023 May;170(2):180-92.
24. Kemper C, Ferreira VP, Paz JT, et al. Complement: The Road Less Traveled. *J Immunol.* 2023 Jan;210(2):119–25.
25. Kaufmann SHE. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat Immunol.* 2008 Jul;9(7):705–12.
26. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, et al. Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol.* 2015 May;6:257.
27. Zarantonello A, Revel M, Grunenwald A, Roumenina LT. C3-dependent effector functions of complement. *Immunol Rev.* 2023 Jan;313(1):120–38.
28. Java A, Kim AHJ. The Role of Complement in Autoimmune Disease-Associated Thrombotic Microangiopathy and the Potential for Therapeutics. *J Rheumatol.* 2023 Jun;50(6):730–40.
29. Pouw RB, Ricklin D. Tipping the balance: intricate roles of the complement system in disease and therapy. *Semin Immunopathol.* 2021 Dec;43(6):757–71.
30. Genest DS, Patriquin CJ, Licht C, et al. Renal Thrombotic Microangiopathy: A Review. *Am J Kidney Dis.* 2023 May;81(5):591–605.
31. Duval A, Frémeaux-Bacchi V. Complement biology for hematologists. *Am J Hematol.* 2023 May;98(S4).
32. Roumenina LT, Daugan MV, Petitprez F, et al. Context-dependent roles of complement in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2019 Dec;19(12):698–715.

33. Schmidt CQ, Smith RJH. Protein therapeutics and their lessons: Expect the unexpected when inhibiting the multi-protein cascade of the complement system. *Immunol Rev.* 2022 Nov 18;imr.13164.
34. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 2010 Sep;11(9):785–97.
35. West EE, Kemper C. Complosome: the intracellular complement system. *Nat Rev Nephrol.* 2023 Jul;19(7):426–39.
36. Kolev M, Friec GL, Kemper C. Complement: tapping into new sites and effector systems. *Nat Rev Immunol.* 2014 Dec;14(12):811–20.
37. Cho H. Complement regulation: physiology and disease relevance. *Korean J Pediatr.* 2015;58(7):239.
38. Nilsson B, Nilsson Ekdahl K. The tick-over theory revisited: Is C3 a contact-activated protein? *Immunobiology.* 2012 Nov;217(11):1106–10.
39. Verbovetski I, Bychkov H, Trahtemberg U, et al. Opsonization of Apoptotic Cells by Autologous iC3b Facilitates Clearance by Immature Dendritic Cells, Down-regulates DR and CD86, and Up-regulates CC Chemokine Receptor 7. *J Exp Med.* 2002 Dec 16;196(12):1553–61.
40. Martin M, Blom AM. Complement in removal of the dead - balancing inflammation. *Immunol Rev.* 2016 Nov;274(1):218–32.
41. Liu D, Niu ZX. The structure, genetic polymorphisms, expression and biological functions of complement receptor type 1 (CR1/CD35). *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2009 Dec;31(4):524–35.
42. Kawai M. Immune complex clearance by complement receptor type 1 in SLE. *Autoimmun Rev.* 2008 Dec;8(2):160–4.
43. Sacks SH. Complement fragments C3a and C5a: The salt and pepper of the immune response. *Eur J Immunol.* 2010 Mar;40(3):668–70.
44. Mastellos DC, Hajishengallis G, Lambris JD. A guide to complement biology, pathology and therapeutic opportunity. *Nat Rev Immunol.* 2023 Sep. In press.
45. Killick J, Morisse G, Sieger D, Astier AL. Complement as a regulator of adaptive immunity. *Semin Immunopathol.* 2018 Jan;40(1):37–48.
46. West EE, Kolev M, Kemper C. Complement and the Regulation of T Cell Responses. *Annu Rev Immunol.* 2018 Apr;36(1):309–38.
47. Lubbers R, Van Essen MF, Van Kooten C, Trouw LA. Production of complement components by cells of the immune system. *Clin Exp Immunol.* 2017 Apr;188(2):183–94.
48. West EE, Afzali B, Kemper C. Unexpected Roles for Intracellular Complement in the Regulation of Th1 Responses. In: *Advances in Immunology.* Elsevier 2018.p. 35–70.
49. Oikonomopoulou K, Ricklin D, Ward PA, Lambris JD. Interactions between coagulation and complement—their role in inflammation. *Semin Immunopathol.* 2012 Jan;34(1):151–65.
50. de Bont CM, Boelens WC, Pruijn GJM. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. *Cell Mol Immunol.* 2019 Jan;16(1):19–27.

51. Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ. Complement, thrombotic microangiopathy and disseminated intravascular coagulation. *J Intensive Care*. 2014 Dec;2(1):61.
52. Noris M, Galbusera M. The complement alternative pathway and hemostasis. *Immunol Rev*. 2022 Oct 22;imr.13150.
53. Bekassy Z, Lopatko Fagerström I, Bader M, Karpman D. Crosstalk between the renin–angiotensin, complement and kallikrein–kinin systems in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2022 Jul;22(7):411–28.
54. Arbore G, Kemper C, Kolev M. Intracellular complement – the complosome – in immune cell regulation. *Mol Immunol*. 2017 Sep;89:2–9.
55. Bohlsón SS, Garred P, Kemper C, Tenner AJ. Complement Nomenclature—Deconvoluted. *Front Immunol*. 2019 Jun;10:1308.
56. Wu X, Hutson I, Akk AM, et al. Contribution of Adipose-Derived Factor D/Adipsin to Complement Alternative Pathway Activation: Lessons from Lipodystrophy. *J Immunol*. 2018 Apr;200(8):2786–97.
57. Truedsson L. Classical pathway deficiencies - A short analytical review. *Mol Immunol*. 2015 Nov;68(1):14–9.
58. Li X, Ding F, Zhang X, Li B, Ding J. The Expression Profile of Complement Components in Podocytes. *Int J Mol Sci*. 2016 Mar;17(4):471.
59. Garred P, Genster N, Pilely K, et al. A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond. *Immunol Rev*. 2016 Nov;274(1):74–97.
60. Cortes C, Desler C, Mazzoli A, et al. The role of properdin and Factor H in disease. In: *Advances in Immunology*. Elsevier; 2022. p.1–90.
61. Harboe M, Johnson C, Nymo S, et al. Properdin binding to complement activating surfaces depends on initial C3b deposition. *Proc Natl Acad Sci* 2017 Jan;114(4).
62. Spitzer D, Mitchell LM, Atkinson JP, Hourcade DE. Properdin Can Initiate Complement Activation by Binding Specific Target Surfaces and Providing a Platform for De Novo Convertase Assembly. *J Immunol*. 2007 Aug;179(4):2600–8.
63. Lewis LA, Ram S. Meningococcal disease and the complement system. *Virulence*. 2014 Jan;5(1):98–126.
64. Xie CB, Jane-Wit D, Pober JS. Complement Membrane Attack Complex. *Am J Pathol*. 2020 Jun;190(6):1138–50.
65. Zarantonello A, Revel M, Grunenwald A, Roumenina LT. C3-dependent effector functions of complement. *Immunol Rev*. 2023 Jan;313(1):120–38.
66. Corcoran JA, Napier BA. C3aR plays both sides in regulating resistance to bacterial infections. *PLoS Pathog*. 2022 Aug;18(8):e1010657.
67. Gao S, Cui Z, Zhao MH. The Complement C3a and C3a Receptor Pathway in Kidney Diseases. *Front Immunol*. 2020;11:1875.

68. Ghosh M, Rana S. The anaphylatoxin C5a: Structure, function, signaling, physiology, disease, and therapeutics. *Int Immunopharmacol*. 2023 May;118:110081.
69. Schmidt CQ, Herbert AP, Hocking HG, Uhrín D, Barlow PN. Translational Mini-Review Series on Complement Factor H: Structural and functional correlations for factor H. *Clin Exp Immunol*. 2007 Dec;151(1):14–24.
70. Józsi M, Barlow PN, Meri S. Editorial: Function and Dysfunction of Complement Factor H. *Front Immunol*. 2022 Jan;12:831044.
71. Prosser BE, Johnson S, Roversi P, et al. Structural basis for complement factor H–linked age-related macular degeneration. *J Exp Med*. 2007 Oct;204(10):2277–83.
72. Pangburn MK, Atkinson MA, Meri S. Localization of the heparin-binding site on complement factor H. *J Biol Chem*. 1991;266(25):16847–53.
73. Khan S, Nan R, Gor J, et al. Bivalent and co-operative binding of complement factor H to heparan sulfate and heparin. *Biochem J*. 2012 Jun;444(3):417–28.
74. Osborne AJ, Nan R, Miller A, et al. Two distinct conformations of factor H regulate discrete complement-binding functions in the fluid phase and at cell surfaces. *J Biol Chem*. 2018 Nov;293(44):17166–87.
75. Sharma AK, Pangburn MK. Identification of three physically and functionally distinct binding sites for C3b in human complement factor H by deletion mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci*. 1996 Oct;93(20):10996–1001.
76. Jokiranta TS, Hellwage J, Koistinen V, et al. Each of the Three Binding Sites on Complement Factor H Interacts with a Distinct Site on C3b. *J Biol Chem*. 2000 Sep;275(36):27657–62.
77. Dunne OM, Gao X, Nan R, et al. A Dimerization Site at SCR-17/18 in Factor H Clarifies a New Mechanism for Complement Regulatory Control. *Front Immunol*. 2020;11:601895.
78. Gómez Delgado I, Corvillo F, Nozal P, et al. Complement Genetic Variants and FH Desialylation in *S. pneumoniae*-Haemolytic Uraemic Syndrome. *Front Immunol*. 2021;12:641656.
79. Boudhabhay I, Roumenina LT. Complement factor H: a guardian within? *Kidney Int*. 2021 Oct;100(4):747–9.
80. Okemefuna AI, Nan R, Miller A, et al. Complement factor H binds at two independent sites to C-reactive protein in acute phase concentrations. *J Biol Chem*. 2010 Jan;285(2):1053–65.
81. Perkins SJ, Nan R, Okemefuna AI, et al. Multiple Interactions of Complement Factor H with Its Ligands in Solution: A Progress Report. In: Lambris JD, Adamis AP, editors. *Inflammation and Retinal Disease: Complement Biology and Pathology*. New York, NY: Springer New York; 2010. p. 25–47.
82. Xu X, Lewis Marffy AL, Keightley A, et al. Group B Streptococcus Surface Protein β : Structural Characterization of a Complement Factor H-Binding Motif and Its Contribution to Immune Evasion. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2022 Mar;208(5):1232–47.
83. Poolpol K, Orth-Höller D, Speth C, et al. Interaction of Shiga toxin 2 with complement regulators of the factor H protein family. *Mol Immunol*. 2014 Mar;58(1):77–84.
84. Agarwal S, Ram S, Ngampasutadol J, et al. Factor H Facilitates Adherence of *Neisseria gonorrhoeae* to Complement Receptor 3 on Eukaryotic Cells. *J Immunol*. 2010 Oct;185(7):4344–53.

85. Chernyaeva L, Ratti G, Teirilä L, et al. Reduced binding of apoE4 to complement factor H promotes amyloid- β oligomerization and neuroinflammation. *EMBO Rep.* 2023 Jul;24(7):e56467.
86. Banerjee P, Veuskens BRJ, De Jorge EG, et al. Evaluating the clinical utility of measuring levels of factor H and the related proteins. *Mol Immunol.* 2022 Nov;151:166–82.
87. Dopler A, Guntau L, Harder MJ, et al. Self versus Nonself Discrimination by the Soluble Complement Regulators Factor H and FHL-1. *J Immunol.* 2019 Apr;202(7):2082–94.
88. Skerka C, Chen Q, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement factor H related proteins (CFHRs). *Mol Immunol.* 2013 Dec;56(3):170–80.
89. Cserhalmi M, Papp A, Brandus B, et al. Regulation of regulators: Role of the complement factor H-related proteins. *Semin Immunol.* 2019 Oct;45:101341.
90. Medjeral-Thomas N, Pickering MC. The complement factor H-related proteins. *Immunol Rev.* 2016 Nov;274(1):191–201.
91. García-Fernández J, Vilches-Arroyo S, Olavarrieta L, et al. Detection of Genetic Rearrangements in the Regulators of Complement Activation RCA Cluster by High-Throughput Sequencing and MLPA. *The Complement System.* New York, NY: Springer US; 2021 p. 159–78.
92. Cserhalmi M, Papp A, Brandus B, et al. Regulation of regulators: Role of the complement factor H-related proteins. *Semin Immunol.* 2019 Oct;45:101341.
93. Skerka C, Zipfel PF. Complement factor H related proteins in immune diseases. *Vaccine.* 2008 Dec;26:19–14.
94. Abarrategui-Garrido C, Martínez-Barricarte R, López-Trascasa M, et al. Characterization of complement factor H-related (CFHR) proteins in plasma reveals novel genetic variations of CFHR1 associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood.* 2009 Nov;114(19):4261–71.
95. Van Beek AE, Pouw RB, Brouwer MC, et al. Factor H-Related (FHR)-1 and FHR-2 Form Homo- and Heterodimers, while FHR-5 Circulates Only As Homodimer in Human Plasma. *Front Immunol.* 2017 Oct;8:1328.
96. Goicoechea de Jorge E, Caesar JJE, Malik TH, et al. Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 2013 Mar;110(12):4685–90.
97. McRae JL, Duthy TG, Griggs KM, et al. Human Factor H-Related Protein 5 Has Cofactor Activity, Inhibits C3 Convertase Activity, Binds Heparin and C-Reactive Protein, and Associates with Lipoprotein. *J Immunol.* 2005 May;174(10):6250–6.
98. Tortajada A, Yébenes H, Abarrategui-Garrido C, et al. C3 glomerulopathy-associated CFHR1 mutation alters FHR oligomerization and complement regulation. *J Clin Invest.* 2013 Jun;123(6):2434–46.
99. Goicoechea De Jorge E, Tortajada A, García SP, et al. Factor H Competitor Generated by Gene Conversion Events Associates with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2018 Jan;29(1):240–9.
100. Dopler A, Stibitzky S, Hevey R, et al. Deregulation of Factor H by Factor H-Related Protein 1 Depends on Sialylation of Host Surfaces. *Front Immunol.* 2021;12:615748.

101. Murphy B, Georgiou T, Machet D, et al. Factor H-related protein-5: A novel component of human glomerular immune deposits. *Am J Kidney Dis.* 2002 Jan;39(1):24–7.
102. Medjeral-Thomas NR, Moffitt H, Lomax-Browne HJ, et al. Glomerular Complement Factor H-Related Protein 5 (FHR5) Is Highly Prevalent in C3 Glomerulopathy and Associated With Renal Impairment. *Kidney Int Rep.* 2019 Oct;4(10):1387–400.
103. Renner B, Laskowski J, Poppelaars F, et al. Factor H related proteins modulate complement activation on kidney cells. *Kidney Int.* 2022 Dec;102(6):1331–44.
104. Papp A, Papp K, Uzonyi B, et al. Complement Factor H-Related Proteins FHR1 and FHR5 Interact With Extracellular Matrix Ligands, Reduce Factor H Regulatory Activity and Enhance Complement Activation. *Front Immunol.* 2022 Mar;13:845953.
105. Gale DP, Pickering MC. Regulating complement in the kidney: insights from CFHR5 nephropathy. *Dis Model Mech.* 2011 Nov;4(6):721–6.
106. Piras R, Valoti E, Alberti M, et al. CFH and CFHR structural variants in atypical Hemolytic Uremic Syndrome: Prevalence, genomic characterization and impact on outcome. *Front Immunol.* 2022;13:1011580.
107. Chen Q, Manzke M, Hartmann A, et al. Complement Factor H-Related 5-Hybrid Proteins Anchor Properdin and Activate Complement at Self-Surfaces. *J Am Soc Nephrol.* 2016 May;27(5):1413–25.
108. Garam N, Cserhalmi M, Prohászka Z, et al. FHR-5 Serum Levels and CFHR5 Genetic Variations in Patients With Immune Complex-Mediated Membranoproliferative Glomerulonephritis and C3-Glomerulopathy. *Front Immunol.* 2021 Sep;12:720183.
109. Deltas C, Gale D, Cook T, et al. C3 Glomerulonephritis/CFHR5 Nephropathy Is an Endemic Disease in Cyprus: Clinical and Molecular Findings in 21 Families. In: Lambris JD, Holers VM, Ricklin D, editors. *Complement Therapeutics.* New York, NY: Springer US; 2013. p. 189–96.
110. Medjeral-Thomas NR, Troldborg A, Constantinou N, et al. Progressive IgA Nephropathy Is Associated With Low Circulating Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease-3 (MASP-3) and Increased Glomerular Factor H-Related Protein-5 (FHR5) Deposition. *Kidney Int Rep.* 2018 Mar;3(2):426–38.
111. Heinen S, Hartmann A, Lauer N, et al. Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood.* 2009 Sep 17;114(12):2439–47.
112. Abarrategui-Garrido C, Martínez-Barricarte R, López-Trascasa M, et al. Characterization of complement factor H-related (CFHR) proteins in plasma reveals novel genetic variations of CFHR1 associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood.* 2009 Nov;114(19):4261–71.
113. Park CT, Wright SD. Plasma Lipopolysaccharide-binding Protein Is Found Associated with a Particle Containing Apolipoprotein A-I, Phospholipid, and Factor H-related Proteins. *J Biol Chem.* 1996 Jul;271(30):18054–60.
114. Eberhardt HU, Buhlmann D, Hortschansky P, et al. Human Factor H-Related Protein 2 (CFHR2) Regulates Complement Activation. Stover CM, editor. *PLoS ONE.* 2013 Nov 18;8(11):e78617.
115. Csincsi ÁI, Kopp A, Zöldi M, et al. Factor H-Related Protein 5 Interacts with Pentraxin 3 and the Extracellular Matrix and Modulates Complement Activation. *J Immunol.* 2015 May 15;194(10):4963–73.

116. Fritsche LG, Lauer N, Hartmann A, et al. An imbalance of human complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular degeneration (AMD). *Hum Mol Genet.* 2010 Dec;19(23):4694–704.
117. Eberhardt HU, Buhlmann D, Hortschansky P, et al. Human Factor H-Related Protein 2 (CFHR2) Regulates Complement Activation. Stover CM, editor. *PLoS ONE.* 2013 Nov;8(11):e78617.
118. Hellwege J, Jokiranta TS, Koistinen V, et al. Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin. *FEBS Lett.* 1999 Dec;462(3):345–52.
119. Rudnick RB, Chen Q, Stea ED, et al. FHR5 Binds to Laminins, Uses Separate C3b and Surface-Binding Sites, and Activates Complement on Malondialdehyde-Acetaldehyde Surfaces. *J Immunol.* 2018 Apr;200(7):2280–90.
120. Riley-Vargas RC, Gill DB, Kemper C, et al. CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol.* 2004 Sep;25(9):496–503.
121. Farkas I, Baranyi L, Ishikawa Y, et al. CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation by homologous C5b-8 as well as C5b-9. *J Physiol.* 2002 Mar;539(2):537–45.
122. Meri S, Morgan BP, Davies A, et al. Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology.* 1990 Sep;71(1):1–9.
123. Hadders MA, Bubeck D, Roversi P, et al. Assembly and Regulation of the Membrane Attack Complex Based on Structures of C5b6 and sC5b9. *Cell Rep.* 2012 Mar;1(3):200–7.
124. Poppelaars F, Thurman JM. Complement-mediated kidney diseases. *Mol Immunol.* 2020 Dec;128:175–87.
125. Dragon-Durey MA, Blanc C, Garnier A, et al. Anti-Factor H Autoantibody–Associated Hemolytic Uremic Syndrome: Review of Literature of the Autoimmune Form of HUS. *Semin Thromb Hemost.* 2010 Sep;36(06):633–40.
126. Gavriilaki E, de Latour RP, Risitano AM. Advancing therapeutic complement inhibition in hematologic diseases: PNH and beyond. *Blood.* 2022 Jun;139(25):3571–82.
127. Blasco M, Guillén-Olmos E, Diaz-Ricart M, Palomo M. Complement Mediated Endothelial Damage in Thrombotic Microangiopathies. *Front Med.* 2022 Apr;9:811504.
128. Loirat C, Frémeaux-Bacchi V. Atypical hemolytic uremic syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6(1):60.
129. Osborne AJ, Breno M, Borsa NG, et al. Statistical Validation of Rare Complement Variants Provides Insights into the Molecular Basis of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome and C3 Glomerulopathy. *J Immunol.* 2018 Apr;200(7):2464–78.
130. Fava A, Petri M. Systemic lupus erythematosus: Diagnosis and clinical management. *J Autoimmun.* 2019 Jan;96:1–13.
131. Fakhouri F, Schwotzer N, Frémeaux-Bacchi V. How I diagnose and treat atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood.* 2023 Mar;141(9):984–95.

132. Leon J, LeStang MB, Sberro-Soussan R, et al. Complement-driven hemolytic uremic syndrome. *Am J Hematol*. 2023 May;98 Suppl 4:S44–56.
133. Palma LMP, Sridharan M, Sethi S. Complement in Secondary Thrombotic Microangiopathy. *Kidney Int Rep*. 2021 Jan;6(1):11–23.
134. Schmidt CQ, Schrezenmeier H, Kavanagh D. Complement and the prothrombotic state. *Blood*. 2022 Mar;139(13):1954–72.
135. Fremeaux-Bacchi V, Fakhouri F, Garnier A, et al. Genetics and Outcome of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: A Nationwide French Series Comparing Children and Adults. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013 Apr;8(4):554–62.
136. Fakhouri F, Frémeaux-Bacchi V. Thrombotic microangiopathy in aHUS and beyond: clinical clues from complement genetics. *Nat Rev Nephrol*. 2021 Aug;17(8):543–53.
137. Rodríguez De Córdoba S. Genetic variability shapes the alternative pathway complement activity and predisposition to complement-related diseases. *Immunol Rev*. 2023 Jan;313(1):71–90.
138. Smith RJH, Appel GB, Blom AM, et al. C3 glomerulopathy — understanding a rare complement-driven renal disease. *Nat Rev Nephrol*. 2019 Mar;15(3):129–43.
139. Byrska-Bishop M, Evani US, Zhao X, et al. High coverage whole genome sequencing of the expanded 1000 Genomes Project cohort including 602 trios. *Cell* 2022 Sep;185(18):3426–3440.e19.
140. The 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Abecasis GR, Steering committee, Altshuler DM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015 Oct 1;526(7571):68–74.
141. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*. 2020 May;581(7809):434–43.
142. Triebwasser MP, Roberson EDO, Yu Y, et al. Rare Variants in the Functional Domains of Complement Factor H Are Associated With Age-Related Macular Degeneration. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2015 Oct;56(11):6873.
143. El Sissy C, Rosain J, Vieira-Martins P, et al. Clinical and Genetic Spectrum of a Large Cohort With Total and Sub-total Complement Deficiencies. *Front Immunol*. 2019;10:1936.
144. Duvvari MR, Saksens NTM, van de Ven JPH, et al. Analysis of rare variants in the CFH gene in patients with the cuticular drusen subtype of age-related macular degeneration. *Mol Vis*. 2015;21:285–92.
145. Fakhouri F, Zuber J, Frémeaux-Bacchi V, Loirat C. Haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet*. 2017 Aug;390(10095):681–96.
146. Marinozzi MC, Vergoz L, Rybkine T, et al. Complement Factor B Mutations in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome—Disease-Relevant or Benign? *J Am Soc Nephrol*. 2014 Sep;25(9):2053–65.
147. Roumenina LT, Jablonski M, Hue C, et al. Hyperfunctional C3 convertase leads to complement deposition on endothelial cells and contributes to atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2009 Sep;114(13):2837–45.
148. El Sissy C, Rosain J, Vieira-Martins P, et al. Clinical and Genetic Spectrum of a Large Cohort With Total and Sub-total Complement Deficiencies. *Front Immunol*. 2019 Aug;10:1936.

149. Meuleman MS, Vieira Martins P, El Sissy C, et al. Rare Variants in Complement Gene in C3 Glomerulopathy and Immunoglobulin-Mediated Membranoproliferative Glomerulonephritis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2023 Aug 24; in press.
150. Wong EKS, Hallam TM, Brocklebank V, et al. Functional Characterization of Rare Genetic Variants in the N-Terminus of Complement Factor H in aHUS, C3G, and AMD. *Front Immunol*. 2021 Jan;11:602284.
151. Piras R, Valoti E, Alberti M, et al. CFH and CFHR structural variants in atypical Hemolytic Uremic Syndrome: Prevalence, genomic characterization and impact on outcome. *Front Immunol*. 2023 Jan;13:1011580.
152. Moore I, Strain L, Pappworth I, et al. Association of factor H autoantibodies with deletions of CFHR1, CFHR3, CFHR4, and with mutations in CFH, CFI, CD46, and C3 in patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2010 Jan;115(2):379–87.
153. Piras R, Breno M, Valoti E, et al. CFH and CFHR Copy Number Variations in C3 Glomerulopathy and Immune Complex-Mediated Membranoproliferative Glomerulonephritis. *Front Genet*. 2021 Jun;12:670727.
154. Piras R, Valoti E, Alberti M, et al. CFH and CFHR structural variants in atypical Hemolytic Uremic Syndrome: Prevalence, genomic characterization and impact on outcome. *Front Immunol*. 2023 Jan;13:1011580.
155. Zipfel PF, Wiech T, Stea ED, Skerka C. CFHR Gene Variations Provide Insights in the Pathogenesis of the Kidney Diseases Atypical Hemolytic Uremic Syndrome and C3 Glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol*. 2020 Feb;31(2):241–56.
156. Józsi M, Tortajada A, Uzonyi B, et al. Factor H-related proteins determine complement-activating surfaces. *Trends Immunol*. 2015 Jun;36(6):374–84.
157. Malik TH, Gitterman DP, Lavin DP, et al. Gain-of-function factor H-related 5 protein impairs glomerular complement regulation resulting in kidney damage. *Proc Natl Acad Sci*. 2021 Mar;118(13):e2022722118.
158. Bernabéu-Herrero ME, Jiménez-Alcázar M, Anter J, et al. Complement factor H, FHR-3 and FHR-1 variants associate in an extended haplotype conferring increased risk of atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol*. 2015 Oct;67(2):276–86.
159. Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci*. 2005 May;102(20):7227–32.
160. Harrison RES, Morikis D. Molecular Mechanisms of Macular Degeneration Associated with the Complement Factor H Y402H Mutation. *Biophys J*. 2019 Jan;116(2):215–26.
161. Tortajada A, Montes T, Martínez-Barricarte R, et al. The disease-protective complement factor H allotypic variant Ile62 shows increased binding affinity for C3b and enhanced cofactor activity. *Hum Mol Genet*. 2009 Sep 15;18(18):3452–61.
162. Harris CL, Heurich M, Cordoba SRD, Morgan BP. The complotype: dictating risk for inflammation and infection. *Trends Immunol*. 2012 Oct;33(10):513–21.

163. Arjona E, Huerta A, Goicoechea De Jorge E, Rodríguez De Córdoba S. Familial risk of developing atypical hemolytic-uremic syndrome. *Blood*. 2020 Sep;136(13):1558–61.
164. Esparza-Gordillo J, Jorge EGD, Buil A, et al. Predisposition to atypical hemolytic uremic syndrome involves the concurrence of different susceptibility alleles in the regulators of complement activation gene cluster in 1q32. *Hum Mol Genet*. 2005 Mar;14(5):703–12.
165. Heurich M, Martínez-Barricarte R, Francis NJ, et al. Common polymorphisms in C3, factor B, and factor H collaborate to determine systemic complement activity and disease risk. *Proc Natl Acad Sci*. 2011 May;108(21):8761–6.
166. Montes T, Tortajada A, Morgan BP, et al. Functional basis of protection against age-related macular degeneration conferred by a common polymorphism in complement factor B. *Proc Natl Acad Sci*. 2009 Mar;106(11):4366–71.
167. Heurich M, Martínez-Barricarte R, Francis NJ, et al. Common polymorphisms in C3, factor B, and factor H collaborate to determine systemic complement activity and disease risk. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May;108(21):8761–6.
168. Yeo SC, Trimachi H, Barratt J. IgA Nephropathy in Adults and Children. In: Craig JC, Molony DA, Strippoli GFM, editors. *Evidence-Based Nephrology*. Wiley; 2022.p.254–71.
169. Willey CJ, Coppo R, Schaefer F, et al. The incidence and prevalence of IgA nephropathy in Europe. *Nephrol Dial Transplant*. 2023 May 8;gfad082.
170. Zhang Z, Zhang Y, Zhang H. IgA Nephropathy: A Chinese Perspective. *Glomerular Dis*. 2021 Oct;2(1):30–41.
171. Wyatt RJ, Julian BA. IgA Nephropathy. *N Engl J Med*. 2013 Jun;368(25):2402–14.
172. Zhang H, Barratt J. Is IgA nephropathy the same disease in different parts of the world? *Semin Immunopathol*. 2021 Oct;43(5):707–15.
173. Yeo SC, Goh SM, Barratt J. Is immunoglobulin A nephropathy different in different ethnic populations? *Nephrology*. 2019 May;nep.13592.
174. Geddes CC. A tricontinental view of IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Aug;18(8):1541–8.
175. Liu ZH. Nephrology in China. *Nat Rev Nephrol*. 2013 Sep;9(9):523–8.
176. D’Amico G. Natural history of idiopathic IgA nephropathy and factors predictive of disease outcome. *Semin Nephrol*. 2004 May;24(3):179–96.
177. D’Amico G. Natural history of idiopathic IgA nephropathy: Role of clinical and histological prognostic factors. *Am J Kidney Dis*. 2000 Aug;36(2):227–37.
178. Bartosik LP, Lajoie G, Sugar L, Cattran DC. Predicting progression in IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 2001 Oct;38(4):728–35.
179. Gutiérrez E, Zamora I, Ballarín JA, et al. Long-Term Outcomes of IgA Nephropathy Presenting with Minimal or No Proteinuria. *J Am Soc Nephrol*. 2012 Oct;23(10):1753–60.
180. Szeto CC, Lai FMM, To KF, et al. The natural history of immunoglobulin a nephropathy among patients with hematuria and minimal proteinuria. *Am J Med*. 2001 Apr;110(6):434–7.

181. Lv J, Yang Y, Zhang H, et al. Prediction of Outcomes in Crescentic IgA Nephropathy in a Multicenter Cohort Study. *J Am Soc Nephrol*. 2013 Dec;24(12):2118–25.
182. Trimarchi H, Haas M, Coppo R. Crescents and IgA Nephropathy: A Delicate Marriage. *J Clin Med*. 2022 Jun;11(13):3569.
183. Asaba K, Tojo A, Onozato ML, et al. Long-term Renal Prognosis of IgA Nephropathy with Therapeutic Trend Shifts. *Intern Med*. 2009;48(11):883–90.
184. Le W, Liang S, Hu Y, et al. Long-term renal survival and related risk factors in patients with IgA nephropathy: results from a cohort of 1155 cases in a Chinese adult population. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 Apr;27(4):1479–85.
185. Pitcher D, Braddon F, Hendry B, et al. Long-Term Outcomes in IgA Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2023 Jun;18(6):727-738.
186. Kawabe M, Yamamoto I. Current Status and Perspectives on Recurrent IgA Nephropathy after Kidney Transplantation. *Nephron*. 2023 Mar;1–5.
187. Trimarchi H, Barratt J, Cattran DC, et al. Oxford Classification of IgA nephropathy 2016: an update from the IgA Nephropathy Classification Working Group. *Kidney Int*. 2017 May;91(5):1014–21.
188. Thompson A, Carroll K, A. Inker L, et al. Proteinuria Reduction as a Surrogate End Point in Trials of IgA Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019 Mar;14(3):469–81.
189. Cheung CK, Barratt J. Biomarkers to Predict Progression in IgA Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019 Oct;14(10):1421–3.
190. Coppo R, D’Amico G. Factors predicting progression of IgA nephropathies. *J Nephrol*. 2005;18(5):503–12.
191. Weng M, Lin J, Chen Y, et al. Time-Averaged Hematuria as a Prognostic Indicator of Renal Outcome in Patients with IgA Nephropathy. *J Clin Med*. 2022 Nov;11(22):6785.
192. Trimarchi H, Barratt J, Cattran DC, et al. Oxford Classification of IgA nephropathy 2016: an update from the IgA Nephropathy Classification Working Group. *Kidney Int*. 2017 May;91(5):1014–21.
193. Maillard N, Mariat C. The Oxford Classification for immunoglobulin A nephropathy: a common language blurred by dissonant voices. *Nephrol Dial Transplant*. 2019 Oct;34(10):1617–8.
194. Coppo R, Troyanov S, Camilla R, et al. The Oxford IgA nephropathy clinicopathological classification is valid for children as well as adults. *Kidney Int*. 2010 May;77(10):921–7.
195. Roberts ISD. Oxford classification of immunoglobulin A nephropathy: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2013 May;22(3):281–6.
196. Chakera A, MacEwen C, Bellur SS, et al. Prognostic value of endocapillary hypercellularity in IgA nephropathy patients with no immunosuppression. *J Nephrol*. 2016 Jun;29(3):367–75.
197. Jullien P, Laurent B, Berthoux F, et al. Repeat renal biopsy improves the Oxford classification-based prediction of immunoglobulin A nephropathy outcome. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2020 Jul;35(7):1179–86.
198. Bellur SS, Troyanov S, Cook HT, on behalf of a Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the Renal Pathology Society. Immunostaining findings in IgA nephropathy:

correlation with histology and clinical outcome in the Oxford classification patient cohort. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Aug;26(8):2533–6.

199. Yu B, Shi S, Hou W, et al. Evaluation of the Oxford classification in immunoglobulin A vasculitis with nephritis: a cohort study and meta-analysis. *Clin Kidney J*. 2021 Feb;14(2):516–25.

200. Suzuki H, Kiryluk K, Novak J, et al. The Pathophysiology of IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Oct;22(10):1795–803.

201. Kiryluk K, Novak J. The genetics and immunobiology of IgA nephropathy. *J Clin Invest*. 2014 Jun;124(6):2325–32.

202. Suzuki H, Novak J. IgA glycosylation and immune complex formation in IgAN. *Semin Immunopathol*. 2021 Oct;43(5):669–78.

203. Nihei Y, Suzuki H, Suzuki Y. Current understanding of IgA antibodies in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Front Immunol*. 2023 Apr;14:1165394.

204. Saha MK, Julian BA, Novak J, Rizk DV. Secondary IgA nephropathy. *Kidney Int*. 2018 Oct;94(4):674–81.

205. Wang M, Lv J, Zhang X, et al. Secondary IgA Nephropathy Shares the Same Immune Features With Primary IgA Nephropathy. *Kidney Int Rep*. 2020 Feb;5(2):165–72.

206. Gentile M, Sanchez-Russo L, Riella LV, et al. Immune abnormalities in IgA nephropathy. *Clin Kidney J*. 2023 Jun;16(7):1059–70.

207. Knoppova B, Reily C, Maillard N, et al. The Origin and Activities of IgA1-Containing Immune Complexes in IgA Nephropathy. *Front Immunol*. 2016 Apr 12;7.

208. Hansen IS, Baeten DLP, Den Dunnen J. The inflammatory function of human IgA. *Cell Mol Life Sci*. 2019 Mar;76(6):1041–55.

209. Suzuki H, Raska M, Yamada K, Moldoveanu Z, Julian BA, Wyatt RJ, et al. Cytokines alter IgA1 O-glycosylation by dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc-II enzymes. *J Biol Chem*. 2014 Feb;289(8):5330–9.

210. Lomax-Browne HJ, Visconti A, Pusey CD, et al. IgA1 Glycosylation Is Heritable in Healthy Twins. *J Am Soc Nephrol*. 2017 Jan;28(1):64–8.

211. Kiryluk K, Li Y, Moldoveanu Z, Suzuki H, et al. GWAS for serum galactose-deficient IgA1 implicates critical genes of the O-glycosylation pathway. Myers AJ, editor. *PLOS Genet*. 2017 Feb;13(2):e1006609.

212. Oortwijn BD, van der Boog PJM, Roos A, et al. A pathogenic role for secretory IgA in IgA nephropathy. *Kidney Int*. 2006 Apr;69(7):1131–8.

213. Oortwijn BD, Rastaldi MP, Roos A, et al. Demonstration of secretory IgA in kidneys of patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Jun;22(11):3191–5.

214. Gharavi AG, Moldoveanu Z, Wyatt RJ, et al. Aberrant IgA1 Glycosylation Is Inherited in Familial and Sporadic IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2008 May;19(5):1008–14.

215. Dotz V, Visconti A, Lomax-Browne HJ, et al. O- and N-Glycosylation of Serum Immunoglobulin A is Associated with IgA Nephropathy and Glomerular Function. *J Am Soc Nephrol*. 2021 Oct;32(10):2455–65.
216. Xie X, Gao L, Liu P, et al. Propensity of IgA to self-aggregate via tailpiece cysteine-471 and treatment of IgA nephropathy using cysteamine. *JCI Insight*. 2021 Oct;6(19):e150551.
217. Matsumoto Y, Aryal RP, Heimbarg-Molinario J, et al. Identification and characterization of circulating immune complexes in IgA nephropathy. *Sci Adv*. 2022 Oct 28;8(43):eabm8783.
218. Nihei Y, Haniuda K, Higashiyama M, et al. Identification of IgA autoantibodies targeting mesangial cells redefines the pathogenesis of IgA nephropathy. *Sci Adv*. 2023 Mar;9(12):eadd6734.
219. Thurman JM, Harrison RA. The susceptibility of the kidney to alternative pathway activation—A hypothesis. *Immunol Rev*. 2023 Jan;313(1):327–38.
220. Shi M, Ouyang Y, Yang M, et al. IgA Nephropathy Susceptibility Loci and Disease Progression. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018 Sep;13(9):1330–8.
221. Kiryluk K, Novak J. The genetics and immunobiology of IgA nephropathy. *J Clin Invest*. 2014 Jun;124(6):2325–32.
222. Gharavi AG, Kiryluk K, Choi M, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nat Genet*. 2011 Apr;43(4):321–7.
223. Kiryluk K, Li Y, Scolari F, et al. Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens. *Nat Genet*. 2014 Nov;46(11):1187–96.
224. Shi D, Zhong Z, Wang M, et al. Identification of susceptibility locus shared by IgA nephropathy and inflammatory bowel disease in a Chinese Han population. *J Hum Genet*. 2020 Mar;65(3):241–9.
225. Barratt J, Lafayette RA, Zhang H, et al. IgA nephropathy: the lectin pathway and implications for targeted therapy. *Kidney Int*. 2023 May;S0085253823003952.
226. Abe K, Miyazaki M, Koji T, et al. Intraglomerular Synthesis of Complement C3 and Its Activation Products in IgA Nephropathy. *Nephron*. 2001;87(3):231–9.
227. Schmitt R, Ståhl A, Olin AI, et al. The Combined Role of Galactose-Deficient IgA1 and Streptococcal IgA-Binding M Protein in Inducing IL-6 and C3 Secretion from Human Mesangial Cells: Implications for IgA Nephropathy. *J Immunol*. 2014 Jul;193(1):317–26.
228. Barratt J, Lafayette RA, Zhang H, et al. IgA nephropathy: the lectin pathway and implications for targeted therapy. *Kidney Int*. 2023 May;S0085253823003952.
229. Chiu YL, Lin WC, Shu KH, et al. Alternative Complement Pathway Is Activated and Associated with Galactose-Deficient IgA1 Antibody in IgA Nephropathy Patients. *Front Immunol*. 2021 Jun;12:638309.
230. Kim SJ, Koo HM, Lim BJ, et al. Decreased Circulating C3 Levels and Mesangial C3 Deposition Predict Renal Outcome in Patients with IgA Nephropathy. Moura IC, editor. *PLoS ONE*. 2012 Jul;7(7):e40495.
231. Chen P, Yu G, Zhang X, et al. Plasma Galactose-Deficient IgA1 and C3 and CKD Progression in IgA Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019 Oct;14(10):1458–65.

232. Itami H, Hara S, Samejima K, Tsushima H, et al. Complement activation is associated with crescent formation in IgA nephropathy. *Virchows Arch.* 2020 Apr;477(4):565-572.
233. Sethi S, Palma LMP, Theis JD, Fervenza FC. Proteomic Analysis of Complement Proteins in Glomerular Diseases. *Kidney Int Rep.* 2023 Apr;8(4):827–36.
234. Hiemstra PS, Gorter A, Stuurman ME, et al Activation of the alternative pathway of complement by human serum IgA. *Eur J Immunol.* 1987;17(3):321–6.
235. Medjeral-Thomas NR, O’Shaughnessy MM. Complement in IgA Nephropathy: The Role of Complement in the Pathogenesis, Diagnosis, and Future Management of IgA Nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2020 Mar;27(2):111–9.
236. Sethi S, Palma LMP, Theis JD, Fervenza FC. Proteomic Analysis of Complement Proteins in Glomerular Diseases. *Kidney Int Rep.* 2023 Apr;8(4):827–36.
237. Kaga H, Matsumura H, Saito A, et al. Comparative proteomic analysis of glomerular proteins in IgA nephropathy and IgA vasculitis with nephritis. *Clin Proteomics.* 2023 Dec;20(1):21.
238. Roos A, Bouwman LH, van Gijlswijk-Janssen DJ, et al. Human IgA Activates the Complement System Via the Mannan-Binding Lectin Pathway. *J Immunol.* 2001 Sep;167(5):2861–8.
239. Trimarchi H, Coppo R. Glomerular endothelial activation, C4d deposits and microangiopathy in immunoglobulin A nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2021 Mar;36(4):581–6.
240. Wei M, Guo W yi, Xu B yang, et al. Collectin11 and Complement Activation in IgA Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2021 Dec;16(12):1840–50.
241. Roos A, Rastaldi MP, Calvaresi N, et al. Glomerular Activation of the Lectin Pathway of Complement in IgA Nephropathy Is Associated with More Severe Renal Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Jun;17(6):1724–34.
242. Chua JS, Zandbergen M, Wolterbeek R, et al. Complement-mediated microangiopathy in IgA nephropathy and IgA vasculitis with nephritis. *Mod Pathol.* 2019 Aug;32(8):1147–57.
243. Shi B, Wang L, Mou S, et al. Identification of mannose-binding lectin as a mechanism in progressive immunoglobulin A nephropathy. *Int J Clin Exp Pathol* 2015 Feb;8(2):1889-99.
244. Shin DH, Lim BJ, Han IM, et al. Glomerular IgG deposition predicts renal outcome in patients with IgA nephropathy. *Mod Pathol.* 2016 Jul;29(7):743–52.
245. Rizk DV, Saha MK, Hall S, et al. Glomerular Immunodeposits of Patients with IgA Nephropathy Are Enriched for IgG Autoantibodies Specific for Galactose-Deficient IgA1. *J Am Soc Nephrol.* 2019 Oct;30(10):2017–26.
246. Seifert L, Zahner G, Meyer-Schwesinger C, et al. The classical pathway triggers pathogenic complement activation in membranous nephropathy. *Nat Commun.* 2023 Jan;14(1):473.
247. Takahata A, Arai S, Hiramoto E, et al. Crucial Role of AIM/CD5L in the Development of Glomerular Inflammation in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2020 Sep;31(9):2013–24.
248. Chen X, Li M, Zhu S, et al. Proteomic profiling of IgA nephropathy reveals distinct molecular prognostic subtypes. *iScience.* 2023 Mar;26(3):105961.

249. Gao S, Cui Z, Zhao M hui. Complement C3a and C3a Receptor Activation Mediates Podocyte Injuries in the Mechanism of Primary Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2022 Sep;33(9):1742–56.
250. Hu X, Feng J, Deng S, et al. Anaphylatoxins enhance Th9 cell recruitment via the CCL20-CCR6 axis in IgA nephropathy. *J Nephrol*. 2020 Oct;33(5):1027–36.
251. Xu L, Yang HC, Hao CM, et al. Podocyte number predicts progression of proteinuria in IgA nephropathy. *Mod Pathol*. 2010 Sep;23(9):1241–50.
252. Zhang Y, Yan X, Zhao T, et al. Targeting C3a/C5a receptors inhibits human mesangial cell proliferation and alleviates immunoglobulin A nephropathy in mice. *Clin Exp Immunol*. 2017 Jun;189(1):60–70.
253. Koopman JJE, van Essen MF, Rennke HG, et al. Deposition of the Membrane Attack Complex in Healthy and Diseased Human Kidneys. *Front Immunol*. 2021 Feb 11;11:599974.
254. Qiu W, Zhou J, Zhu G, et al. Sublytic C5b-9 triggers glomerular mesangial cell apoptosis via XAF1 gene activation mediated by p300-dependent IRF-1 acetylation. *Cell Death Dis*. 2014 Apr;5(4):e1176–e1176.
255. Zhu G, Qiu W, Li Y, et al. Sublytic C5b-9 Induces Glomerular Mesangial Cell Apoptosis through the Cascade Pathway of MEKK2–p38 MAPK–IRF-1–TRADD–Caspase 8 in Rat Thy-1 Nephritis. *J Immunol*. 2017;198(3):1104–18.
256. Xia L, Liu Y, Zhang Z, et al. Modulation of IL-6 Expression by KLF4-Mediated Transactivation and PCAF-Mediated Acetylation in Sublytic C5b-9-Induced Rat Glomerular Mesangial Cells. *Front Immunol*. 2022 Jan;12:779667.
257. Stangou M, Alexopoulos E, Pantzaki A, et al. C5b-9 glomerular deposition and tubular $\alpha 3 \beta 1$ - integrin expression are implicated in the development of chronic lesions and predict renal function outcome in immunoglobulin A nephropathy. *Scand J Urol Nephrol*. 2008 Jan;42(4):373–80.
258. Alexopoulos E, Papagianni A, Papadimitriou M. The pathogenetic significance of C5b-9 in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 1995;10(7):1166–72.
259. Yu BC, Park JH, Lee KH, et al. Urinary C5b-9 as a Prognostic Marker in IgA Nephropathy. *J Clin Med*. 2022 Feb;11(3):820.
260. Kiryluk K, Li Y, Scolari F, et al. Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens. *Nat Genet*. 2014 Nov;46(11):1187–96.
261. Shi DC, Feng SZ, Zhong Z, et al. Functional variant rs12614 in CFB confers a low risk of IgA nephropathy by attenuating complement alternative pathway activation in Han Chinese. *Front Immunol*. 2022 Oct 13;13:973169.
262. Hou W, Shi S, Zhou X, et al. Complement factor H variants are associated with microangiopathy lesions in IgA nephropathy. *Int Immunopharmacol*. 2022 Nov;112:109234.
263. Ouyang Y, Zhu L, Shi M, et al. A Rare Genetic Defect of MBL2 Increased the Risk for Progression of IgA Nephropathy. *Front Immunol*. 2019 Mar;10:537.

264. Ibrahim ST, Chinnadurai R, Ali I, et al. Genetic polymorphism in C3 is associated with progression in chronic kidney disease (CKD) patients with IgA nephropathy but not in other causes of CKD. Remuzzi G, editor. PLOS ONE. 2020 Jan;15(1):e0228101.
265. Pesce F, Stea ED, Divella C, et al. DelCFHR3-1 influences graft survival in transplant patients with IgA nephropathy via complement-mediated cellular senescence. *Am J Transplant*. 2021 Feb;21(2):838–45.
266. Jullien P, Laurent B, Claisse G, et al. Deletion Variants of CFHR1 and CFHR3 Associate with Mesangial Immune Deposits but Not with Progression of IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2018 Feb;29(2):661–9.
267. Kang Y, Xu B, Shi S, et al. Mesangial C3 Deposition, Complement-Associated Variant, and Disease Progression in IgA Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2023 Aug. In press.
268. Liu Y, Li H, Yu H, et al. Sialylation of IgG inhibits the formation of galactose-deficient IgA1-containing immune complexes and protects mesangial cells from injury in IgA nephropathy. *BMC Nephrol*. 2022 Dec;23(1):25.
269. Li J, Guo L, Shi S, et al. The Role of Complement in Microangiopathic Lesions of IgA Nephropathy. *Kidney International Reports*. 2022 Jun;7(6):1219–28.
270. Nakamura H, Anayama M, Makino M, et al. Atypical Hemolytic Uremic Syndrome Associated with Complement Factor H Mutation and IgA Nephropathy: A Case Report Successfully Treated with Eculizumab. *Nephron*. 2018;138(4):324–7.
271. Manenti L, Gnappi E, Vaglio A, et al. Atypical haemolytic uraemic syndrome with underlying glomerulopathies. A case series and a review of the literature. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2013 Sep;28(9):2246–59.
272. Manenti L, Rossi GM, Pisani I, et al. IgA nephropathy and atypical hemolytic uremic syndrome: a case series and a literature review. *J Nephrol*. 2022 May;35(4):1091–100.
273. Cavero T, Auñón P, Caravaca-Fontán F, Tet al. Thrombotic microangiopathy in patients with malignant hypertension. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2023 May;38(5):1217–26.
274. Zhu L, Zhai YL, Wang FM, et al. Variants in Complement Factor H and Complement Factor H-Related Protein Genes, CFHR3 and CFHR1, Affect Complement Activation in IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2015 May;26(5):1195–204.
275. Jia M, Zhu L, Zhai Y, et al. Variation in complement factor H affects complement activation in immunoglobulin A vasculitis with nephritis. *Nephrology*. 2020 Jan;25(1):40–7.
276. Niu X, Zhang S, Shao C, et al. Urinary complement proteins in IgA nephropathy progression from a relative quantitative proteomic analysis. *PeerJ*. 2023 Apr;11:e15125.
277. Wang D, Wu C, Chen S, et al. Urinary complement profile in IgA nephropathy and its correlation with the clinical and pathological characteristics. *Front Immunol*. 2023 Mar;14:1117995.
278. Murphy B, Georgiou T, Machet D, et al. Factor H-related protein-5: A novel component of human glomerular immune deposits. *Am J Kidney Dis*. 2002 Jan;39(1):24–7.

279. Paunas TIF, Finne K, Leh S, et al. Glomerular abundance of complement proteins characterized by proteomic analysis of laser-captured microdissected glomeruli associates with progressive disease in IgA nephropathy. *Clin Proteomics*. 2017 Dec;14(1):30.
280. Kiryluk K, Li Y, Scolari F, et al. Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens. *Nat Genet*. 2014 Nov;46(11):1187–96.
281. Kiryluk K, Li Y, Sanna-Cherchi S, Rohanizadegan M, Suzuki H, Eitner F, et al. Geographic Differences in Genetic Susceptibility to IgA Nephropathy: GWAS Replication Study and Geospatial Risk Analysis. McCarthy MI, editor. *PLoS Genet*. 2012 Jun;8(6):e1002765.
282. Cavero T, Auñón P, Caravaca-Fontán F, et al. Thrombotic microangiopathy in patients with malignant hypertension. *Nephrol Dial Transplant*. 2023 May;38(5):1217–26.
283. Li J, Guo L, Shi S, et al. The Role of Complement in Microangiopathic Lesions of IgA Nephropathy. *Kidney Int Rep*. 2022 Jun;7(6):1219–28.
284. Glasscock RJ. IgA Nephropathy: “The Times They Are a-Changin’”. *Glomerular Dis*. 2021 Apr 14;2(1):4–14.
285. Barratt J, Lafayette R, Kristensen J, et al. Results from part A of the multi-center, double-blind, randomized, placebo-controlled NefigArd trial, which evaluated targeted-release formulation of budesonide for the treatment of primary immunoglobulin A nephropathy. *Kidney Int*. 2023 Feb;103(2):391–402.
286. Hou FF, Xie D, Wang J, et al. Effectiveness of Mycophenolate Mofetil Among Patients With Progressive IgA Nephropathy: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open*. 2023 Feb;6(2):e2254054.
290. Vieira-Martins P, El Sissy C, Bordereau P, et al. Defining the genetics of thrombotic microangiopathies. *Transfus Apher Sci*. 2016 Apr;54(2):212–9.
291. Timmermans SAMEG, Van Doorn DPC, Van Paassen. P. Rare variants in complement genes may not be that rare after all. *Kidney Int Rep*. 2023 Aug;S2468024923014547.
292. Meuleman MS, Duval A, Fremeaux-Bacchi V, et al. Ex Vivo Test for Measuring Complement Attack on Endothelial Cells: From Research to Bedside. *Front Immunol*. 2022;13:860689.
293. Roos A, Bouwman LH, van Gijlswijk-Janssen DJ, et al. Human IgA Activates the Complement System Via the Mannan-Binding Lectin Pathway. *J Immunol*. 2001 Sep;167(5):2861–8.
294. Byrska-Bishop M, Evani US, Zhao X, et al. High-coverage whole-genome sequencing of the expanded 1000 Genomes Project cohort including 602 trios. *Cell*. 2022 Sep;185(18):3426–3440.e19.
295. Guo W yi, Liu Q zhen, Zhu L, et al. Coding and Noncoding Variants in CFH Act Synergistically for Complement Activation in Immunoglobulin A Nephropathy. *Am J Med Sci*. 2018 Aug;356(2):114–20.
296. Ibrahim ST, Chinnadurai R, Ali I, et al. Genetic polymorphism in C3 is associated with progression in chronic kidney disease (CKD) patients with IgA nephropathy but not in other causes of CKD. *PLoS One*. 2020;15(1):e0228101.
297. Das S, Forer L, Schönherr S, et al. Next-generation genotype imputation service and methods. *Nat Genet*. 2016 Oct;48(10):1284–7.
298. Chen S, Francioli LC, Goodrich JK, et al. A genome-wide mutational constraint map quantified from variation in 76,156 human genomes. *Genetics*; 2022 Mar;03.20.485034.

299. Rentzsch P, Schubach M, Shendure J, Kircher M. CADD-Splice—improving genome-wide variant effect prediction using deep learning-derived splice scores. *Genome Med.* 2021 Dec;13(1):31.
300. Sim NL, Kumar P, Hu J, et al. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jul 1;40(W1):W452–7.
301. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010 Apr;7(4):248–9.
302. Merinero HM, García SP, García-Fernández J, et al. Complete functional characterization of disease-associated genetic variants in the complement factor H gene. *Kidney Int.* 2018 Feb;93(2):470–81.
303. Hashimoto A, Suzuki Y, Suzuki H, et al. Determination of Severity of Murine IgA Nephropathy by Glomerular Complement Activation by Aberrantly Glycosylated IgA and Immune Complexes. *Am J Pathol.* 2012 Oct;181(4):1338–47.
304. Chen P, Yu G, Zhang X, Xie X, et al. Plasma Galactose-Deficient IgA1 and C3 and CKD Progression in IgA Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2019 Oct;14(10):1458–65.
305. Mizerska-Wasiak M, Małydyk J, Rybi-Szumińska A, et al. Relationship between serum IgA/C3 ratio and severity of histological lesions using the Oxford classification in children with IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2015 Jul;30(7):1113–20.
306. Mizerska-Wasiak M. How to take advantage of easily available biomarkers in patients with IgA nephropathy: IgA and C3 in serum and kidney biopsies. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2023 May;38(5):1439–48.
307. Bi TD, Zheng JN, Zhang JX, et al. Serum complement C4 is an important prognostic factor for IgA nephropathy: a retrospective study. *BMC Nephrol.* 2019 Jul;20(1):244.
308. Chiu YL, Lin WC, Shu KH, et al. Alternative Complement Pathway Is Activated and Associated with Galactose-Deficient IgA1 Antibody in IgA Nephropathy Patients. *Front Immunol.* 2021 Jun;12:638309.
309. Itami H, Hara S, Samejima K, et al. Complement activation is associated with crescent formation in IgA nephropathy. *Virchows Arch.* 2020 Oct;477(4):565–72.
310. Juan YT, Chiang WC, Lin WC, et al. Associations between Biomarkers of Complement Activation, Galactose-Deficient IgA1 Antibody and the Updated Oxford Pathology Classification of IgA Nephropathy. *J Clin Med.* 2022 Jul;11(14):4231.
311. Sogabe A, Uto H, Kanmura S, et al. Correlation of serum levels of complement C4a desArg with pathologically estimated severity of glomerular lesions and mesangial hypercellularity scores in patients with IgA nephropathy. *Int J Mol Med.* 2013 Aug;32(2):307–14.
312. Zwirner J, Burg M, Schulze M, et al. Activated complement C3: A potentially novel predictor of progressive IgA nephropathy. *Kidney Int.* 1997 Apr;51(4):1257–64.
313. Liu L, Zhang Y, Duan X, et al. C3a, C5a Renal Expression and Their Receptors are Correlated to Severity of IgA Nephropathy. *J Clin Immunol.* 2014 Feb;34(2):224–32.

314. Abou-Ragheb HHA, Williams AJ, Brown CB, Milford-Ward A. Plasma Levels of the Anaphylatoxins C3a and C4a in Patients with IgA Nephropathy/Henoch-Schönlein Nephritis. *Nephron*. 1992;62(1):22–6.
315. Li J, Guo L, Shi S, Zhou X, et al. The Role of Complement in Microangiopathic Lesions of IgA Nephropathy. *Kidney Int Rep*. 2022 Jun;7(6):1219–28.
316. Janssen U, Bahlmann F, Köhl J, et al. Activation of the acute phase response and complement C3 in patients with IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 2000 Jan;35(1):21–8.
317. Chiu YL, Lin WC, Shu KH, et al. Alternative Complement Pathway Is Activated and Associated with Galactose-Deficient IgA1 Antibody in IgA Nephropathy Patients. *Front Immunol*. 2021 Jun;12:638309.
318. Westergren E, Söderberg M, Challis B, et al. P0347 COMPLEMENT FACTOR BB AND FACTOR C4D IN IGA NEPHROPATHY AND IGA VASCULITIS. *Nephrol Dial Transplant*. 2020 Jun 1;35(S3):gfaa142.P0347.
319. Wijaya C, Burns C, Hall S, et al. Measurement of complement activation via plasma soluble C5b-9 comparison with terminal complement complex staining in a series of kidney biopsies. *Kidney Blood Press Res* 2023 Mar;48(1):220–30.
320. Martin IV, Bohner A, Boor P, et al. Complement C5a receptors C5L2 and C5aR in renal fibrosis. *Am J Physiol-Ren Physiol*. 2018 Jan;314(1):F35–46.
321. Barnum SR, Bubeck D, Schein TN. Soluble Membrane Attack Complex: Biochemistry and Immunobiology. *Front Immunol*. 2020;11:585108.
322. Conway EM. Complement-coagulation connections. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2018 Apr;29(3):243–51.
323. Dzik S. Complement and Coagulation: Cross Talk Through Time. *Transfus Med Rev*. 2019 Oct;33(4):199–206.
324. Rizk DV, Maillard N, Julian BA, et al. The Emerging Role of Complement Proteins as a Target for Therapy of IgA Nephropathy. *Front Immunol*. 2019 Mar;10:504.
325. Wu D, Li X, Yao X, et al. Mesangial C3 deposition and serum C3 levels predict renal outcome in IgA nephropathy. *Clin Exp Nephrol*. 2021 Jun;25(6):641–51.
326. Cavero T, Auñón P, Caravaca-Fontán F, et al. Thrombotic microangiopathy in patients with malignant hypertension. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2023 May;38(5):1217–26.
327. Schmidt C, Bechtler C, Sichau J, et al. 207 Crystal structure of the Factor H domains 8-14 in complex with the Factor H-recruiting peptide 5C6 validates the unprecedented domain arrangement in the central segment of Factor H. *Immunobiology*. 2023 Sep;228(5):152657.
328. Coppo R, Peruzzi L, Loiacono E, et al. Defective gene expression of the membrane complement inhibitor CD46 in patients with progressive immunoglobulin A nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2019 Apr;34(4):587–96.
329. Cernoch M, Hrubá P, Kollar M, et al. Intrarenal Complement System Transcripts in Chronic Antibody-Mediated Rejection and Recurrent IgA Nephropathy in Kidney Transplantation. *Front Immunol*. 2018 Oct;9:2310.

330. Liszewski MK, Atkinson JP. Membrane cofactor protein (MCP; CD46): deficiency states and pathogen connections. *Curr Opin Immunol*. 2021 Oct;72:126–34.
331. Simpson N, Wood C, Baillie K, et al. 114 Complement protein autoantibodies and increased Factor H related protein four levels may contribute to pathogenesis in IgA nephropathy. *Immunobiology*. 2023 Sep;228(5):152565.

Annexes

Annexe 1.

Revue n°1.

Complement in IgAN: from mechanistic context to
therapeutic opportunities

The complement system in IgAN: mechanistic context for therapeutic opportunities

Anna Duval^{1,2}, Sophie Caillard² and Véronique Frémeaux-Bacchi^{1,3}

¹Centre de Recherche des Cordeliers, Inserm UMR S1138, Paris, France

²Department of Nephrology, Dialysis and Transplantation, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France

³Service d'Immunologie Biologique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

Correspondence to: Anna Duval; E-mail: anna.duval@inserm.fr

ABSTRACT

The complement system plays a crucial role in innate immunity, providing essential defense against pathogens. However, uncontrolled or prolonged activation of the complement cascade can significantly contribute to kidney damage, especially in cases of glomerulonephritis. Immunoglobulin A nephropathy (IgAN), the most prevalent form of primary glomerulonephritis, has growing evidence supporting the involvement of complement alternative and lectin pathways. In fact, patients with IgAN experience complement activation within their kidney tissue, which may be involved in the development of glomerular damage and the progression of IgAN. Complement activation has emerged as a significant area of interest in IgAN, with numerous complement-targeting agents currently being explored within this field. Nevertheless, the exact mechanisms of complement activation and their role in IgAN progression require comprehensive elucidation. This review seeks to contextualize the proposed mechanisms of complement activation within the various stages (“hits”) of IgAN pathogenesis, while also addressing the clinical implications and anticipated outcomes of complement inhibition in IgAN.

Keywords: complement, complement inhibitors, glomerulonephritis, IgA nephropathy, therapeutics

INTRODUCTION

Immunoglobulin A nephropathy (IgAN) is a prevalent glomerulonephritis and a major contributor to renal failure, particularly among young individuals [1]. Characterized histologically by dominant IgA immune deposits in the glomerular mesangium, it is often accompanied by mesangial proliferation and matrix expansion. Clinical manifestations can range from subtle forms with minor urinary alterations and recurrent macroscopic hematuria following mucosal infections, to progressive renal failure culminating in end-stage renal disease. According to cohort studies, nearly half of patients with IgAN will progress to end-stage renal disease during their lifetime, highlighting the importance of addressing this public health concern [2].

CURRENT UNDERSTANDING OF IgAN PATHOGENESIS

The pathophysiology of IgAN is intricate and not entirely understood. The most widely accepted model for the pathogenesis is multifactorial, known as the “four-hit” model (Fig. 1), which encompasses a combination of environmental, immunological and genetic factors [3, 4]. According to this model, the first hit involves the synthesis of an aberrant glycosylated IgA1 molecule, termed galactose-deficient IgA1 (Gd-IgA1). The second hit encompasses the production of antibodies that target Gd-IgA1. These antibodies and Gd-IgA1 molecules subsequently form “immune complexes,” constituting the third hit. Finally, the fourth hit entails the deposition of these immune complexes within the glomerular mesangium. The combination of these events classifies IgAN

as an autoimmune glomerulonephritis. IgAN can manifest as either primary or secondary, with the latter being associated with infections, inflammation or autoimmune conditions affecting the gastrointestinal tract, liver or skin. Secondary forms may exhibit a similar Gd-IgA1-driven pathogenesis.

The initiation of IgAN pathogenesis, known as the “first hit,” involves the synthesis of Gd-IgA1 [5]. IgA1 is generated within the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) (intestinal, respiratory and nasopharyngeal mucosa) and by the bone marrow. The IgA1 isoform is distinguished from IgA2 by its extensive heavily O-glycosylated hinge region. The glycosylation pattern of IgA1 is constructed through the sequential action of glycosyltransferases. An alteration in the enzymatic activity or a modification in IgA1’s glycosylation pattern—such as the digestion of galactose residues from normoglycosylated IgA1 by mucosal microbiota—leads to the production of IgA1 that lacks galactose residues (Gd-IgA1). Once formed, Gd-IgA1 enters the bloodstream; however, the mechanism through which this occurs remains unclear [6].

However, the presence of Gd-IgA1 in the bloodstream alone is not sufficient to trigger nephropathy [7]. Alongside Gd-IgA1, patients with IgAN produce (auto)antibodies that may target the hinge region of Gd-IgA1 (“hit 2”). Consequently, Gd-IgA1 may become susceptible to IgG/IgM antibodies or undergo self-aggregation [8] forming high molecular weight “immune complexes” coupled with CD89 (“hit 3”) (Gd-IgA1-IC) [9]. Due to impaired endothelium fenestrae or changes in glomerular tuft structural support, Gd-IgA1-IC that escape hepatic clearance can then accumulate in the mesangium (“hit 4”)[5]. The negative charge of Gd-IgA1-IC—along with the potential roles of IgA receptors (CD71, sCD89), local antigens to IgA expressed on mesangial cells

Received: May 15, 2023; Editorial decision: June 28, 2023

© The Author(s) 2023. Published by Oxford University Press on behalf of the ERA.

All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

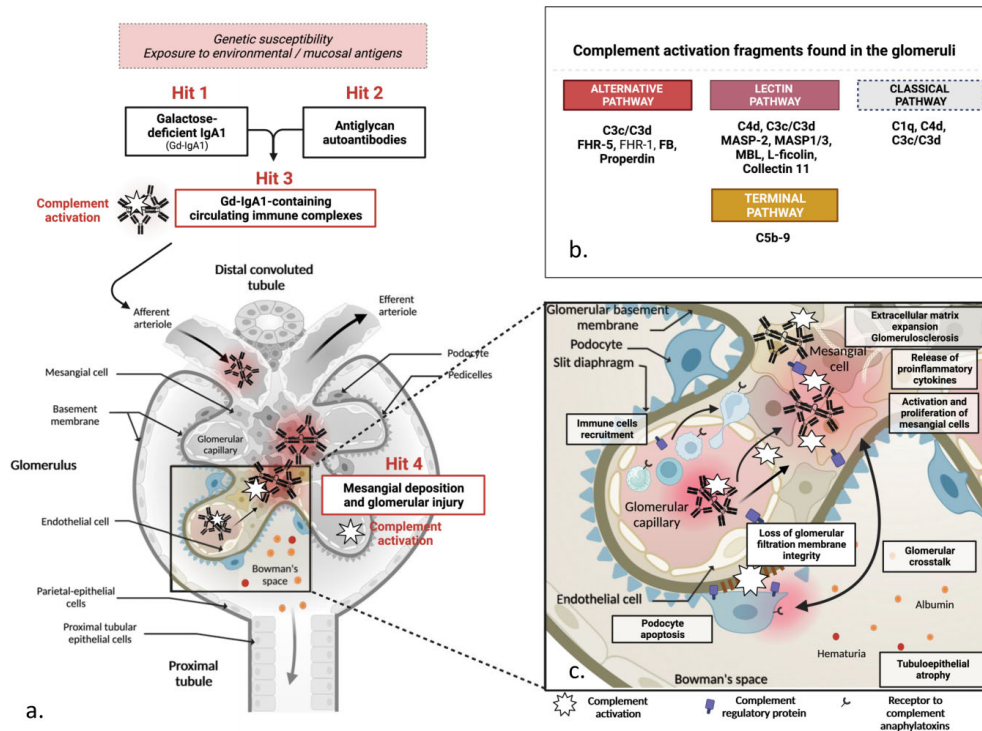


Figure 1: Proposed mechanisms of complement activation in IgAN pathogenesis through the “multi-hit” model. (a–c) The “multi-hit” pathogenic model of IgAN. IgAN is an autoimmune glomerulonephritis characterized by a series of events (or “hits”) that contribute to its onset. Patients with IgAN exhibit an abnormal response to mucosal antigens, resulting in the production of galactose-deficient IgA1 (Gd-IgA1) (“Hit 1”) and autoantibodies, primarily IgG and IgM (“Hit 2”). These events lead to the formation of pathological circulating immune complexes (Gd-IgA1-IC) in the bloodstream (“Hit 3”). High-molecular-weight Gd-IgA1-ICs then reach and accumulate in the mesangium, causing local inflammation, complement activation, and glomerular injury (“Hit 4”). Complement activation through the alternative (AP) and lectin (LP) pathways occurs in the mesangium, either secondary to the deposition of pathological immune complexes or as a direct result of immune complex-mediated events (“Hits 3 and 4”). Steps involving complement activation are highlighted in red. Panel b. Key complement proteins identified in IgAN glomeruli. Immunostaining and proteomic analyses reveal the main complement proteins associated with each complement pathway in IgAN glomeruli. Abbreviations: AP: alternative pathway; Gd-IgA1: galactose-deficient IgA1; Gd-IgA1-IC: galactose-deficient IgA1-immune complexes; LP: lectin pathway.

(β II-spectrin, and the rheological properties of the glomerular microcirculation—may contribute to their mesangial tropism [10]. Impaired clearance of deposited Gd-IgA1-IC facilitates their accumulation in the mesangium. The multifaceted pathogenesis of IgAN may be impacted by various factors—including exposure to environmental antigens, mucosal infections and potential genetic factors that could influence the humoral response (HLA loci), IgA1 O-glycosylation, innate immunity and local inflammation [3, 4].

Complement has been identified as a contributing factor in the glomerular inflammation associated with IgAN. Activation of the complement system can occur in the mesangium (“hit 4”), potentially directly on Gd-IgA1- IC in the circulation (“hit 3”), as well as in mucosal regions. The complement present in the kidney is primarily thought to originate from systemic sources, with the possibility of additional contributions from local synthesis (Fig. 1).

COMPLEMENT INVOLVEMENT IN IgAN

The complement system

The complement system serves as a crucial component of innate immunity, protecting the body from pathogens while maintaining homeostasis by eliminating cellular debris and immune complexes [11]. Three pathways initiate complement activation: the classical pathway (CP), the lectin pathway (LP) and the alternative pathway (AP). The CP is activated by the binding of C1q to immune complexes, while the LP is triggered by mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)/mannose binding lectin (MBL) or ficolin complexes recognizing glycation residues. Conversely, the AP is continuously activated at a low level due to the spontaneous hydrolysis of the C3 molecule. Activation of any of these pathways, along with the further amplification by the AP, leads to the formation of enzymatic complexes called convertases, which cleave and activate C3 and C5. This, in turn, engages the terminal pathway (TP), ultimately resulting in the formation and

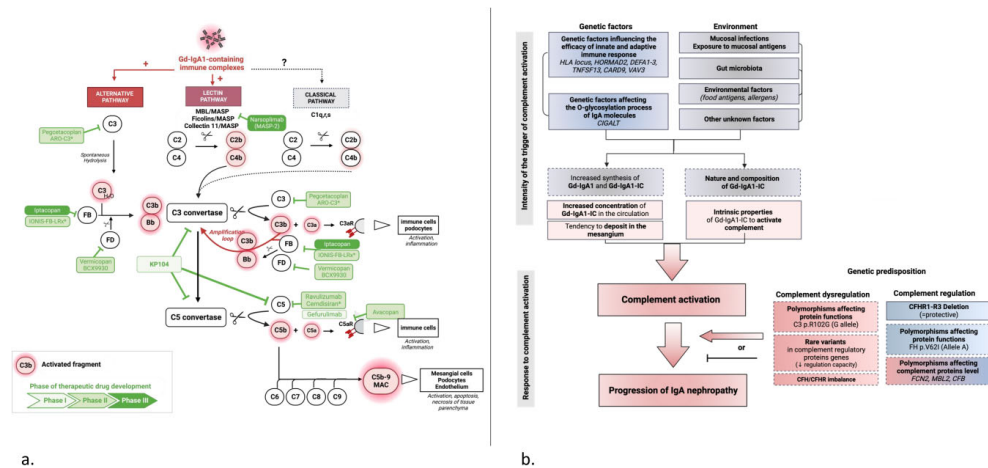


Figure 2: Overview of complement role and complement inhibition in IgAN. (a) Overview of complement therapeutics under investigation for IgAN in 2023. In IgAN, pathological immune complexes have been found to activate the complement alternative pathway (AP) and lectin pathway (LP), while typically showing no signs of complement classical pathway (CP) activation. The initiation of any of these three pathways triggers the complement cascade, leading to the formation of enzymes known as convertases. These enzymes cleave and activate C3 and C5 molecules, producing C3b, C3a, C5b, and C5a. The classical C3 convertase is identified as C4b2b (previously referred to as C4b2a), while the alternative C3 convertase is known as C3bBb. Upon activation, complement proteins release fragments, which are represented with a halo. The complement alternative pathway serves as an amplification mechanism for complement activation, regardless of the pathway initially triggered. This cascade offers various opportunities for targeting specific proteins. Currently, several therapeutic agents are undergoing clinical trials for IgAN treatment, with their development phases depicted in shades of green. Two complement inhibitors, Iptacopan and Narsoplimab, are being tested in phase III clinical trials. (*) The mechanism of action for these drugs involves the inhibition of protein synthesis. (b) Proposed perspective of potential factors contributing to complement activation and disease progression in IgA nephropathy. Complement activation, particularly when strong or prolonged, plays a crucial role in driving glomerular inflammation and injury in IgAN. The extent of complement activation in individual patients may be influenced by a complex interplay of genetic, immunological, and environmental factors. Mucosal infections, both chronic and acute, as well as other environmental factors, can exacerbate the production of galactose-deficient IgA1 and pathological immune complexes. Additionally, the presence of gut microbiota dysbiosis may further contribute to this process. These factors collectively enhance the triggering of the alternative complement and lectin pathway activation. Genetic factors, which can subtly impact the immune response and complement regulatory capacity, may either promote or inhibit complement activation and subsequent glomerular injury. **Abbreviations:** AP: alternative pathway; CP: classical pathway; Gd-IgA1-IC: galactose-deficient IgA1 containing immune complexes; IgAN: IgA nephropathy; LP: lectin pathway. Figures 1 and 2 were created using Biorender.com.

insertion of a (sub)lytic membrane pore (membrane attack complex, MAC or C5b-9) on the cell surface. In addition to MAC formation and opsonization functions, the complement cascade generates C3a and C5a anaphylatoxins that promote inflammation at the site of complement activation. To prevent self-damage and maintain opsonization functions without inappropriately engaging the TP, this powerful system is tightly regulated by proteins such as Factor H (FH), Factor I (FI), monocyte chemoattractant protein or CD46, CR1 or CD35, CD55, and CD59, which act in the circulation or on the cell surface (Fig. 2a). FH is the main regulator of the complement AP. It competes for the binding of factor B (FB) to C3b, an activation product of C3, expedites the decay of the convertase, and functions as a FI cofactor for C3b inactivation on the cell surface. FH-related proteins (FHR) 1–5 exhibit significant homology to FH. These proteins can attach to surface sulfation patterns and bind to C3b/C3d, similar to FH, but they lack the regulatory activity for C3b [12]. FHR1, -2 and -5 possess shared dimerization domains, enabling the formation of homo- or heterodimers in the circulation. FHR proteins are believed to influence FH regulatory activity and amplify complement activation on cell surfaces with high C3b/C3d density, acting as competitors to FH [13]. The specific functions of FHR, however, remain to be uncovered.

Putative mechanisms of complement activation in IgAN

The hallmark of complement activation in IgAN is the colocalization of C3 deposition with IgA, which is observed in over 90% of patients. The deposition of C3 in the mesangium can be attributed to several factors, including the activity of local C3 convertases, the transport of Gd-IgA1-IC-bound C3 to the mesangium via immune complexes and the potential contribution of locally secreted C3 in response to Gd-IgA1-IC [14].

Where does complement activation occur?

Complement activation primarily occurs in the glomeruli. Proteins from the three complement pathways have been detected in the mesangium, with varying proportions among patients (Table 1). In approximately 40% of patients, C4d (without C1q) is found alongside C3 deposition, which suggests the potential involvement of the LP as a local initiator of complement activation. For other patients, the presence of C3 without C4 or C1q indicates that the complement cascade may be initiated by the AP (~50% of patients) [15]. Interestingly, the overall infrequency of C1q deposition (~10%), a marker for CP activation, is somewhat unexpected considering the central role immune complexes are believed to play in IgAN.

Downloaded from https://academic.oup.com/ndt/advance-article/doi/10.1093/ndt/gfad140/7210537 by guest on 18 July 2023

Table 1: Main findings supporting the involvement of the complement system in the pathogenesis of IgAN.

Compartment	Evidence
Renal tissue (glomerulus)	<p>Characteristic findings in routine immunostaining:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Co deposition of C3 and IgA in the mesangium (>90% of patients) [14, 17] • C4d (30%–64% of patients) [14] • C1q (5%–18% of patients) [28] <p>Additional markers in immunostaining:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Other specific markers of each pathway localized in the mesangium: <ul style="list-style-type: none"> ◦ AP: Properdin (FP), FB, FHR5 [18, 19, 21] ◦ LP: MBL, MASP1/3, MASP2, L-ficolin, Collectin11 [17, 24–26] ◦ TP: C5b-9 (MAC) deposition is common [35, 37] <p>→ C3 intensity and FHR5 are linked to renal prognosis [19, 21]</p> <p>→ Markers of lectin activation (MBL, L-ficolin, MASP2 and MASP1/3) are related to more severe nephropathy [22]</p> <p>Proteomic and transcriptomic analysis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • AP: FHR1, FHR5, FHR2, FHR4 [18] • Intrarenal synthesis of C3, Collectin11, C1q [25, 31]
Circulation	<ul style="list-style-type: none"> • Imbalance in FH/FHR is associated with adverse renal outcomes (↑ FHR1:FH ratio, ↑ FHR1–5) [21, 22] • ↑ Gd-IgA1:C3 ratio in IgAN patients with progressive IgAN [16] • ↑ Components of LP (MASP3, MASP1, Map19, L-ficolin, M-ficolin) ([14], [15]) • ↑ or ↓ MBL • ↓ MASP3 is associated with IgAN severity [22]
Urine	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ AP, LP and TP activation fragments in the urine from IgAN patients (ELISA, proteomic analysis) [22]
Mucosa	<ul style="list-style-type: none"> • MBL deficiency might expose IgAN patients to progressive IgAN, and could be linked to prodromal mucosal infections as well as gross hematuria [51]
Genetic factors	<ul style="list-style-type: none"> • CFHR1–R3 deletion may be protective regarding to IgAN susceptibility (GWAS) [3, 4, 19] • Rare variants in CFH, CFHR5 and/or lectin pathway are linked to less favorable outcomes and/or the occurrence of microangiopathy [46, 47]
Experimental models	<p>Cellular models:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Targeting C3a/C5a receptors inhibits IgA-induced cell proliferation and ↓ cytokines production (IL-6, MCP-1) in human mesangial cells [36] <p>Murine models:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Targeting C3a/C5a receptors alleviates IgAN in mice [36] • Acute mesangial deposition of p-IgA (but not m-IgA) is associated with C3 deposition, mesangial hypercellularity, matrix expansion and proteinuria in rats

The main elements linked to prognosis are highlighted in bold.

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; GWAS: genome-wide association studies; IL-6: interleukin-6; m-IgA: monomeric IgA; MASP19: alternative splice product of MASP-2; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; p-IgA: polymeric IgA.

The detection of sensitive biomarkers, including C5a and C3 byproducts, in the plasma of IgAN patients provides additional evidence of complement activation in the circulation, even though the majority of patients exhibit normal C3 and C4 levels [15]. A study of 343 IgAN patients of Asian descent revealed an inverse correlation between plasma C3 levels and the intensity of mesangial C3b/iC3b deposition. Additionally, patients with subnormal plasma C3 levels (defined as C3 <90 mg/dL) experienced a more rapid decline in estimated glomerular filtration rate (eGFR) and decreased renal survival [16]. Supporting these observations, the Gd-IgA1:C3 ratio, which partially reflects C3 consumption, may serve as a biomarker for IgAN progression [17]. This offers indirect evidence that complement activation plays a role in driving IgAN.

Which complement pathway is activated?

Alternative pathway: the task force

In IgAN, the presence of mesangial C3 deposition without C4 or C1q suggests that the AP initiates the complement cascade in nearly 50% of patients [15, 18]. The detection of other essential proteins in the AP convertase, such as properdin (FP) and FB, accompanying C3 deposition, offers additional evidence supporting

AP activation in renal tissue [19, 20]. The AP may directly activate on high molecular weight Gd-IgA1-IC, but the exact mechanism remains unclear. An early study [21] unexpectedly showed that plate-bound IgA aggregates, isolated from healthy donors, could activate the complement AP *in vitro*. In this research, only IgA that was covalently chemically aggregated exhibited the ability to activate the AP. Furthermore, an increase in AP activation correlated with the molecular weight of the aggregates.

Complement AP serves as the task force for the complement system and possesses the ability to self-amplify or amplify an initial activation by other pathways within seconds. This process generates new C3b, which is linked to IgAN progression. The efficient control of deposited C3b by FH is maintained through a balance between the quantity and function of competing proteins, such as FHRs. In IgAN, an imbalance in circulating FH and FHR (FHR1, FHR5) levels or function may disrupt the regulatory activity of FH on the cell surface. Notably, FHR1 and FHR5 staining may colocalize with C3 deposits and correlate with the severity of IgAN [19, 21]. Moreover, the FHR1:FH ratio and FHR5 plasma levels have been associated with IgAN activity [20, 22, 23]. These findings lend support to the hypothesis that FHR may play a detrimental role in IgAN by subtly modulating complement regulation.

Lectin pathway: a contributor to IgAN severity

The LP plays a crucial role in innate immunity, especially at the mucosal level. This pathway is initiated when MBL binds to glycation residues present on pathogens. Research conducted *in vitro* has demonstrated that polymeric IgA effectively binds to MBL, subsequently activating the complement LP, with a dose- and calcium-dependent response [24].

In IgAN, the detection of mesangial C4d deposits (without C1q) combined with the presence of other LP initiators—including L-ficolin, collectin-11, MBL and MASP—offers compelling evidence for local activation of the LP [18, 25–27]. C4d, an activation byproduct of C4, remains covalently attached to the cell surface, serving as a marker of past LP activation (in the absence of C1q). Mesangial and/or arteriolar C4d can be detected in up to 30%–64% of patients, and this may be linked to eGFR decline, proteinuria, interstitial inflammation and fibrosis [20, 27, 28]. Furthermore, arteriolar and glomerular C4d [25] may be more prevalent in IgAN patients exhibiting histological microangiopathy, either with or without thrombotic lesions (TMA or MA). However, the exact mechanism by which LP activation itself, independent of AP amplification, can directly induce TMA remains unclear [25]. The synthesis of LP components, notably collectin-11, by activated mesangial cells exposed to Gd-IgA1-IC may play a role in exacerbating complement-mediated damage [26]. Furthermore, elevated concentrations of LP proteins in plasma (MASP1/3, L-ficolin) and urine (MBL) could be linked to progressive forms of IgAN [23]. Consequently, the LP is believed to serve as a catalyst for complement activation contributing to the severity of IgAN.

Should classical pathway be ruled out from IgAN pathogenesis?

Immune complexes play a crucial role in IgAN. These high molecular weight immune complexes comprise IgG and/or IgM [9], which are anticipated to initiate the complement CP, while C1q deposition is typically absent. In 20%–30% of patients, IgG and IgA mesangial co-deposition can be identified through routine immunofluorescence [29], and this is independently correlated with unfavorable renal outcomes. In the mentioned study [29], the intensity of mesangial IgG deposition showed a relationship with the presence of C1q (5%–18% of patients), which was in turn associated with the severity of IgAN. It is plausible that complement CP activation in severe cases might occur as a result of significant glomerular damage.

Intriguingly, Rizk et al. [30] discovered that IgAN biopsies, which appeared to be IgG-negative in standard immunofluorescence staining, actually contained IgG. This finding underscores the inherent limitations of traditional immunofluorescence techniques, which may only detect a portion of immune deposits [31]. Additionally, in an IgAN mouse model, the apoptosis inhibitor of macrophages (AIM/CD5L) proved crucial in facilitating the binding of pre-deposited IgA with IgM/IgG, resulting in complement activation, glomerular inflammation and kidney damage [32]. In this model, the activation of the complement system may be triggered as a result of IgG/IgM deposition, which facilitates a process that relies on the complement CP. The potential involvement of CP in IgAN is further substantiated by proteomic and transcriptomic analyses conducted on biopsy specimens from patients. These studies revealed an upregulation of complement CP signatures, particularly C1q, suggesting a possible local synthesis [33]. Based on this evidence, it would be unwarranted to completely disregard the CP's potential contribution to IgAN.

Consequences of complement activation

The formation of C3 convertases leads to the release of C3 activation fragments, C3a and C3b, within the glomeruli. Both tubulopodocytes and podocytes express the C3a receptor (C3aR), suggesting that local C3a release may contribute to complement-mediated podocyte damage [34] and facilitate immune cells recruitment [35]. Complement receptors for C3b (CR1) are expressed on podocytes, while myeloid cells have receptors for iC3b (CR3). One study observed a reduced glomerular CR1 staining in IgAN patients, identifying an inverse relationship between glomerular C5b-9 deposition and CR1 intensity [36]. Furthermore, in a rat model, targeting C3a/C5a receptors mitigated IgAN, supporting the potential role of complement anaphylatoxin receptors in IgAN [37].

Mesangial MAC (C5b-9) deposition in IgAN patients has frequently been observed in small-scale descriptive studies [38]. This indicates that the entire cascade is activated within the glomeruli. While MAC insertion on nucleated cells does not cause cell lysis, it can lead to irreversible damage by altering the host-cell phenotype and eventually inducing apoptosis [39]. C5b-9 insertion on mesangial cell stimulates cell activation, extracellular matrix synthesis, production of cytokines (transforming growth factor- β , interleukin-6), fibrotic factors and cell apoptosis [40]. Significantly, C5b-9 deposition may also directly attack podocytes [36]. The MAC triggers podocytes to produce inflammatory cytokines, oxidants and extracellular matrix components, thereby disrupting the glomerular filtration barrier and causing proteinuria. Interactions between activated mesangial cells and endothelial cells create a proinflammatory microenvironment, further intensifying podocyte aggression. Although the level of sC5b-9 in urine (potentially released by podocytes) may correlate with proteinuria severity, its prognostic value remains uncertain [41]. Concurrently, local complement activation and the production of proinflammatory and profibrotic cytokines exacerbate tubulointerstitial fibrosis, ultimately leading to an irreversible decline in renal function.

Complement genetics in IgAN: friend or foe?

Patients with IgAN face a continuous/repeated challenge posed by the activation of the complement system in their renal tissue. To prevent unintentional self-harm, it is crucial to maintain control over this process. The capacity of each individual to manage exposure to a complement trigger may be affected by genetic predisposition, which influences their ability to regulate complement activity.

Genome-wide association studies have provided substantial support for the hypothesis that the complement regulatory activity locus (1q32) affects the susceptibility to IgAN [3, 4]. This locus contains complement FH (CFH) and its related proteins 1–5 (CFHR1–5) genes. Notably, a top-signal single nucleotide polymorphism (rs6677604) within this region demonstrates strong linkage disequilibrium with the CFHR1–R3 deletion. This deletion may offer protection against IgAN susceptibility, particularly when homozygous [20]. Additionally, other complement genes (CFB) and complement-associated genes (ITGAM, ITGAX) have been identified as susceptibility loci.

In IgAN, polymorphisms in MBL2 (p.Gly54Asp), FCN2 (p.Ala258Ser), FH (p.Val62Ile) and CFB (p.R32W, intronic rs4151657) genes may subtly alter plasma protein levels and/or functionality, consequently influencing the activation of the LP and AP in the Han Chinese population [42–45]. The C3 polymorphism (p.Arg102Gly) has been linked to an increased eGFR loss in a European population [46]. In a Spanish cohort, rare variants in

Table 2: Overview of complement therapeutics under investigation for IgAN in 2023.

Complement pathway	Target	Mechanism of action	Drug	Pharmaceutical company	Type of inhibitor	Mode of administration, dose	Phase of drug development	Last registration trial	Main results (recruitment status)
Lectin pathway	MASP-2	Inhibition of MASP-2 and initiation of lectin pathway	Narsoplimab (OMS721)	Omeros	Antibody	IV, 4 mg/kg once weekly	Phase III, FDA—breakthrough therapy	NCT03608033 ARTEMIS-IgAN	No results available (recruiting)
Alternative pathway	C3	Inhibiting the expression of C3 gene	ARO-C3	Arrowhead Pharmaceuticals	RNAi	SC, 1 or 2 doses	Phase I/II	NCT05083364 AROC3-1001	Interim results on healthy volunteers (part 1): good safety and tolerance Six IgAN patients included, no results available ^a
		Inhibition of the binding of C3 to the AP convertase	Pegcetacoplan (APL-2)	Apellis	Peptide	SC, twice weekly	Phase II	NCT02453619 DISCOVERY	
	Factor B	Inhibiting the expression of FB gene	IONIS-FB-LRx	Ionis Pharmaceuticals	RNAi	SC, monthly	Phase II	NCT04014335	First results on 10 patients: 1/44% in 24 h UPE from baseline to Week 29, good safety profile ^b No results available (recruiting)
	Factor D	Inhibition of the serine protease FB and the cleavage of C3 and C5 by FD	Iptacopan (LNP023)	Novartis	Small molecule	Oral, 200 mg, twice daily	Phase III	NCT04578834 APPLAUSE IgAN	No results available (recruiting)
Alternative + terminal pathway	C5/C5b and C3bBb	Inhibiting the C3 convertase step (FH domains) and inhibition of C5	Vemiricopan (ALXN2050) BCX9930 KP104	AstraZeneca BioCryst Kira Pharmaceuticals	Small molecule Small molecule Bifunctional biologic (anti-body + peptide)	Oral, 180 mg/day Oral, twice daily SC/IV, weekly or biweekly	Phase II Phase II Phase I	NCT050597989 NCT05162066 RENEW NCT05517980 SYNERGY-1	No results available (recruiting) No results available (recruiting) Not yet recruiting
Terminal pathway	C5	Inhibition of C5 cleavage by C5 convertase	Cemdisiran (ALN-CC5) Gefurlimab (ALXN1720) Ravulizumab	Alyrium Pharmaceuticals Alexion AstraZeneca Alexion	RNAi Antibody Antibody	SC, weekly SC/IV, weekly IV, loading doses and maintenance every 2 months	Phase II Phase I Phase II	NCT03841448 NCT05314231 NCT04564339 SANCTUARY	No results available No results available No results available
	C5aR1	Inhibition of the C5a receptor (C5aR1)	Avacopan (CCX168)	ChemoCentryx	Small molecule	Oral, twice daily	Phase II	NCT02384317	Reduction in the UPCR in 6/7 patients (~50% in 3/7) at Week 12; 5/7 participants showed persistent improvement in 24 h UPCR at Week 24 [52]

^aResults presented at ASN congress 2019, PO1852.^bResults presented at the ASN congress, SA-PO714.

ASN: American Society of Nephrology; C3bBb: alternative C3 convertase; C3G: C3 glomerulopathy; C5aR1: C5a receptor 1; EU: European Union; FDA: Food and Drug Administration; IV: intravenous; SC: subcutaneous; UPCR: urine protein to creatinine ratio; UPE: urinary protein excretion (g/24h).

complement AP regulatory genes (CFH, CFI) were identified in five patients with low FH levels. Among these patients, four exhibited signs of TMA during follow-up [20]. In a separate cohort of 94 IgAN cases with arteriolar microangiopathic lesions, nearly half of the patients were found to have rare variants in complement-related genes [47]. These findings suggest that these rare variants may intensify complement activation triggered by Gd-IgA-IC. However, the specific pathways by which complement gene polymorphisms and rare variants influence the progression of IgAN and modify the final phenotype require further investigation.

With the expanding knowledge of the mechanistic intricacies involved in complement activation in IgAN, the recent discoveries bolster encouragement for the continued pursuit of clinical trials focused on complement-targeting therapies for this nephropathy. In the long run, these advancements hold the potential to change the treatment paradigms for IgAN.

COMPLEMENT-TARGETING THERAPIES FOR IgAN

The future of IgAN treatment may see significant advancements. At present, the primary approach to slowing down the progression of IgAN is primarily supportive. Despite the suspected (auto)immune nature of IgAN, the use of immunosuppressants remains controversial [48]. Recent findings from the NeflgArd study (NCT03643965) have highlighted the potential advantages of using steroids that act in the gut for at-risk IgAN patients to prevent progression to kidney failure [49]. Mycophenolate mofetil may serve as a corticoid-sparing solution for Chinese IgAN patients at risk of progression [50]. Complement, another factor contributing to glomerular injury, has emerged as a potential target for treatment. A variety of complement-targeting therapies are currently being investigated in IgAN, as detailed in Supplementary data, Tables S1 and S2, and Fig. 2a.

Terminal pathway blockade

Eculizumab, as the pioneering complement inhibitor, has significantly transformed the treatment landscape for atypical hemolytic uremic syndrome. C5 blockade aims to halt complement self-aggression caused by terminal effectors (C5a, C5b-9), irrespective of the initiating pathway. The presence of C5b-9 staining in IgAN suggests that inhibiting the TP at the C5 level could be a rational therapeutic strategy. Nevertheless, eculizumab has demonstrated variable efficacy in treating crescentic IgAN accompanied by rapidly progressive kidney failure (Supplementary data, Table S2). Ravulizumab, a long-acting anti-C5 monoclonal antibody, advanced to a phase II clinical trial for IgAN (NCT04564339). Additionally, a short-term open-label pilot study evaluated the efficacy of avacopan (CCX168), a C5a receptor (C5aR) antagonist, in patients with IgAN. The study found that, within 3 months of treatment, avacopan reduced proteinuria by 50% in three out of seven patients with a urine protein-to-creatinine ratio (UPCR) >1 g/g despite renin-angiotensin blockade therapy (NCT02384317).

Therapeutics to prevent the C3 convertase formation

The complement AP activation is crucial in IgAN, making it the primary target for intervention. In contrast to blocking the TP, inhibiting the AP upstream of C3 convertase could help prevent the release of C3 activation products and their potential effects. Iptacopan (LNP023) is an orally administered small molecule

that inhibits FB and the formation of AP convertase. A phase II study (NCT03373461) in 58 patients showed promising results, with a decrease in UPCR by the third month and a sustained dose-response effect by the sixth month, along with a favorable safety profile. These findings supported the initiation of a phase III trial, APPLAUSE-IGAN (NCT04578834), which is currently underway (Supplementary Table S1). Additional strategies under investigation include (i) targeting C3 by interfering with its production, (ii) preventing the activation and assembly of alternative C3 convertase components (C3, FB and FD inhibition) and (iii) accelerating the decay of C3 convertase (Table 2).

Another potential solution involves targeting the LP. Narsoplimab (OMS721), a fully human IgG4 monoclonal antibody, specifically targets the MASP2 protein. A phase II study (NCT02682407) demonstrated a significant 61.4% short-term reduction in 24-h urinary protein excretion and stability of eGFR in five patients. Currently, the ARTEMIS-IGAN trial, a randomized, double-blind and placebo-controlled phase III clinical trial (NCT03608033), is evaluating this biotherapy in patients with mild proteinuria (>1 g/day). The long-term efficacy of these complement inhibitors on clinical phenotype, histological lesions and renal prognosis is eagerly anticipated.

Specificity of complement-targeting strategies for IgAN

IgAN exemplifies the translation of innovative, effective, and costly therapies from rare, life-threatening diseases to more prevalent chronic conditions. Additionally, IgAN is a highly complex and heterogeneous nephropathy, with complement being just one of the many contributing factors. The degree of complement activation depends on various factors, such as: (i) the intensity of the triggering factors (synthesis of Gd-IgA1-IC, infections, exposure to environmental factors, as well as mesangial deposition), (ii) the complement pathway(s) involved and (iii) genetic factors that subtly influence the capacity to downregulate complement and glomerular inflammation in the long-term (Fig. 2b). In chronic conditions like IgAN, strategies that delicately fine-tune complement activation in a targeted manner may prove advantageous for patients. The goal is to shift the complement balance towards enhanced regulation. Nevertheless, it is crucial to weigh the anticipated benefits of prolonged complement inhibition against the potential risks of infection and, possibly, other undiscovered long-term side effects. Attaining complete complement blockade may not be suitable for conditions that necessitate long-term treatment. The degree of complement involvement and the relative contribution of complement pathways could differ throughout an individual's lifespan. Consequently, determining the ideal timing and level of complement blockade becomes imperative. A significant challenge now lies in identifying non-invasive biomarkers to safely select patients who may benefit from complement-targeting therapies. Moreover, these biomarkers can aid in monitoring the complement blockade and personalizing therapeutic strategies (Supplementary data, Box S1).

CONCLUSIONS

Complement is a contributor to the multifaceted pathogenesis of IgAN. Advancements in understanding the mechanisms governing immune response and complement activation have paved the way for novel therapeutic approaches that could revolutionize the management of IgAN.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at [ndt](https://ndt.oxfordjournals.org/) online.

FUNDING

This work was supported by a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (FDM202006011155).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data sharing is not applicable to this article as no new data were created or analyzed in this study.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

A.D. drafted the initial version of the manuscript. Following this, all contributing authors thoroughly examined the content, offered critical insights, and endorsed the finalized version prior to submission.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

A.D. declares no conflict of interest. S.C. has been compensated by Alexion Pharmaceuticals for participation in advisory boards and attendance at conferences. V.F.-B. has received honoraria from Alexion Pharmaceuticals, Biocryst, Roche, Apellis, Novartis and Baxter for delivering lectures and/or serving on boards. Additionally, V.F.-B. has been awarded a research grant from Alexion Pharmaceuticals.

REFERENCES

- Wiley CJ, Coppo R, Schaefer F et al. The incidence and prevalence of IgA nephropathy in Europe. *Nephrol Dial Transplant* 2023; **38**:gfaad082.
- Pitcher D, Braddon F, Hendry B et al. Long-term outcomes in IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2023; **18**:727–38.
- Gharavi AG, Kiryluk K, Choi M et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nat Genet* 2011; **43**:321–7.
- Kiryluk K, Li Y, Scolari F et al. Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens. *Nat Genet* 2014; **46**:1187–96.
- Knoppova B, Reilly C, Maillard N et al. The origin and activities of IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy. *Front Immunol* 2016; **7**:117.
- Nihei Y, Suzuki H, Suzuki Y. Current understanding of IgA antibodies in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Front Immunol* 2023; **14**:1165394.
- Gharavi AG, Moldoveanu Z, Wyatt RJ et al. Aberrant IgA1 glycosylation is inherited in familial and sporadic IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**:1008–14.
- Xie X, Gao L, Liu P et al. Propensity of IgA to self-aggregate via tailpiece cysteine-471 and treatment of IgA nephropathy using cysteamine. *JCI Insight* 2021; **6**:e150551.
- Matsumoto Y, Aryal RP, Heimburg-Molinaro J et al. Identification and characterization of circulating immune complexes in IgA nephropathy. *Sci Adv* 2022; **8**:eabm8783.
- Nihei Y, Haniuda K, Higashiyama M et al. Identification of IgA autoantibodies targeting mesangial cells redefines the pathogenesis of IgA nephropathy. *Sci Adv* 2023; **9**:eadd6734.
- Duval A, Frémeaux-Bacchi V. Complement biology for hematologists. *Am J Hematol* 2023; **98**:55–19.
- Skerka C, Chen Q, Frémeaux-Bacchi V et al. Complement factor H related proteins (CFHRs). *Mol Immunol* 2013; **56**:170–80.
- Renner B, Laskowski J, Poppelaars F et al. Factor H related proteins modulate complement activation on kidney cells. *Kidney Int* 2022; **102**:1331–44.
- Schmitt R, Ie SA, Olin AI et al. The combined role of galactose-deficient IgA1 and streptococcal IgA-binding M protein in inducing IL-6 and C3 secretion from human mesangial cells: implications for IgA nephropathy. *J Immunol* 2014; **193**:317–26.
- Chiu YL, Lin WC, Shu KH et al. Alternative complement pathway is activated and associated with galactose-deficient IgA1 antibody in IgA nephropathy patients. *Front Immunol* 2021; **12**:638309.
- Kim SJ, Koo HM, Lim BJ et al. Decreased circulating C3 levels and mesangial C3 deposition predict renal outcome in patients with IgA nephropathy. *PLoS One* 2012; **7**:e40495.
- Chen P, Yu G, Zhang X et al. Plasma galactose-deficient IgA1 and C3 and CKD progression in IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2019; **14**:1458–65.
- Itami H, Hara S, Samejima K et al. Complement activation is associated with crescent formation in IgA nephropathy. *Virchows Arch* 2020; **477**:565–72.
- Sethi S, Palma LMP, Theis JD et al. Proteomic analysis of complement proteins in glomerular diseases. *Kidney Int Rep* 2023; **8**:827–36.
- Tortajada A, Gutiérrez E, Goicoechea de Jorge E et al. Elevated factor H-related protein 1 and factor H pathogenic variants decrease complement regulation in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2017; **92**:953–63.
- Hiemstra PS, Gorter A, Stuurman ME et al. Activation of the alternative pathway of complement by human serum IgA. *Eur J Immunol* 1987; **17**:321–6.
- Medjeral-Thomas NR, Lomax-Browne HJ, Beckwith H et al. Circulating complement factor H-related proteins 1 and 5 correlate with disease activity in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2017; **92**:942–52.
- Medjeral-Thomas NR, Troldborg A, Constantinou N et al. Progressive IgA nephropathy is associated with low circulating mannan-binding lectin-associated serine protease-3 (MASP-3) and increased glomerular factor H-related protein-5 (FHR5) deposition. *Kidney Int Rep* 2018; **3**:426–38.
- Roos A, Bouwman LH, van Gijlswijk-Janssen DJ et al. Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *J Immunol* 2001; **167**:2861–8.
- Trimarchi H, Coppo R. Glomerular endothelial activation, C4d deposits and microangiopathy in immunoglobulin A nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2021; **36**:581–6.
- Wei M, Y Guo W, Y Xu B et al. Collectin11 and complement activation in IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2021; **16**:1840–50.
- Roos A, Rastaldi MP, Calvaresi N et al. Glomerular activation of the lectin pathway of complement in IgA nephropathy is associated with more severe renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**:1724–34.
- Chua JS, Zandbergen M, Wolterbeek R et al. Complement-mediated microangiopathy in IgA nephropathy and IgA vasculitis with nephritis. *Mod Pathol* 2019; **32**:1147–57.
- Shin DH, Lim BJ, Han IM et al. Glomerular IgG deposition predicts renal outcome in patients with IgA nephropathy. *Mod Pathol* 2016; **29**:743–52.
- Rizk DV, Saha MK, Hall S et al. Glomerular immunodeposits of patients with IgA nephropathy are enriched for IgG

- autoantibodies specific for galactose-deficient IgA1. *J Am Soc Nephrol* 2019;**30**:2017–26.
31. Seifert L, Zahner G, Meyer-Schwesinger C et al. The classical pathway triggers pathogenic complement activation in membranous nephropathy. *Nat Commun* 2023;**14**:473.
 32. Takahata A, Arai S, Hiramoto E et al. Crucial role of AIM/CD5L in the development of glomerular inflammation in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2020;**31**:2013–24.
 33. Chen X, Li M, Zhu S et al. Proteomic profiling of IgA nephropathy reveals distinct molecular prognostic subtypes. *iScience* 2023;**26**:105961.
 34. Gao S, Cui Z, Zhao M-H. Complement C3a and C3a receptor activation mediates podocyte injuries in the mechanism of primary membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2022;**33**:1742–56.
 35. Hu X, Feng J, Deng S et al. Anaphylatoxins enhance Th9 cell recruitment via the CCL20-CCR6 axis in IgA nephropathy. *J Nephrol* 2020;**33**:1027–36.
 36. Xu L, Yang HC, Hao CM et al. Podocyte number predicts progression of proteinuria in IgA nephropathy. *Mod Pathol* 2010;**23**:1241–50.
 37. Zhang Y, Yan X, Zhao T et al. Targeting C3a/C5a receptors inhibits human mesangial cell proliferation and alleviates immunoglobulin A nephropathy in mice. *Clin Exp Immunol* 2017;**189**:60–70.
 38. Koopman JJE, van Essen MF, Rennke HG et al. Deposition of the membrane attack complex in healthy and diseased human kidneys. *Front Immunol* 2021;**11**:599974.
 39. Xie CB, Jane-Wit D, Pober JS. Complement membrane attack complex. *Am J Pathol* 2020;**190**:1138–50.
 40. Zhu G, Qiu W, Li Y et al. Sublytic C5b-9 induces glomerular mesangial cell apoptosis through the cascade pathway of MEKK2–p38 MAPK–IRF-1–TRADD–Caspase 8 in rat Thy-1 nephritis. *J Immunol* 2017;**198**:1104–18.
 41. Yu BC, Park JH, Lee KH et al. Urinary C5b-9 as a prognostic marker in IgA nephropathy. *J Clin Med* 2022;**11**:820.
 42. Shi M, Ouyang Y, Yang M et al. IgA nephropathy susceptibility loci and disease progression. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018;**13**:1330–8.
 43. Shi DC, Feng SZ, Zhong Z et al. Functional variant rs12614 in CFB confers a low risk of IgA nephropathy by attenuating complement alternative pathway activation in Han Chinese. *Front Immunol* 2022;**13**:973169.
 44. Hou W, Shi S, Zhou X et al. Complement factor H variants are associated with microangiopathy lesions in IgA nephropathy. *Int Immunopharmacol* 2022;**112**:109234.
 45. Ouyang Y, Zhu L, Shi M et al. A rare genetic defect of MBL2 increased the risk for progression of IgA nephropathy. *Front Immunol* 2019;**10**:537.
 46. Ibrahim ST, Chinnadurai R, Ali I et al. Genetic polymorphism in C3 is associated with progression in chronic kidney disease (CKD) patients with IgA nephropathy but not in other causes of CKD. *PLoS One* 2020;**15**:e0228101.
 47. Li J, Guo L, Shi S et al. The role of complement in microangiopathic lesions of IgA nephropathy. *Kidney Int Rep* 2022;**7**:1219–28.
 48. Glassock RJ. IgA nephropathy: “the times they are a-changin”. *Glomerular Dis* 2021;**2**:4–14.
 49. Barratt J, Lafayette R, Kristensen J et al. Results from part A of the multi-center, double-blind, randomized, placebo-controlled NefigArd trial, which evaluated targeted-release formulation of budesonide for the treatment of primary immunoglobulin A nephropathy. *Kidney Int* 2023;**103**:391–402.
 50. Hou FF, Xie D, Wang J et al. Effectiveness of mycophenolate mofetil among patients with progressive IgA nephropathy: a randomized clinical trial. *JAMA* 2023;**6**:e2254054.
 51. Guo WY, Zhu L, Meng SJ et al. Mannose-binding lectin levels could predict prognosis in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2017;**28**:3175–81.
 52. Bruchfeld A, Magin H, Nachman P et al. C5a receptor inhibitor avacopan in immunoglobulin A nephropathy—an open-label pilot study. *Clin Kidney J* 2022;**15**:922–28.

1 Supplementary materials

Drug	Target	Registration trial(s)	Phase	Study design	Key inclusion criteria	Surrogate endpoint	Number of patients	Main results	Reference
Narsoplimab (OMS721)	MASP-2	NCT02682407	II	Substudy 1: Narsoplimab IV 4 mg/kg once weekly, 12 weeks (open label), steroids tapering, 6 weeks follow-up with an additional 12-week extension of open-label therapy	Age ≥ 18 years Biopsy-proven IgAN 24 h UPE > 1 g/day on ACE eGFR > 30 mL/min/1.73m ² Blood pressure <150/90 mmHg Corticosteroids > 10mg/day (substudy 1)	24 h UPE, 12 weeks	Substudy 1: four patients Substudy 2: nine patients (five randomized to narsoplimab and four to vehicle in each arm; all participants received narsoplimab in the extension period)	Substudy 1: median reduction of 24 h UPE of 72% at 13-15 weeks Substudy 2: median reduction of 24 h UPE of 61.4% at 51-54 weeks Long-term outcomes (n=12, ~3 years follow-up): eGFR stabilization (n=9), increase in eGFR (n=3), median reduction of 24 h UPE of 38%	Lafayette, et al. Kidney Int Rep 2020 ^(S1) Results presented in the ERA EDTA Congress 2021 (Late Breaking Clinical Trials, Barratt J, et al) ^(S2)
				Substudy 2): Narsoplimab IV 370 mg fixed-dose or vehicle 12 weeks (double-blind, 1:1 randomization), 6 weeks follow-up with an additional 12-week extension of open-label therapy	Age ≥ 18 years Biopsy-proven IgAN < 8 years 24 h UPE > 1 g/day < 6 months before screening or at baseline eGFR ≥ 30 mL/min/1.73m ²	24 h UPE, 12 weeks	450 patients (225 per arm)	Recruiting	Lafayette, et al. Kidney Int Rep 2022 ^(S3)
Iptacopan (LNP023)	Factor B	NCT03373461 NCT04557462	II	Part I: Iptacopan 10 mg, 50 mg, 200 mg twice daily, 90 days	Age ≥ 18 years Biopsy-proven IgAN < 3 years UPCR ≥ 0.8 g/g or urine protein ≥ 0.75g/24h eGFR ≥ 30mL/min/1.73m ² On ACEI/ARB, antihypertensive therapy or diuretics at maximum daily dose/tolerated dose ≥ 90 days before study treatment. Vaccination against <i>N. meningitidis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , and <i>H. influenzae</i> .	UPCR at 12 weeks	Part 1: n=46, Part 2: n=26 with 200mg twice daily dose, 25 with placebo	200 mg twice daily led to 23% reduction in UPCR at 12 weeks; the decrease persisted at 6 months.	Results presented at World Congress of Nephrology 2022 (Barratt, et al. Kidney Int Rep 2022) ^(S4)
				Part II: Iptacopan 10mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg twice daily or placebo, 180 days, interim analysis at 90 days	Age ≥ 18 years Biopsy-proven IgAN	UPCR at 9 months,	450 patients (215 per arm)	Recruiting	Rizk, et al. Kidney Int Rep
		NCT04578834 APPLAUSE	III	Iptacopan 200 mg twice daily versus placebo, 1:1					

1
2

Reference	Patient characteristics	Clinical presentation	Renal biopsy findings	Renal function at start of eculizumab	Eculizumab duration	Response to eculizumab (follow-up)
Case 1 (86)	Male, 16 yo, native kidney	Rapidly progressive renal failure	Crescentic IgA, IgA, C3, C4 deposition	Serum creatinine 97 µmol/L	1.5 month	Immediate, transitory and incomplete response, ESRD after 2 years
Case 2 (87)	Male, 16 yo, native kidney	Progressive renal failure, nephrotic range proteinuria	Crescentic IgA, IgA, C3, IgG, C5b-9 deposition	Serum creatinine 369 µmol/L	3 months	Immediate, stabilization of renal function on eculizumab, ESRD after eculizumab withdrawal
Case 3 (88)	Male, 43 yo, native kidney	Progressive renal failure	Crescentic IgA, Glomerular TMA, IgA, C3 deposition	Under HD	2 months	Remission of biological TMA by day 70, persistence of renal failure and HD dependence
Case 4 (89)	Male, 28 yo, KTR, first-degree related living donor	Acute graft injury, infectious trigger	Crescentic IgA	Under HD	1 month	Graft loss
Case 5 (90)	Female, 24yo, KTR, first-degree related living donor	Rapidly progressive kidney failure, biological TMA	Crescentic IgA, glomerular TMA	Serum creatinine 450 µmol/L	12 months	Complete graft function recovery

3 **Table S2: Clinical characteristics and outcomes of patients receiving eculizumab as salvage therapy for rapidly progressive renal failure caused by**
4 **crescentic IgAN.** In all cases, eculizumab was administered as a salvage therapy when first-line treatments, such as plasma exchange, high-dose steroids, and/or
5 cyclophosphamide, failed to produce the desired response. *Abbreviations:* ACE: angiotensin converting enzyme inhibitors, aHUS: atypical hemolytic and uremic
6 syndrome, AP: alternative pathway, ESRD: end-stage renal disease, FH: complement factor H, HD: hemodialysis, IF: immunofluorescence, IgAN: IgA
7 nephropathy, KTR: kidney transplant recipient, TMA: thrombotic microangiopathy, yo: years old.

4

1

2 **Box S1. Key points**

3

- 4 ▪ **Patients with IgAN experience persistent complement activation in their renal tissue**
- 5 ▪ **In IgAN, complement activation is primarily initiated by Gd-IgA1-containing immune**
6 **complexes and may predominantly involve both the alternative and lectin pathways**
- 7 ▪ **Complement activation can contribute to glomerular inflammation and IgAN**
8 **progression**
- 9 ▪ **Further research is needed to understand how complement genetics impact the extent of**
10 **complement activation in kidney tissue, disease phenotype, renal prognosis, and response**
11 **to complement inhibition therapies**
- 12 ▪ **Non-invasive biomarkers are crucial for: i) identifying patients likely to benefit from**
13 **complement-targeting therapies and facilitating follow-up; ii) stratifying patients for**
14 **enrollment in clinical trials; iii) monitoring the effectiveness of complement-targeting**
15 **therapies**
- 16 ▪ **The optimal approach for incorporating complement modulation alongside or in**
17 **combination with steroids or other immunosuppressive treatments must be determined**

18

1

2 Supplemental References

- 3 S1. Lafayette RA, Rovin BH, Reich HN, et al. Safety, Tolerability and Efficacy of Narsoplimab, a
4 Novel MASP-2 Inhibitor for the Treatment of IgA Nephropathy. *Kidney Int Rep*. 2020;5(11):2032-
5 2041. doi: 10.1016/j.ekir.2020.08.003.
- 6 S2. Barratt J, Carroll K, Lafayette R, et al. POS-107 Long-Term Phase 2 Efficacy Of The Masp-2
7 Inhibitor Narsoplimab For Treatment Of Severe IgA Nephropathy. *Kidney Int Rep* 2022;7(2):S45.
8 Results presented in ERA EDTA Congress 2021, Late Breaking Clinical Trials session.
- 9 S3. Lafayette RA, Rovin B, Floege J et al. POS-132 TRIAL DESIGN: PHASE 3 RANDOMIZED,
10 DOUBLE-BLIND, PLACEBO-CONTROLLED STUDY OF NARSOPLIMAB SAFETY AND
11 EFFICACY IN IGA NEPHROPATHY (ARTEMIS-IGAN) *Kidney Int Rep* 2022;7(2):S56.
- 12 S4. Barratt J, Rovin B, Zhang H, et al. POS-546 Efficacy And Safety Of Iptacopan In Iga
13 Nephropathy: Results Of A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Phase 2 Study At 6
14 Months. *Kidney Int Rep* 2022;7(2):S236. Results presented at World Congress of Nephrology 2022.
- 15 S5. Rizk D, Rovin B, Zhang H, et al. Targeting the Alternative Complement Pathway With Iptacopan
16 to Treat IgA Nephropathy: Design and Rationale of the APPLAUSE-IgAN Study. *Kidney Int Rep*
17 2023;8(5):968-979.
- 18 S6. Ring T, Pedersen BB, Salkus G, Goodship THJ: Use of eculizumab in crescentic IgA nephropathy:
19 proof of principle and conundrum? *Clin Kidney J* 2015;8:489–491.
- 20 S7. Rosenblad T, Rebetz J, Johansson M, Békássy Z, Sartz L, Karpman D: Eculizumab treatment for
21 rescue of renal function in IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol* 2014;29:2225–2228.
- 22 S8. Matsumura D, Tanaka A, Nakamura T, Sato E, Node K: Coexistence of atypical hemolytic uremic
23 syndrome and crescentic IgA nephropathy treated with eculizumab: a case report. *Clin Nephrol Case*
24 *Stud*. 2016;12(4):24-28.
- 25 S9. Herzog AL, Wanner C, Amann K, Lopau K: First Treatment of Relapsing Rapidly Progressive
26 IgA Nephropathy With Eculizumab After Living Kidney Donation: A Case Report. *Transplant Proc*
27 2017;49:1574–1577.
- 28 S10. Duval A, Olagne J, Obrecht A, et al. Eculizumab as a Therapeutic Approach for Severe
29 Crescentic Recurrence of IgA Nephropathy after Kidney Transplantation. *Am J Transplant*.
30 2023;31:S1600-6135(23)00519-1.

31

32

33

34

Annexe 2.

Revue n°2

Ex vivo Test for Measuring Complement Attack on Endothelial Cells: From Research to Bedside



Ex Vivo Test for Measuring Complement Attack on Endothelial Cells: From Research to Bedside

Marie-Sophie Meuleman*, Anna Duval, Véronique Fremeaux-Bacchi, Lubka T. Roumenina and Sophie Chauvet

Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Sorbonne Université, Université de Paris, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Erik J. M. Toonen,
Hycult Biotech, Netherlands

Reviewed by:

Jeffrey Laurence,
Cornell University, United States
Daniel Ricklin,
University of Basel, Switzerland

*Correspondence:

Marie-Sophie Meuleman
marie-sophie.meuleman@inserm.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular Innate Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 23 January 2022

Accepted: 21 March 2022

Published: 12 April 2022

Citation:

Meuleman M-S, Duval A,
Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT
and Chauvet S (2022) Ex Vivo
Test for Measuring Complement
Attack on Endothelial Cells:
From Research to Bedside.
Front. Immunol. 13:860689.
doi: 10.3389/fimmu.2022.860689

As part of the innate immune system, the complement system plays a key role in defense against pathogens and in host cell homeostasis. This enzymatic cascade is rapidly triggered in the presence of activating surfaces. Physiologically, it is tightly regulated on host cells to avoid uncontrolled activation and self-damage. In cases of abnormal complement dysregulation/overactivation, the endothelium is one of the primary targets. Complement has gained momentum as a research interest in the last decade because its dysregulation has been implicated in the pathophysiology of many human diseases. Thus, it appears to be a promising candidate for therapeutic intervention. However, detecting abnormal complement activation is challenging. In many pathological conditions, complement activation occurs locally in tissues. Standard routine exploration of the plasma concentration of the complement components shows values in the normal range. The available tests to demonstrate such dysregulation with diagnostic, prognostic, and therapeutic implications are limited. There is a real need to develop tools to demonstrate the implications of complement in diseases and to explore the complex interplay between complement activation and regulation on human cells. The analysis of complement deposits on cultured endothelial cells incubated with pathologic human serum holds promise as a reference assay. This *ex vivo* assay most closely resembles the physiological context. It has been used to explore complement activation from sera of patients with atypical hemolytic uremic syndrome, malignant hypertension, elevated liver enzymes low platelet syndrome, sickle cell disease, pre-eclampsia, and others. In some cases, it is used to adjust the therapeutic regimen with a complement-blocking drug. Nevertheless, an international standard is lacking, and the mechanism by which complement is activated in this assay is not fully understood. Moreover, primary cell culture remains difficult to perform, which probably explains why no standardized or commercialized assay has been proposed. Here, we review the diseases for which endothelial assays have been applied. We also compare this test with others currently available to explore complement overactivation. Finally, we discuss the unanswered questions and challenges to overcome for validating the assays as a tool in routine clinical practice.

Keywords: complement, endothelial cells, diagnostics, prognostics, therapeutics, kidney injury, nephrology, explorations

INTRODUCTION

As part of the complex innate immune surveillance system, the complement system plays a key role in defense against pathogens and in host homeostasis. This enzymatic cascade is rapidly triggered in the presence of activating surfaces, such as bacteria or apoptotic necrotic cells. However, the cascade is highly physiologically regulated on host cells to avoid self-aggression. The endothelium is one of the primary targets of complement dysregulation. There is increasing evidence of complement implications in the pathophysiology of many human diseases. Many complement-blocking therapeutics are under development, and some are already available in clinical practice. Nevertheless, detection of abnormal functioning complement is challenging, because in many pathological conditions C3 and C4 plasma levels, the two main biomarkers of complement activation, remain within normal ranges. The available tests to demonstrate such overactivation with diagnostic, prognostic, and therapeutic implications are limited. Methods are poorly standardized, and only a few have functional value. Therefore, there is a need to develop a robust and standardized tool for identifying infraclinical complement activation.

The final objective is to allow better pathophysiologically based therapeutic management of patients. The analysis of complement deposits on cultured endothelial cells (EC) incubated with patient serum holds promise as a reference assay. This approach has been used to explore complement activation in the sera of patients with atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS), malignant hypertension, hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet (HELLP) syndrome, sickle cell disease (SCD), and pre-eclampsia. In some cases, adjusting the complement-blocking drugs has been considered. Nevertheless, the international standard for this test is lacking, and the mechanism by which complement is activated in this assay is not fully understood.

After a brief summary of the complement cascade, we present the mechanisms of complement activation and how they contribute to cell damage in several human diseases. We then provide an overview of the tests currently available to explore complement overactivation in routine practice. Finally, through a comparative analysis of the available endothelial assays for complement exploration, we discuss the unanswered questions and challenges to overcome to validate the study of complement deposition on cultured EC as a tool in routine clinical practice.

THE COMPLEMENT SYSTEM IN HEALTH AND DISEASE

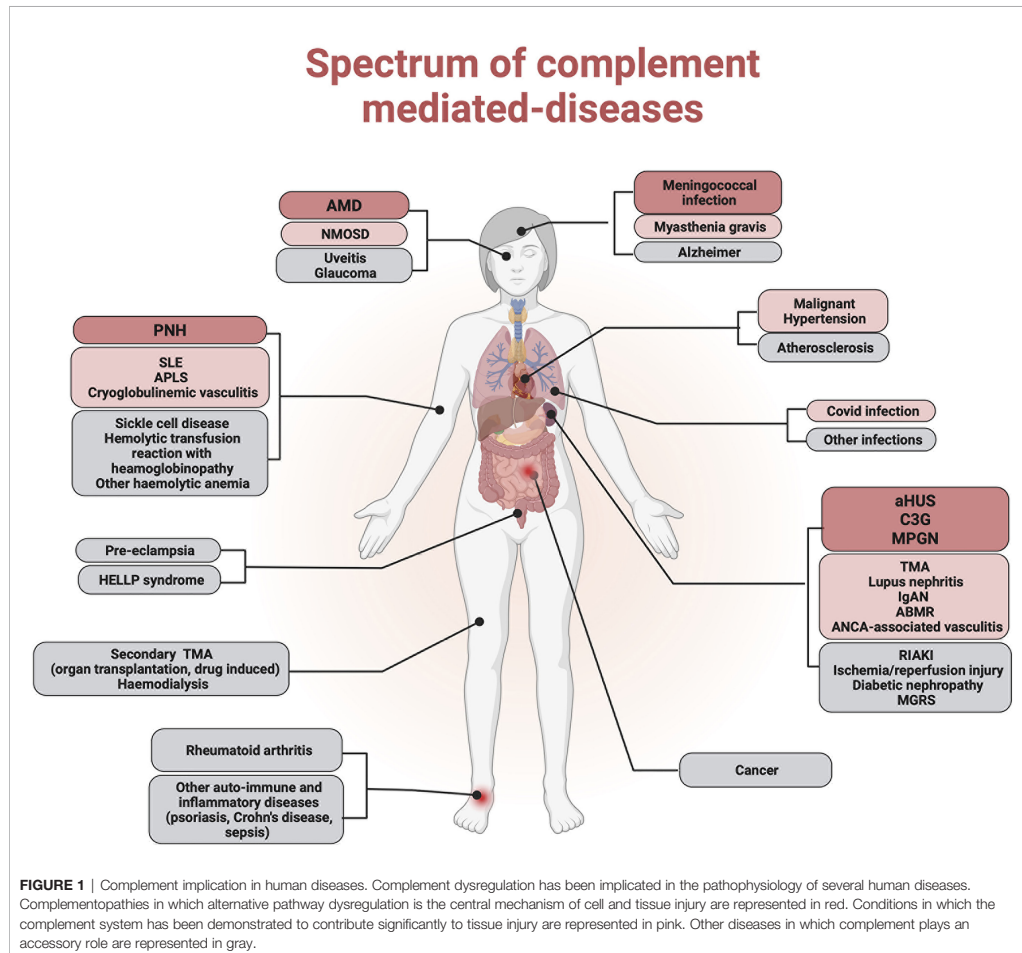
The complement system plays a key role in cell homeostasis, inflammation, and defense against pathogens. It is the first line of defense. The system comprises more than 30 soluble and membrane-bound proteins. Three different pathways lead to complement activation: the classical (CP), lectin (LP), and alternative (AP) pathways. When activated, these serine protease

ascades converge to the formation of two enzymes, C3 convertase and C5 convertase, allowing the generation of the main effectors of this system: anaphylatoxins (C3a and C5a), opsonin (C3b/iC3b), and the membrane attack complex (MAC) (C5b-9). CP and LP are initiated by the recognition of pathogen-associated molecular patterns or damage-associated molecular patterns by pattern-recognition molecules (C1q and mannose-binding lectin). Conversely, AP is constantly activated at a low level in the fluid phase, generating a small quantity of C3b. In the presence of an activating surface (apopto-necrotic or bacterial), C3b covalently binds to the surface, and thus, initiates cell surface C3 convertase formation (C3bBb) and the AP amplification loop. To avoid self-aggression, AP is highly regulated in the fluid phase and on the host cell surface by soluble (factor H (FH), factor I (FI)) and membrane-bound regulators (membrane cofactor protein (MCP) or CD46, complement receptor 1 (CR1) or CD35, decay accelerating factor or CD55, and CD59). In humans, deficiencies in complement regulatory proteins are associated with rare diseases, such as aHUS, C3 glomerulopathy (C3G), and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). However, complement activation triggered by different pathophysiological processes that overwhelm the capacity of regulation has been increasingly described in a wide spectrum of diseases.

COMPLEMENT IMPLICATION IN DISEASES

While AP overactivation is the central mechanism of cell and tissue injury in complementopathies (aHUS, C3G, and PNH), complement is crucial to tissue injury in a wide variety of diseases. These include age-related macular degeneration (AMD), antibody-mediated rejection (ABMR), cryoglobulinemic vasculitis (CV), IgA nephropathy (IgAN), systemic lupus erythematosus (SLE), anti-phospholipid syndrome (APS), ANCA-associated vasculitis (AAV), rheumatoid arthritis (RA), HELLP syndrome, pre-eclampsia, myasthenia gravis (MG), neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOSD), SCD, and rhabdomyolysis-induced acute kidney injury (RIAKI). To a lesser extent, complement seems to be involved in an increasing spectrum of human pathological conditions, such as inflammatory disorders, ischemia/reperfusion, cancer, degenerative disorders (e.g., Alzheimer's disease, atherosclerosis), and more recently, viral infections that include COVID-19 (1) (**Figure 1**).

Complementopathies are characterized by a specific cell target of AP-mediated damage. In aHUS and PNH, AP dysregulation occurs on the cell membrane, EC surface or platelets (2) and erythrocyte surface (3). In C3G, overactivation of C3 and C5 convertases may occur in the fluid phase or locally within the glomeruli, where the targeted surface remains to be determined (suggestions include glomerular EC and mesangial cells). AP dysregulation is a central pathophysiological mechanism in these diseases. It can be related to innate or acquired abnormalities in complement components, mainly regulators (FH, FI, or MCP) or C3 convertase components (C3 or FB) (4–15).



In diseases with major complement contributions, complement activation can be triggered by one or another pathway. In CV (16) and ABMR (17), activation occurs through CP in the presence of immune complexes (IC). In cryoglobulinemia (type II), IC are composed of IgM with rheumatoid factor activity associated with polyclonal IgG. In ABMR, IC are composed of IgG and donor HLA molecules. Conversely, despite the disease being triggered by the presence of IC, AP appears to be essential for disease development in mouse models of RA (18, 19) and SLE (20–22). This activation can be enhanced by apoptotic and necrotic cells due to prior damage (23) or by proteins of the extracellular matrix (ECM) from damaged cartilage in RA (24). In IgAN, AP (25), and LP (26) activation is mediated by polymeric IgA. *In vitro*, a correlation was found between C3 cleavage products (iC3b, C3c, C3dg) and

IgA-A-IgG IC levels, suggesting that IC-containing IgA may act as a surface for soluble AP activation (27). In AAV, AP may be activated by neutrophil extracellular traps, thus amplifying complement activation and damage of EC (28). Finally, a disease-specific soluble factor has been implicated in complement activation. Free heme renders EC more sensitive to complement activation in SCD (29), aHUS (30), and RIAKI (31). *In vitro*, thrombin induces C5 cleavage in C5a in APS (32).

Complement activation does not arise from a unique mechanism but can be triggered in several ways according to the disease pathophysiology. Identification of the precise mechanisms of complement activation will help determine different potential therapeutic targets within the cascade.

Complement activation contributes to cell and tissue injuries in different ways. First, it promotes inflammatory cell

recruitment mainly in CV (33), ABMR (34), AMD (35), SLE (36) and RA. C5a and its receptor C5aR are involved in neutrophil recruitment (37–39) and endothelial activation (40) in AAV. Complement activation can promote specific disease processes. Thus, MAC can directly affect collagenase production by synovial fibroblasts in RA (41). In IgAN, mesangial cells exposed to complement activation and C3 deposition promote phenotypic conversion to a more synthetic and proliferative state (42). In AMD, C3a and C5a promote choroidal and C5a induces vascular endothelial growth factor secretion by retinal pigment epithelium (35). In pre-eclampsia, it has been suggested that the binding of C5a to C5aR expressed on trophoblasts contributes to the acquisition of their anti-angiogenic phenotype (43).

The complement system can also act as an amplifier for other molecules involved in injury. The C5a/C5aR axis participates in neutrophil recruitment and activation, which in turn can induce complement activation in AAV (38). C5a induces tissue factor expression by neutrophils, leading to factor X activation and thrombin generation, which in turn cleaves C5 into C5a in APS (32).

Ultimately, several triggers of complement activation and effectors may contribute to cell and tissue damage in heterogeneous human diseases. The identification of specific triggers of complement activation and fine pathophysiological mechanisms resulting in cell and tissue complement-mediated injury is needed to determine the best therapeutic target within the cascade. Complement inhibitor anti-C5 monoclonal antibody (eculizumab, and more recently its long-acting form, ravulizumab) is the gold standard in two complementopathies, aHUS and PNH, and has obtained Food and Drug Administration (FDA) approval for MG and NMO. Avacopan is a C5aR1 antagonist that has also been approved by the FDA for patients with AAV, another disease with a major complement contribution. Understanding the detailed mechanisms of complement activation and complement-mediated damage is necessary to guide the prescription of new complement inhibitors.

OVERVIEW OF THE TESTS EXPLORING COMPLEMENT ACTIVATION

Quantification of Complement Components

Currently available tests mainly consist in quantification of individual complement components or activation products.

- For the quantification of individual complement proteins in plasma, various types of immunoassays are used to determine the concentration of individual complement components. The most common is nephelometry. Polyclonal antibodies to component are added in excess of the sample and bind to their target. Quantification is performed by passing a light beam through the sample, which is distorted by the IC that have formed (44).
- Quantification of complement activation products corresponding to cleavage fragments or complement

protein complexes (C3a, C3dg, C4a, C4d, Ba, Bb, C5a, C3bBbP, MASP2, and sC5b-9) is possible. Several assays have been described, mostly based on the recognition of a neoepitope of the complement component in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) format. Thus, C4a and C4d reflect CP/LP activation, Ba, Bb, and C3bBbP reflect AP activation, MASP2 is a key enzyme in LP activation (45) and increasing soluble C5b-9 reflects TP activation (46). C3a and C5a are common to the three activation pathways.

- Detection of auto-Abs (anti-FH, FB, C3b, C3bBb, and C1q) targeting complement proteins can be performed using ELISA (14).

Functional Assays

- Quantification of complement function is used to explore the activity of a pathway or the entire cascade.
- In hemolytic assays, CP activation can be assessed by incubating patient sera with sheep erythrocytes coated with rabbit anti-sheep red blood cell antibodies (47). In this assay, termed the CH50 assay, C1q binds to immunoglobulins, initiates the formation of CP C3 convertase, and leads to MAC assembly and erythrocyte lysis. Hemoglobin release is determined to calculate the number of hemolytic sites per cell. Activation through AP can be assessed using rabbit or guinea pig erythrocytes, which are activators of human AP, incubated with patient serum added to ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether) (EGTA), which chelates Ca^{2+} and inhibits activation *via* CP and LP (48). This hemolytic assay is termed the AP50 assay.
- Liposomes coated with an activator can be used in a similar manner to CH50 assays (49). The main difference is the readout, which consists of the quenching of a fluorescent dye and not the lysis of erythrocytes.
- Assays based on ELISA method can also be used to explore the function of the three pathways. Microtiter plate wells are coated with recognition structures specific to each pathway (IgM for CP, mannan or acetylated bovine serum albumin for LP, and LPS for AP). Patient serum is added and incubated under conditions in which only one pathway is operative at any given time; the other two pathways are blocked. Finally, activation capacity is detected through the formation of the C5b-9 complex by monoclonal antibodies targeting a neo-epitope in complex-bound C9 (50).
- Different hemolytic assays have been developed to explore specific steps of the AP.
- Sanchez-Corral et al. (51) developed a hemolytic assay to study FH functional defects in aHUS. The assay relies on the knowledge that sheep erythrocytes are highly sialylated and favor FH binding, whereas their membrane complement regulators are incompatible with human complement proteins. Therefore, they are protected from complement lysis due to the binding of human FH to their surface. In the assay, sheep erythrocytes are incubated with human plasma in Mg-EGTA buffer, allowing activation of AP only.

Normal plasma does not induce lysis, whereas aHUS plasma with FH functional defects (mutations or autoantibodies) induces lysis under these conditions (51).

- Hemolytic assays can also be used to study the stabilization of cell-bound AP convertases (52). This assay has been used to detect C3Nef in C3G cells. Sheep erythrocytes bearing C3 convertase C3bBb (generated by exposure of sheep erythrocytes bearing C3b to FB and FD) were incubated with patient IgG. C3Nef activity correlates with residual C3bBb hemolytic sites, and lysis is developed by the addition of rat serum.
- Staining of tissue sections for the deposition of complement activation products can provide information about local complement activation in tissue. This can be performed by immunohistochemistry or immunofluorescence (53). For example, this technique has been used to study C5b-9 deposition in the skin of patients with aHUS (54).

These tests allow only the characterization of a specific molecule or step of the complement cascade. To reproduce human pathological conditions and their complexity, several authors have proposed the use of an *ex vivo* endothelial assay. The assay detects and quantifies complement component deposition on the EC surface after incubation with human serum. The EC surface is used as the regulating surface. The objective is to detect abnormal complement deposition that could result from either complement overactivation exceeding the capacity of regulation, or from a defect in complement regulation in fluid or on the EC surface. The *ex vivo* endothelial assay is presented in **Figure 2**.

We next discuss the advantages and limits of this functional approach.

STUDY OF COMPLEMENT DEPOSITION ON CULTURED ENDOTHELIAL CELLS

Heterogeneity of Endothelial Cells Populations and Their Complement Regulation

EC line blood vessels and constitute an active regulatory organ that has been implicated in vascular homeostasis, permeability regulation, vasomotor tone, angiogenesis, and diapedesis of immune cells (55). As first barrier between the blood and interstitium it is in constant equilibrium with the environment. Thus, heterogeneity in the structure and function of EC is a core property of the endothelium, allowing diverse vascular functions and regional specificity (56, 57). This diversity can be partially explained by a distinct transcriptional profile (58) in relation to neighboring cells (59). Hence, EC from different blood vessels have distinct and dynamic expression profiles of complement components and regulators, which may explain the different susceptibility and specific organ tropism observed in some complement-mediated diseases (60).

At a steady state, EC can produce most complement components and express high levels of complement regulators

on their membranes (**Table S1**). Under inflammatory conditions, complement component production and regulatory protein expression are modified (**Table 1**). In addition to the steady state, the modulation of complement protein expression under inflammatory conditions differs according to the EC type and probably contributes to a specific damage mediated by AP and the different organ tropisms observed in complement-mediated diseases. Sartain et al. demonstrated that resting or tumor necrosis factor (TNF)-stimulated brain microvascular EC expressed higher levels of regulatory molecules (FH, FI, CD46, CD55, and THBD), generated lower levels of C3a and C4a, and enhanced lower degree AP activation (measured by lower Ba generation) than human renal glomerular EC (HRGEC) (61). The authors also demonstrated a slight increase in CD46 expression, decrease in thrombomodulin (TM), and increase in C3 and FB transcription in HRGEC exposed to TNF (62). These results agree with the prior demonstrations of an increase in C3 and FB production by human umbilical vein EC (HUVEC) exposed to TNF (63), increased FH transcription and production by HUVEC exposed to interferon (INF) gamma (64), increased C2, FH, FB, and C1inh transcription, and decreased C3 production by HUVEC exposed to INF gamma (65). May et al. compared the properties of four EC types (HRGEC, glomerular EC (GEnC), human microvascular EC (HMEC), and HUVEC) in the resting state and after overnight exposure to heme (66). While there was no difference in expression of regulatory factors (MCP, CD55, TM) at resting state, after overnight heme exposure, C3 deposits on glomerular EC were greater than on other EC. This was associated with, and possibly explained by, weaker FH binding and TM upregulation and lower upregulation of heme-oxygenase 1 (cytoprotective heme-degrading enzyme) compared to HUVEC. Moreover, HUVEC, but not EC, of glomerular origin were protected from complement deposition after re-challenge with heme (**Table S2**).

EC used for *ex vivo* experiments comprise two types: conditionally immortalized EC (CI-EC) and primary EC (**Table 2**). Primary EC can be difficult to isolate and maintain in culture, and have a limited lifespan. Moreover, differences in the genetic background of individual donors can lead to interexperimental variability. In particular, inter-individual heterogeneity in complement regulator expression at the EC surface cannot be excluded. CI-EC has been developed to overcome these difficulties. HMEC-1 and CI-GEnC are HMEC and GEnCs, respectively, that have been transfected with SV40 large T antigen (67, 68). EA.hy926 cells were obtained by fusing HUVEC with A549 cells obtained from human lung carcinoma (69). The EA.hy926 cells were used to generate glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein-deficient cells when treated with phosphatidylinositol-specific phospholipase C. These cells have been used along with the PIGA-mutant TF-1 to study complement deposits by confocal microscopy and flow cytometry after incubation with serum from patients with thrombotic microangiopathy (TMA), this test was called the modified Ham test (70). After incubation with serum from aHUS patients, cell surface C5b-9 deposits were reportedly higher than after incubation with thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) serum.

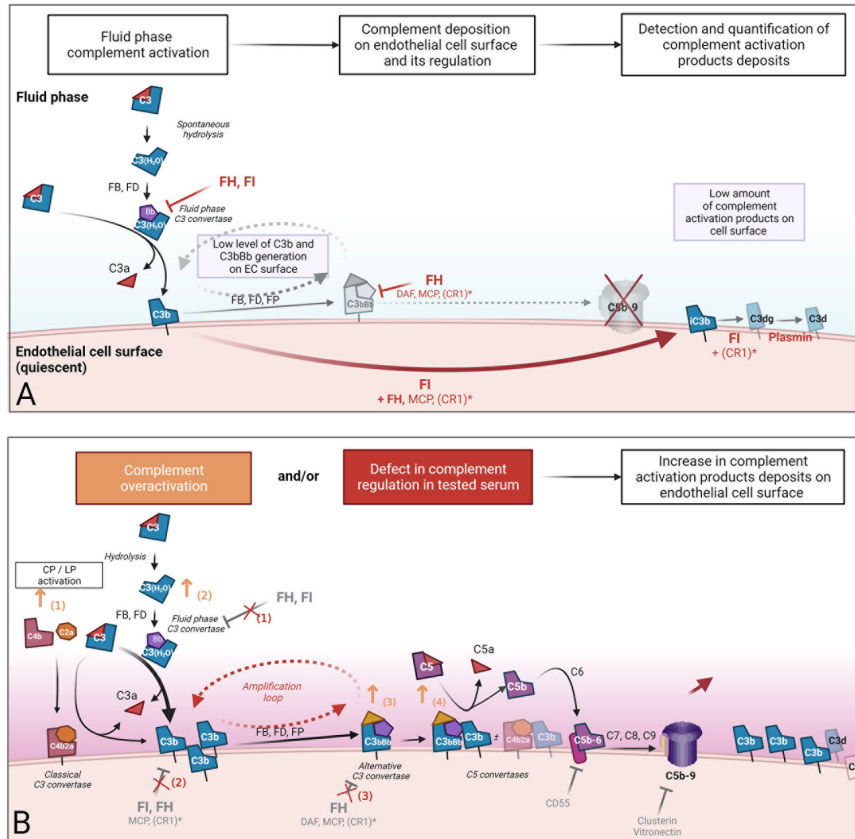


FIGURE 2 | Concept of *ex vivo* complement deposition on endothelial cells. An *ex vivo* endothelial assay was developed to reproduce human pathological conditions and their complexity. The assay consists of the detection and quantification of complement component deposition on the cultured endothelial cells (EC) surface after incubation with human serum. The EC surface was used as the regulatory surface. **(A)** In serum from healthy individuals, the alternative pathway is active at low levels but tightly regulated in the fluid phase by regulators, resulting in a very low level of complement activation product deposition on the EC surface. The detection of an increased complement deposition when incubation is performed with pathological serum **(B)** could result in either i) complement overactivation that overwhelms EC capacity of regulation (orange) or ii) defect in complement regulation in fluid or solid phase. Both are induced by tested human serum incubated with EC. Orange arrows represent some mechanisms involved in complement overactivation in serum (1): the participation of a coactivation of classical/alternative pathway due to pathological immunoglobulins, immune complexes, or lectin pathway activation by polymeric IgA in IgA nephropathy (2), an increase in the formation of fluid phase C3 convertases in the presence of heme or fluid phase activating surface, and the stabilization of C3 (3) or C5 (4) convertases by pathological immunoglobulins, such as C3 and C5 nephritic factors. Red crosses represent potential defects in alternative complement pathway regulation in the fluid phase (1) and on the cell surface (2, 3). These defects in complement regulation could be the consequence of inhibition of the main alternative pathway regulator FH due to anti-factor H antibodies (such as in aHUS), a lack of function, or a quantitative deficiency of FH and FI due to pathological genetic variants. *CR1: weak expression of CR1 on endothelial cells. CR1, complement receptor 1 (CD35); FB, factor B; FD, factor D; FH, factor H; FI, factor I; FP, properdin; MCP, membrane cofactor protein.

Therefore, this test has been considered a tool to distinguish aHUS from TTP. It is important to note that sC5b-9, reflecting terminal pathway activation and regulation, is elevated under both aHUS and TTP plasma conditions (71, 72). One possibility is that both conditions are associated with complement activation. However,

in aHUS, complement overactivation exceeds alternative and terminal pathway regulation, leading to C5b-9 deposits. In contrast, in TTP, complement activation is counterbalanced by complement regulation, leading to sC5b-9 release, but not C5b-9 deposits in the modified Ham test.

TABLE 1 | Production of distinct complement components and expression of regulators according to endothelial cell type after stimulation.

		TNF	INF gamma	IL1 beta	Heme
HRGEC	C3	↑	↑	→*	
	C4	→*	↑	→*	
	C5	→*		→*	
	FB	↑		→*	
	FD	→*		→*	
	Properdin	↓*		→*	
	FH	→		→*	
	FI			→*	
	TM	↓		↑	
	CD46	↑		→	↓
	CD55	→		→	↓
	CD59	→		→	
	E-selectine	↑	→		
	C3aR	↑			
	C5aR				
BMVEC	C3	↑			
	C4	→*			
	C5	→*			
	FB	↑			
	FD	→*			
	Properdin	↓*			
	FH	→			
	CD46	↑			
	CD55	→			
	C3aR	↑			
HMEC	E-selectine	↑	→		
	C3		→		
	C4		↑		
	CD46				↓
	CD55				→
HUVEC	C2		↑		
	C3	↑	→/↓	↑	
	C4			→*	
	C5			→*	
	FB	↑	↑	↑*	
	FD			→*	
	Properdin			→*	
	FH		↑	↓	
	FI			→*	
	TM	↓		→	
	CD46	↑		→	↓
	CD55	↑		↑	↓
	CD59	→		→	→
	E-selectin	↑	→		
	P-selectin				↑
C1-inh		↑			

The data presented here are mainly concerned with protein expression. ↑, increase in protein production; ↓, decrease and →, no change. *Denotes transcriptomic data. For details, please refer to **Table S2**. BMVEC, brain microvascular endothelial cells; HMEC, human microvascular endothelial cells; HRGEC, human renal glomerular endothelial cells; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells.

Micro- or macrovascular origin of the EC tissue lineages also needs to be considered. Complement-mediated EC injury demonstrates specific cell tropism according to pathophysiological processes. In HUS and TTP, microvascular EC of dermal, renal, and cerebral origin are more sensitive to apoptosis, whereas microvascular EC of pulmonary and hepatic origin and macrovascular EC are resistant (73). Distinct sensitivity of EC to complement attack has also been explored in aHUS and heme exposure. The demonstration of a distinct EC response in terms of complement regulator expression after a trigger (here heme) was proposed to partially explain the kidney tropism in this disease (66).

HUVEC are primary macrovascular EC isolated from human umbilical cords. These are the most frequently used cells for *ex vivo* assays (74). If tissue specificity is required, HRGEC (75) or GENCs (76), which are both isolated from human glomeruli, can be used. More recently, the use of blood outgrowth EC obtained from the differentiation of circulating marrow-derived endothelial progenitor cells isolated from peripheral blood has been proposed (77).

Comparative Analysis of the Available Endothelial Assays

These tests consist of the quantification of complement activation products (C3 activation fragments and C5b-9) deposits on EC by immunofluorescence (IF) measured by confocal microscopy or flow cytometry (fluorescence-activated cell sorting, FACS) after incubation with a serum sample of interest. Different protocols have been proposed to study complement activation on the EC surface in several pathological conditions, including aHUS (30, 78–88), TMA of other etiologies (89, 90), HELLP syndrome and pre-eclampsia (91), C3G (14, 92), lupus nephritis (LN) (93, 94), APS (95, 96), SCD (29), hemolytic anemia (97) and hyperhemolytic transfusion reaction without hemoglobinopathy (98).

The general procedure of the *ex vivo* assay and the different protocols are presented in **Figure 3**.

To Pre-Activate or Not Pre-Activate EC?

Resting EC or EC pre-activated by cytokines, ADP, or heme can be used (**Table S3**) to provide additional information.

When resting HUVEC were incubated with aHUS FB mutants added to FB-depleted normal human serum (NHS), enhanced C3b/iC3b-fragment deposition as measured by an anti-C3c-reacting antibody was observed (78). The same result was obtained for some cases when aHUS patient serum was incubated with resting HUVEC (30, 79). Nevertheless, incubation with NHS depleted in FB and reconstituted with other aHUS FB variants (80) or incubation with aHUS serum from patients carrying some C3 or FH variants (30, 79) may be insufficient to induce C3 or C5b-9 deposits. When quiescent HMEC-1 were incubated with aHUS serum from patients carrying mutations in FH, FI, C3, or FH/CFHR1 hybrid, enhanced C3c or C5b-9 deposition was reported only if serum was collected during the acute phases of the disease and not after reaching remission (82, 89). Furthermore, deposits on quiescent HMEC-1 are better correlated with relapse risk during the tapering or discontinuation of eculizumab (85).

TABLE 2 | Endothelial cells used for *ex vivo* experiments.

	Conditionally immortalized	Primary
Macrovascular		HUVEC
Microvascular	CI-GenC HMEC-1	BMVEC HRGEC BOEC

BMVEC, brain microvascular endothelial cells; BOEC, blood outgrowth endothelial cells; CI-GenC, conditionally immortalized human glomerular endothelial cells; HMEC, human microvascular endothelial cells; HRGEC, human renal glomerular endothelial cells; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells.

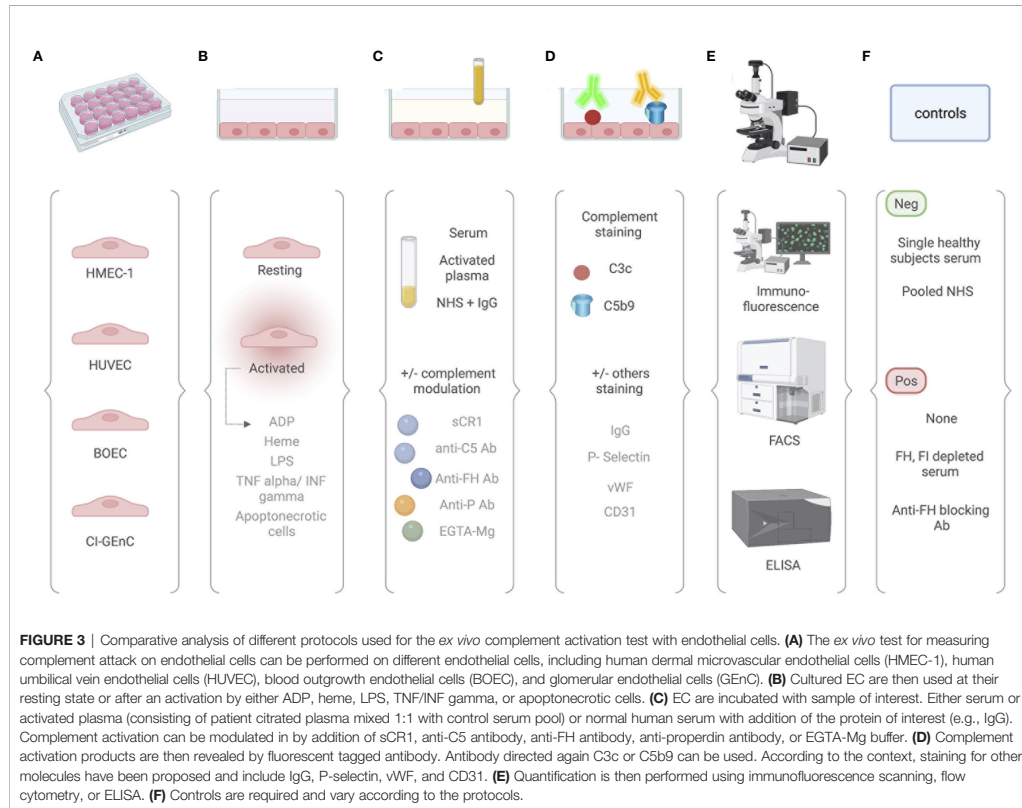


FIGURE 3 | Comparative analysis of different protocols used for the *ex vivo* complement activation test with endothelial cells. **(A)** The *ex vivo* test for measuring complement attack on endothelial cells can be performed on different endothelial cells, including human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1), human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), blood outgrowth endothelial cells (BOEC), and glomerular endothelial cells (GenC). **(B)** Cultured EC are then used at their resting state or after an activation by either ADP, heme, LPS, TNF/INF gamma, or apoptonecrotic cells. **(C)** EC are incubated with sample of interest. Either serum or activated plasma (consisting of patient citrated plasma mixed 1:1 with control serum pool) or normal human serum with addition of the protein of interest (e.g., IgG). Complement activation can be modulated in by addition of sCR1, anti-C5 antibody, anti-FH antibody, anti-properdin antibody, or EGTA-Mg buffer. **(D)** Complement activation products are then revealed by fluorescent tagged antibody. Antibody directed again C3c or C5b9 can be used. According to the context, staining for other molecules have been proposed and include IgG, P-selectin, vWF, and CD31. **(E)** Quantification is then performed using immunofluorescence scanning, flow cytometry, or ELISA. **(F)** Controls are required and vary according to the protocols.

To increase test sensitivity, the authors proposed pre-activating EC. Modifications in surface-bound protein expression enable complement activation. This was achieved in the case of P-selectin expression on HMEC-1 pre-activated with ADP, LPS, or thrombin (82) or P-selectin expression on HUVEC or GenC pre-activated with heme (30, 80, 99), which could allow C3b binding and C3 convertase formation. Enhanced formation of C3 fragments by TNF/INF pre-activation and C5b-9 deposition by ADP pre-activation on HUVEC or HMEC-1 cells was described after incubation of these cells with serum from asymptomatic carriers of mutations in AP regulatory proteins

or C3 (79, 82). The normal range was established when pre-activated EC were incubated with sera from healthy donors. In addition, serum from healthy family members without the mutation was within the normal range in this assay (79).

What Kind of Blood Samples Might Be Incubated With EC?

Serum has been used as the source of complement proteins in the vast majority of the tests described above. One limitation of these tests, particularly when deposits are detected by IF, is the variation in the results, reportedly from 30% to 52% when

activated HMEC-1 were incubated with serum collected at the acute phase of aHUS (91). To reduce this variation, Palomo et al. proposed the use of activated plasma, which refers to citrated plasma mixed 1:1 with a control serum pool. Using this approach, the authors derived a coefficient of variation of 9% to 18% (91). C3 consumption by the patient or loss of C3 activity during the pre-analytical phase are also potential factors responsible for this variation (4). Finally, for all complement assays and to avoid *in vitro* complement activation, proper blood collection and processing must be achieved (100). Processing of plasma or serum sample must be performed within a few hours of collection, with storage at -80°C and defrosting immediately before use to avoid repeated freezing and thawing.

To explore the functional consequences of autoantibodies against C3 and properdin in SLE, Vasilev et al. and Radanova et al. incubated HUVEC with NHS supplemented with purified IgG from patients positive for such autoantibodies (93, 94). Using this strategy, complement deposition on EC can be directly ascribed to the addition of autoantibodies to NHS. The same approach was applied for anti-C3b/FB autoantibodies in patients with C3G (14). To understand the mechanism behind complement deposits on EC from patients with SCD, microvesicles from normal or patient-derived erythrocytes were added to normal serum to model the disease condition. Enhanced binding of the C3 activation products was demonstrated (29, 101).

Which Controls Are Relevant?

Most often, NHS is used as a negative control (14, 29, 30, 78–83) (Table S4). An important aspect to consider is the inter-individual variability in deposits induced by normal sera. FACS analysis has revealed that this variability was relatively low when sera from 50 healthy donors were tested (79). However, this is a concern, particularly when deposits are detected by IF. This has not been directly reported, but has been suggested by the use of pooled sera in more recent papers (85, 91) and our own experience. Aiello et al. reported that C3 and C5b-9 deposits obtained after a single healthy subject serum (N=12) incubation range from 0.5 to 1.5 fold increase of stained surface area compared to pooled serum (from 10 healthy donors) run in parallel (87).

Several authors did not use any positive controls for their experiments (82, 83, 85, 90, 91). The comparison was only made with the deposits obtained with negative controls. It might be interesting to position the results on a scale. Positive controls with published data are FH or FI depleted NHS (14, 79, 81) or normal serum supplemented with blocking anti-FH antibodies targeting the N-terminus or C-terminus (30, 80) or with FH19-20, corresponding to the two last domains of FH, able to compete with the full FH protein for cell surface binding (97).

The main issues with this type of assay are the lack of validated international standards as well as standardized positive and negative controls. The variability of the results in samples from healthy donors needs to be studied extensively to determine the appropriate cutoff. In addition, the impact of C3 or other complement protein consumption in the patient and the influence of the pre-analytical phase must be determined to avoid false positive and false negative results.

Which Deposits Should Be Measured?

The objective of these tests is to demonstrate and explore complement overactivation or dysregulation on the EC surface after incubation with blood samples of interest. This is enabled by quantification of the deposition of complement component products resulting from activation or regulation. C3c (a common epitope to C3, C3(H₂O), C3b, and iC3b) (which reflects C3 convertase activity and the early phase of the complement cascade) can be detected by polyclonal anti-C3c antibody. Antibody targeting C5b-9 reveals the final step of the cascade. When a signal is detected on the cell membrane, it can be assumed that the detected fragment is C3b or iC3b covalently attached to the surface. Nevertheless, heme-activated EC and likely ADP-activated EC (102, 103) express P-selectin, which recruits C3b, C3(H₂O), and a C3(H₂O)-like form of C3 generated after contact with heme (30, 99). Properdin also binds to heme-exposed or stressed EC, promoting complement activation in a similar manner without covalent C3b binding (97). This is an additional mechanism for amplification of complement activation on the EC surface. C5b-9 deposits may be more relevant in identifying dysregulation at any step. Nevertheless, early dysregulation can induce C3 activation fragment deposits without C5b-9 formation because of TP regulation. C5b-9 is readily detectable by IF but is much more difficult to detect by FACS because of the weak shifts of the peaks. To test for CP participation, the presence of C4d-positive deposits was also investigated (82, 89). Staining can also be performed under the same conditions for von Willebrand Factor, C5aR1, P-selectin, and others (87).

Evaluation of Activated Pathways

The test can be modified to assess which complement pathway is activated in given pathological settings. The test can be performed under different conditions to avoid CP and LP contributions, which include C2 (30) or C1q (104) depleted NHS, addition of SCRI (87) or Mg-EGTA buffer (30, 78, 93, 94). EGTA chelates Ca²⁺, which is crucial for CP and LP activation, whereas AP depends on Mg²⁺. If AP has to be inhibited, FB-depleted NHS can be used. These reagents are applicable for test conditions, where the activating factor is added externally to the serum (i.e., IgG, heme, microvesicles, etc.). When patient samples are used directly, the same effect can be achieved by inhibiting C1q, C4, FB, or properdin with blocking antibodies, protein constructs, or small molecules, if available (97). Quantification of complement activation products (split fragments generated by cleavage of complement components or protein complexes when activated components bind their target (i.e., C3a, C4a, Ba, Bb, C5a, and sC5b-9) in the supernatant might be an additional element to study complement cascade activation.

Which Techniques Are Used for Detection and Quantification?

The two main detection techniques commonly used are FACS and IF. HUVEC pre-activated with heme and then incubated with NHS or aHUS serum showed results similar by FACS or IF detection (30). IF directly analyzes deposits on EC grown on slides. FACS requires a cell detachment step before staining, with

the potential risk of losing a part of the deposit signal. In contrast, as mentioned by Gavriilaki et al., obtaining quantitative data by IF requires confocal microscopy and further analysis using specialized software (70). When IF is used, the area occupied by fluorescent staining in fields systematically digitized along the surface is quantified. The quantified results expressed as the mean of the square number of pixels per field are compared with the negative control (82, 83, 85, 89, 91). Considering the number of EC on which fluorescence has been measured and the staining intensity might appear relevant. In contrast, FACS allows the rapid and objective quantification of deposits.

What Are the Functional Consequences of Such Deposits?

If enhancement of complement fragment deposits on EC is interpreted as pathogenic, the functional consequences of such deposits must be questioned. Lactate dehydrogenase release from EC reflects cell damage. This release can be measured in the cell culture supernatant (104). Analysis of complement deposits can also be associated with a cell viability assay, corresponding to a colorimetric assay based on cleavage of the WST-1 tetrazolium salt by mitochondrial dehydrogenases in viable cells (70). Cellular integrity can be verified by May-Grunwald Giemsa staining (88). Direct cell death rarely occurs under these experimental conditions. Experiments testing cell activation status by complement overactivation have not been reported in the literature and are needed to further understand the impact of complement on endothelial injury. Analysis of transcriptomic modifications in EC exposed to complement deposits under several conditions could also be of interest.

Clinical and Therapeutic Relevance of the Obtained Results

The *ex vivo* EC assay, consisting in the quantification of complement activation products (C3 activation fragments or C5b-9) deposits on EC (by IF measured on confocal microscopy or FACS), after incubation with a serum sample of interest, was first used for specific characterization of complement component abnormalities (78–81, 83) or exploration of mechanisms implicated in EC injury (30) in the main complementopathy, aHUS. The assay was then used to demonstrate and explore complement activation and participation in the pathophysiology of several diseases, including C3G (14, 92), HELLP syndrome and pre-eclampsia (91, 105), TMA associated with severe hypertension (89, 106), drug-induced TMA (90), SCD (29), hemolytic anemia (97, 98), SLE (93, 94), and APS (96). Demonstration of increasing complement deposits on EC incubated with pathological sera is not sufficient to determine what is responsible for complement activation at the EC surface. Modulation of the test conditions can help in detailing complement activation. This was the case when complement activation was inhibited by the addition of hemopexin to the sera of patients with SCD (29).

Noris et al. and Galbusera et al. also proposed the use of this *ex vivo* EC test to monitor eculizumab therapy in patients with aHUS (82, 85). During eculizumab tapering or discontinuation, disease relapse preceded or was associated with an increase in C5b-9 deposits on resting HMEC-1 in all patients. In contrast,

only one patient without relapse showed increased deposits (85). In clinical practice, CH50 is the only routine test used to monitor eculizumab therapy. CH50 is reportedly strongly suppressed in patients receiving eculizumab according to the standard protocol. However, CH50 does not allow monitoring of eculizumab dosage tapering or discontinuation, as it is not well correlated with relapse risk (82, 85). Eculizumab therapy monitoring using the Wieslab[®] complement system screen (107) or the modified Ham test (108) has also been proposed. Thus, the *ex vivo* EC assay could represent a test of interest to a better personalized complement-blocking therapy, but first needs to be more standardized.

This test can also be used to better classify and assess the prognosis of specific diseases. This is the case for hypertensive TMA, as Timmermans et al. demonstrated in a cohort of hypertension emergencies associated with TMA (106). The authors demonstrated a statistical association between increased C5b-9 deposition in the EC *ex vivo* test and kidney survival. Moreover, they reported an improvement in renal function for those with increased deposits treated with eculizumab. The authors proposed a classification of TMA-hypertensive emergency based on the EC *ex vivo* test (106).

Finally, many new anti-complement drugs targeting specific steps of the cascade have been under development in recent years (109). A standardized and validated assay to study complement activation could be a useful tool in their development.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The increasing demonstration of complement involvement in the pathophysiology of many human diseases has mandated the development of tools to finely explore complement activation. Complement is a complex enzymatic cascade that is highly regulated in constant interplay with its environment. The current arsenal for complement exploration does not provide functional characterization and does not report on the complex interplay between complement and its environment, particularly the cell surface.

The development of tests with these capabilities could allow for a deeper exploration of the mechanisms of complement activation in several diseases. This information could inform the development of a complement blocking therapeutic strategy based on pathophysiological mechanisms.

Ex vivo complement activation on EC represents a promising tool for demonstrating and exploring complement activation (Figure 4). It not only recapitulates complex complement cascade regulation *in vivo*, but also allows modification of several steps of the experimental procedure to characterize complement activation mechanisms.

However, there are still unanswered questions hindering broad use. The first is the variability in the results and the inter-individual variability in deposits induced by normal sera. Comprehension of the precise mechanism responsible for complement deposition in this assay would improve its better use. The second issue is to standardize the main steps of the procedure to improve the interexperimental comparison.

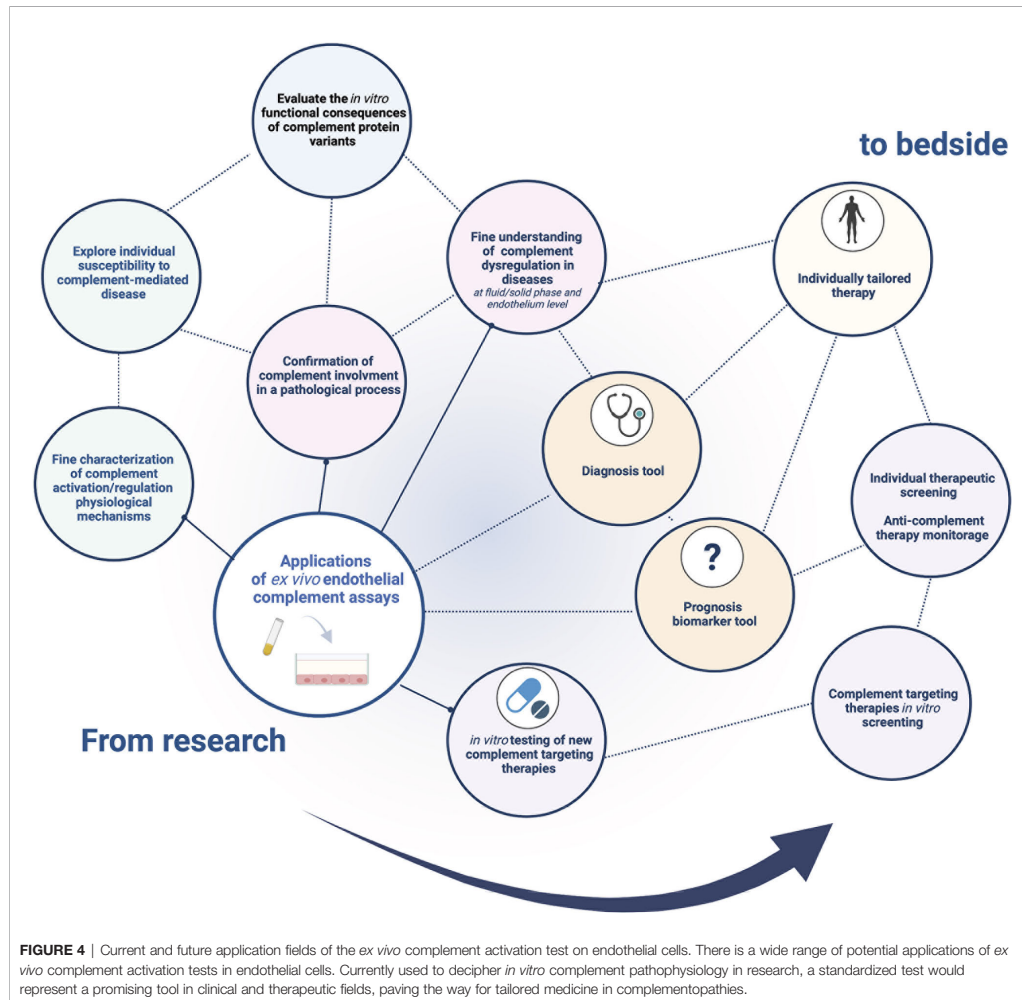


FIGURE 4 | Current and future application fields of the ex vivo complement activation test on endothelial cells. There is a wide range of potential applications of ex vivo complement activation tests in endothelial cells. Currently used to decipher *in vitro* complement pathophysiology in research, a standardized test would represent a promising tool in clinical and therapeutic fields, paving the way for tailored medicine in complementopathies.

The use of such a test could be multiple, including molecular functional characterization, disease pathophysiology exploration, prognosis classification, complement targeting drug development, and complement therapeutic monitoring. The use of standardized conditions will expand the field of this promising tool.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M-SM, SC, and LR conceptualized and conceived the manuscript. M-SM drafted the manuscript, including the literature search, reading, and writing. SC, VF-B, AD, and LR edited and critically

evaluated the manuscript. All authors have contributed to the manuscript and approved the submitted version.

FUNDING

This research was funded by ANR JCJC 2020 COMSIGN.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.860689/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Magro C, Mulvey JJ, Laurence J, Seshan S, Crowson AN, Dannenberg AJ, et al. Docked SARS CoV-2 Proteins Within the Cutaneous and Subcutaneous Microvasculature and Their Role in the Pathogenesis of Severe COVID-19. *Hum Pathol* (2020) 106:106–16. doi: 10.1016/j.humpath.2020.10.002
- Fakhouri F, Zuber J, Frémeaux-Bacchi V, Loirat C. Haemolytic Uraemic Syndrome. *Lancet* (2017) 390:681–96. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30062-4
- Brodsky RA. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Blood* (2014) 124:2804–11. doi: 10.1182/blood-2014-02-522128
- Roumenina LT, Loirat C, Dragon-Durey M-A, Halbwachs-Mecarelli L, Sautès-Fridman C, Frémeaux-Bacchi V. Alternative Complement Pathway Assessment in Patients With Atypical HUS. *J Immunol Methods* (2011) 365:8–26. doi: 10.1016/j.jim.2010.12.020
- Heinen S, Józsi M, Hartmann A, Noris M, Remuzzi G, Skerka C, et al. Hemolytic Uremic Syndrome: A Factor H Mutation (E1172Stop) Causes Defective Complement Control at the Surface of Endothelial Cells. *J Am Soc Nephrol* (2007) 18:506–14. doi: 10.1681/ASN.2006091069
- Dragon-Durey M-A. Heterozygous and Homozygous Factor H Deficiencies Associated With Hemolytic Uremic Syndrome or Membranoproliferative Glomerulonephritis: Report and Genetic Analysis of 16 Cases. *J Am Soc Nephrol* (2004) 15:787–95. doi: 10.1097/01.ASN.0000115702.28859.A7
- Lehtinen MJ, Rops AL, Iseman DE, van der Vlag J, Jokiranta TS. Mutations of Factor H Impair Regulation of Surface-Bound C3b by Three Mechanisms in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *J Biol Chem* (2009) 284:15650–8. doi: 10.1074/jbc.M900814200
- Manuelian T, Hellwege J, Meri S, Caprioli J, Noris M, Heinen S, et al. Mutations in Factor H Reduce Binding Affinity to C3b and Heparin and Surface Attachment to Endothelial Cells in Hemolytic Uremic Syndrome. *J Clin Invest* (2003) 111:1181–90. doi: 10.1172/JCI16651
- Kavanagh D, Richards A, Noris M, Hauhart R, Liszewski MK, Karpman D, et al. Characterization of Mutations in Complement Factor I (CFI) Associated With Hemolytic Uremic Syndrome. *Mol Immunol* (2008) 45:95–105. doi: 10.1016/j.molimm.2007.05.004
- Bienaim F, Dragon-Durey M-A, Regnier CH, Nilsson SC, Kwan WH, Blouin J, et al. Mutations in Components of Complement Influence the Outcome of Factor I-Associated Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Kidney Int* (2010) 77:339–49. doi: 10.1038/ki.2009.472
- Frémeaux-Bacchi V, Moulton EA, Kavanagh D, Dragon-Durey M-A, Blouin J, Caudy A, et al. Genetic and Functional Analyses of Membrane Cofactor Protein (CD46) Mutations in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *J Am Soc Nephrol* (2006) 17:2017–25. doi: 10.1681/ASN.2005101051
- Dragon-Durey M-A, Loirat C, Cloarec S, Macher M-A, Blouin J, Nivet H, et al. Anti-Factor H Autoantibodies Associated With Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *J Am Soc Nephrol* (2005) 16:555–63. doi: 10.1681/ASN.2004050380
- Blanc C, Togarsimalemath SK, Chauvet S, Le Quintrec M, Moulin B, Buchler M, et al. Anti-Factor H Autoantibodies in C3 Glomerulopathies and in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: One Target, Two Diseases. *J Immunol* (2015) 194:5129–38. doi: 10.1093/jimmunol.1402770
- Marinozzi MC, Roumenina LT, Chauvet S, Hertig A, Bertrand D, Olanje J, et al. Anti-Factor B and Anti-C3b Autoantibodies in C3 Glomerulopathy and Ig-Associated Membranoproliferative Gn. *J Am Soc Nephrol* (2017) 28:1603–13. doi: 10.1681/ASN.2016030343
- Iatropoulos P, Noris M, Mele C, Piras R, Valoti E, Bresin E, et al. Complement Gene Variants Determine the Risk of Immunoglobulin-Associated MPGN and C3 Glomerulopathy and Predict Long-Term Renal Outcome. *Mol Immunol* (2016) 71:131–42. doi: 10.1016/j.molimm.2016.01.010
- Sansonno D, Gesualdo L, Manno C, Schena FP, Dammacco F. Hepatitis C Virus-Related Proteins in Kidney Tissue From Hepatitis C Virus-Infected Patients With Cryoglobulinemic Membranoproliferative Glomerulonephritis. *Hepatology* (1997) 25:1237–44. doi: 10.1002/hep.510250529
- Stegall MD, Chedid MF, Cornell LD. The Role of Complement in Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplantation. *Nat Rev Nephrol* (2012) 8:670–8. doi: 10.1038/nrneph.2012.212
- Banda NK, Takahashi K, Wood AK, Holers VM, Arend WP. Pathogenic Complement Activation in Collagen Antibody- Induced Arthritis in Mice Requires Amplification by the Alternative Pathway. *J Immunol* (2007) 179:4101–9. doi: 10.4049/jimmunol.179.6.4101
- Banda NK, Thurman JM, Kraus D, Wood A, Carroll MC, Arend WP, et al. Alternative Complement Pathway Activation Is Essential for Inflammation and Joint Destruction in the Passive Transfer Model of Collagen-Induced Arthritis. *J Immunol* (2006) 177:1904–12. doi: 10.4049/jimmunol.177.3.1904
- Watanabe H, Garnier G, Circolo A, Wetsel RA, Ruiz P, Holers VM, et al. Modulation of Renal Disease in MRL/ Lpr Mice Genetically Deficient in the Alternative Complement Pathway Factor B. *J Immunol* (2000) 164:786–94. doi: 10.4049/jimmunol.164.2.786
- Elliott MK, Jarmi T, Ruiz P, Xu Y, Holers VM, Gilkeson GS. Effects of Complement Factor D Deficiency on the Renal Disease of MRL/lpr Mice. *Kidney Int* (2004) 65:129–38. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00371.x
- Sekine H, Kinsler TTH, Qiao F, Martinez E, Paulling E, Ruiz P, et al. The Benefit of Targeted and Selective Inhibition of the Alternative Complement Pathway for Modulating Autoimmunity and Renal Disease in MRL/lpr Mice. *Arthritis Rheum* (2011) 63:1076–85. doi: 10.1002/art.30222
- Nauta AJ, Trouw LA, Daha MR, Tijssma O, Nieuwland R, Schwaebel WJ, et al. Direct Binding of C1q to Apoptotic Cells and Cell Blebs Induces Complement Activation. *Eur J Immunol* (2002) 32:1726. doi: 10.1002/1521-4141(200206)32:6<1726::AID-IMMU1726>3.0.CO;2-R
- Sjöberg AP, Manderson GA, Mörgelin M, Day AJ, Heinegård D, Blom AM. Short Leucine-Rich Glycoproteins of the Extracellular Matrix Display Diverse Patterns of Complement Interaction and Activation. *Mol Immunol* (2009) 46:830–9. doi: 10.1016/j.molimm.2008.09.018
- Russell MW, Mansa B. Complement-Fixing Properties of Human IgA Antibodies Alternative Pathway Complement Activation by Plastic-Bound, But Not Specific Antigen-Bound, IgA. *Scand J Immunol* (1989) 30:175–83. doi: 10.1111/j.1365-3083.1989.tb01199.x
- Roos A, Bouwman LH, van Gijlswijk-Janssen DJ, Faber-Krol MC, Stahl GL, Daha MR. Human IgA Activates the Complement System Via the Mannan-Binding Lectin Pathway. *J Immunol* (2001) 167:2861–8. doi: 10.4049/jimmunol.167.5.2861
- Maillard N, Boerma LJ, Hall S, Huang ZQ, Mrug M, Moldoveanu Z, et al. L'analyse Protéomique De Complexes Immuns Artificiels IgA1-IgG Révèle Une Association Avec Des Formes Actives De C3. *Néphrologie Thérapeutique* (2014) 10:279. doi: 10.1016/j.nephro.2014.07.347
- Schreiber A, Rousselle A, Becker JU, von Massenhausen A, Linkermann A, Ketritz R. Necroptosis Controls NET Generation and Mediates Complement Activation, Endothelial Damage, and Autoimmune Vasculitis. *Proc Natl Acad Sci* (2017) 114:E9618–25. doi: 10.1073/pnas.1708247114
- Roumenina LT, Chadebech P, Bodivit G, Vieira-Martins P, Grunenwald A, Boudhaby I, et al. Complement Activation in Sickle Cell Disease: Dependence on Cell Density, Hemolysis and Modulation by Hydroxyurea Therapy. *Am J Hematol* (2020) 95:456–64. doi: 10.1002/ajh.25742
- Frimat M, Tabarin F, Dimitrov JD, Poitou C, Halbwachs-Mecarelli L, Frémeaux-Bacchi V, et al. Complement Activation by Heme as a Secondary Hit for Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Blood* (2013) 122:282–92. doi: 10.1182/blood-2013-03-489245
- Boudhaby I, Poillat V, Grunenwald A, Torset C, Leon J, Daugan MV, et al. Complement Activation is a Crucial Driver of Acute Kidney Injury in Rhabdomyolysis. *Kidney Int* (2020) 99(3):581–97. doi: 10.1016/j.kint.2020.09.033
- Ritis K, Doumas M, Mastellos D, Micheli A, Giaglis S, Magotti P, et al. A Novel C5a Receptor-Tissue Factor Cross-Talk in Neutrophils Links Innate Immunity to Coagulation Pathways. *J Immunol* (2006) 177:4794–802. doi: 10.4049/jimmunol.177.7.4794
- Sansonno D, Dammacco F. Hepatitis C Virus, Cryoglobulinaemia, and Vasculitis: Immune Complex Relations. *Lancet Infect Dis* (2005) 5:227–36. doi: 10.1016/S1473-3099(05)70053-0
- Loupy A, Lefaucheur C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *N Engl J Med* (2018) 379:1150–60. doi: 10.1056/NEJMra1802677
- Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, Sarma JV, Barnum SR, Lambris JD, et al. Drusen Complement Components C3a and C5a Promote Choroidal Neovascularization. *Proc Natl Acad Sci* (2006) 103:2328–33. doi: 10.1073/pnas.0408835103
- Botto M, Dell' Agnola C, Bygrave AE, Thompson EM, Cook HT, Petry F, et al. Homozygous C1q Deficiency Causes Glomerulonephritis Associated With Multiple Apoptotic Bodies. *Nat Genet* (1998) 19:56–9. doi: 10.1038/ng0598-56

37. Dick J, Gan P-Y, Ford SL, Odobasic D, Alikhan MA, Loosen SH, et al. C5a Receptor 1 Promotes Autoimmunity, Neutrophil Dysfunction and Injury in Experimental Anti-Myeloperoxidase Glomerulonephritis. *Kidney Int* (2018) 93:615–25. doi: 10.1016/j.kint.2017.09.018
38. Schreiber A, Xiao H, Jennette JC, Schneider W, Luft FC, Kettritz R. C5a Receptor Mediates Neutrophil Activation and ANCA-Induced Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* (2009) 20:289–98. doi: 10.1681/ASN.2008050497
39. Camous L, Roumenina L, Bigot S, Brachemi S, Frémeaux-Bacchi V, Lesavre P, et al. Complement Alternative Pathway Acts as a Positive Feedback Amplification of Neutrophil Activation. *Blood* (2011) 117:1340–9. doi: 10.1182/blood-2010-05-283564
40. Foreman KE, Vaporciyan AA, Bonish BK, Jones ML, Johnson KJ, Glosky MM, et al. C5a-Induced Expression of P-Selectin in Endothelial Cells. *J Clin Invest* (1994) 94:1147–55. doi: 10.1172/JCI117430
41. Jahn B, Von Kempis J, Krämer KL, Filsinger S, Hänsch GM. Interaction of the Terminal Complement Components C5b-9 With Synovial Fibroblasts: Binding to the Membrane Surface Leads to Increased Levels in Collagenase-Specific mRNA. *Immunology* (1993) 78:329–34.
42. Wan J-X, Fukuda N, Endo M, Tahira Y, Yao E-H, Matsuda H, et al. Complement 3 is Involved in Changing the Phenotype of Human Glomerular Mesangial Cells. *J Cell Physiol* (2007) 213:495–501. doi: 10.1002/jcp.21129
43. Ma Y, Kong L-R, Ge Q, Lu Y-Y, Hong M-N, Zhang Y, et al. Complement 5a-Mediated Trophoblasts Dysfunction is Involved in the Development of Pre-Eclampsia. *J Cell Mol Med* (2017) 22(2):1034–46. doi: 10.1111/jcmm.13466
44. Ekdahl KN, Persson B, Mohlin C, Sandholm K, Skattum L, Nilsson B. Interpretation of Serological Complement Biomarkers in Disease. *Front Immunol* (2018) 9:2237. doi: 10.3389/fimmu.2018.02237
45. Elhadad S, Chapin J, Copertino D, Van Besien K, Ahamed J, Laurence J. MASP2 Levels Are Elevated in Thrombotic Microangiopathies: Association With Microvascular Endothelial Cell Injury and Suppression by Anti-MASP2 Antibody Narsoplimab. *Clin Exp Immunol* (2021) 203:96–104. doi: 10.1111/cei.13497
46. Molnes TE, Lea T, Froland SS, Harboe M. Quantification of the Terminal Complement Complex in Human Plasma by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Monoclonal Antibodies Against a Neoantigen of the Complex. *Scand J Immunol* (1985) 22:197–202. doi: 10.1111/j.1365-3083.1985.tb01871.x
47. Mayer MM. On the Destruction of Erythrocytes and Other Cells by Antibody and Complement. *Cancer Res* (1961) 21:1262–9.
48. Platts-Mills TA, Ishizaka K. Activation of the Alternate Pathway of Human Complement by Rabbit Cells. *J Immunol Baltim Md 1950* (1974) 113:348–58.
49. Yamamoto S, Kubotsu K, Kida M, Kondo K, Matsuura S, Uchiyama S, et al. Automated Homogeneous Liposome-Based Assay System for Total Complement Activity. *Clin Chem* (1995) 41:586–90. doi: 10.1093/clinchem/41.4.586
50. Seelen MA, Roos A, Wieslander J, Molnes TE, Sjöholm AG, Wurzner R, et al. Functional Analysis of the Classical, Alternative, and MBL Pathways of the Complement System: Standardization and Validation of a Simple ELISA. *J Immunol Methods* (2005) 296:187–98. doi: 10.1016/j.jim.2004.11.016
51. Sanchezcorral P. Functional Analysis in Serum From Atypical Hemolytic Uremic Syndrome Patients Reveals Impaired Protection of Host Cells Associated With Mutations in Factor H. *Mol Immunol* (2004) 41:81–4. doi: 10.1016/j.molimm.2004.01.003
52. Daha MR, Fearon DT, Austen KF. C3 Nephritic Factor (C3NeF): Stabilization of Fluid Phase and Cell-Bound Alternative Pathway Convertase. *J Immunol Baltim Md 1950* (1976) 116:1–7.
53. Mori H, Cardiff RD. “Methods of Immunohistochemistry and Immunofluorescence: Converting Invisible to Visible.”. In: J Ursini-Siegel and N Beauchemin, editors. *The Tumor Microenvironment*. New York, NY: Springer (2016). p. 1–12. doi: 10.1007/978-1-4939-3801-8_1
54. Magro CM, Montahan S, Mulvey JJ, Yassin AH, Kaplan RB, Laurence JC. Role of the Skin Biopsy in the Diagnosis of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Am J Dermatopathol* (2015) 37:349–56. doi: 10.1097/DAD.0000000000000234
55. Sturtzel C. “Endothelial Cells”. In: S Sattler and T Kennedy-Lydon, editors. *The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology*. Cham: Springer International Publishing (2017). p. 71–91. doi: 10.1007/978-3-319-57613-8_4
56. Aird WC. Endothelial Cell Heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med* (2012) 2:a006429–a006429. doi: 10.1101/cshperspect.a006429
57. Dumas SJ, Meta E, Borri M, Luo Y, Li X, Rabelink TJ, et al. Phenotypic Diversity and Metabolic Specialization of Renal Endothelial Cells. *Nat Rev Nephrol* (2021) 17:441–64. doi: 10.1038/s41581-021-00411-9
58. Chi J-T, Chang HY, Haraldsen G, Jahnsen FL, Trovanskaya OG, Chang DS, et al. Endothelial Cell Diversity Revealed by Global Expression Profiling. *Proc Natl Acad Sci* (2003) 100:10623–8. doi: 10.1073/pnas.1434429100
59. Jambusaria A, Hong Z, Zhang L, Srivastava S, Jana A, Toth PT, et al. Endothelial Heterogeneity Across Distinct Vascular Beds During Homeostasis and Inflammation. *eLife* (2020) 9:e51413. doi: 10.7554/eLife.51413
60. Roumenina LT, Rayes J, Frimat M, Frémeaux-Bacchi V. Endothelial Cells: Source, Barrier, and Target of Defensive Mediators. *Immunol Rev* (2016) 274:307–29. doi: 10.1111/imr.12479
61. Sartain SE, Turner NA, Moake JL. Brain Microvascular Endothelial Cells Exhibit Lower Activation of the Alternative Complement Pathway Than Glomerular Microvascular Endothelial Cells. *J Biol Chem* (2018) 293:7195–208. doi: 10.1074/jbc.RA118.002639
62. Sartain SE, Turner NA, Moake JL. TNF Regulates Essential Alternative Complement Pathway Components and Impairs Activation of Protein C in Human Glomerular Endothelial Cells. *J Immunol* (2016) 196:832–45. doi: 10.4049/jimmunol.1500960
63. Kawakami Y, Watanabe Y, Yamaguchi M, Sakaguchi H, Kono I, Ueki A. TNF- α Stimulates the Biosynthesis of Complement C3 and Factor B by Human Umbilical Cord Vein Endothelial Cells. *Cancer Lett* (1997) 116:21–6. doi: 10.1016/S0304-3835(97)04737-X
64. Brooimans RA, van der Ark AA, Buurman WA, van Es LA, Daha MR. Differential Regulation of Complement Factor H and C3 Production in Human Umbilical Vein Endothelial Cells by IFN-Gamma and IL-1. *J Immunol Baltim Md 1950* (1990) 144:3835–40.
65. Lappin DF, Guc D, Hill A, McShane T, Whaley K. Effect of Interferon- γ on Complement Gene Expression in Different Cell Types. *Biochem J* (1992) 281:437–42. doi: 10.1042/bj2810437
66. May O, Merle NS, Grunenwald A, Gnemmi V, Leon J, Payet C, et al. Heme Drives Susceptibility of Glomerular Endothelium to Complement Overactivation Due to Inefficient Upregulation of Heme Oxygenase-1. *Front Immunol* (2018) 9:3008. doi: 10.3389/fimmu.2018.03008
67. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Susan S, DC B, et al. HMEC-1: Establishment of an Immortalized Human Microvascular Endothelial Cell Line. *J Invest Dermatol* (1992) 99:683–90. doi: 10.1111/1523-1747.ep12613748
68. Satchell SC, Tasman CH, Singh A, Ni L, Geelen J, von Ruhland CJ, et al. Conditionally Immortalized Human Glomerular Endothelial Cells Expressing Fenestrations in Response to VEGF. *Kidney Int* (2006) 69:1633–40. doi: 10.1038/sj.ki.5000277
69. Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent Cell Line Expressing Human Factor VIII-Related Antigen Established by Hybridization. *Proc Natl Acad Sci* (1983) 80:3734–7. doi: 10.1073/pnas.80.12.3734
70. Gavrilaki E, Yuan X, Ye Z, Ambinder AJ, Shanbhag SP, Streiff MB, et al. Modified Ham Test for Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Blood* (2015) 125:3637–46. doi: 10.1182/blood-2015-02-629683
71. Réti M, Farkas P, Csuka D, Rázsó K, Schlammadinger Á, Udvardy ML, et al. Complement Activation in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *J Thromb Haemost JTH* (2012) 10:791–8. doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04674.x
72. Bettoni S, Galbusera M, Gastoldi S, Donadelli R, Tentori C, Sparta G, et al. Interaction Between Multimeric Von Willebrand Factor and Complement: A Fresh Look to the Pathophysiology of Microvascular Thrombosis. *J Immunol* (2017) 199:1021–40. doi: 10.4049/jimmunol.1601121
73. Mitra D, Jaffe EA, Weksler B, Hajjar KA, Soderland C, Laurence J. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and Sporadic Hemolytic-Uremic Syndrome Plasmas Induce Apoptosis in Restricted Lineages of Human Microvascular Endothelial Cells. *Blood* (1997) 89:1224–34. doi: 10.1182/blood.V89.4.1224
74. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of Human Endothelial Cells Derived From Umbilical Veins. Identification By

- Morphologic and Immunologic Criteria. *J Clin Invest* (1973) 52:2745–56. doi: 10.1172/JCI107470
75. McGinn S, Poronnik P, Gallery ED, Pollock CA. A Method for the Isolation of Glomerular and Tubulointerstitial Endothelial Cells and a Comparison of Characteristics With the Human Umbilical Vein Endothelial Cell Model. *Nephrology* (2004) 9:229–37. doi: 10.1111/j.1440-1797.2004.00254.x
 76. van Setten PA, van Hinsbergh VWM, van der Velden TJAN, van de Kar NCAJ, Vermeer M, Mahan JD, et al. Effects of Tnf α on Verocytotoxin Cytotoxicity in Purified Human Glomerular Microvascular Endothelial Cells. *Kidney Int* (1997) 51:1245–56. doi: 10.1038/ki.1997.170
 77. Martin-Ramirez J, Hofman M, van den Biggelaar M, Hebbel RP, Voorberg J. Establishment of Outgrowth Endothelial Cells From Peripheral Blood. *Nat Protoc* (2012) 7:1709–15. doi: 10.1038/nprot.2012.093
 78. Roumenina LT, Jablonski M, Hue C, Blouin J, Dimitrov JD, Dragon-Durey M-A, et al. Hyperfunctional C3 Convertase Leads to Complement Deposition on Endothelial Cells and Contributes to Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Blood* (2009) 114:2837–45. doi: 10.1182/blood-2009-01-197640
 79. Roumenina LT, Frimat M, Miller EC, Provot F, Dragon-Durey M-A, Boredeau P, et al. A Prevalent C3 Mutation in aHUS Patients Causes a Direct C3 Convertase Gain of Function. *Blood* (2012) 119:4182–91. doi: 10.1182/blood-2011-10-383281
 80. Marinozzi MC, Vergoz L, Rybkine T, Ngo S, Bettoni S, Pashov A, et al. Complement Factor B Mutations in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome—Disease-Relevant or Benign? *J Am Soc Nephrol* (2014) 25:2053–65. doi: 10.1681/ASN.2013070796
 81. Schramm EC, Roumenina LT, Rybkine T, Chauvet S, Vieira-Martins P, Hue C, et al. Mapping Interactions Between Complement C3 and Regulators Using Mutations in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Blood* (2015) 125:2359–69. doi: 10.1182/blood-2014-10-609073
 82. Noris M, Galbusera M, Gastoldi S, Macor P, Banterla F, Bresin E, et al. Dynamics of Complement Activation in aHUS and How to Monitor Eculizumab Therapy. *Blood* (2014) 124:1715–26. doi: 10.1182/blood-2014-02-558296
 83. Valoti E, Alberti M, Tortajada A, Garcia-Fernandez J, Gastoldi S, Besso L, et al. A Novel Atypical Hemolytic Uremic Syndrome-Associated Hybrid *CFHR1/CFH* Gene Encoding a Fusion Protein That Antagonizes Factor H-Dependent Complement Regulation. *J Am Soc Nephrol* (2015) 26:209–19. doi: 10.1681/ASN.2013121339
 84. Rigother C, Delmas Y, Roumenina LT, Contin-Bordes C, Lepreux S, Bridoux F, et al. Distal Angiopathy and Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: Clinical and Functional Properties of an Anti-Factor H Ig α Antibody. *Am J Kidney Dis* (2015) 66:331–6. doi: 10.1053/ajkd.2015.03.039
 85. Galbusera M, Noris M, Gastoldi S, Bresin E, Mele C, Breno M, et al. An Ex Vivo Test of Complement Activation on Endothelium for Individualized Eculizumab Therapy in Hemolytic Uremic Syndrome. *Am J Kidney Dis* (2019) 74:56–72. doi: 10.1053/ajkd.2018.11.012
 86. Madden I, Roumenina LT, Langlois-Meurinne H, Guichoux J, Llanas B, Frémeaux-Bacchi V, et al. Hemolytic Uremic Syndrome Associated With Bordetella Pertussis Infection in a 2-Month-Old Infant Carrying a Pathogenic Variant in Complement Factor H. *Pediatr Nephrol* (2019) 34:533–7. doi: 10.1007/s00467-018-4174-1
 87. Aiello S, Gastoldi S, Galbusera M, Ruggenti PL, Portalupi V, Rota S, et al. C5a and C5aR1 are Key Drivers of Microvascular Platelet Aggregation in Clinical Entities Spanning From aHUS to COVID-19. *Blood Adv* (2021) 6(3):866–81. doi: 10.1182/bloodadvances.2021005246
 88. Piras R, Iatropoulos P, Bresin E, Todeschini M, Gastoldi S, Valoti E, et al. Molecular Studies and an Ex Vivo Complement Assay on Endothelium Highlight the Genetic Complexity of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: The Case of a Pedigree With a Null CD46 Variant. *Front Med* (2020) 7:579418. doi: 10.3389/fmed.2020.579418
 89. Timmermans SAMEG, Abdul-Hamid MA, Potjewijd J, Theunissen ROMFIH, Damoiseaux JGMC, Reutelingsperger CP, et al. C5b9 Formation on Endothelial Cells Reflects Complement Defects Among Patients With Renal Thrombotic Microangiopathy and Severe Hypertension. *J Am Soc Nephrol* (2018) 29:2234–43. doi: 10.1681/ASN.2018020184
 90. Blasco M, Martínez-Roca A, Rodríguez-Lobato LG, García-Herrera A, Rosiñol L, Castro P, et al. Complement as the Enabler of Carfilzomib-Induced Thrombotic Microangiopathy. *Br J Haematol* (2020) 193(1):181–7. doi: 10.1111/bjh.16796
 91. Palomo M, Blasco M, Molina P, Lozano M, Praga M, Torramade-Moix S, et al. Complement Activation and Thrombotic Microangiopathies. *Clin J Am Soc Nephrol* (2019) 14:1719–32. doi: 10.2215/CJN.05830519
 92. Chauvet S, Roumenina LT, Bruneau S, Marinozzi MC, Rybkine T, Schramm EC, et al. A Familial C3GN Secondary to Defective C3 Regulation by Complement Receptor 1 and Complement Factor H. *J Am Soc Nephrol* (2016) 27:1665–77. doi: 10.1681/ASN.2015040348
 93. Vasilev VV, Noe R, Dragon-Durey M-A, Chauvet S, Lazarov VJ, Deliyiska BP, et al. Functional Characterization of Autoantibodies Against Complement Component C3 in Patients With Lupus Nephritis. *J Biol Chem* (2015) 290:25343–55. doi: 10.1074/jbc.M115.647008
 94. Radanova M, Mihaylova G, Ivanova D, Daugan M, Lazarov V, Roumenina L, et al. Clinical and Functional Consequences of Anti-Properdin Autoantibodies in Patients With Lupus Nephritis. *Clin Exp Immunol* (2020) 201(2):135–44. doi: 10.1111/cei.13443
 95. Chaturvedi S, Braunstein EM, Yuan X, Yu J, Alexander A, Chen H, et al. Complement Activity and Complement Regulatory Gene Mutations are Associated With Thrombosis in APS and CAPS. *Blood* (2020) 135:239–51. doi: 10.1182/blood.2019003863
 96. Timmermans S, Damoiseaux J, Reutelingsperger C, van Paassen P. More About Complement in the Antiphospholipid Syndrome. *Blood* (2020) 136(12):1456–9. doi: 10.1182/blood.2020005171
 97. Chen JY, Galwankar NS, Emch HN, Menon SS, Cortes C, Thurman JM, et al. Properdin Is a Key Player in Lysis of Red Blood Cells and Complement Activation on Endothelial Cells in Hemolytic Anemias Caused by Complement Dysregulation. *Front Immunol* (2020) 11:1460. doi: 10.3389/fimmu.2020.01460
 98. Cid J, Fernández J, Palomo M, Blasco M, Bailó N, Diaz-Ricart M, et al. Hyperhemolytic Transfusion Reaction in Non-Hemoglobinopathy Patients and Terminal Complement Pathway Activation: Case Series and Review of the Literature. *Transfus Med Rev* (2020) 34(3):172–7. doi: 10.1016/j.tmr.2020.06.002
 99. Merle NS, Paule R, Leon J, Daugan M, Robe-Rybkine T, Poillat V, et al. P-Selectin Drives Complement Attack on Endothelium During Intravascular Hemolysis in TLR-4/Heme-Dependent Manner. *Proc Natl Acad Sci* (2019) 116:6280–5. doi: 10.1073/pnas.1814797116
 100. Mollnes TE, Garred P, Bergseth G. Effect of Time, Temperature and Anticoagulants on *In Vitro* Complement Activation: Consequences for Collection and Preservation of Samples to be Examined for Complement Activation. *Clin Exp Immunol* (1988) 73:484–8.
 101. Merle NS, Grunenwald A, Rajaratnam H, Gnemmi V, Frimat M, Figueres M-L, et al. Intravascular Hemolysis Activates Complement via Cell-Free Heme and Heme-Loaded Microvesicles. *JCI Insight* (2018) 3:e96910. doi: 10.1172/jci.insight.96910
 102. del Conde I, Cruz MA, Zhang H, López JA, Afshar-Kharghan V. Platelet Activation Leads to Activation and Propagation of the Complement System. *J Exp Med* (2005) 201:871–9. doi: 10.1084/jem.20041497
 103. Morigi M, Galbusera M, Gastoldi S, Locatelli M, Buelli S, Pezzotta A, et al. Alternative Pathway Activation of Complement by Shiga Toxin Promotes Exuberant C3a Formation That Triggers Microvascular Thrombosis. *J Immunol* (2011) 187:172–80. doi: 10.4049/jimmunol.1100491
 104. Noone DG, Riedl M, Pluthero FG, Bowman ML, Liszewski MK, Lu L, et al. Von Willebrand Factor Regulates Complement on Endothelial Cells. *Kidney Int* (2016) 90:123–34. doi: 10.1016/j.kint.2016.03.023
 105. Youssef L, Miranda J, Blasco M, Paules C, Croveto F, Palomo M, et al. Complement and Coagulation Cascades Activation Is the Main Pathophysiological Pathway in Early-Onset Severe Preeclampsia Revealed by Maternal Proteomics. *Sci Rep* (2021) 11:3048. doi: 10.1038/s41598-021-82733-z
 106. Timmermans SAMEG, Wérion A, Damoiseaux JGMC, Morelle J, Reutelingsperger CP, van Paassen P. Diagnostic and Risk Factors for Complement Defects in Hypertensive Emergency and Thrombotic Microangiopathy. *Hypertension* (2020) 75:422–30. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13714
 107. Volokhina EB, van de Kar NCAJ, Bergseth G, van der Velden TJAM, Westra D, Wetzels JFM, et al. Sensitive, Reliable and Easy-Performed Laboratory

- Monitoring of Eculizumab Therapy in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Clin Immunol Orlando Fla* (2015) 160:237–43. doi: 10.1016/j.clim.2015.05.018
108. Merrill SA, Brittingham ZD, Yuan X, Moliterno AR, Sperati CJ, Brodsky RA. Eculizumab Cessation in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Blood* (2017) 130:368–72. doi: 10.1182/blood-2017-02-770214
109. Mastellos DC, Ricklin D, Lambris JD. Clinical Promise of Next-Generation Complement Therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* (2019) 18:707–29. doi: 10.1038/s41573-019-0031-6

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Meuleman, Duval, Fremeaux-Bacchi, Roumenina and Chauvet. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Table S1: Characteristics of the endothelial cells used for in vitro experimentation at resting state

Characteristics	Endothelial cells
Surface proteins expressed at resting state	
DAF (CD55)	HMEC1=HUVEC<CI-GenC=HRGEC (FACS) (1); HRGECx2,5 > HUVEC (FACS) (2); BMVEC x2 > HRGEC (FACS) (3)
CD59	HRGEC x1,4 > HUVEC (FACS) (2)
MCP (CD46)	HMEC1=HUVEC<CI-GenC=HRGEC (FACS) (1), HRGEC x1,5> HUVEC (FACS) (2); BVMEC ≈ HRGEC (FACS) (3)
CR1 (CD35)	No/very low on HUVEC and CI-GenC (FACS) (4)
Thrombomodulin	HMEC1=HUVEC<CI-GenC=HRGEC (FACS) (1); HRGEC x1,3 > HUVEC (FACS) (2) Positive on BOEC (FACS) (5)
C3aR / C5aR	BMVEC x2 > HRGEC / Undetectable (FACS) (3)
PECAM-1 (CD31)	HUVEC>HRGEC (IHC) (6) HMEC=HUVEC>HRGEC (ELISA Cell) (7); CI-GenC=HRGEC (IF, WB)(8) HMEC1=HMEC (FACS)(9), Positive on BOEC (IF) (5) (FACS) (10)
ICAM 2	CI-GenC=HRGEC (WB) (8)
VEGFR2=flk1	HUVEC=HRGEC (IHC) (6) , CI-GenC=HRGEC (WB) (8) + on BOEC(IF) (5)
VE-Cadherin	CI-GenC=HRGEC (IF, WB) ((8) + on BOEC (FACS) (L) ((IF) (5)
tPA (supernatant)	HUVEC>HRGEC (ELISA) (11)
uPA(supernatant)	HUVEC<<HRGEC (ELISA) (11)
PAI-1 (supernatant)	HUVEC>>HRGEC (ELISA) (11)
Ratio tPA+uPA:PAI1	HUVEC antifibrinolytique (1:55) vs HRGEC profibrinolytique (24:1)(11)
VCAM-1	HMEC, HUVEC, HRGEC: Fine granular pattern on the surface (IF) (7)
VWF	HUVEC>HRGEC (IHC) (6) ; CI-GenC=HRGEC (IF,WB) (8); HMEC1=HMEC (IF) (9) ; Positive on BOEC (IF) (5)
Genes expression at resting state	
CD46 / CD55 / CD59	HRGEC> HUVEC : x0,3/x0,3/x1,7 (RTqPCR) (2); BOEC=HUVEC (RTqPCR)(10); CD46 et CD55: BMVEC x 6 / x 14 / NA > HRGEC (RTqPCR) (3)
Properdin / FD / CFH	HRGEC x7/ x3/ x3 >HUVEC (RTqPCR) (2); BMVEC x 4 < / x 4 < / x3,5 > HRGEC (RTqPCR) (3)
C3 / C5 / CFB / CFI / C4 / VWF / ADAMTS13	HUVEC=HRGEC (RTqPCR) (2); BMVEC x14 / x3 / x3/ x18 / x5 / NA / NA > HRGEC (RTqPCR) (3)
Thrombomodulin	HRGEC x2 > HUVEC (RTqPCR) (2); BMVEC x2,5 > HRGEC (RTqPCR) (3)
FI	BMVEC x18 > HRGEC (RTqPCR) (3)
C3aR / C5aR	BMVECx 3,8 < HRGEC / Undetectable (RTqPCR) (3)
VE-Cadherin	HRGEC<HUVEC (RTqPCR) (12)
PAI-1 / Thrombospondin / Fibronectin	HRGEC=CI-GenC (RTqPCR) (8)
Specific EC genes expression at resting state	
PECAM-1	CI-GenC=HRGEC (RTqPCR) (8)
ICAM2	CI-GenC=HRGEC (RTqPCR) (8)
VEGFR2	CI-GenC>HRGEC (RTqPCR) (8)
vWF	CI-GenC>HRGEC (RTqPCR) (8) ; BOEC=HUVEC (RTqPCR) (10)

Abbreviations:

BMVEC: Brain Microvascular Endothelial Cells
 BOEC: Blood outgrowth endothelial cells
 CI-GenC: Conditionally Immortalized Human Glomerular Endothelial Cell
 HMEC: Human Microvascular Endothelial Cells
 HRGEC: Human Renal Glomerular Endothelial Cell
 HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

References

1. May O, Merle NS, Grunenwald A, Gnemmi V, Leon J, Payet C, Robe-Rybikine T, Paule R, Delguste F, Satchell SC, et al. Heme Drives Susceptibility of Glomerular Endothelium to Complement Overactivation Due to Inefficient Upregulation of Heme Oxygenase-1. *Front Immunol* (2018) 9: doi: 10.3389/fimmu.2018.03008
2. Sartain SE, Turner NA, Moake JL. TNF Regulates Essential Alternative Complement Pathway Components and Impairs Activation of Protein C in Human Glomerular Endothelial Cells. *J Immunol* (2016) 196:832–845. doi: 10.4049/jimmunol.1500960
3. Sartain SE, Turner NA, Moake JL. Brain microvascular endothelial cells exhibit lower activation of the alternative complement

- pathway than glomerular microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* (2018) **293**:7195–7208. doi: 10.1074/jbc.RA118.002639
4. Roumenina LT, Jablonski M, Hue C, Blouin J, Dimitrov JD, Dragon-Durey M-A, Cayla M, Fridman WH, Macher M-A, Ribes D, et al. Hyperfunctional C3 convertase leads to complement deposition on endothelial cells and contributes to atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* (2009) **114**:2837–2845. doi: 10.1182/blood-2009-01-197640
 5. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* (2000) **105**:71–77. doi: 10.1172/JCI8071
 6. McGinn S, Poronnik P, Gallery ED, Pollock CA. A method for the isolation of glomerular and tubulointerstitial endothelial cells and a comparison of characteristics with the human umbilical vein endothelial cell model. *Nephrology* (2004) **9**:229–237. doi: 10.1111/j.1440-1797.2004.00254.x
 7. Murakami S, Morioka T, Nakagawa Y, Suzuki Y, Arakawa M, Oite T. Expression of Adhesion Molecules by Cultured Human Glomerular Endothelial Cells in Response to Cytokines: Comparison to Human Umbilical Vein and Dermal Microvascular Endothelial Cells. *Microvasc Res* (2001) **62**:383–391. doi: 10.1006/mvre.2001.2356
 8. Satchell SC, Tasman CH, Singh A, Ni L, Geelen J, von Ruhland CJ, O'Hare MJ, Saleem MA, van den Heuvel LP, Mathieson PW. Conditionally immortalized human glomerular endothelial cells expressing fenestrations in response to VEGF. *Kidney Int* (2006) **69**:1633–1640. doi: 10.1038/sj.ki.5000277
 9. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers Susan, Bosse DC, Lawley TJ. HMEC-1: Establishment of an Immortalized Human Microvascular Endothelial Cell Line. *J Invest Dermatol* (1992) **99**:683–690. doi: 10.1111/1523-1747.ep12613748
 10. Noone DG, Riedl M, Pluthero FG, Bowman ML, Liszewski MK, Lu L, Quan Y, Balgobin S, Schneppenheim R, Schneppenheim S, et al. Von Willebrand factor regulates complement on endothelial cells. *Kidney Int* (2016) **90**:123–134. doi: 10.1016/j.kint.2016.03.023
 11. Louise CB, Obrigg TG. Human Renal Microvascular Endothelial Cells as a Potential Target in the Development of the Hemolytic Uremic Syndrome as Related to Fibrinolysis Factor Expression, in Vitro. *Microvasc Res* (1994) **47**:377–387. doi: 10.1006/mvre.1994.1030
 12. Du L, Dong F, Guo L, Hou Y, Yi F, Liu J, Xu D. Interleukin-1 β increases permeability and upregulates the expression of vascular endothelial-cadherin in human renal glomerular endothelial cells. *Mol Med Rep* (2015) **11**:3708–3714. doi: 10.3892/mmr.2015.3172

Table S2: Specific characteristics of the endothelial cells after stimulation

Characteristics	Endothelial cells
Behavior after TNF alpha stimulation compared to resting cells	
PECAM-1 = CD31	↓ HMEC, HUVEC and HRGEC (ELISA Cell) (1)
VCAM1	↑ : HUVEC and HRGEC; no effect HMEC (ELISA Cell) (1)
E selectine	↑ HMEC, HRGEC and HUVEC (ELISA Cell) (1)
ICAM1	↑ HMEC1 ≈ HMEC (FACS) (2)
tPA (supernatant)	↓ HUVEC, ↑ HUVEC (ELISA) (3)
uPA (supernatant)	↑ HUVEC, no effect HRGEC (ELISA) (3)
PAI- 1 (supernatant)	↑ HUVEC, ↓ HRGEC (ELISA) (3)
Ratio tPA+uPA:PAI1	Accentuation of HUVEC antifibrinolytique (1:227) vs HRGEC profibrinolytique (75:1) (3)
CD46 / CD55	BMVEC ≈ / x2 > HRGEC (FACS) (4)
FH / C3 / FB (supernatant)	BMVEC x 1,5 / x4 / x4 > HRGEC (ELISA) (4)
C3a / Ba / C5a generation (supernatant)	BMVEC <<< / >x2 / <<< HRGEC (ELISA) (4)
FB cleavage to Ba	HRGEC: 4%; BMVEC : 2% (ELISA) (4)
C3aR / C5aR gene expression	BMVEC x23 < HRGEC / Undetectable (RTqPCR) (4)
C3aR / C5aR protein expression	BMVEC x2 > HRGEC / Undetectable (FACS) (4)
CD46 / CD55 / CD59 / TM	Profile HUVEC ≈ HRGEC: ≈ / ≈ / ≈ / ↓ (FACS) (5)
CD46 / CD55 / CD59 / TM gene expression	Profile HUVEC ≈ HRGEC: ≈ / ≈ / ≈ / ↓ (RTqPCR) (5) ; BMVEC x 4 / x18 / NA/ x10 > HRGEC (RTqPCR)(4)
Fi / FH gene expression	BMVEC x7 / x23 > HRGEC (RTqPCR)(4); minor effect: HUVEC ≈ HRGEC (RTqPCR) (5)
C3 / FB gene expression	↑ HRGEC > HUVEC (RTqPCR)(5) BMVEC x7 / x4 > HRGEC (RTqPCR) (4)
C5 / C4 / FD / FP gene expression	BMVEC x5 > x8 > x3 < / x4 < HRGEC (RTqPCR) (4) ; minor effect: HUVEC ≈ HRGEC (RTqPCR) (5)
VWF et ADAMTS13 gene expression	Minor effect: HUVEC ≈ HRGEC (RTqPCR) (5)
C3 / FB generation (supernatant)	↑ / ↑ HUVEC and HRGEC (Fluorescence immunoassay)(5); HUVEC : ↑ x 11 / ↑ x 13 (ELISA) (6)
Behavior after INF gamma stimulation compared to resting cells	
PECAM-1 = CD31	↓ HMEC, HUVEC and HRGEC (ELISA Cell) (1)
VCAM1	↑ HUVEC ; ≈ HMEC and HRGEC (ELISA Cell) (1)
E selectine	No effect: HMEC, HUVEC and HRGEC (ELISA Cell) (1)
FH production (supernatant)	HUVEC: ↑ (ELISA) (7)
FH expression (mRNA)	HUVEC: ↑) (Northern Blot) (7)
C2, C3, FB, C1inh, FH expression (mRNA)	HUVEC: ↑ / ↓ / ↑ / ↑ / ↑ (Northern Blot) (8)
C2, C3, FB, C1inh, FH generation (supernatant)	HUVEC: ↑ / ↓ / ↑ / ↑ / ↑ (ELISA) (8)
C3 / FB (supernatant)	HUVEC : ≈ / ↑ x5,5 (ELISA) (6)
C3 / C4 cellular synthesis	HMEC1: ≈ / ↑ CI-GenC : ↑ / ↑ (WB on lysates) (9)
Behavior after IL1 beta stimulation compared to resting cells	
VE Cadherin gene and protein expression	↓ HUVEC, ↑ HRGEC (RTqPCR, WB and IF) (10)
Permeability *	↑ HUVEC > HRGEC (10)
Trans Endothelial Electrical Resistance **	↓ HUVEC > HRGEC (10)
CD46 / CD55 / CD59 / TM protein expression	HUVEC & HRGEC : Minor effect (FACS) (5)
CD46 / CD55 / CD59 / TM gene expression	HUVEC & HRGEC : Minor effect (RTqPCR) (5)
C3 / FB gene expression	↑ C3 and FB HUVEC > HRGEC (RT-qPCR) (5)
C5, Fi, C4, VWF et ADAMTS13, Properdin, FD, CFH gene expression	No effect : HUVEC ≈ HRGEC (RT-qPCR) (5)
C3 / FB (supernatant)	HUVEC : ↑ x4,8 / ≈ (ELISA)(6)
Behavior after IL1 alpha stimulation compared to resting cells	
C3 / FB / FH generation (supernatant)	HUVEC : ↑ / ↑ / ↓ (ELISA) (11)
C3 / FB expression (mRNA)	HUVEC : ↑ / ↑ (Northern Blot) (11)
Behavior after LPS stimulation	

TPA (supernatant)	↓ HUVEC, ↑ HUVEC (ELISA) (3)
uPA (supernatant)	↑ HUVEC, no effect HRGEC(ELISA) (3)
PAI-1 (supernatant)	↑ HUVEC, ↓ HRGEC (ELISA) (3)
Ratio tPA+uPA:PAI1	Accentuation of HUVEC antifibrinolytique (1:227) vs HRGEC profibrinolytique (75:1) (3)
C3 / C4 cellular synthesis	HMEC-1 and CI-GenC : ↑ / ≈ (WB on lysates) (9)
Behavior after heme exposure, NHS incubation compared to resting cells	
C3 deposits (heme overnight exposure)	HRGEC≈GENC>HMEC1≈HUVEC (FACS) (12)
C3 deposits (heme overnight exposure and 30min rechallenge)	↑ CI-GenC and HRGEC ; ≈ HMEC1 ; ↓ HUVEC (FACS) (12)
Binding FH from NHS	↑ HRGEC<CI-GenC<HMEC1≈HUVEC (FACS) (12)
MCP Expression	↓ HRGEC≈CI-GenC≈HMEC1≈HUVEC (FACS) (12)
Thrombomodulin gene expression	↑ HUVEC > HRGEC≈CI-GenC≈HMEC1 (RTqPCR) (12)
HO-1 gene expression	↑ HUVEC > HRGEC≈CI-GenC≈HMEC1 (RTqPCR) (12)
CD55 / CD59 expression	HUVEC : ↓ / ↓ (FACS) (13)
P Selectin expression	HUVEC : ↑ (FACS) (13)
vWF generation (supernatant)	HUVEC : ↑ (ELISA) (13)

Abbreviations:

BMVEC: Brain Microvascular Endothelial Cells
BOEC: Blood outgrowth endothelial cells
CI-GenC: Conditionally Immortalized Human Glomerular Endothelial Cell
HMEC: Human Microvascular Endothelial Cells
HRGEC: Human Renal Glomerular Endothelial Cell
HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

References

- Murakami S, Morioka T, Nakagawa Y, Suzuki Y, Arakawa M, Oite T. Expression of Adhesion Molecules by Cultured Human Glomerular Endothelial Cells in Response to Cytokines: Comparison to Human Umbilical Vein and Dermal Microvascular Endothelial Cells. *Microvasc Res* (2001) **62**:383–391. doi: 10.1006/mvre.2001.2356
- Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers Susan, Bosse DC, Lawley TJ. HMEC-1: Establishment of an Immortalized Human Microvascular Endothelial Cell Line. *J Invest Dermatol* (1992) **99**:683–690. doi: 10.1111/1523-1747.ep12613748
- Louise CB, Obrig TG. Human Renal Microvascular Endothelial Cells as a Potential Target in the Development of the Hemolytic Uremic Syndrome as Related to Fibrinolysis Factor Expression, in Vitro. *Microvasc Res* (1994) **47**:377–387. doi: 10.1006/mvre.1994.1030
- Sartain SE, Turner NA, Moake JL. Brain microvascular endothelial cells exhibit lower activation of the alternative complement pathway than glomerular microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* (2018) **293**:7195–7208. doi: 10.1074/jbc.RA118.002639
- Sartain SE, Turner NA, Moake JL. TNF Regulates Essential Alternative Complement Pathway Components and Impairs Activation of Protein C in Human Glomerular Endothelial Cells. *J Immunol* (2016) **196**:832–845. doi: 10.4049/jimmunol.1500960
- Kawakami Y, Watanabe Y, Yamaguchi M, Haruko Sakaguchi, Kono I, Ueki A. TNF-α stimulates the biosynthesis of complement C3 and factor B by human umbilical cord vein endothelial cells. *Cancer Lett* (1997) **116**:21–26. doi: 10.1016/S0304-3835(97)04737-X
- Brooimans RA, van der Ark AA, Buurman WA, van Es LA, Daha MR. Differential regulation of complement factor H and C3 production in human umbilical vein endothelial cells by IFN-gamma and IL-1. *J Immunol Baltim Md 1950* (1990) **144**:3835–3840.
- Lappin DF, Guc D, Hill A, McShane T, Whaley K. Effect of interferon-γ on complement gene expression in different cell types. *Biochem J* (1992) **281**:437–442. doi: 10.1042/bj2810437
- Hamer R, Molostvov G, Lowe D, Satchell S, Mathieson P, Ilyas R, Mitchell DA, Lam FT, Kashi H, Tan LC, et al. Human Leukocyte Antigen-Specific Antibodies and Gamma-Interferon Stimulate Human Microvascular and Glomerular Endothelial Cells to Produce Complement Factor C4. *Transplant J* (2012) **93**:867–873. doi: 10.1097/TP.0b013e31824b3762
- Du L, Dong F, Guo L, Hou Y, Yi F, Liu J, Xu D. Interleukin-1β increases permeability and upregulates the expression of vascular endothelial-cadherin in human renal glomerular endothelial cells. *Mol Med Rep* (2015) **11**:3708–3714. doi: 10.3892/mmr.2015.3172
- Coulpier M, Andreev S, Lemerrier C, Dauchel H, Lees O, Fontaine M, Ripoché J. Activation of the endothelium by IL-1α and glucocorticoids results in major increase of complement C3 and factor B production and generation of C3a. *Clin Exp Immunol* (2008) **101**:142–149. doi: 10.1111/j.1365-2249.1995.tb02290.x
- May O, Merle NS, Grunenwald A, Gnemmi V, Leon J, Payet C, Robe-Rybkiné T, Paule R, Delguste F, Satchell SC, et al. Heme Drives Susceptibility of Glomerular Endothelium to Complement Overactivation Due to Inefficient Upregulation of Heme Oxygenase-1. *Front Immunol* (2018) **9**: doi: 10.3389/fimmu.2018.03008
- Frimat M, Tabarin F, Dimitrov JD, Poitou C, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement activation by heme as a secondary hit for atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* (2013) **122**:282–292. doi: 10.1182/blood-2013-03-489245

Table S3: Comparative analysis of different protocols used for the ex vivo complement activation test on endothelial cells.

	Human Microvascular Endothelial Cells (HMEC-1)	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)	Blood Outgrowth Endothelial Cells (BOEC)	Conditionally Immortalized Human Cerebral Endothelial Cells (C-CEC)
Pre-activation				
Resting cells	(3)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)	(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16)(17)	(18)	(20)(13)(12)(19)
ADP	10 μ M, 10min (1)(7)(20)(3)(4)(2)(6)(21)(8)(9)	(11)(13)(14)		(11)
TNF alpha + INF gamma	100 ng/ml 2h (1)			
LPS	2U/ml 10min (1)	(10)(14)		
Thrombine		(10)(22)(23)		(19)
Apoptonecrotic*				
Necrotic**				
Heme				
Incubation				
		20min, 37°C (12)(14)(17)(24)		20min, 37°C (12)
Type of blood product incubated	Serum (1)(7)(20)(4)(2)(6)(21)(9), *Activated Plasma (3)(5)(25)(8)	Serum (1)(12)(13)(15)(23)(17)(24); NHS+IGS 500ug/ml (16)(22); FB-depleted serum supplemented with mutant FB (20)(14)	Serum (18)	Serum (11)(12)(19), FB-depleted serum supplemented with mutant FB (10)
Dilution	1:2 (1)(20)(3)(4)(2)(5)(8)(9)	1-4 (10)(12); 1:3 (16)(13); 1:10 (22)	Serum (18)	1-4 (10)(12); 1:3 (19)
Duration	4h (1)(20)(3)(4)(2)(5)(8)(9), 3h (2)(7)(16), 4h-ADP et 2h-resting (4)	30 min (10)(12)(16)(22)(17)(24)	1 h (18)	30 min (10)(12)(19)
Use of AP complement inhibitors	Anti FB Ab: TA106 150 μ g/ml (1)	Ox24 = Blocking anti FH Ab (11)	Blocking anti CD59 Ab (18)	Ox24 = Blocking anti FH Ab (11)
	Blocking anti-properdin Ab (3)	GB24 = Blocking anti MCP Ab (11)	Blocking anti CD55 Ab (18)	GB24 = Blocking anti MCP Ab (11)
	Recombinant human complement Factor (H3)	FB depleted serum (12)(24)	Blocking anti CD46 Ab (18)	FB depleted serum (12)
Use of Ig and CP complement inhibitors	sCR1 (7)	Anti-properdin Ab (24)		
Complement inhibitors	sCR1; TP-10, 150 μ g/ml (1)(20)	EGTA-Mg (10)(12)(16)(21), C2 depleted serum (2)	C1q depleted serum (18)	EGTA-Mg (10)(13), C2 depleted serum (12)
Use of TP complement inhibitor	Blocking human complement C5 minibody (1)(7), Eculizumab (1)(8), Anti-human C7 Ab (13), Avascapan (C5a6c antiagonist) (7)	EDTA (12)(24)		EDTA (12)
		SS17 (secreted by Staph aureus) vs different Single Domain Ab anti C5 (including sDAb_EH(23); Eculizumab (24)		

Other complement modulation	Addition of : CR2-CFH (TT30-150 or 300 µg/ml; CFH concentrate from human plasma (230 µg/ml) (1) ; wild-type -purified FHR1-(20). Heat inactivated serum(2)	Supplementation with different concentrations of purified FH(11)(13)	Supplementation with different concentrations of purified FH (11)
Other modulation	Blocking FXII with coethrypsin(3), thrombin with hirudin(3). Anticoagulation with EDTA or LMMWH(3)	Addition of hemopexin(17)	

*apoptotic and necrotic cells ; staurosporine-induced

**Necrotic cells: overnight detached HUVECs; annexin V, propidium iodide, and trypan blue positive

Abbreviations:

ADPKD: Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease

aiHUS : Atypical Hemolytic Uremic Syndrome

APS: AntiPhospholipid Syndrome

C3G: C3 Glomerulopathy

CFZ: Carfilzomib

CKD: Chronic Kidney Disease

DDD: Dense Deposit Disease

GPI: Glycosyl Phosphatidy Inositol

HELLP: Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, and Low Platelet

HHTR: Hyperhemolytic Transfusion Reaction

MIM: Multiple Myeloma

NHS: Normal Human Serum

PIPLC: Phosphatidy Inositol specific Phospho Lipase C

SCD: Sickle Cell Disease

SLE: Systemic Lupus Erythematosus

TMA: Thrombotic MicroAngiopathy

TTP: Thrombotic Thrombocytopenic Purpura

VWF: Von Willebrand Factor

References

- Noris M, Galbusera M, Gastoldi S, Macor P, Banterla F, Bresin E, Tripodo C, Bettoni S, Donadelli R, Valoti E, et al. Dynamics of complement activation in aHUS and how to monitor eculizumab therapy. *Blood* (2014) **124**:1715–1726. doi: 10.1182/blood-2014-02-558296
- Timmermans SAMEG, Abdul-Hamid MA, Potjewijd J, Theunissen ROMFIH, Damoiseaux JGMC, Reutelingsperger CP, van Paassen P, on behalf of the Limburg Renal Registry. C5b9 Formation on Endothelial Cells Reflects Complement Defects among Patients with Renal Thrombotic Microangiopathy and Severe Hypertension. *J Am Soc Nephrol* (2018) **29**:2234–2243. doi: 10.1681/ASN.2018020184
- Palomo M, Blasco M, Molina P, Lozano M, Praga M, Torramade-Moix S, Martínez-Sánchez J, Cid J, Escolar G, Carreras E, et al. Complement Activation and Thrombotic Microangiopathies. *Clin J Am Soc Nephrol* (2019) **14**:1719–1732. doi: 10.2215/CJN.05830519
- Galbusera M, Noris M, Gastoldi S, Bresin E, Mele C, Breno M, Cuccarolo P, Alberti M, Valoti E, Piras R, et al. An Ex Vivo Test of Complement Activation on Endothelium for Individualized Eculizumab Therapy in Hemolytic Uremic Syndrome. *Am J Kidney Dis* (2019) **74**:56–72. doi: 10.1053/j.ajkd.2018.11.012
- Blasco M, Martínez-Roca A, Rodríguez-Lobato LG, García-Herrera A, Rosiñol L, Castro P, Fernández S, Quintana LF, Cibeira MT, Bladé J, et al. Complement as the enabler of carfilzomib-induced thrombotic microangiopathy. *Br J Haematol* (2020) doi: 10.1111/bjh.16796
- Timmermans SAMEG, Wérieron A, Damoiseaux JGMC, Morelle J, Reutelingsperger CP, van Paassen P. Diagnostic and Risk Factors for Complement Defects in Hypertensive Emergency and Thrombotic Microangiopathy. *Hypertension* (2020) **75**:422–430. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13714
- Aiello S, Gastoldi S, Galbusera M, Ruggenenti PL, Portalupi V, Rota S, Rubis N, Liguori L, Conti S, Tironi M, et al. C5a and C5aR1 are key drivers of microvascular platelet aggregation in clinical entities spanning from aHUS to COVID-19. *Blood Adv* (2021) bloodadvances.2021005246. doi: 10.1182/bloodadvances.2021005246
- Youssef L, Miranda J, Blasco M, Paules C, Crovetto F, Palomo M, Torramade-Moix S, García-Calderó H, Tura-Ceide O, Dantas AP, et al. Complement and coagulation cascades activation is the main pathophysiological pathway in early-onset severe preeclampsia revealed by maternal proteomics. *Sci Rep* (2021) **11**:3048. doi: 10.1038/s41598-021-82733-z
- Piras R, Iatropoulos P, Bresin E, Todeschini M, Gastoldi S, Valoti E, Alberti M, Mele C, Galbusera M, Cuccarolo P, et al. Molecular Studies and an ex vivo Complement Assay on Endothelium Highlight the Genetic Complexity of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: The Case of a Pedigree With a Null CD46 Variant. *Front Med* (2020) **7**:579418. doi: 10.3389/fmed.2020.579418
- Roumenina LT, Jablonski M, Hue C, Blouin J, Dimitrov JD, Dragon-Durey M-A, Cayla M, Fridman WH, Macher M-A, Ribes D, et al. Hyperfunctional C3 convertase leads to complement deposition on endothelial cells and contributes to atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* (2009) **114**:2837–2845. doi: 10.1182/blood-2009-01-197640
- Roumenina LT, Frimat M, Miller EC, Provot F, Dragon-Durey M-A, Bordereau P, Bigot S, Hue C, Satchell SC, Mathieson PW, et al. A prevalent C3 mutation in aHUS patients causes a direct C3 convertase gain of function. *Blood* (2012) **119**:4182–4191. doi: 10.1182/blood-2011-10-383281
- Frimat M, Tabarin F, Dimitrov JD, Poitou C, Halbwachs-Mecarelli L, Fremaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement activation by heme as a secondary hit for atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* (2013) **122**:282–292. doi: 10.1182/blood-2013-03-489245
- Schramm EC, Roumenina LT, Rybkine T, Chauvet S, Vieira-Martins P, Hue C, Maga T, Valoti E, Wilson V, Jokiranta S, et al. Mapping interactions between complement C3 and regulators using mutations in atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* (2015) **125**:2359–2369. doi: 10.1182/blood-2014-10-609073
- Marinozzi MC, Vergoz L, Rybkine T, Ngo S, Bettoni S, Pashov A, Cayla M, Tabarin F, Jablonski M, Hue C, et al. Complement Factor B Mutations in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome—Disease-Relevant or Benign? *J Am Soc Nephrol* (2014) **25**:2053–2065. doi: 10.1681/ASN.2013070796
- Marinozzi MC, Roumenina LT, Chauvet S, Hertig A, Bertrand D, Olagne J, Frimat M, Ulinski T, Deschênes G, Burtey S, et al. Anti-Factor B and Anti-C3b Autoantibodies in C3 Glomerulopathy and Ig-Associated Membranoproliferative GN. *J Am Soc Nephrol* (2017) **28**:1603–1613. doi: 10.1681/ASN.2016030343
- Vasilev VV, Noe R, Dragon-Durey M-A, Chauvet S, Lazarov VJ, Deliyaska BP, Fremaux-Bacchi V, Dimitrov JD, Roumenina LT. Functional Characterization of Autoantibodies against Complement Component C3 in Patients with Lupus Nephritis. *J Biol Chem* (2015) **290**:25343–25355. doi: 10.1074/jbc.M115.647008
- Roumenina LT, Chadebech P, Bodivit G, Vieira-Martins P, Grunenwald A, Boudhabhay I, Poillerat V, Pakdaman S, Kiger L, Jouard A, et al. Complement activation in sickle cell disease: Dependence on cell density, hemolysis and modulation by hydroxyurea therapy. *Am J Hematol* (2020) **95**:456–464. doi: 10.1002/ajh.25742
- Noone DG, Riedl M, Pluthero FG, Bowman ML, Liszewski MK, Lu L, Quan Y, Balgobin S, Schneppenheim R, Schneppenheim S, et al. Von Willebrand factor regulates complement on endothelial cells. *Kidney Int* (2016) **90**:123–134. doi: 10.1016/j.kint.2016.03.023
- Chauvet S, Roumenina LT, Bruneau S, Marinozzi MC, Rybkine T, Schramm EC, Java A, Atkinson JP, Aldigier JC, Bridoux F, et al. A Familial C3GN Secondary to Defective C3 Regulation by Complement Receptor 1 and Complement Factor H. *J Am Soc Nephrol* (2016) **27**:1665–1677. doi: 10.1681/ASN.2015040348
- Valoti E, Alberti M, Tortajada A, García-Fernández J, Gastoldi S, Besso L, Bresin E, Remuzzi G, Rodríguez de Cordoba S, Noris M. A Novel Atypical Hemolytic Uremic Syndrome-Associated Hybrid *CFHR1/CFH* Gene Encoding a Fusion Protein That Antagonizes Factor H-Dependent Complement Regulation. *J Am Soc Nephrol* (2015) **26**:209–219. doi: 10.1681/ASN.2013121339
- Timmermans S, Damoiseaux J, Reutelingsperger C, van Paassen P. More About Complement in the Antiphospholipid Syndrome. *Blood* (2020) doi: 10.1182/blood.2020005171
- Radanova M, Mihaylova G, Ivanova D, Daugan M, Lazarov V, Roumenina L, Vasilev V. Clinical and functional consequences of anti-properdin autoantibodies in patients with lupus nephritis. *Clin Exp Immunol* (2020) doi: 10.1111/cei.13443
- Yatime L, Merle NS, Hansen AG, Friis NA, Østergaard JA, Bjerre M, Roumenina LT, Thiel S, Kristensen P, Andersen GR. A Single-Domain Antibody Targeting Complement Component C5 Acts as a Selective Inhibitor of the Terminal Pathway of the Complement System and Thus Functionally Mimics the C-Terminal Domain of the Staphylococcus aureus SSL7 Protein. *Front Immunol* (2018) **9**: doi: 10.3389/fimmu.2018.02822
- Chen JY, Galwankar NS, Emch HN, Menon SS, Cortes C, Thurman JM, Merrill SA, Brodsky RA, Ferreira VP. Properdin Is a Key Player in Lysis of Red Blood Cells and Complement Activation on Endothelial Cells in Hemolytic Anemias Caused by Complement Dysregulation. *Front Immunol* (2020) **11**: doi: 10.3389/fimmu.2020.01460
- Cid J, Fernández J, Palomo M, Blasco M, Bailó N, Diaz-Ricart M, Lozano M. Hyperhemolytic Transfusion Reaction in Non-

Hemoglobinopathy Patients and Terminal Complement Pathway Activation: Case Series and Review of the Literature. *Transfus Med Rev* (2020) doi: 10.1016/j.tmr.2020.06.002

Table S4: Comparative analysis of different controls used for the ex vivo complement activation test on endothelial cells.

	Human Microvascular Endothelial Cells (HMEC-1)	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)	Blood Outgrowth Endothelial Cells (BOEC)	Conditionally immortalized Human Glomerular Endothelial Cell (CI-GEnc)
Pooled sample run in parallel	8 NHS Pooled(1); Healthy plasma and serum pooled (2)(3)(4) ; 10 NHS pooled (5) (6); NHS Pooled(7)(8)(9) One healthy control in parallel (10)(11) ; DDD(1), patients with arteriosclerosis(1); 10 healthy pregnant women(2); ADPKD(2); CKD(5), dialysis(5); 35 NHS(5), MM treated with CFZ(3), 10 NHS(12)	AB normal serum(13), FB-depleted serum supplemented with recombinant WT FB(13) 20 NHS(13); 50 NHS(14), NHS(15)(16)(17)(18)(19) (20)(21); IgG from HD(19)(22)	BOEC from healthy donors v2 BOEC from deficient vWF patients (23)	AB normal serum(13), FB-depleted serum supplemented with recombinant WT FB(13), 10 NHS (13); 50 NHS(14); NHS (15)(24)
Negative control		0(13)(19)(22), FH depleted(14)(15)(16)(18), FI depleted(15), NHS + FH blocking Ab(15)(17), NHS+heme(21)		0 (13) ; FH depleted serum(14) (15) (24) aSHU serum carrying known FH mutation (24)
Positive control	0(10)(11)(2)(5)(3), aHUS (1)(8), complement asymptomatic-mutation-carriers(12)		0 (23)	
Background	Incubation with test medium alone (10)(1)	Incubation with test medium alone(16)(19)		

Abbreviations:

ADPKD: Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease
aHUS : Atypical Hemolytic Uremic Syndrome
CKD: Chronic Kidney Disease
MM: Multiple Myeloma
NHS: Normal Human Serum

References

1. Timmermans SAMEG, Abdul-Hamid MA, Potjewijd J, Theunissen ROMFIH, Damoiseaux JGMC, Reutelingsperger CP, van Paassen P, on behalf of the Limburg Renal Registry. C5b9 Formation on Endothelial Cells Reflects Complement Defects among Patients with Renal Thrombotic Microangiopathy and Severe Hypertension. *J Am Soc Nephrol* (2018) **29**:2234–2243. doi: 10.1681/ASN.2018020184
2. Palomo M, Blasco M, Molina P, Lozano M, Praga M, Torramade-Moix S, Martinez-Sanchez J, Cid J, Escolar G, Carreras E, et al. Complement Activation and Thrombotic Microangiopathies. *Clin J Am Soc Nephrol* (2019) **14**:1719–1732. doi: 10.2215/CJN.05830519
3. Blasco M, Martínez-Roca A, Rodríguez-Lobato LG, García-Herrera A, Rosiñol L, Castro P, Fernández S, Quintana LF, Cibeira MT, Bladé J, et al. Complement as the enabler of carfilzomib-induced thrombotic microangiopathy. *Br J Haematol* (2020) doi: 10.1111/bjh.16796
4. Youssef L, Miranda J, Blasco M, Paules C, Croveto F, Palomo M, Torramade-Moix S, García-Calderó H, Tura-Ceide O, Dantas AP, et al. Complement and coagulation cascades activation is the main pathophysiological pathway in early-onset severe preeclampsia revealed by maternal proteomics. *Sci Rep* (2021) **11**:3048. doi: 10.1038/s41598-021-82733-z
5. Galbusera M, Noris M, Gastoldi S, Bresin E, Mele C, Breno M, Cuccarolo P, Alberti M, Valoti E, Piras R, et al. An Ex Vivo Test of Complement Activation on Endothelium for Individualized Eculizumab Therapy in Hemolytic Uremic Syndrome. *Am J Kidney Dis* (2019) **74**:56–72. doi: 10.1053/j.ajkd.2018.11.012
6. Aiello S, Gastoldi S, Galbusera M, Ruggenti PL, Portalupi V, Rota S, Rubis N, Liguori L, Conti S, Tironi M, et al. C5a and C5aR1 are key drivers of microvascular platelet aggregation in clinical entities spanning from aHUS to COVID-19. *Blood Adv* (2021) bloodadvances.2021005246. doi: 10.1182/bloodadvances.2021005246
7. Timmermans SAMEG, Wèrion A, Damoiseaux JGMC, Morelle J, Reutelingsperger CP, van Paassen P. Diagnostic and Risk Factors for Complement Defects in Hypertensive Emergency and Thrombotic Microangiopathy. *Hypertension* (2020) **75**:422–430. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13714
8. Timmermans S, Damoiseaux J, Reutelingsperger C, van Paassen P. More About Complement in the Antiphospholipid Syndrome. *Blood* (2020) doi: 10.1182/blood.2020005171
9. Piras R, Iatropoulos P, Bresin E, Todeschini M, Gastoldi S, Valoti E, Alberti M, Mele C, Galbusera M, Cuccarolo P, et al. Molecular Studies and an ex vivo Complement Assay on Endothelium Highlight the Genetic Complexity of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: The Case of a Pedigree With a Null CD46 Variant. *Front Med* (2020) **7**:579418. doi: 10.3389/fmed.2020.579418
10. Noris M, Galbusera M, Gastoldi S, Macor P, Banterla F, Bresin E, Tripodo C, Bettoni S, Donadelli R, Valoti E, et al. Dynamics of complement activation in aHUS and how to monitor eculizumab therapy. *Blood* (2014) **124**:1715–1726. doi: 10.1182/blood-2014-02-558296
11. Valoti E, Alberti M, Tortajada A, García-Fernández J, Gastoldi S, Besso L, Bresin E, Remuzzi G, Rodríguez de Cordoba S, Noris M. A Novel Atypical Hemolytic Uremic Syndrome–Associated Hybrid *CFHR1/CFH* Gene Encoding a Fusion Protein That Antagonizes Factor H–Dependent Complement Regulation. *J Am Soc Nephrol* (2015) **26**:209–219. doi: 10.1681/ASN.2013121339
12. Cid J, Fernández J, Palomo M, Blasco M, Bailó N, Diaz-Ricart M, Lozano M. Hyperhemolytic Transfusion Reaction in Non-Hemoglobinopathy Patients and Terminal Complement Pathway Activation: Case Series and Review of the Literature. *Transfus Med Rev* (2020) doi: 10.1016/j.tmr.2020.06.002
13. Roumenina LT, Jablonski M, Hue C, Blouin J, Dimitrov JD, Dragon-Durey M-A, Cayla M, Fridman WH, Macher M-A, Ribes D, et al. Hyperfunctional C3 convertase leads to complement deposition on endothelial cells and contributes to atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* (2009) **114**:2837–2845. doi: 10.1182/blood-2009-01-197640
14. Roumenina LT, Frimat M, Miller EC, Provot F, Dragon-Durey M-A, Bordereau P, Bigot S, Hue C, Satchell SC, Mathieson PW, et al. A prevalent C3 mutation in aHUS patients causes a direct C3 convertase gain of function. *Blood* (2012) **119**:4182–4191. doi: 10.1182/blood-2011-10-383281
15. Frimat M, Tabarin F, Dimitrov JD, Poitou C, Halbwachs-Mecarelli L, Fremaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement activation by heme as a secondary hit for atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* (2013) **122**:282–292. doi: 10.1182/blood-2013-03-489245
16. Schramm EC, Roumenina LT, Rybkine T, Chauvet S, Vieira-Martins P, Hue C, Maga T, Valoti E, Wilson V, Jokiranta S, et al. Mapping interactions between complement C3 and regulators using mutations in atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* (2015) **125**:2359–2369. doi: 10.1182/blood-2014-10-609073
17. Marinozzi MC, Vergoz L, Rybkine T, Ngo S, Bettoni S, Pashov A, Cayla M, Tabarin F, Jablonski M, Hue C, et al. Complement Factor B Mutations in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome—Disease-Relevant or Benign? *J Am Soc Nephrol* (2014) **25**:2053–2065. doi: 10.1681/ASN.2013070796
18. Marinozzi MC, Roumenina LT, Chauvet S, Hertig A, Bertrand D, Olagne J, Frimat M, Ulinski T, Deschênes G, Burtey S, et al. Anti-Factor B and Anti-C3b Autoantibodies in C3 Glomerulopathy and Ig-Associated Membranoproliferative GN. *J Am Soc Nephrol* (2017) **28**:1603–1613. doi: 10.1681/ASN.2016030343
19. Vasilev VV, Noe R, Dragon-Durey M-A, Chauvet S, Lazarov VJ, Deliyka BP, Fremaux-Bacchi V, Dimitrov JD, Roumenina LT. Functional Characterization of Autoantibodies against Complement Component C3 in Patients with Lupus Nephritis. *J Biol Chem* (2015) **290**:25343–25355. doi: 10.1074/jbc.M115.647008
20. Roumenina LT, Chadebecq P, Bodivit G, Vieira-Martins P, Grunenwald A, Boudhabhay I, Poillat V, Pakdaman S, Kiger L, Jouard A, et al. Complement activation in sickle cell disease: Dependence on cell density, hemolysis and modulation by hydroxyurea therapy. *Am J Hematol* (2020) **95**:456–464. doi: 10.1002/ajh.25742
21. Chen JY, Galwankar NS, Emch HN, Menon SS, Cortes C, Thurman JM, Merrill SA, Brodsky RA, Ferreira VP. Properdin Is a Key Player in Lysis of Red Blood Cells and Complement Activation on Endothelial Cells in Hemolytic Anemias Caused by Complement Dysregulation. *Front Immunol* (2020) **11**: doi: 10.3389/fimmu.2020.01460
22. Radanova M, Mihaylova G, Ivanova D, Daugan M, Lazarov V, Roumenina L, Vasilev V. Clinical and functional consequences of anti-properdin autoantibodies in patients with lupus nephritis. *Clin Exp Immunol* (2020) doi: 10.1111/cei.13443
23. Noone DG, Riedl M, Pluthero FG, Bowman ML, Liszewski MK, Lu L, Quan Y, Balgobin S, Schneppenheim R, Schneppenheim S, et al. Von Willebrand factor regulates complement on endothelial cells. *Kidney Int* (2016) **90**:123–134. doi: 10.1016/j.kint.2016.03.023
24. Chauvet S, Roumenina LT, Bruneau S, Marinozzi MC, Rybkine T, Schramm EC, Java A, Atkinson JP, Aldigier JC, Bridoux F, et al. Familial C3GN Secondary to Defective C3 Regulation by Complement Receptor 1 and Complement Factor H. *J Am Soc Nephrol* (2016) **27**:1665–1677. doi: 10.1681/ASN.2015040348

Annexe 3.

Eculizumab as a therapeutic approach for severe crescentic recurrence of immunoglobulin A nephropathy after kidney transplantation



Contents lists available at ScienceDirect

American Journal of Transplantation

journal homepage: www.amjtransplant.org

Case Report

Ecuzumab as a therapeutic approach for severe crescentic recurrence of immunoglobulin A nephropathy after kidney transplantation

Anna Duval^{1,2,3,*}, Jérôme Olgne^{1,4}, Augustin Obrecht¹,
 Gabriela Gautier Vargas¹, Peggy Perrin¹, Bruno Moulin^{1,2},
 Véronique Frémeaux-Bacchi^{3,5}, Sophie Caillard^{1,2}

¹ Department of nephrology, dialysis and transplantation, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, Bas Rhin, France

² Inserm UMRS 1109 Molecular Immuno Rheumatology, University of Strasbourg, Strasbourg, Bas Rhin, France

³ Inserm UMRS 1138, Complement and diseases, Cordeliers' research center, Paris, France

⁴ Department of pathology, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, Bas Rhin, France

⁵ Service d'immunologie Biologique, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France

ARTICLE INFO

Keywords:

IgA nephropathy
 complement
 glomerulonephritis
 recurrence
 transplantation

ABSTRACT

Crescentic forms of immunoglobulin A nephropathy (IgAN) are rare but can be associated with rapid kidney failure and a high rate of end-stage renal disease despite immunosuppression therapy. Complement activation has emerged as a key driver of glomerular injury in IgAN. Therefore, complement inhibitors may be a rational treatment option in patients unresponsive to first-line immunosuppressive therapy. Here, we describe the case of a 24-year-old woman presenting with crescentic IgAN recurrence a few months after living kidney transplantation. Considering the dramatic graft failure accompanied by malignant hypertension and thrombotic microangiopathy features worsening after a first-line of high-dose steroids and 3 sessions of plasma exchanges, ecuzumab was started as a rescue therapy. For the first time, the clinical response to ecuzumab was highly successful, with a complete graft recovery without any relapse after 1 year of treatment. Further clinical studies are strongly needed to specify which patients might benefit from terminal complement blockade.

Abbreviations: ADAMTS13, a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats-13; IgA, immunoglobulin A; IgAN, IgA nephropathy; KT, kidney transplantation; LDH, lactate dehydrogenase; MP, methylprednisolone; P/C_{ratio}, proteinuria/creatinine ratio in urine; PE, plasma exchange session; sCR, serum creatinine; TMA, thrombotic microangiopathy.

* Corresponding author: Anna Duval, Department of Nephrology, Dialysis and Transplantation, University Hospitals Strasbourg, 1 place de l'Hôpital, Strasbourg, Bas Rhin, 67000, France.

E-mail address: anna.duval@inserm.fr (A. Duval).

<https://doi.org/10.1016/j.ajt.2023.05.031>

Received 2 March 2023; Received in revised form 22 May 2023; Accepted 26 May 2023

Available online xxx

1600-6135/© 2023 American Society of Transplantation & American Society of Transplant Surgeons. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Please cite this article as: Duval A et al., Ecuzumab as a therapeutic approach for severe crescentic recurrence of immunoglobulin A nephropathy after kidney transplantation, American Journal of Transplantation, <https://doi.org/10.1016/j.ajt.2023.05.031>

1. Introduction

Immunoglobulin A nephropathy (IgAN) is a common glomerulonephritis. Severe forms of the disease can be associated with rapidly progressive kidney failure because of inflammation and extracapillary proliferation invading the glomerular space. The current strategy to slow down a crescentic IgAN flare is based on high-dose steroids and/or cyclophosphamide with supportive treatment. Patients unresponsive to these first-line therapies are at high risk of end-stage renal disease or graft loss.

The emergence of the pivotal role of complement in IgAN has provided new therapeutic perspectives. Therefore, anticomplement therapies, such as eculizumab, a humanized anti-C5 monoclonal antibody, might be considered as a possible therapeutic approach in these severe forms.

Here, we describe the case of a transplant recipient receiving eculizumab as a rescue therapy for a dramatic crescentic IgAN recurrence a few months after a living kidney donor transplant with a successful and persistent graft recovery.

2. Case report

A 19-year-old woman with no significant comorbidity was admitted to the hospital for malignant hypertension with severe renal failure and a nephritic syndrome. A kidney specimen biopsy revealed an IgAN with signs of chronicity (M1E0S1T2-C0). There

was no thrombotic microangiopathy (TMA) at diagnosis. Hemodialysis was started 2 years later.

Three years later, she underwent a kidney transplant from a living kidney donor, her mother (no human leukocyte antigen-immunization, 0 mismatch in class I, and 2 mismatch in class II major histocompatibility complex antigens). The immunosuppressive induction regimen consisted of thymoglobulin, tacrolimus, mycophenolate mofetil and steroids. Graft function recovery was complete (serum creatinine [sCR] level 70 $\mu\text{mol/L}$ at discharge). Six weeks later, because of digestive intolerance, mycophenolate mofetil was replaced with everolimus.

The first 3 months after transplantation were marked by a slow decline in graft function and the onset of proteinuria. Graft biopsy revealed the recurrence of IgAN with endocapillary proliferation and fibrinoid necrosis lesions in 10% of glomeruli. Steroids were maintained at 0.3 mg/kg/d for 1 month.

At 6 months after transplantation, she presented with rapidly progressive graft failure with a nephritic syndrome, malignant hypertension, and microscopic hematuria. The second graft biopsy showed active crescents affecting 15% of the glomeruli with endocapillary hypercellularity and the intensification of IgA, C3c, and C4d deposits, confirming the persistence of IgAN activity despite steroids (Supplementary Figure). At this time, some fibrin thrombi in glomerular capillary loops were also noticed evoking TMA lesions (Fig. 1). Treatment consisted of intravenous steroids (500 mg/d for 3 days), followed by high-dose oral steroids (1 mg/

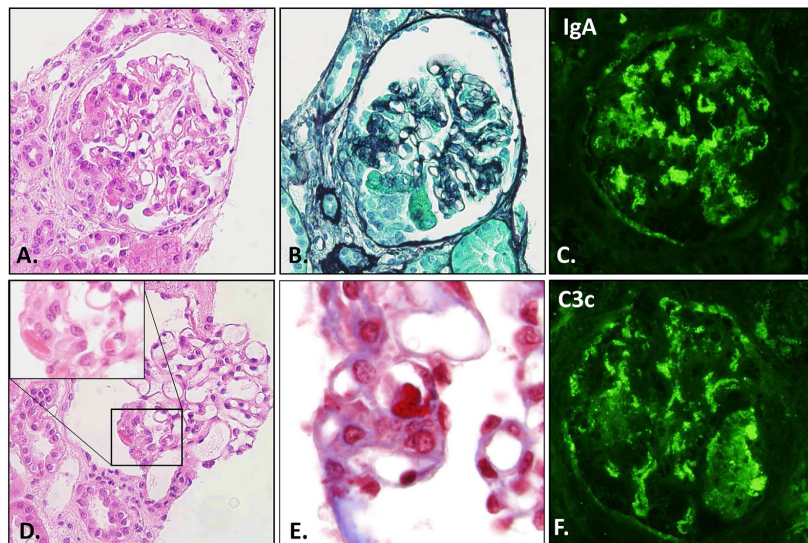


Figure 1. Biopsy findings in the kidney graft at 5 months of transplantation. (A, B) Active glomerular crescent with areas of focal necrosis affecting 15% of the glomeruli, associated with an endocapillary hypercellularity. Light microscopy, hematoxylin-eosin staining (A) and argentic coloration (B), original magnification $\times 400$. (D, E) Fibrin thrombi in a glomerular capillary loop, evoking a thrombotic microangiopathy lesion. Light microscopy, hematoxylin-eosin staining (D) and Masson's trichrome (E), with original magnifications of $\times 400$ (D), and $\times 4000$ (E). (C, F) Signs of IgAN recurrence on the graft with intense granular IgA (C) and C3c immune deposits (F) in the mesangium and in peripheral capillary loops. IgA and C3c immunofluorescence staining, original magnification $\times 400$ (polyclonal rabbit anti-IgA-FITC and antiC3c-FITC) (Dako Agilent). Banff score: g2, cg2, tcg2, mm1, i-IF/TA1, ti0, ci1, ct1, cpt0, ah0, aah0, cv2, and negative C4d immunostaining in peritubular capillaries (murine monoclonal anti-C4d) (Eurobio Scientific). IgA, immunoglobulin A; IgAN, IgA nephropathy.

kg/d), and intravenous antihypertensive therapy. Although graft function worsened within 2 weeks, biological TMA features appeared, including a sharp drop in platelet count (from 400 to 55 G/l), the presence of schistocytes in the blood smear, and lactate dehydrogenase levels reaching 1000 UI/L (Fig. 2). Complement exploration in plasma showed a decreased complement hemolytic activity (CH50 = 20%) with C3, C4, FH, and FI in normal ranges. Tacrolimus and everolimus trough levels were in the therapeutic range. There was no evidence of antibody-mediated rejection or other identified triggers. Everolimus was switched to mycophenolate mofetil.

In the absence of a favorable clinical course, plasma exchanges were started. In spite of 3 sessions every second day, sCR continued to rise and thrombopenia worsened. Because of the failure of this intensive first-line treatment and the evidence of TMA features, we decided to start eculizumab. After

antimeningococcal vaccination and antibiotic prophylaxis, eculizumab (900 mg/wk) was given for 4 weeks, followed by 1200 mg biweekly. The graft function improved significantly, and the biological TMA recovered rapidly (Fig. 2). Graft function recovery was obtained 3 months thereafter and maintained over time, with a stabilization of sCR at 115 μ mol/L and the regression of proteinuria after 1 year of eculizumab therapy. There was no variant in atypical hemolytic and uremic syndrome-shared genes.

3. Discussion

Here, we describe a case of a recurrence of steroids and plasmapheresis-resistant crescentic IgAN in a living kidney donor recipient successfully treated by eculizumab.

The treatment of choice for a crescentic IgAN recurrence after kidney transplantation is unknown. The therapeutic approach

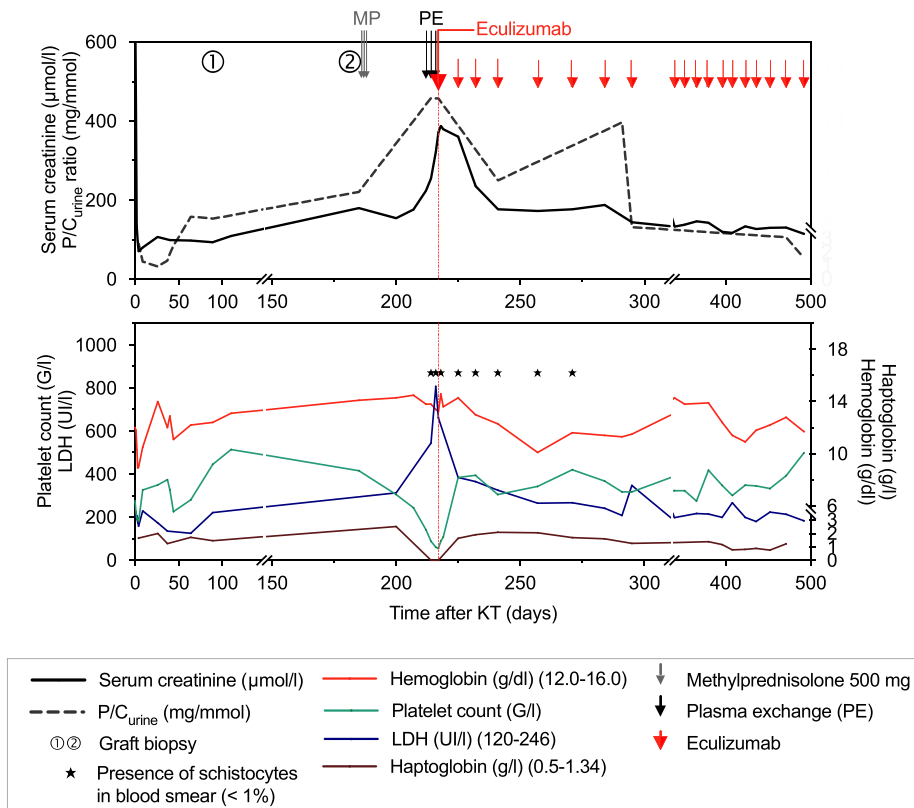


Figure 2. Graft parameters and biological thrombotic microangiopathy features following transplantation. The upper panel shows graft parameters, and the lower panel shows the biological TMA features in blood. The patient showed a slow decline in graft function with the onset of proteinuria (0-60 days post-KT). The first graft biopsy (1) showed evidence of crescentic IgAN recurrence. Despite high-dose steroids, thrombotic microangiopathy signs in the blood appeared secondarily and correlated with a rapidly progressive graft failure. ADAMTS13 activity was normal. Eculizumab was started after three plasma exchange (PE) sessions with a significant improvement in graft function and biological TMA. ADAMTS13, a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13; IgA, immunoglobulin A; IgAN, IgA nephropathy; KT, kidney transplantation; LDH, lactate dehydrogenase; MP, methylprednisolone; P/C_{urine}, proteinuria/creatinine ratio in urine; PE, plasma exchange session.

kg/d), and intravenous antihypertensive therapy. Although graft function worsened within 2 weeks, biological TMA features appeared, including a sharp drop in platelet count (from 400 to 55 G/l), the presence of schistocytes in the blood smear, and lactate dehydrogenase levels reaching 1000 UI/L (Fig. 2). Complement exploration in plasma showed a decreased complement hemolytic activity (CH50 = 20%) with C3, C4, FH, and FI in normal ranges. Tacrolimus and everolimus trough levels were in the therapeutic range. There was no evidence of antibody-mediated rejection or other identified triggers. Everolimus was switched to mycophenolate mofetil.

In the absence of a favorable clinical course, plasma exchanges were started. In spite of 3 sessions every second day, sCR continued to rise and thrombopenia worsened. Because of the failure of this intensive first-line treatment and the evidence of TMA features, we decided to start eculizumab. After

antimeningococcal vaccination and antibiotic prophylaxis, eculizumab (900 mg/wk) was given for 4 weeks, followed by 1200 mg biweekly. The graft function improved significantly, and the biological TMA recovered rapidly (Fig. 2). Graft function recovery was obtained 3 months thereafter and maintained over time, with a stabilization of sCR at 115 μ mol/L and the regression of proteinuria after 1 year of eculizumab therapy. There was no variant in atypical hemolytic and uremic syndrome-shared genes.

3. Discussion

Here, we describe a case of a recurrence of steroids and plasmapheresis-resistant crescentic IgAN in a living kidney donor recipient successfully treated by eculizumab.

The treatment of choice for a crescentic IgAN recurrence after kidney transplantation is unknown. The therapeutic approach

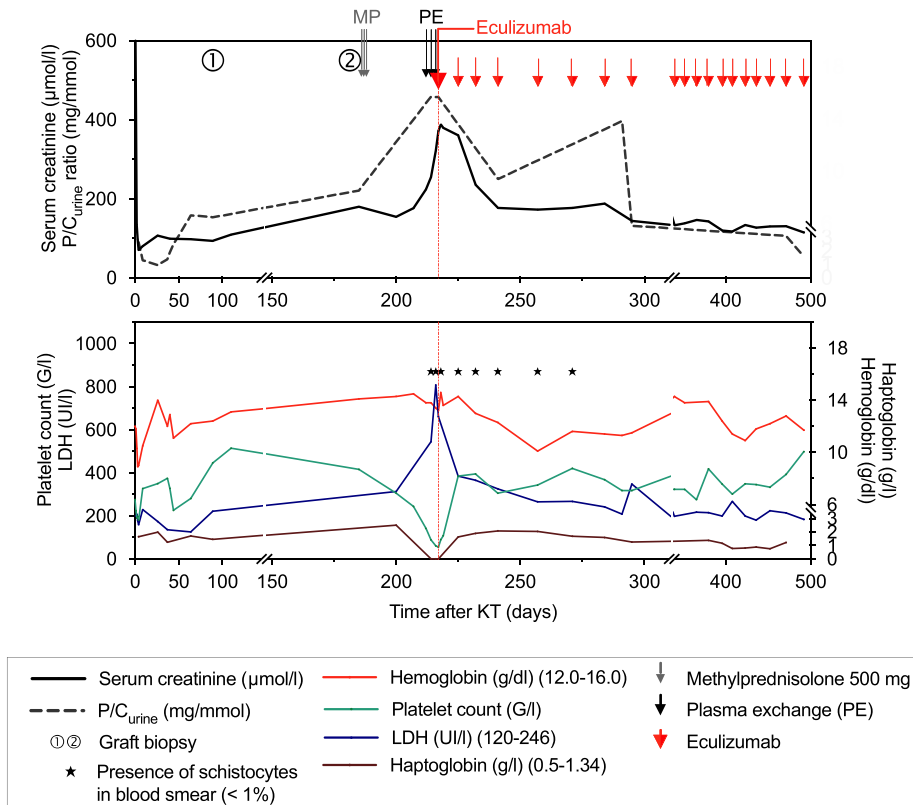


Figure 2. Graft parameters and biological thrombotic microangiopathy features following transplantation. The upper panel shows graft parameters, and the lower panel shows the biological TMA features in blood. The patient showed a slow decline in graft function with the onset of proteinuria (0-60 days post-KT). The first graft biopsy (1) showed evidence of crescentic IgAN recurrence. Despite high-dose steroids, thrombotic microangiopathy signs in the blood appeared secondarily and correlated with a rapidly progressive graft failure. ADAMTS13 activity was normal. Eculizumab was started after three plasma exchange (PE) sessions with a significant improvement in graft function and biological TMA. ADAMTS13, a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13; IgA, immunoglobulin A; IgAN, IgA nephropathy; KT, kidney transplantation; LDH, lactate dehydrogenase; MP, methylprednisolone; P/C_{urine}, proteinuria/creatinine ratio in urine; PE, plasma exchange session.

recommended by the kidney disease improving global outcomes (KDIGO) guidelines for crescentic IgAN associated with rapidly progressive renal failure is the use of high-dose steroids and cyclophosphamide, whereas the benefit of plasmapheresis is debated. In this case, eculizumab was preferred to cyclophosphamide due to the strong immunosuppression burden in the recipient and the occurrence of a systemic TMA.

Complement activation is a driver of several glomerulonephritis.¹ In IgAN, the glomerular codeposition of galactose deficient IgA1 with a set of complement activation fragments have provided evidence of a complement alternative and lectin pathways activation in renal tissue, which intensity may correlate with disease's severity.²

Interestingly, acute graft failure was associated with the occurrence of TMA features in blood analysis. These signs were preceded by fibrin thrombi in some glomerular capillary loops on the biopsy performed 1 month before the acute graft injury episode, before the onset of malignant hypertension. The occurrence of arteriolar/glomerular TMA lesions in patients with IgAN is not anecdotal and may have a significant impact on renal outcomes.³ The role of genetic traits potentially shared between patients with IgAN and atypical hemolytic and uremic syndrome needs to be clarified.⁴⁻⁶

Eculizumab prevents the release of C5a by inhibiting C5 cleavage by the C5 convertase, thus breaking the self-reinforcing cycle of glomerular inflammation because of complement activation in tissue. We must, however, point out that eculizumab does not treat the deposition of pathological IgA in the kidney. The only data available concerning the use of eculizumab for a crescentic IgAN flare are based on anecdotal cases (n = 4) with usually poor renal outcomes (Supplementary Table).⁶⁻⁹

In our patient, eculizumab was started when graft function worsened and after only 3 plasmapheresis sessions. The early administration probably preceded the occurrence of irreversible glomerular damages, thus contributing to the favorable outcomes. However, a delayed effect of the other associated therapies cannot be fully excluded. The maintenance of complement inhibition several months after this episode may have contributed to the graft function recovery and, perhaps, the prevention of relapses.⁴ Eculizumab was withdrawn based on the stabilization of graft function without recurrence after 1 year of treatment and the absence of genetic abnormalities in complement genes.

4. Conclusion

This report provides an example of the efficiency of eculizumab therapy in a rapidly progressive graft failure because of IgAN recurrence after kidney transplantation. This observation underlines the necessity to strengthen the link between complement activation and crescentic forms of IgAN.

Disclosure

The authors of this manuscript have conflicts of interest to disclose as described by the American Journal of Transplantation. B. Moulin reported received fees from Alexion Pharmaceuticals for advisory boards and congress travel. V.F. Bacchi

reported received fees from Alexion Pharmaceuticals for advisory boards and congress travel as well as the recipient of a research grant from Alexion Pharmaceuticals. S. Caillard reported received fees from Alexion Pharmaceuticals for advisory boards and congress travel. All other authors of this manuscript have no conflict of interest to disclose as described by the American Journal of Transplantation.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Veronique Fremeaux-Bacchi reports a relationship with Alexion Pharmaceuticals Inc that includes: board membership, funding grants, and travel reimbursement. Sophie Caillard reports a relationship with Alexion Pharmaceuticals Inc that includes: travel reimbursement. Bruno Moulin reports a relationship with Alexion Pharmaceuticals Inc that includes: travel reimbursement.

Data availability

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgements

This work was supported by the *Fondation pour la Recherche Médicale* (FDM202006011155).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ajt.2023.05.031>.

ORCID

Anna Duval <https://orcid.org/0000-0002-6432-881X>
 Jérôme Olgne <https://orcid.org/0000-0001-6792-5399>
 Augustin Obrecht <https://orcid.org/0009-0004-1671-3053>
 Gabriela Gautier Vargas <https://orcid.org/0000-0001-9377-1055>
 Peggy Perrin <https://orcid.org/0000-0001-7343-5943>
 Bruno Moulin <https://orcid.org/0000-0001-6772-7165>
 Véronique Frémeaux-Bacchi <https://orcid.org/0000-0002-4865-8528>
 Sophie Caillard <https://orcid.org/0000-0002-0525-4291>

References

- Kaartinen K, Safa A, Kotha S, Ratti G, Meri S. Complement dysregulation in glomerulonephritis. *Semin Immunol*. 2019;45:101331. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101331>.
- Xie M, Zhu Y, Wang X, et al. Predictive prognostic value of glomerular C3 deposition in IgA nephropathy. *J Nephrol*. 2023;36(2):495–505. <https://doi.org/10.1007/s40620-022-01363-4>.
- El Karoui K, Hill GS, Karras A, et al. A clinicopathologic study of thrombotic microangiopathy in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23(1):137–148. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010111130>.
- Guzzo G, Sadallah S, Fodstad H, et al. Case report: a rare truncating variant of the CFHR5 gene in IgA nephropathy. *Front Genet*. 2021;12(12): 529236. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.529236>.
- Nakamura H, Anayama M, Makino M, Makino Y, Tamura K, Nagasawa M. Atypical hemolytic uremic syndrome associated with complement factor H mutation and IgA nephropathy: a case report successfully treated with

- eculizumab. *Nephron*. 2018;138(4):324–327. <https://doi.org/10.1159/000485194>.
6. Matsumura D, Tanaka A, Nakamura T, Sato E, Node K. Coexistence of atypical hemolytic uremic syndrome and crescentic IgA nephropathy treated with eculizumab: a case report. *Clin Nephrol Case Stud*. 2016; 4(4):24–28. <https://doi.org/10.5414/CNCS108889>.
 7. Ring T, Pedersen BB, Salkus G, Goodship THJ. Use of eculizumab in crescentic IgA nephropathy: proof of principle and conundrum? *Clin Kidney J*. 2015;8(5):489–491. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfv076>.
 8. Rosenblad T, Rebetz J, Johansson M, Békássy Z, Sartz L, Karpman D. Eculizumab treatment for rescue of renal function in IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol*. 2014;29(11):2225–2228. <https://doi.org/10.1007/s00467-014-2863-y>.
 9. Herzog AL, Wanner C, Amann K, Lopau K. First treatment of relapsing rapidly progressive IgA nephropathy with eculizumab after living kidney donation: a case report. *Transplant Proc*. 2017;49(7):1574–1577. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2017.02.044>.

Supplementary material

Table S1: Detailed characteristics of reported cases treated by eculizumab for a rapidly progressive renal failure due to a crescentic IgAN.

Figure S1: Kinetic of immune deposits on graft biopsy at 3 and 5 months of transplantation

Graft biopsy on the 3rd month of transplantation confirmed the recurrence of IgAN and signs of complement activation in renal tissue with the co-deposition of IgA and C3 activation fragments within glomerular mesangium and peripheral capillary loops. Immune deposits (IgA, C3c, C4d) increased significantly on the second graft biopsy performed on the 5th month after transplantation, indicating an active complement activation process in glomeruli. Complement membrane attack complex (C5b-9) staining was noticed in vascular pole of glomeruli (considered as weak). Immunofluorescence staining (Polyclonal rabbit anti-IgA-FITC and anti-C3c-FITC, Dako Agilent, murine monoclonal anti-C4d Eurobio scientific) and immunochemistry staining (C5b-9, B7 clone, gift from Paul Morgan), original magnification x400. *Abbreviations:* IgAN: IgA nephropathy.

Reference	Patient characteristics	Clinical presentation, delay	Biological TMA	Biopsy findings (delay)	Initial therapies	Clinical response	Serum creatinine at ecuzumab initiation	Start of ecuzumab treatment	Complement activation in blood	Complement genetic analysis	Ecuzumab discontinuation (delay)	Evolution (follow-up)
Current case	Female, 24 yo, KTR, first-degree related living donor	Rapidly progressive graft failure, Malignant hypertension, 6 months after KT	Yes	Crescentic IgA (15% glomeruli), endocapillary proliferation and high dose oral steroids (1mg/kg/day) PE (3 sessions), tacrolimus (1 month before PE)	Steroids IV pulse (500mg/day, 3 days) and high dose oral steroids (1mg/kg/day) PE (3 sessions), tacrolimus (1 month before PE)	No	450 µmol/L	After 3 PE sessions 900mg/week then 1200mg biweekly	No	No identified variant in aHUS-associated genes	Yes, 10 months	Favorable, complete recovery (1 year)
Ring, <i>et al.</i> (7)	Male, 16 yo, native kidney	Rapidly progressive renal failure	No	Crescentic IgA (43% glomeruli) M1, S0, E1, T0 IF: IgA, C3, C4 (1 month before PE)	PE (5 sessions), Cyclophosphamide (1.5mg/kg), Steroids IV pulse (500mg/day, 3 days)	No	97 µmol/L	After 5 PE sessions	No	No identified variant in aHUS-associated genes	Yes 900mg/week followed by one 1200mg single dose.	Immediate, transitory and incomplete response Evolution to ESRD within 2 years
Rosenblad, <i>et al.</i> (8)	Male, 16 yo, native kidney	Progressive renal failure nephrotic range proteinuria, 1 year after diagnosis	No	Fibrocellular and fibrous crescents in 80% of glomeruli IF: IgA, C3, IgG, C5b-9 (2 months before Ecuzumab)	Steroids IV pulse, oral steroids, mycophenolate mofetil 1500mg/day, ACE (double blockade)	No	369 µmol/L	While renal function decline, 900mg/week followed by 1200mg biweekly (2 doses) then 600mg/week (massive proteinuria, sCR rise)	No	Not performed	Yes, 3 months [€]	Immediate, maintained while under ecuzumab Evolution to ESRD
Matsumura, <i>et al.</i> (6)	Male, 43yo, native kidney	TMA Kidney failure (signs of chronicity)	Yes	Glomerular sclerosis, fibrocellular crescents in 35% of glomeruli, TMA features in some glomeruli IF: IgA, C3 (5 days after HD initiation)	Steroid pulse (1g/day, 3 days) followed by oral steroids 40mg/day, PE (2/week from day 10) and HD (3/week)	No	Under HD (3/week) (Initial sCR >1500µmol/L)	21 days after HD initiation	Yes, decreased CH50, low C3 and C4.	Not performed	Yes, two months 900mg/week followed by 1200mg biweekly	Remission of biological TMA by day 70 Persistence of renal failure and HD dependence
Herzog, <i>et al.</i> (9)	Male, 28 yo, KTR, first-degree related living kidney donor,	Acute graft injury Infectious trigger (lymphocelle infection)	N/A	Crescents in 60% of glomeruli (after HD initiation)	Cyclophosphamide (cumulated dose 6g), tacrolimus, oral steroids (1mg/kg/day)	Incomplete and temporary	Under HD (initial sCR >900µmol/L)	After HD initiation (3 sessions)	N/A	Not performed	Yes 900mg/week (4 doses) [£]	Graft loss

Table S1: Detailed characteristics of reported cases treated by ecuzumab for a rapidly progressive renal failure due to a crescentic IgAN.

§ thrombopenia resolution, absence of renal recovery; * Presence of TMA features on both peripheral blood and kidney/graft biopsy. €: discontinuation due to advanced renal failure associated with an evolution to end stage renal disease. £: withdrawal after 4 doses due to multiple infections and severe chronic lesions at graft biopsy. *Abbreviations*: ACE: angiotensin converting enzyme inhibitors, aHUS: atypical hemolytic and uremic syndrome, AP: alternative pathway, ESRD: end stage renal disease, FH: complement factor H, HD: hemodialysis, IF: immunofluorescence, IgAN: IgA nephropathy, IV: intravenous, KT: kidney transplantation, KTR: kidney transplant recipient, N/A: not available, PE: plasma exchange, sCR: serum creatinine, TMA: thrombotic microangiopathy, yo: years old.

Annexe 4.

Revue n°3
Complement biology for Hematologists

Complement biology for hematologists

Anna Duval^{1,2}  | Véronique Frémeaux-Bacchi^{1,3} 

¹Centre de Recherche des Cordeliers, Inserm UMR S1138, Paris, France

²Department of Nephrology Dialysis and Transplantation, University Hospital of Strasbourg, Strasbourg, France

³Service d'Immunologie, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

Correspondence

Anna Duval, Centre de Recherche des Cordeliers, Inserm UMR S1138, 15 rue de l'école de Médecine, Paris 75006, France.
Email: anna.duval@inserm.fr

Véronique Frémeaux-Bacchi, Laboratoire d'Immunologie Biologique, Hôpital Européen Georges Pompidou, 20 Rue Leblanc, Paris 75015, France
Email: veronique.fremeaux-bacchi@aphp.fr

Funding information

Fondation pour la Recherche Médicale, Grant/Award Number: FDM202006011155

Abstract

The complement system is part of the innate immunity. An increased activation or a loss of the regulation of this fine-tuned cascade is involved in a variety of hematological diseases. During the last decade, anti-C5 therapies have revolutionized the management and prognosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and atypical hemolytic and uremic syndrome (aHUS). The availability of a rapidly growing number of innovative complement inhibitors has opened new therapeutic perspectives for several other hematological disorders in which the complement is involved at different degrees. This review focuses on complement biology and its mechanisms of activation in hematological diseases.

1 | INTRODUCTION

The complement system is an important part of the innate immune defense. Complement proteins interact in a cascade in order to opsonize pathogens and induce a series of inflammatory responses which help immune cells fight infection and maintain homeostasis. However, complement is also involved in pathological processes and complement activation contributes to tissue damage, autoimmune reactions, and chronic inflammation. Tight regulation of complement activation by both fluid-phase and membrane-bound complement inhibitors is

essential to maintain a good balance between optimal protection with as little as possible damage to host's cells. Therefore, an excessive complement activation can lead to injury of normal cells. An increased activation or a loss of regulation of complement is involved in a variety of hematological diseases including among others: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), atypical hemolytic-uremic syndrome (aHUS), autoimmune hemolytic anemias (AIHA) and hematopoietic stem cell transplantation associated thrombotic microangiopathies (HSCT-TMA).

Over the past decade, the blockade of the terminal complement pathway using C5 inhibitors has dramatically improved the morbidity and mortality of patients with PNH and aHUS, two prototypic complement-mediated diseases. Moreover, a growing body of evidence underlines the role of complement in other hematological diseases, which may help identify new potential therapeutic approaches. Recently, the first demonstration of the efficacy of C1s inhibition efficiency in cold agglutinin disease (CAD) has provided an illustration of these new targets within the complement cascade for the treatment of hematological disorders.

Abbreviations: AIHA, autoimmune hemolytic anemia; aHUS, atypical hemolytic-uremic syndrome; AP, alternative pathway; APS, antiphospholipid syndrome; CAD, cold agglutinin disease; CAPS, catastrophic antiphospholipid syndrome; CP, classical pathway; DAF, decay accelerating factor; DAT, direct antiglobulin test; DHTR, delayed hemolytic transfusion reaction; HSCT-TMA, hematopoietic stem cell transplantation-associated thrombotic microangiopathy; FH, factor H; LP, lectin pathway; MAC, membrane attack complex; MASP, mannan-binding lectin serine protease; MBL, mannan-binding lectin; PNH, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; RBCs, red blood cells; SCD, sickle cell disease; TMA, thrombotic microangiopathy; wAIHA, warm autoimmune hemolytic anemia.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.
© 2023 The Authors. *American Journal of Hematology* published by Wiley Periodicals LLC.

This review aims to provide an overview of the physiology of the complement cascade, to present the main mechanisms of its overactivation or dysregulation in a set of hematological disorders in which the complement is involved at variable degrees, and to discuss the rational use of complement inhibitors in this field.

2 | COMPLEMENT CASCADE IN PHYSIOLOGY

The complement is composed of plasma proteins, produced mainly by the liver, and of membrane proteins expressed on cell surface. More than fifty plasma and membrane-bound proteins participate in this complex serine protease cascade.¹ Complement operates in plasma, in tissues, or within cells.¹⁻³

2.1 | Activation of the cascade

The complement system is a powerful part of the innate immune defense pathway which is essential in the fight against microorganisms (bacteria, viruses). One of the main physiological functions of complement is to label invading microbes for removal by phagocytes (opsonization) and subsequently killing by the formation of a lytic membrane attack complex (MAC) on their surface, a mechanism of particular importance for the destruction of encapsulated bacteria. Activation of the complement system by antigens from pathogens also promotes the inflammatory response and enhances the activation of adaptive immunity. As complement is an integral part of the immune system and protects against infection, complement inhibition increases the risk of infections, notably invasive meningococcal infections and, to a lesser extent, of encapsulated and unencapsulated germs.

Besides its role in the protection against pathogens, the activation of the complement system is crucial for the maintenance of homeostasis via the opsonization of necrotic cells or apoptotic bodies. In addition, the complement is closely linked to other physiologic pathways and processes such as coagulation cascade, adaptive immune response, and inflammation.^{2,4-6} The role of complement in homeostasis and its cross talk with coagulation cascade have been recently summarized.⁷⁻⁹

Three initiating pathways of complement activation are described: the classical pathway (CP), the lectin pathway (LP), and the alternative pathway (AP) (Figure 1). The CP is triggered by immune complexes and the LP is initiated by the recognition of exposed glycans (mannose residues) on bacterial surface. In the CP, the C1q, in complex with C1r and C1s serine proteases (the C1 complex) binds to the Fc region of surface-bound antibodies (IgG, or IgM). Autocatalytic activation of C1r and C1s cleaves C2 and C4 leading to the assembly of the classical C3 convertase (C4b2b, formerly known as C4b2a). LP is initiated after the recognition of mannose residues on cell surface by sensor molecules called mannan-binding lectins (MBL) and ficolins. As for the CP, the binding of MBL-associated serine proteases or

MASPs to MBL further activates C2 and C4 and initiates the C4b2b convertase. Even in the absence of infection, the AP is permanently active at a low level via the spontaneous hydrolysis of the C3 (C3 "tickover"). The generation of the active form of C3 (C3H₂O) leads to the formation of the initial AP C3 convertase (C3bH₂OBB) in the presence of Factors B and D and in turn able to cleave C3.

The activation of the complement cascade by any of the three pathways leads to the formation of central enzymatic complexes C4b2b and C3bBb convertases. Through their serine-protease activity, the C3 convertases are capable to cleave the C3 molecule nearby into its bioactive form C3b and C3a, an anaphylatoxin. The generated C3b covalently binds to an activating surface (pathogens, necrotic/apoptotic cells) and forms new C3bBb convertases allowing the self-amplification of the C3 cleavage in a few minutes (amplification loop). Properdin is a positive regulator of complement, which stabilizes the AP C3 convertase thus increasing its half-life. A high concentration of C3b deposits close to a C3 convertase, in turn generates the C5 convertase (C3bBbC3b or C4b2bC3b) with the ensuing cleavage of C5 into its effectors C5b and C5a, a potent anaphylatoxin.¹⁰

The generated C5b will assemble with terminal complement components (C6, C7, C8) and insert into the phospholipid bilayer of the membrane. The addition of multiple C9 molecules promotes the formation a membrane attack complex (MAC or C5b-9) pore. The formation of a MAC on an unprotected surface such as gram-negative bacteria (*Neisseria* species) induces the lysis and the destruction of the pathogen.¹¹ Importantly, however, C5b-9 deposits on nucleated cells, such as endothelial cells, can cause irreversible damages via the initiation of intracellular signaling pathways by a calcium flux responsible for a modification of the cellular phenotype (activation, proliferation) and ultimately the induction of apoptosis.¹²

2.2 | Complement regulation

The maintenance of a fine balance between the different levels of activation of this powerful cascade is challenging, and should preserve its functions of opsonization and guardian of homeostasis while avoiding normal cell damage but the activation of the complement terminal pathway.¹ Under physiological conditions, initiation and the amplification of the complement cascade are tightly regulated by plasmatic or cell surface regulators to avoid its self-amplification and damage to normal cells. These multiple regulators act at different steps of the cascade (Figure 2). Factor H (FH) is the main regulator of the complement AP and of its amplification loop in plasma and on cell surface. FH consists of 20 modules called complement control proteins (CCPs). The four N-terminal domains (CCPs 1-4) of FH bind the C3b and the C-terminal domains (CCPs 19-20) are able to bind polyanions such as glycosaminoglycans allowing FH to downregulate complement activation on the cell surface. The FH controls the complement AP activation by several mechanisms. First, the interaction of FH with C3b competes with the binding of FB to C3b, thus preventing the formation of the AP C3 convertase (Figure 2A). Second, FH also accelerates the decay of the C3 convertase (Figure 2B). Last, FH acts as a

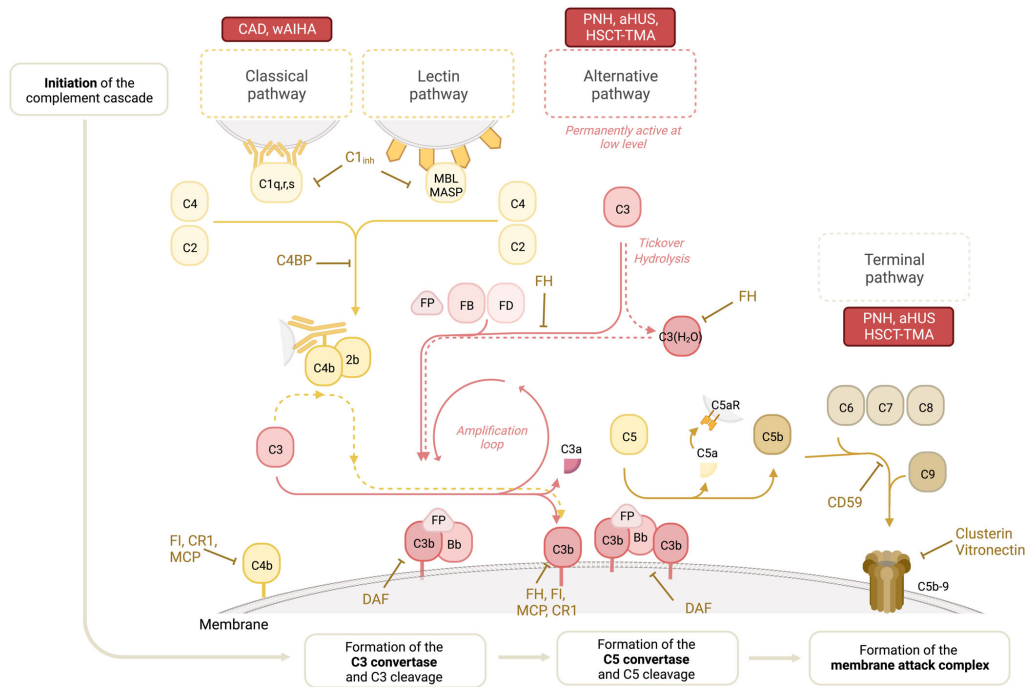


FIGURE 1 Complement cascade and therapeutic targets in hematological diseases. The classical complement pathway is initiated by the binding of complement protein 1q (C1q) to an antigen-antibody complex at the surface of a pathogen or a host cell. This allows the subsequent activation of C1r, C1s, and the formation of a serine protease complex (C1q,r,s) that in turn cleaves C4 and C2. C4b and C2a will subsequently assemble to form a classical C3 convertase (C4b2b, formerly called C3b2a). LP is initiated by the recognition of mannose-binding residues on a cell surface by the mannan-binding lectin complex (MBL/MASP). Complement AP is permanently active at low level via the spontaneous hydrolysis of C3, a process called “tickover”. The latter generates low amount of C3b (or C3H₂O) ready to bind covalently on surface. The binding of factor B (FB) to C3b forms C3 pro convertases (C3bB). The further activation of C3b-bound FB into Bb by factor D forms the alternative C3 convertases (C3bBb). The C3 convertases are then able to cleave new C3 molecules into its active form C3b. The enrichment in C3b deposits close to C3 convertases will form C5 convertases which are able to cleave C5 into C5b. The assembly of C5b with terminal components (C6-C9) will ultimately form a membrane attack complex (MAC or C5b-9) on the membrane. To avoid self-amplification and self-damage, the cascade is tightly downregulated by regulators in plasma and on cell surface (represented in brown). The main complement-mediated hematological diseases (PNH, aHUS, HSCT-TMA, CAD and wAIHA), are presented in red close to the pathway engaged in their pathogenesis. aHUS: atypical hemolytic-uremic syndrome; CAD: cold agglutinin disease; FB: factor B; FD: factor D; FH: factor H; FI: factor I; FP: Properdin; C5aR: C5a receptor; HSCT-TMA: hematopoietic stem-cells associated thrombotic microangiopathy; MAC, membrane attack complex (or C5b-9); MASP: mannan-binding lectin serine protease; MBL: mannan-binding lectin; PNH: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; wAIHA: warm autoimmune hemolytic anemia.

cofactor for factor I (FI)-mediated proteolytic inactivation of C3b (Figure 2C).

On the membrane of nucleated cells, FI and its cofactors FH, complement receptor I (CR1 or CD35), and MCP (CD46) act synergistically to prevent the formation of AP C3 convertases via the proteolysis of the C3b into its inactive form iC3b. The bound iC3b fragments are further cleaved into C3c (released into the circulation) and C3dg/C3d by FI and CR1. Proteins with decay-accelerating activity within the alternative C3 convertase include decay accelerating factor (DAF, CD55), FH, and CRI. CD55 is a complement regulatory protein expressed by cells to protect them from bystander lysis by

complement. It prevents the formation of C3/C5 convertases. Other regulators (C1 inhibitor, C4BP) act in the early phases of the cascade avoiding the initiation of classical/ LP. Terminal pathway is downregulated by CD59 which interferes with the assembly of C5b-8 and C9 on the membrane.¹³ Terminal activation products are made water-soluble, and thus unable to attach to the membrane, by fluid-phase clusterin or vitronectin (sC5b-9)¹⁴ (Figure 2D).

Complement deficiencies can be either primary (hereditary) or acquired. Biological assessment of complement activation can be studied *in vitro* with EDTA-plasma.¹⁵ Quantitative measurement of complement proteins aims to determine if plasma levels of

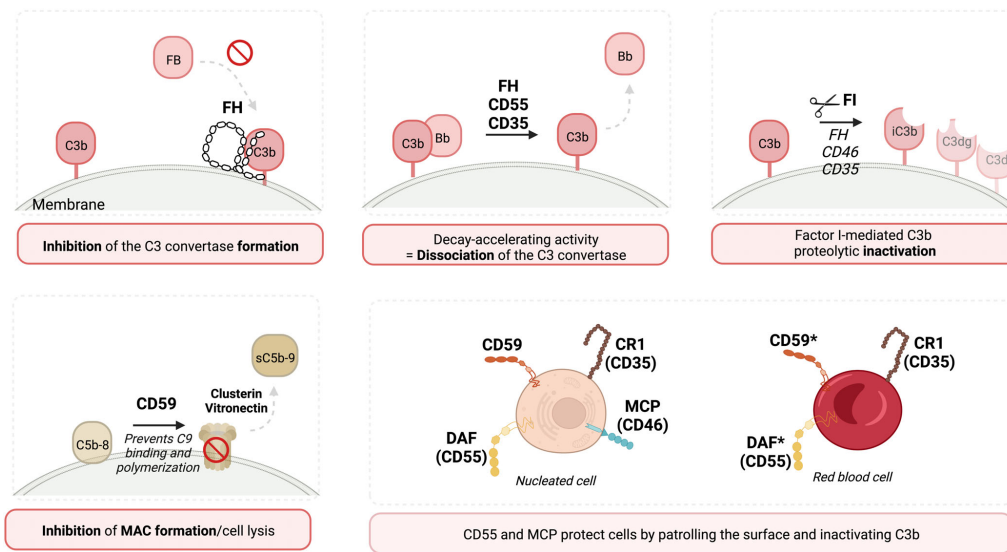


FIGURE 2 Complement activity must be regulated to prevent bystander damage to the host's cells. (A) Factor I-mediated cleavage of C3b prevents the latter from forming active convertases, and requires cofactor activity. These cofactors include the membrane-bound membrane cofactor protein (MCP or CD46) and complement receptor 1 (CR1 or CD35), as well as the fluid-phase Factor H (FH) and C4-binding protein (C4BP). (B) C3 convertases are regulated by proteins with a decay-accelerating activity, which serves to inhibit the assembly of new C3 convertases and shorten the half-life of the preformed convertases, limiting their ability to participate in complement activation. Proteins with decay-accelerating activity for the classical C3 convertase include decay-accelerating factor (DAF or CD55), CR1, and C4BP. AP inhibitors with this activity are DAF, FH, and CR1. (C) Proteolytic inactivation of C3b deposits on cell surface by factor I (FI) and its cofactors FH, MCP, and CR1. (D) The MAC is the lytic complex of complement and its assembly can be inhibited by the membrane-bound CD59 and the fluid-phase vitronectin and clusterin. (E) CD55 and MCP protect cells by patrolling the surfaces and inactivating C3b. CR1: complement receptor 1; DAF: decay accelerating factor; FB: factor B; FH: factor H; FI: factor I; MAC, membrane attack complex (or C5b-9).

complement proteins are reduced, as a marker of the preferential activation of complement AP (low C3, normal C4), classical/ LP (low C4, low C3) or of a complement protein deficiency (*ie* FH, FI, C1q). The CH50 and AP50 evaluate the function of the CP and AP respectively. Normal biological investigations in plasma or sera can strictly remain normal, even in an acute phase of intra-organ complement activation since this phenomenon first takes place in tissue or on cell surfaces. The quantification of complement biomarkers as C3a, C4d, sC5b-9, C5a and factor Bb is under clinical evaluation in various types of diseases.

3 | COMPLEMENT DYSREGULATION IN HEMATOLOGICAL DISEASES

The pathophysiology of hematological diseases illustrates several mechanisms of complement overactivation resulting from genetic or acquired complement dysregulation or from the combination of conditions enhancing complement activation leading to cell damage. During the last 20 years, the advances in diagnostic and therapeutic tools

helped demonstrate the role of complement in the pathogenesis of hematological diseases.

3.1 | Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

PNH is a clonal hematological disorder due to acquired somatic mutations located in the X-linked phosphatidylinositol glycan class A (PIGA) gene in a subset of hematopoietic stem cells. The PIGA gene is crucial for the biosynthesis of the glycosphosphatidylinositol (GPI) anchor of proteins on the surface of hematopoietic progenitors, notably on erythrocytes.¹⁶ This GPI-anchor is essential for the anchoring to the membrane of two main complement regulatory proteins: DAF (CD55) and CD59. GPI-deficient cells are then unshielded from complement attack since they lack these two essential complement regulatory proteins DAF (CD55) and CD59.¹⁷ Therefore, only CR1 and FH are operational to protect the red blood cells (RBCs) against complement attack (Figure 2E). The diagnosis of PNH is made by flow cytometry with the identification of GPI-deficient cells using a fluorescently labeled inactive variant of protein aerolysin (FLAER).¹⁸

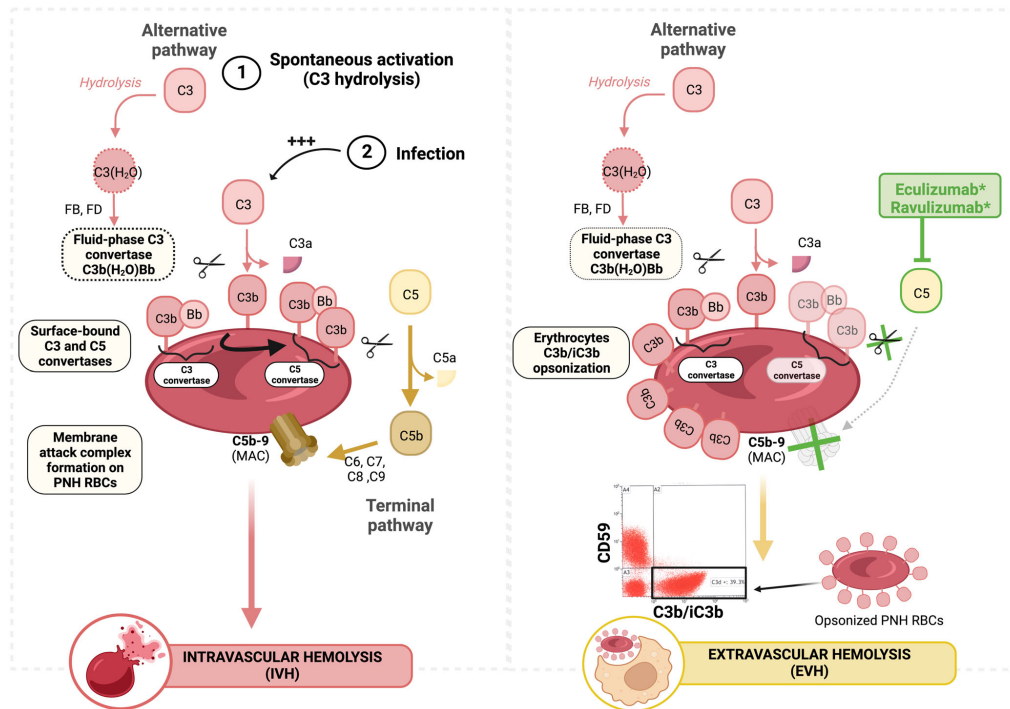


FIGURE 3 Mechanisms of hemolysis of PNH RBCs in the absence or in a presence of a complement terminal pathway inhibition. (A) Mechanisms of intravascular hemolysis in PNH patients. CD55/CD59-deficient PNH erythrocytes are not shielded from intense activation of the alternative complement pathway. After a trigger (such as an infection), complement AP is strongly activated and large amounts of C3b are deposited on erythrocytes. This overwhelms the complement regulatory capacity of CD55/CD59-deficient erythrocytes with the rapid formation of C3 and C5 convertases. Uncontrolled engagement of the complement terminal pathway results in the formation of lytic membrane attack complexes (MAC, or C5b-9) on defective erythrocytes and intravascular hemolysis. (B). Mechanisms involved in extravascular hemolysis in PNH patients treated with eculizumab. PNH erythrocytes are susceptible to extravascular hemolysis. The alternative complement pathway is continuously and spontaneously activated, leading to the deposition of small amounts of C3b on erythrocytes. The engagement of the terminal complement pathway in PNH patients on C5 inhibitors is prevented. Thus, C3b and its degradation products (iC3b, C3d) deposits accumulate on the surviving defective erythrocytes, reaching high densities. The C3b/iC3b opsonized erythrocytes are then phagocytosed by macrophages in the spleen and liver: a process called extravascular hemolysis. This phenomenon is responsible for persistent anemia under terminal complement pathway blockade. C3 activation products on erythrocytes can be detected by flow cytometry. AP: alternative pathway; MAC, membrane attack complex (or C5b-9); PNH: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; RBCs: red blood cells.

Patients typically present with chronic intravascular hemolysis due to low-level complement activation,^{19,20} and intravascular hemolysis episodes with the occurrence of hemoglobinuria following events with a potent trigger of complement activation, such as infection.^{9,20}

The efficiency of anti-C5 therapies has been demonstrated first in PNH.^{21,22} Eculizumab is an anti-C5 monoclonal antibody and represents the first approved complement drug.^{22,23} This biotherapy inhibits the cleavage of the C5 molecule by the C5 convertase, thereby avoiding the activation of the complement terminal pathway and the formation of MAC. The success of eculizumab in PNH confirmed the involvement of complement terminal pathway in acute

hemolysis episodes typical of this disease since it halts intravascular hemolysis in almost all PNH patients.

However, PNH patients may have a suboptimal response to C5 inhibition with a residual anemia or an RBCs-transfusion-dependence in up to 20–30% of patients while on eculizumab. The first mechanisms of the breakthrough hemolysis under eculizumab are the over activation of complement during infections and situations where the control of complement activity is not fully achieved as in pregnancy or during inflammation.^{24,25} Nishimura, et al. described another cause of poor response to eculizumab due to genetic variants in the C5 gene (c.2654G > A p.Arg885His and c.2653C > T p.Arg885Cys) disrupting the eculizumab epitope in a subset of patients of Asian ancestry.²⁶

The measure of CH50 activity (a functional test, which evaluates the residual hemolytic capacity of complement cascade) and circulating free eculizumab may help physicians' management and the prevention of acute hemolysis episodes.²⁵

The last mechanism underlying a suboptimal response to C5 blockade is the occurrence of extravascular hemolysis.²⁷ Indeed, C5 blockade does not inhibit the AP activation upstream since the formation and the activity of C3 convertases is not altered. On C5 blockade, persistent dysregulated activation of the early phases of the complement cascade on PNH RBCs may lead to progressive C3 deposition on surviving yet defective erythrocytes. The opsonization of erythrocytes by C3b/iC3b renders them susceptible to phagocytosis in the spleen and the liver, a process called extravascular hemolysis.²⁸⁻³⁰ Evidence of an extravascular hemolysis in PNH patients treated by C5 inhibitors raised the question of the potential value of upstream

complement blockade with C3 inhibitors.^{31,32} The detection of C3 activation fragments using an anti-C3d antibody on GPI-deficient RBCs by flow cytometry might constitute an interesting tool for the follow-up of patients under complement blockade. But the clinical usefulness of this technique is yet to be determined.^{27,30} The distinct mechanisms involved in intra and extravascular hemolysis in PNH patients are depicted in Figure 3.

3.2 | Atypical hemolytic and uremic syndrome: A prototype of complement alternative pathway-mediated disease

Thrombotic microangiopathies (TMA) are defined as a clinical triad associating mechanical hemolytic anemia, thrombocytopenia, and

TABLE 1 The rationale for the use of therapeutic complement inhibition in main hematological diseases with complement involvement.

Hematological disease	Pathway(s) involved	Complement involvement	Main tool for the diagnosis	Signs of complement activation in patients
aHUS	AP, TP	Acquired or genetic complement alternative pathway dysregulation in up to 50%-60% of patients. ^{53,54}	Genetic screening of variant in complement genes	↓ C3 in about 30%-50% of patients. ⁸¹ Presence of anti-FH Ab (5%-10% of patients) ↓FH, ↓FI levels (mostly associated with genetic variants)
PNH	AP, TP	Acquired CD55 and CD59 deficiency on RBCs AP deregulation and activation of TP are involved in paroxysmal episodes of intravascular hemolysis AP is involved in RBCs opsonization and extravascular hemolysis by macrophages and persistent anemia while under anti-C5 therapy.	GPI-deficient (CD55 ⁻ /CD59 ⁻) cells in blood circulation by flow cytometry (FLAER technique)	<i>For the diagnosis:</i> none <i>Under C5 inhibition:</i> C3d deposits on RBCs (flow cytometry), evaluation of complement activity (CH50) for drug monitoring
CAD	CP	<i>Acquired autoantibodies</i> (IgM) recognizing self-antigens on RBCs and promoting complement-mediated RBC aggregation and hemolysis below 37°C	Direct Antiglobulin test (DAT) positive for C3d deposits on RBCs	Direct Antiglobulin test (DAT) positive for C3d deposits on RBCs
wAIHA	CP	<i>Acquired autoantibodies</i> (IgG, IgM) recognizing self-antigens on RBCs and promoting complement-mediated RBC aggregation and hemolysis	Direct Antiglobulin test (DAT) positive for C3d and IgG deposits on RBCs	Direct Antiglobulin test (DAT) positive for C3d deposits on RBCs
HSCT-TMA	AP, TP	Combination of hits: myeloablative conditioning regimen ± additional endothelial injury of inflammatory context ± preexisting endothelial cell damage <i>Role of a genetic predisposition</i> in complement dysregulation is to be confirmed	None	Signs of complement activation (↓C3, ↑sC5b-9) can be absent

Abbreviations: aHUS, atypical hemolytic uremic syndrome; AP, alternative pathway; CAD, cold agglutinin disease; CP, classical pathway; HSCT-TMA, hematopoietic stem cell transplantation associated microangiopathy; RBCs, red blood cells; TMA, thrombotic microangiopathy; PNH, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; TP, terminal pathway; wAIHA, warm autoimmune hemolytic anemia.

TABLE 2 Complement activation mechanisms in hematological diseases with emergence of complement activation in pathogenesis.

Hematological disease	Pathway(s) involved	Mechanisms of complement activation involved in pathogenesis	Features of complement activation in patients (plasma, tissue, ex vivo models)	Registered trials (Phase I-IV) with complement inhibitors. Retrospective series and cases reports
Antiphospholipid syndrome (APS) Catastrophic antiphospholipid syndrome (CAPS)	AP, TP	Complement might be activated by antiB2GPI antibodies ⁸² or autoantibodies directed against complement components ⁸³ Complement activation and complement AP genetic variants may be associated with thrombotic events ^{84,85}	↑ C5b-9, Bb and C3a plasma levels in patients ⁸⁶	Ecilizumab (anti-C5) (post-transplantation) (NCT01029587) Ecilizumab treatment in small cases series ⁸⁷⁻⁹⁸ and cases reports ^{99,100}
Immune thrombopenia (ITP)	CP, TP	Activation of complement CP by autoantibodies deposition on platelets. ¹⁰¹ Complement TP may contribute to autoimmune platelet destruction. ^{100,102}	↓ C3, C4, CH50 in up to 30–40% of patients. ¹⁰⁰	No therapeutic trial registered No cases reported In vitro success of Sutimilimab ¹⁰³
Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP)	Not clearly established (AP)	Mechanisms of complement activation not clearly established. Ultra large Von Willebrand factor multimers anchored on the endothelial cell surface may promote the assembly of AP C3 convertases, ¹⁰⁴ thus enhancing complement activation on endothelium, endothelial damage and intravascular thrombosis. ¹⁰³	↑ C3a, sC5b-9 plasma level during acute episodes, ↓ C3 level in 15% of patients, ¹⁰⁵⁻¹¹⁰ but the dosage of C5b-9 is much lower in TTP than in aHUS patients.	Sutimilimab (anti-C1s) (phase 1) (NCT03275454) Anecdotal cases treated with the success of ecilizumab ¹¹¹ One reported case with refractory to C5 inhibition by ecilizumab ¹¹²
HELLP syndrome	AP, TP	AP activation may be involved ¹¹³ No association with genetic variant in complement AP genes ^{114,115}	↑ serum levels C5a and/or sC5b-9 at diagnosis. ¹¹⁶ Placental deposition of C5b-9 ¹¹⁷ Ex vivo model with ↑ C5b-9 deposits on endothelial cells in activated plasma from HELLP patients ¹¹⁸⁻¹²¹	Ecilizumab (anti-C5) (phase 1) (NCT04103489) Cases reports ¹²² and cases series ¹²³ treated with ecilizumab
Carfilzomib-induced TMA	AP	Mechanisms of complement activation not clearly identified ^{124,125} Genetic variants in AP genes may predispose to a Carfilzomib-induced complement dysregulation ⁸⁰	Ex vivo model: ↑ C5b-9 deposits of endothelial cells exposed to the plasma from patients ¹²⁶⁻¹³⁰	No therapeutic trial. Cases series with a success of ecilizumab ^{48,73}
Sickle cell disease (SCD)	AP, TP	Mechanisms of complement activation not fully elucidated. Role of complement TP in vaso-occlusive crisis and tissue injury. AP activation may be enhanced by the liberation of free heme during acute hemolysis episodes ⁷⁸	↑ sC5b-9, C5a and/or Bb fragments in plasma during hemolysis crisis and at a steady state ⁷⁷ C3d deposits can be detected on the surface of SCD RBCs ¹³¹⁻¹³⁶	Crovalimab (phase 1) NCT04912869 Anecdotal cases treated with Ecilizumab ¹³⁷
Thalassemia	Not clearly established	Complement AP activation may participate in RBCs opsonization and chronic hemolysis. Decrease in CD55 expression on β-thalassemia RBCs may contribute to complement dysregulation ¹³⁸	↑ C5b-9 in plasma after transfusion ¹³⁹ Positivity of DAT in about 50% of patients ¹⁴⁰	No therapeutic trial registered No case reported
Disseminated intravascular coagulation (DIC)	TP	Mechanisms of complement activation not fully characterized	Participation of C5 activation products (C5a) in DIC associated with a sepsis	No therapeutic trial registered.

(Continues)

TABLE 2 (Continued)

Hematological disease	Pathway(s) involved	Mechanisms of complement activation involved in pathogenesis	Features of complement activation in patients (plasma, tissue, ex vivo models)	Registered trials (Phase I-IV) with complement inhibitors. Retrospective series and cases reports
		Coagulation and complement crosstalk may participate in the pathogenesis. Proposal mechanism: pathogenic effect of C5a in sepsis associated-DIC	context ¹⁴¹ and spinal-cord injury ^{142,143}	Anecdotal cases of patients receiving eculizumab (sepsis context) ¹⁴⁴
Hemolysis after ABO transfusion or delayed hemolytic transfusion reaction (DHTR)	TP	Mechanisms of complement activation not fully characterized. Complement activation may be mediated by isoagglutinin recognizing minor antigens on RBCs (DHTR) or ABO antigens (ABO incompatible transfusions) and promoting complement-mediated RBC aggregation and hemolysis. ¹⁴⁵ DHTR is more frequent in SCD patients. ¹⁴⁶	↑ sC5b-9 in plasma in some patients with DHTR treated with eculizumab ^{134,135}	Anecdotal cases reports treated with Eculizumab as a salvage therapy after an ABO incompatible transfusion ^{147,148} Anecdotal cases reports of success of Eculizumab in delayed hemolytic transfusion reaction (DHTR) in patients with β-thalassemia ¹⁴⁵ and sickle cell disease. ¹⁴⁵

Abbreviations: AP, alternative pathway; APS, antiphospholipid syndrome; C3nef, C3 nephritic factor; CAPS, catastrophic antiphospholipid syndrome; CP, classical pathway; DAT, direct antiglobulin test; DIC, disseminated intravascular coagulation; DHTR, delayed hemolytic transfusion reaction; ITP, immune thrombopenia; SCD, sickle cell disease; TTP, thrombotic thrombocytopenic purpura; TMA, thrombotic microangiopathy; TP, terminal pathway.

organ damage.³³ The main feature of TMA is endothelial damage, which favors the formation of microthrombi in small vessels of several organs and thrombopenia caused by platelet consumption. The formation of thrombi in vascular bed is then responsible for an intravascular hemolysis by a mechanical lysis of red blood cells passing through the fibrin microthrombi. This results in hemolytic anemia with the appearance of red cells fragments (schistocytes) in the blood smear. In TMA, dysregulation of the complement system may be responsible for endothelial damage and the prothrombotic condition.^{9,33}

TMA constitutes a large family of pathological entities including Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), an emblematic hematological disease linked to the acquired or hereditary ADAMTS13 deficiency,³³ the hemolytic and uremic syndromes with the aHUS a prototypic complement AP-mediated kidney disease and the secondary forms of HUS triggered by different events (infection, cancer, transplantation).

A genetic predisposition underlies the mechanisms of complement AP dysregulation in the setting of aHUS. About half of the patients carry a pathogenic variant in complement AP genes. The variants lead to a quantitative or a functional deficiency (FH, MCP, FI), or to the generation of an overactive C3 convertase resistant to regulation (gain of function of C3 or FB).^{34–36} Most variants are located in the CFH gene (20–30% of patients),^{15,37} and affect the C terminal functional domains of FH protein (SCR19–10). These domains are crucial for the interaction of FH with the glycosaminoglycans on the membrane and the binding to C3b^{38,39} resulting in an impairment of FH regulatory function.⁴⁰ In 5% of the patients, a complex rearrangement between the CFH and the CFHR1 genes induces the production of CFH/CFHR hybrid proteins acting as competitive antagonists of

FH. Other variants affecting proteins at the interface of complement and coagulation cascades (THBD) and DGKe have been identified in a subset of patients.^{41,42} Acquired autoantibodies directed against FH are another cause of complement dysregulation in 5–10% aHUS patients.⁴³ TMA associated with monoclonal gammopathy is also associated with AP abnormalities.⁴⁴

Constitutive or acquired predisposition to complement dysregulation leads to an uncontrolled AP self-amplification. This phenomenon generates large amounts of C3b overwhelming complement regulation capacity. Activation of the terminal pathway with the formation of C5b-9 on the endothelium promotes endothelial damage, inflammation, and the prothrombotic phenotype of these cells.^{9,45,46} Intravascular hemolysis aggravates this vicious circle via the generation of free heme which contributes to oxidative stress, endothelial damage, and complement activation.^{47,48} The glomerular endothelium is particularly susceptible to complement attack. Its fenestrated architecture, the terminal vascularization, and its sulfation pattern on the membrane might partly explain the renal tropism of aHUS.⁴⁹

C5-targeting therapies, such as eculizumab or its analogs, interrupt this vicious circle by stopping the C5 cleavage by the C5 convertases, preventing the formation of C5b-9. During the last decade, anti-C5 therapies have dramatically revolutionized the prognosis and the management of aHUS patients.⁵⁰ Moreover, the presence of pathogenic variants is associated with a higher risk of recurrence after C5 blockade discontinuation.⁵¹ Thus, the screening for complement variants in aHUS patients is now crucial to stratify the risk of recurrence and to guide clinicians in the decision to stop or not anti-complement therapies.^{15,42,51,52} Genetic assessment is even more critical since up

TABLE 3 Principal complement-targeting therapies in hematological field currently in phase III of drug development or commercialized.

Target	Complement pathway (initiation/effector)	Mechanism of action	Drug	Pharmaceutical company	Type of inhibitor	Mode of administration	Phases of drug development	Hematological diseases
C5	TP	Inhibition of the release of C5a and C5b and of the formation of C5b9.	Eculizumab	Alexion Pharma	mAb	IV	Commercialized Phase III	aHUS, PNH HSCT-TMA
			Ravulizumab	Alexion Pharma	mAb	IV	Commercialized, Phase III	aHUS, PNH HSCT-TMA
			Crovalimab	Roche	mAb	SC	Phase III	aHUS, PNH
			Pozelimab	Regeneron Pharmaceuticals	mAb	IV	Phase III	PNH
			Cemdisiran	Regeneron Pharmaceuticals	siRNA	SC	Phase III	PNH
C3	AP	Inhibition of the binding of C3 to the C3bBb and thus of its cleavage	Eculizumab biosimilars SB12, Elizaria, ABP 589, BCD148	Samsung Bioepis, Ao Generium, Angen Biocad	mAb	IV	Phase III	PNH
			Pegcetacoplan	Apellis Pharma/SOBI	Pegylated peptide	SC	Phase III FDA approval	CAD, wAIHA PNH
Factor B	AP	Inhibition of the serine protease FB and thus of the cleavage of C3 and C5	Iptacopan	Novartis	Small molecule	Oral	Phase III	aHUS, PNH
Factor D	AP	Inhibition of the cleavage of FB	Danicopan	Alexion Pharma	Small molecule	Oral	Phase III (add-on therapy to C5 inhibition)	PNH
C1s	CP	Inhibition of the serine protease C1s	Sutimlimab	Sanofi	mAb	IV	Commercialized	CAD

Abbreviations: aHUS, atypical hemolytic uremic syndrome; AP, alternative pathway; CAD, cold agglutinin disease; CP, classical pathway; FDA, Food and Drug Administration; IV, intravenous; HSCT-TMA, hematologic-stem-cell associated thrombotic microangiopathy; mAb, monoclonal antibody; PNH, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; SC, subcutaneous; TP, terminal pathway; wAIHA, warm autoimmune hemolytic anemia.

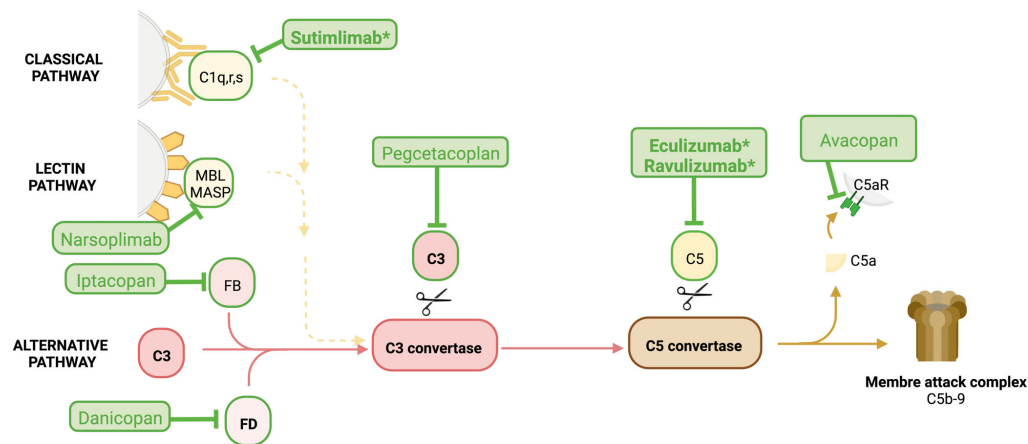


FIGURE 4 Main complement inhibitors undergoing development in hematological diseases. Complement inhibitors under development (Phase II-III), approved or currently available in hematological diseases (*) and their target are represented in green. The targets and the mechanisms of action of complement cascade inhibitors are multiple. Sutimlimab is a C1s inhibitor, which inhibits the initiation of CP. MASP-2 inhibition by Narsoplimab prevents the activation of the LP. Iptacopan and Danicopan prevent the formation of C3 convertase. Pegcetacoplan binds to C3 molecule, avoiding its cleavage by the C3 convertase. Eculizumab (and its analogs) and Ravulizumab inhibit C5-cleavage and the initiation of the terminal pathway and the formation of the membrane attack complex (C5b-9). Avacopan inhibits the pathogenic effects of the anaphylatoxin C5a. Figures 1-4 created with [Biorender.com](https://www.biorender.com). FB: factor B; FD: factor D; C5aR: C5a receptor. MASP-2: mannan-binding lectin serine protease-2; MBL: mannan-binding lectin.

to 30–50% of aHUS patients do not have markers of systemic complement activation.^{53,54}

3.3 | Hematopoietic stem cell transplantation associated thrombotic microangiopathy: A multi-system endothelial injury

Thrombotic microangiopathy is a complication occurring in up to 10–20% of patients following hematopoietic stem-cells transplantation (HSCT-TMA).^{9,55} This complication associates with a high morbidity and mortality rate, in the absence of a rapid treatment⁵⁶; signs of TMA should be then rapidly identified⁵⁷ to avoid irreversible organ damage due to microvascular thrombosis. In the context of HSCT, the potential triggers of TMA are multiple: the occurrence of proinflammatory stimuli as a graft-versus-host disease (GVHD) is one of the most common. Other triggers can be infectious complications or the consequences of immunosuppressive or conditioning regimen.^{57–59} The precise mechanisms of complement activation in this setting have not been fully dissected. The implication of genetic susceptibility needs to be further evaluated.

Recent studies⁶⁰ have shown a potential benefit of an early use of complement therapies in this peculiar type of TMA, but not all patients respond to eculizumab therapy (efficacy shown in pediatric cohorts essentially).

Algorithms have been proposed to help physicians identify and treat HSCT-TMA patients.^{55,57} A close biological monitoring of

hemolysis features (hemoglobin, platelets, schistocytes, LDH) should be performed after HSCT. Biological signs of systemic complement activation (C3 consumption, increase in sC5b-9 plasmatic level) can be absent and TMA can only manifest with unexplained organ dysfunction. In these cases (when possible) organ biopsy may help to confirm the diagnosis. Therapeutic monitoring of eculizumab is of importance, particularly in bleeding HSCT-recipients.⁶¹

3.4 | Autoimmune hemolytic anemias: The resurgence of complement in the pathogenesis

AIHA encompasses several autoimmune disorders characterized by the presence of autoantibodies recognizing self-antigens on RBCs.⁶² Different clinical entities have been described: the cold agglutinin disease (CAD) and the warm AIHA (wAIHA), both of which can be idiopathic or secondary. Cold agglutinins are immunoglobulins (IgM) directed against RBCs, which are active below normal body temperature: in CAD, cooling of the blood in the acral parts of the body enables the cold agglutinins to bind self-antigens on RBCs and cause agglutination. Other hemolytic anemias are termed “warm” when agglutinin activity occurs at body temperature. In these diseases, the binding of clonal IgM or IgG immunoglobulins on self-antigens expressed on erythrocytes initiates complement activation through the CP.⁶³ The further amplification by the complement AP leads to the enrichment of C3b deposits on erythrocytes which promotes erythrophagocytosis.⁶⁴ At a steady state, the C3b and the C3

convertases on cell surface are thus well-regulated and terminal pathway is not engaged. A stronger complement activation following an infection, a surgery or a trauma is often necessary to trigger intravascular complement-mediated hemolysis.

The treatment of CAD was historically based on the association of symptomatic measures and B-cell reductive chemotherapies.⁶⁵ Therapeutic field has recently been expanded to complement inhibitors highlighting the role of complement in the pathogenesis.^{66,67} Sutimlimab is a humanized monoclonal antibody, which targets the C1s protein (a C1 serine protease) and prevents the initiation of CP.⁶⁸⁻⁷⁰ Patients receiving anti-C1s therapy experience an improvement in hemoglobin and bilirubin levels and fatigue.⁷¹ Other studies suggested a potential benefit of eculizumab in CAD.^{68,72} We must emphasize that the primary treatment of this immune-complexes-driven hematological disorder is the control of the B-cell clone and not complement inhibition.

Complement activation is also an actor in the pathogenesis of some wAIHA, particularly when IgM is involved but the potential benefit of complement inhibition in this field remains to be further investigated.

Biologically, some patients may present signs of CP activation with C4 consumption. Complement activation fragments C3d deposition on RBCs can be detected by a direct antiglobulin test (DAT) (see Table 1).

The mechanisms of classical complement pathway activation and its involvement in extravascular hemolysis in CAD and wAIHA share several similarities with another hemolytic disease: the delayed hemolytic transfusion reaction (DHTR). In DHTR, extravascular hemolysis of erythrocytes occurs a few days after a blood transfusion and may also be mediated by the opsonization of donor erythrocytes by IgG alloantibodies (undetectable at transfusion) and complement CP activation in a sensitized recipient. The IgG opsonized donor's erythrocytes are then destroyed by phagocytosis. DHTR can also manifest as an intense intravascular hemolysis in some patients. Efficacy of terminal pathway blockade in this life-threatening complication of blood transfusion supports the involvement of complement terminal pathway in these intravascular hemolysis episodes. This phenomenon may be increased in patients suffering from hemoglobinopathies such as sickle cell disease (SCD).⁷³

3.5 | Other hematological disorders with the emergence of a role of complement in pathology

Features of complement cascade activation have been recently described in a growing spectrum of hematological diseases such as (catastrophic) antiphospholipid syndrome (APS and CAPS),⁷⁴ TTP,⁷⁵ immune thrombocytopenia,⁷⁶ sickle cell disease (SCD),^{77,78} delayed hemolytic transfusion reaction (DHTR) or even in drug-related complications as proteasome inhibitors in multiple myeloma.^{79,80} The main diseases in which the role of complement in pathogenesis has recently emerged or has been updated in the era of the development of several complement-targeting therapies are presented in Table 2. It is noteworthy that in hematological diseases associated with acute hemolysis episodes, the activation of the AP may be enhanced by the release of free heme.^{47,73}

3.6 | Different complement therapeutic targets for hematological diseases

An overview of the main emergent complement-targeting therapies and their rational use in the field of hematological diseases is presented in Table 3 and Figure 4. The implication of complement activation in hematological diseases, and hence the potential benefit of complement blockade, can be inferred using a combination of clinical, pathological, and experimental arguments.

4 | CONCLUSION

Complement biology and the rational use of complement inhibitors are now hot topics in hematological diseases. The current vision of complement as a field wide open to new promising therapeutics has greatly reinforced clinician's interest in this pathway, bringing the physiology of complement into the spotlight.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

AD has no conflict of interest. VF-B has received fees from Alexion Pharmaceuticals, Biocryps, Roche, Apellis, Novartis, and Baxter for invited lectures and/or board membership and is the recipient of a research grant from Alexion Pharmaceuticals.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

None.

ORCID

Anna Duval  <https://orcid.org/0000-0002-6432-881X>

Véronique Frémeaux-Bacchi  <https://orcid.org/0000-0002-4865-8528>

REFERENCES

- Merle NS, Church SE, Frémeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part I: molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol*. 2015;6:262.
- Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Frémeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part II: role in immunity. *Front Immunol*. 2015;6:257.
- Kunz N, Kemper C. Complement has brains: do intracellular complement and Immunometabolism cooperate in tissue homeostasis and behavior? *Front Immunol*. 2021;12:629986.
- Oikonomopoulou K, Ricklin D, Ward PA, Lambris JD. Interactions between coagulation and complement: their role in inflammation. *Semin Immunopathol*. 2012;34(1):151-165.
- de Bont CM, Boelens WC, Pruijn GJM. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(1):19-27.
- Foley JH. Examining coagulation-complement crosstalk: complement activation and thrombosis. *Thromb Res*. 2016;141:S50-S54.
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*. 2010;11(9):785-797.
- Noris M, Galbusera M. The complement alternative pathway and hemostasis. *Immunol Rev*. 2022;313(1):139-161.
- Schmidt CQ, Schrezenmeier H, Kavanagh D. Complement and the prothrombotic state. *Blood*. 2022;139(13):1954-1972.

10. Li XX, Lee JD, Kemper C, Woodruff TM. The complement receptor C5aR2: a powerful modulator of innate and adaptive immunity. *J Immunol*. 2019;202(12):3339-3348.
11. Lewis LA, Ram S. Meningococcal disease and the complement system. *Virulence*. 2014;5(1):98-126.
12. Xie CB, Jane-Wit D, Pober JS. Complement Membrane Attack Complex. *Am J Pathol*. 2020;190(6):1138-1150.
13. Meri S, Morgan BP, Davies A, et al. Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology*. 1990;71(1):1-9.
14. Hadders MA, Bubeck D, Roversi P, et al. Assembly and regulation of the membrane attack complex based on structures of C5b6 and sC5b9. *Cell Rep*. 2012;1(3):200-207.
15. Fakhouri F, Frémeaux-Bacchi V. Thrombotic microangiopathy in aHUS and beyond: clinical clues from complement genetics. *Nat Rev Nephrol*. 2021;17(8):543-553.
16. Colden MA, Kumar S, Munkhbileg B, Babushok DV. Insights into the emergence of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Front Immunol*. 2022;12:830172.
17. Mastellos DC, Ricklin D, Yancopoulos D, Risitano A, Lambris JD. Complement in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: exploiting our current knowledge to improve the treatment landscape. *Expert Rev Hematol*. 2014;7(5):583-598.
18. Brodsky RA, Mukhina GL, Li S, et al. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent Aerolysin. *Am J Clin Pathol*. 2000;114(3):459-466.
19. Risitano AM, Rotoli B. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: pathophysiology, natural history and treatment options in the era of biological agents. *Biol Targets Ther*. 2008;2(2):205-222.
20. Risitano AM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and other complement-mediated hematological disorders. *Immunobiology*. 2012;217(11):1080-1087.
21. Hill A, Hillmen P, Richards SJ, et al. Sustained response and long-term safety of eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005;106(7):2559-2565.
22. Hillmen P, Hall C, Marsh JCW, et al. Effect of Eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2004;350(6):552-559.
23. Hillmen P, Young NS, Schubert J, et al. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2006;355(12):1233-1243.
24. Notaro R, Luzzatto L. Breakthrough hemolysis in PNH with proximal or terminal complement inhibition. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 2022;387(2):160-166.
25. Peffault de Latour R, Brodsky RA, Ortiz S, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of ravulizumab and eculizumab on complement component 5 in adults with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: results of two phase 3 randomised, multicentre studies. *Br J Haematol*. 2020;191(3):476-485.
26. Nishimura J, Ichi, Yamamoto M, Hayashi S, et al. genetic variants in C5 and poor response to Eculizumab. *N Engl J Med*. 2014;370(7):632-639.
27. Risitano AM, Notaro R, Marando L, et al. Complement fraction 3 binding on erythrocytes as additional mechanism of disease in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients treated by eculizumab. *Blood*. 2009;113(17):4094-4100.
28. Hill A, Rother RP, Arnold L, et al. Eculizumab prevents intravascular hemolysis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and unmasks low-level extravascular hemolysis occurring through C3 opsonization. *Haematologica*. 2010;95(4):567-573.
29. Gurnari C, Nautiyal I, Pagliuca S. Current opinions on the clinical utility of Ravulizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Ther Clin Risk Manag*. 2021;17:1343-1351.
30. Lin Z, Schmidt CQ, Koutsogiannaki S, et al. Complement C3dg-mediated erythrophagocytosis: implications for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2015;126(7):891-894.
31. Gavriilaki E, de Latour RP, Risitano AM. Advancing therapeutic complement inhibition in hematologic diseases: PNH and beyond. *Blood*. 2022;139(25):3571-3582.
32. Risitano AM, Marotta S, Ricci P, et al. Anti-complement treatment for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: time for proximal complement inhibition? A position paper from the SAAWP of the EBMT. *Front Immunol*. 2019;10:1157.
33. Fakhouri F, Zuber J, Frémeaux-Bacchi V, Loirat C. Haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet*. 2017;390(10095):681-696.
34. Roumenina LT, Jablonski M, Hue C, et al. Hyperfunctional C3 convertase leads to complement deposition on endothelial cells and contributes to atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2009;114(13):2837-2845.
35. Marinozzi MC, Vergoz L, Rybkine T, et al. Complement factor B mutations in atypical hemolytic uremic syndrome—disease-relevant or benign? *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(9):2053-2065.
36. Valoti E, Alberti M, Tortajada A, et al. A novel atypical hemolytic uremic syndrome-associated hybrid *CFHR1/CFH* gene encoding a fusion protein that antagonizes factor H-dependent complement regulation. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(1):209-219.
37. Loirat C, Frémeaux-Bacchi V. Atypical hemolytic uremic syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6(1):60.
38. Ferreira VP, Herbert AP, Cortés C, et al. The binding of factor H to a complex of physiological Polyanions and C3b on cells is impaired in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Immunol*. 2009;182(11):7009-7018.
39. Roumenina LT, Roquigny R, Blanc C, et al. Functional Evaluation of Factor H genetic and Acquired Abnormalities: Application for Atypical Hemolytic Uremic Syndrome (aHUS). *Complement Syst*. 2014;1100:237-247.
40. Sánchez-Corral P, Pérez-Caballero D, Huarte O, et al. Structural and functional characterization of factor H mutations associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Am J Hum Genet*. 2002;71(6):1285-1295.
41. Lemaire M, Frémeaux-Bacchi V, Schaefer F, et al. Recessive mutations in DGKE cause atypical hemolytic-uremic syndrome. *Nat Genet*. 2013;45(5):531-536.
42. Roumenina LT, Loirat C, Dragon-Durey MA, Halbawachs-Mecarelli L, Sautes-Fridman C, Frémeaux-Bacchi V. Alternative complement pathway assessment in patients with atypical HUS. *J Immunol Methods*. 2011;365(1-2):8-26.
43. Dragon-Durey MA, Blanc C, Garnier A, Hofer J, Sethi SK, Zimmerhackl LB. Anti-factor H autoantibody-associated hemolytic uremic syndrome: review of literature of the autoimmune form of HUS. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36(6):633-640.
44. Martins M, Bridoux F, Goujon JM, et al. Complement activation and thrombotic Microangiopathy associated with monoclonal Gammopathy: a National French Case Series. *Am J Kidney Dis*. 2022;80(3):341-352.
45. Aiello S, Gastoldi S, Galbusera M, et al. C5a and C5aR1 are key drivers of microvascular platelet aggregation in clinical entities spanning from aHUS to COVID-19. *Blood Adv*. 2022;6(3):866-881.
46. Estrada CC, Cardona S, Guo Y, et al. Endothelial-specific loss of Krüppel-like factor 4 triggers complement-mediated endothelial injury. *Kidney Int*. 2022;102(1):58-77.
47. Frimat M, Tabarin F, Dimitrov JD, et al. Complement activation by heme as a secondary hit for atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2013;122(2):282-292.
48. Belcher JD, Chen C, Nguyen J, et al. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood*. 2014;123(3):377-390.

49. Clark SJ, Ridge LA, Herbert AP, et al. Tissue-specific host recognition by complement factor H is mediated by differential activities of its glycosaminoglycan-binding regions. *J Immunol.* 2013;190(5):2049-2057.
50. Zuber J, Frimat M, Caillard S, et al. Use of highly individualized complement blockade has revolutionized clinical outcomes after kidney transplantation and renal epidemiology of atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2019;30(12):2449-2463.
51. Fakhouri F, Fila M, Hummel A, et al. Eculizumab discontinuation in children and adults with atypical hemolytic-uremic syndrome: a prospective multicenter study. *Blood.* 2021;137(18):2438-2449.
52. Le Quintrec M, Zuber J, Moulin B, et al. Complement genes strongly predict recurrence and graft outcome in adult renal transplant recipients with atypical hemolytic and uremic syndrome: genetic complement in renal transplantation. *Am J Transplant.* 2013;13(3):663-675.
53. Fremeaux-Bacchi V, Fakhouri F, Garnier A, et al. Genetics and outcome of atypical hemolytic uremic syndrome: a Nationwide French series comparing children and adults. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8(4):554-562.
54. Noris M, Caprioli J, Bresin E, et al. Relative role of genetic complement abnormalities in sporadic and familial aHUS and their impact on clinical phenotype. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(10):1844-1859.
55. Meri S, Bunjes D, Cofield R, Jodele S. The role of complement in HSCT-TMA: basic science to clinical practice. *Adv Ther.* 2022;39(9):3896-3915.
56. Gavrilaki E, Sakellari I, Batsis I, et al. Transplant-associated thrombotic microangiopathy: incidence, prognostic factors, morbidity, and mortality in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Clin Transplant.* 2018;32(9):e13371.
57. Young JA, Pallas CR, Knovich MA. Transplant-associated thrombotic microangiopathy: theoretical considerations and a practical approach to an unrefined diagnosis. *Bone Marrow Transplant.* 2021;56(8):1805-1817.
58. Jodele S, Laskin BL, Dandoy CE, et al. A new paradigm: diagnosis and management of HSCT-associated thrombotic microangiopathy as multi-system endothelial injury. *Blood Rev.* 2015;29(3):191-204.
59. Willems E, Baron F, Seidel L, Frère P, Fillet G, Beguin Y. Comparison of thrombotic microangiopathy after allogeneic hematopoietic cell transplantation with high-dose or nonmyeloablative conditioning. *Bone Marrow Transplant.* 2010;45(4):689-693.
60. Jodele S, Dandoy CE, Lane A, et al. Complement blockade for TA-TMA: lessons learned from large pediatric cohort treated with eculizumab. *Blood.* 2020;135(13):1049-1057.
61. Mizuno K, Dandoy CE, Teusink-Cross A, Davies SM, Vinks AA, Jodele S. Eculizumab precision-dosing algorithm for thrombotic microangiopathy in children and young adults undergoing HSCT. *Blood Adv.* 2022;6(5):1454-1463.
62. Pruzanski W, Shumak KH. Biologic activity of cold-reacting autoantibodies: (first of two parts). *N Engl J Med.* 1977;297(10):538-542.
63. Schreiber AD, Frank MM. Role of antibody and complement in the immune clearance and destruction of erythrocytes: in vivo effects of IgM and IgM complement-fixing sites. *J Clin Invest.* 1972;51(3):575-582.
64. Berentsen S. Role of complement in autoimmune hemolytic anemia. *Transfus Med Hemotherapy.* 2015;42(5):303-310.
65. Zanella A, Barcellini W. Treatment of autoimmune hemolytic anemias. *Haematologica.* 2014;99(10):1547-1554.
66. Berentsen S, Barcellini W, D'Sa S, Jilma B. Sutimlimab for treatment of cold agglutinin disease: why, how and for whom? *Immunotherapy.* 2022;14(15):1191-1204.
67. Ecw DB, Jalink M, Delvasto-Nuñez L, et al. P1530: Peritransfusional C1-inhibitor in patients with severe complement-mediated autoimmune hemolytic anemia: an open label phase 2 trial. *Hema.* 2022;6:1411-1412.
68. Röth A, Hüttmann A, Rother RP, Dührsen U, Philipp T. Long-term efficacy of the complement inhibitor eculizumab in cold agglutinin disease. *Blood.* 2009;113(16):3885-3886.
69. Wouters D, Stephan F, Strengers P, et al. C1-esterase inhibitor concentrate rescues erythrocytes from complement-mediated destruction in autoimmune hemolytic anemia. *Blood.* 2013;121(7):1242-1244.
70. Tesfaye A, Broome C. A novel approach for treatment of cold agglutinin syndrome-related severe hemolysis. *J Hematol.* 2016;5(1):30-33.
71. Röth A, Barcellini W, D'Sa S, et al. Sutimlimab in cold agglutinin disease. *N Engl J Med.* 2021;384(14):1323-1334.
72. Röth A, Bommer M, Hüttmann A, et al. Eculizumab in cold agglutinin disease (DECADE): an open-label, prospective, bicentric, nonrandomized phase 2 trial. *Blood Adv.* 2018;2(19):2543-2549.
73. Merle NS, Boudhabhay I, Leon J, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement activation during intravascular hemolysis: implication for sickle cell disease and hemolytic transfusion reactions. *Transfus Clin Biol.* 2019;26(2):116-124.
74. Chaturvedi S, Braunstein EM, Yuan X, et al. Complement activity and complement regulatory gene mutations are associated with thrombosis in APS and CAPS. *Blood.* 2020;135(4):239-251.
75. Blasco M, Guillén E, Quintana LF, et al. Thrombotic microangiopathies assessment: mind the complement. *Clin Kidney J.* 2021;14(4):1055-1066.
76. Sun S, Urbanus RT, ten Cate H, et al. Platelet activation mechanisms and consequences of immune thrombocytopenia. *Cell.* 2021;10(12):3386.
77. Roumenina LT, Chadebech P, Bodivit G, et al. Complement activation in sickle cell disease: dependence on cell density, hemolysis and modulation by hydroxyurea therapy. *Am J Hematol.* 2020;95(5):456-464.
78. Gavrilaki E, Mainou M, Christodoulou I, et al. In vitro evidence of complement activation in patients with sickle cell disease. *Haematologica.* 2017;102(12):e481-e482.
79. Jindal N, Jandial A, Jain A, et al. Carfilzomib-induced thrombotic microangiopathy: a case based review. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2020;S1658-3876(20)30118-7.
80. Blasco M, Martínez-Roca A, Rodríguez-Lobato LG, et al. Complement as the enabler of carfilzomib-induced thrombotic microangiopathy. *Br J Haematol.* 2021;193(1):181-187.
81. Chaturvedi S, Brodsky RA, McCrae KR. Complement in the pathophysiology of the antiphospholipid syndrome. *Front Immunol.* 2019;10:449.
82. Bečarević M. Antibodies against complement components: relevance for the antiphospholipid syndrome-biomarkers of the disease and biopharmaceuticals. *Curr Rheumatol Rep.* 2017;19(7):40.
83. Chaturvedi S, Braunstein EM, Brodsky RA. Antiphospholipid syndrome: complement activation, complement gene mutations, and therapeutic implications. *J Thromb Haemost.* 2021;19(3):607-616.
84. Breen KA, Seed P, Parmar K, Moore GW, Stuart-Smith SE, Hunt BJ. Complement activation in patients with isolated antiphospholipid antibodies or primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 2012;107(3):423-429.
85. Oku K, Atsumi T, Bohgaki M, et al. Complement activation in patients with primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(6):1030-1035.
86. Kello N, Khoury LE, Marder G, Furie R, Zapantis E, Horowitz DL. Secondary thrombotic microangiopathy in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome, the role of complement and use of eculizumab: case series and review of literature. *Semin Arthritis Rheum.* 2019;49(1):74-83.
87. Meroni PL, Macor P, Durigutto P, et al. Complement activation in antiphospholipid syndrome and its inhibition to prevent rethrombosis after arterial surgery. *Blood.* 2016;127(3):365-367.

88. Shapira I, Andrade D, Allen SL, Salmon JE. Brief report: induction of sustained remission in recurrent catastrophic antiphospholipid syndrome via inhibition of terminal complement with eculizumab. *Arthritis Rheum.* 2012;64(8):2719-2723.
89. Wig S, Chan M, Thachil J, Bruce I, Barnes T. A case of relapsing and refractory catastrophic anti-phospholipid syndrome successfully managed with eculizumab, a complement 5 inhibitor. *Rheumatology.* 2016;55(2):382-384.
90. Zikos TA, Sokolove J, Ahuja N, Berube C. Eculizumab induces sustained remission in a patient with refractory primary catastrophic antiphospholipid syndrome. *J Clin Rheumatol.* 2015;21(6):311-313.
91. Strakhan M, Hurtado-Sbordoni M, Galeas N, Bakirhan K, Alexis K, Elrafei T. 36-year-old female with catastrophic antiphospholipid syndrome treated with Eculizumab: a case report and review of literature. *Case Rep Hematol.* 2014;2014:1-7.
92. Rovere-Querini P, Canti V, Erra R, et al. Eculizumab in a pregnant patient with laboratory onset of catastrophic antiphospholipid syndrome: a case report. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(40):e12584.
93. Geethakumari PR, Mille P, Gulati R, Nagalla S. Complement inhibition with eculizumab for thrombotic microangiopathy rescues a living-donor kidney transplant in a patient with antiphospholipid antibody syndrome. *Transfus Apher Sci.* 2017;56(3):400-403.
94. Gustavsen A, Skattum L, Bergseth G, et al. Effect on mother and child of eculizumab given before caesarean section in a patient with severe antiphospholipid syndrome: a case report. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(11):e6338.
95. Kronbichler A, Frank R, Kirschfink M, et al. Efficacy of Eculizumab in a patient with Immunoabsorption-dependent catastrophic antiphospholipid syndrome: a case report. *Medicine (Baltimore).* 2014;93(26):e143.
96. Lonze BE, Zachary AA, Magro CM, et al. Eculizumab prevents recurrent antiphospholipid antibody syndrome and enables successful renal transplantation: Eculizumab and renal transplantation in APS. *Am J Transplant.* 2014;14(2):459-465.
97. Hussain H, Tarantino MD, Chaturvedi S, et al Eculizumab for refractory thrombosis in antiphospholipid syndrome. *Blood Adv.* 2022;6(4):1271-1277.
98. Nauseef JT, Lim HI, DeSancho MT. Successful outcome with eculizumab treatment in a patient with antiphospholipid syndrome presenting with an unusual thrombotic storm. *J Thromb Thrombolysis.* 2021;52(2):597-600.
99. Johnsen J. Pathogenesis in immune thrombocytopenia: new insights. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2012;2012:306-312.
100. Peerschke EIB, Panicker S, Bussel J. Classical complement pathway activation in immune thrombocytopenia purpura: inhibition by a novel C1s inhibitor. *Br J Haematol.* 2016;173(6):942-945.
101. Peerschke EIB, Andemariam B, Yin W, Bussel JB. Complement activation on platelets correlates with a decrease in circulating immature platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 2010;148(4):638-645.
102. Cheloff AZ, Kuter DJ, Al-Samkari H. Serum complement levels in immune thrombocytopenia: characterization and relation to clinical features. *Res Pract Thromb Haemost.* 2020;4(5):807-812.
103. Turner N, Sartain S, Moake J. Ultralarge von Willebrand factor-induced platelet clumping and activation of the alternative complement pathway in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndromes. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2015;29(3):509-524.
104. Réti M, Farkas P, Csuka D, Rázsó K, et al. Complement activation in thrombotic thrombocytopenic purpura: complement activation in TTP. *J Thromb Haemost.* 2012;10(5):791-798.
105. Sasapu A, Cottler-Fox M, Motwani P. Acquired thrombotic thrombocytopenic purpura and atypical hemolytic uremic syndrome successfully treated with eculizumab. *Proc Bayl Univ Med Cent.* 2017;30(2):182-183.
106. Chapin J, Weksler B, Magro C, Laurence J. Eculizumab in the treatment of refractory idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 2012;157(6):772-774.
107. Tsai E, Chapin J, Laurence JC, Tsai HM. Use of eculizumab in the treatment of a case of refractory, ADAMTS13-deficient thrombotic thrombocytopenic purpura: additional data and clinical follow-up. *Br J Haematol.* 2013;162(4):558-559.
108. Vigna E, Petrunaro A, Perri A, et al. Efficacy of eculizumab in severe ADAMTS13-deficient thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) refractory to standard therapies. *Transfus Apher Sci.* 2018;57(2):247-249.
109. Bitzan M, Hammad RM, Bonnefoy A, al Dhaheer WS, Vézina C, Rivard GÉ. Acquired thrombotic thrombocytopenic purpura with isolated CFHR3/1 deletion: rapid remission following complement blockade. *Pediatr Nephrol.* 2018;33(8):1437-1442.
110. Pecoraro C, Ferretti AVS, Rurali E, Galbusera M, Noris M, Remuzzi G. Treatment of congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with Eculizumab. *Am J Kidney Dis off J Natl Kidney Found.* 2015;66(6):1067-1070.
111. Malik F, Ali N, Ahsan I, Ghani AR, Fidler C. Eculizumab refractory thrombotic thrombocytopenic purpura secondary to post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis in a patient. *J Community Hosp Intern Med Perspect.* 2016;6(6):32310.
112. Vaught AJ, Braunstein E, Chaturvedi S, Blakemore K, Brodsky RA. A review of the alternative pathway of complement and its relation to HELLP syndrome: is it time to consider HELLP syndrome a disease of the alternative pathway. *J Matern-Fetal Neonatal Med.* 2022;35(7):1392-1400.
113. Fakhouri F, Scully M, Ardissino G, al-Dakkak I, Miller B, Rondeau E. Pregnancy-triggered atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS): a global aHUS registry analysis. *J Nephrol.* 2021;34(5):1581-1590.
114. Bazzan M, Todros T, Tedeschi S, et al. Genetic and molecular evidence for complement dysregulation in patients with HELLP syndrome. *Thromb Res.* 2020;196:167-174.
115. Chen S, Li Z, He Y, Chen Q. Dysregulation of complement system in HELLP syndrome. *Hypertens Pregnancy.* 2021;40(4):303-311.
116. Burwick RM, Feinberg BB. Complement activation and regulation in preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 2022;226(2 S):S1059-S1070.
117. Palomo M, Blasco M, Molina P, et al. Complement activation and thrombotic Microangiopathies. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2019;14(12):1719-1732.
118. Lokki AI, Haapio M, Heikkinen-Eloranta J. Eculizumab treatment for postpartum HELLP syndrome and aHUS-case report. *Front Immunol.* 2020;11:548.
119. Elabd H, Elkholi M, Steinberg L, Acharya A. Eculizumab, a novel potential treatment for acute kidney injury associated with preeclampsia/HELLP syndrome. *BMJ Case Rep.* 2019;12(9):e228709.
120. Artinger K, Hackl G, Schilcher G, et al. The conundrum of postpartum thrombotic Microangiopathy: case report and considerations for management. *BMC Nephrol.* 2019;20(1):91.
121. Burwick RM, Feinberg BB. Eculizumab for the treatment of preeclampsia/HELLP syndrome. *Placenta.* 2013;34(2):201-203.
122. Kozlovskaya NL, Korotchaeva YV, Bobrova LA. Adverse outcomes in obstetric-atypical haemolytic uraemic syndrome: a case series analysis. *J Matern-Fetal Neonatal Med.* 2019;32(17):2853-2859.
123. Egbire-Molen O, Hermelin D, Blackall D. Carfilzomib-induced thrombotic Microangiopathy: focus on pathogenesis. *J Med Cases.* 2022;13(6):274-280.
124. Gavrilaki E, Dalampira D, Theodorakou F, et al. Genetic and functional evidence of complement dysregulation in multiple myeloma patients with carfilzomib-induced thrombotic Microangiopathy compared to controls. *J Clin Med.* 2022;11(12):3355.

125. Casiez C, Pica GM, Bally S. Carfilzomib-induced haemolytic and uremic syndrome: favorable outcome with eculizumab. *Nephrol Ther.* 2020;16(4):221-224.
126. Darwin A, Malpica L, Dhanoa J, Hashmi H. Carfilzomib-induced atypical haemolytic uraemic syndrome: a diagnostic challenge and therapeutic success. *BMJ Case Rep.* 2021;14(2):e239091.
127. Bhutani D, Assal A, Mapara MY, Prinzing S, Lentzsch S. Case report: carfilzomib-induced thrombotic Microangiopathy with complement activation treated successfully with Eculizumab. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2020;20(4):e155-e157.
128. Terao T, Tsumihata T, Miura D, et al. Carfilzomib-induced thrombotic microangiopathy is underestimated in clinical practice: a report of five patients and literature review. *Leuk Lymphoma.* 2022;63(5):1102-1110.
129. Rassner M, Baur R, Wäsch R, et al. Two cases of carfilzomib-induced thrombotic microangiopathy successfully treated with Eculizumab in multiple myeloma. *BMC Nephrol.* 2021;22(1):32.
130. Moliz C, Gutiérrez E, Cavero T, Redondo B, Praga M. Eculizumab as a treatment for atypical hemolytic syndrome secondary to carfilzomib. *Nefrologia.* 2019;39(1):86-88.
131. Patel I, Odak M, Douedi S, et al. Eculizumab as a treatment for hyper-Haemolytic and aplastic crisis in sickle cell disease. *Eur J Case Rep Intern Med.* 2021;8(10):002824.
132. Chonat S, Chandrakasan S, Kalinyak KA, Ingala D, Gruppo R, Kalfa TA. Atypical haemolytic uraemic syndrome in a patient with sickle cell disease, successfully treated with eculizumab. *Br J Haematol.* 2016;175(4):744-747.
133. Boonyasampant M, Weitz IC, Kay B, Boonchalermvichian C, Liebman HA, Shulman IA. Life-threatening delayed hyperhemolytic transfusion reaction in a patient with sickle cell disease: effective treatment with eculizumab followed by rituximab. *Transfusion (Paris).* 2015;55(10):2398-2403.
134. Dumas G, Habibi A, Onimus T, et al. Eculizumab salvage therapy for delayed hemolysis transfusion reaction in sickle cell disease patients. *Blood.* 2016;127(8):1062-1064.
135. Vlachaki E, Gavriilaki E, Kafantari K, et al. Successful outcome of Hyperhemolysis in sickle cell disease following multiple lines of treatment: the role of complement inhibition. *Hemoglobin.* 2018;42(5-6):339-341.
136. Bhunia N, Abu-Arja R, Bajwa RPS, Auletta JJ, Rangarajan HG. Successful treatment with eculizumab for posterior reversible encephalopathy syndrome due to underlying transplant-associated thrombotic microangiopathy in patients transplanted for sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer.* 2019;66(10):e27912.
137. Obaid JM, Abo El-Nazar SY, Ghanem AM, et al. Expression of CD55 on red blood cells of β -thalassemia patients. *Hemoglobin.* 2014;38(5):339-344.
138. Gavriilaki E, Christodoulou I, Koravou EE, et al. Pre- and post-transfusion complement activation in transfusion-dependent β -thalassaemia. *HemaSphere.* 2018;2(5):e58.
139. Arinsburg SA, Skerrett DL, Kleinert D, Giardina PJ, Cushing MM. The significance of a positive DAT in thalassemia patients. *Immunohematology.* 2010;26(3):87-91.
140. Ward PA. Role of C5 activation products in sepsis. *Sci World J.* 2010;10:2395-2402.
141. Peterson SL, Anderson AJ. Complement and spinal cord injury: traditional and non-traditional aspects of complement cascade function in the injured spinal cord microenvironment. *Exp Neurol.* 2014;258:35-47.
142. Abe T, Sasaki A, Ueda T, Miyakawa Y, Ochiai H. Complement-mediated thrombotic microangiopathy secondary to sepsis-induced disseminated intravascular coagulation successfully treated with eculizumab: a case report. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(6):e6056.
143. Galic S, Csuka D, Prohászka Z, Turudic D, Dzepina P, Milosevic D. A case report of a child with sepsis induced multiorgan failure and massive complement consumption treated with a short course of Eculizumab: a case of crosstalk between coagulation and complement? *Medicine (Baltimore).* 2019;98(4):e14105.
144. Panch SR, Montemayor-Garcia C, Klein HG. Hemolytic transfusion reactions. Longo DL, editor. *N Engl J Med.* 2019;381(2):150-162.
145. Mpinganzima C, Haaland A, Holm AGV, Thein SL, Tjønnfjord GE, Iversen PO. Two consecutive episodes of severe delayed hemolytic transfusion reaction in a sickle cell disease patient. *Case Rep Hematol.* 2020;2020:1-5.
146. Weinstock C, Möhle R, Dorn C, et al. Successful use of eculizumab for treatment of an acute hemolytic reaction after ABO-incompatible red blood cell transfusion: Eculizumab treatment of acute hemolysis. *Transfusion.* 2015;55(3):605-610.
147. Pantelidou D, Pilalas D, Daios S, et al. Hyperhaemolytic transfusion reaction in two β -thalassaemia major patients: the role of eculizumab. *J Clin Pharm Ther.* 2022;47(3):411-414.
148. Cannas G, Dubreuil L, Fichez A, Gerfaud-Valentin M, Debard AL, Hot A. Delayed severe hemolytic transfusion reaction during pregnancy in a woman with β -thalassemia intermediate: successful outcome after Eculizumab administration. *Am J Case Rep.* 2021;22:e931107.

How to cite this article: Duval A, Frémeaux-Bacchi V. Complement biology for hematologists. *Am J Hematol.* 2023; 98(54):S5-S19. doi:10.1002/ajh.26855

Annexe 5.

ERA-EDTA 2023
Abstract présenté
en communication orale
dans la session
« *Navigating the IgAN pathogenesis* »

Investigating the role of CFH variants and haplotypes as a risk factor of IgA nephropathy in a French cohort

Anna Duval^{1,2}, Nicolas Maillard^{3,4}, Sophie Limou⁵, Christophe Mariat^{3,4}, Sophie Caillard-Ohlmann², Véronique-Frémeaux-Bacchi^{1,5}.

¹. Complement, Inflammation et Cancer, UMRS1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

². Service de Néphrologie Dialyse et Transplantation, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

³. Service de Néphrologie, Dialyse et Transplantation Rénale, Hôpital NORD CHU de Saint-Etienne, France.

⁴. Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, Équipe d'Accueil 3064, Université Jean Monnet, Saint-Etienne, Communauté d'Universités et Établissements de Lyon, France.

⁵. Université de Nantes, INSERM, CR2TI – Centre de Recherche en transplantation et en immunologie translationnelle, F-44000, Nantes, France.

⁶. Service d'immunologie biologique, équipe complement, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France.

Background. Excessive complement activation is particularly important in the pathogenesis of IgAN nephropathy (IgAN). The relationship of complement CFH gene genetics and IgAN phenotype has not been clearly established in IgAN.

Methods. We performed a genetic analysis of 234 French IgAN patients by *next generation sequencing* and Sanger. CFH polymorphisms were combined into haplotypes using the Michigan imputation Server¹. CFH rare variants (MAF<0.1%) and haplotypes frequencies were compared to the 1k genome population of European ancestry. Recombinant full-length FH rare variants were produced and studied functionally *in vitro*.

Results. Genetic analysis revealed an enrichment in CFH non synonymous rare variants in IgAN patients (n=234) compared to the reference population (n=503) (5.1 versus 1.8%, p=0.010). Interestingly, the identified variants preferentially located in FH functional domains. *In vitro* functional studies based on new functional Luminex® assays showed a decrease in C3b-binding, C3bBb decay-accelerating activity and/or FI-cofactor activity for 4 variants, classifying a newly identified variant as a pathogenic variant. CFH haplotypes distribution differed between the IgAN patients and controls (p<0.001), with a higher prevalence of the H3 haplotype (rs80029 c.184G>A, rs1061170 c.1204T>C, rs7542235 chr1:196854483 A>G, GTA) in IgAN patients (28.2 versus 21.1%, p=0.0029), but this haplotype was not associated with renal survival.

Conclusion. In our series of French IgAN patients, CFH rare variants and haplotypes are associated with disease's susceptibility. Our results support the hypothesis of a complement dysregulation underlying the IgAN pathogenesis.

References:

¹. Available from <https://imputationserver.sph.umich.edu>



An inter-disciplinary approach established to disseminate knowledge and information amongst those interested in dialysis, transplantation and renal diseases


Abstract Certificate

The abstract below, submitted to the
60th ERA Congress
(June 15-18, 2023),
has reached a percentile of
90.56/100


INVESTIGATING THE ROLE OF CFH VARIANTS AND
HAPLOTYPES AS A RISK FACTOR OF IGA NEPHROPATHY IN A
FRENCH COHORT

by

**Anna
DUVAL**



Ronald Gansevoort
Paper Selection
Committee Chair



Christoph
Wanner
ERA

Étude de la génétique du complément dans la néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA et son impact en clinique

Résumé

Le complément est activé dans la néphropathie à IgA (IgAN). Nous avons étudié les marqueurs plasmatiques d'activation du complément de 87 patients par ELISA multiplex et les dépôts endothéliaux induits *ex vivo* par le sérum de 41 patients. L'impact clinique de la génétique du complément a été explorée dans une cohorte de 260 patients. Malgré l'absence de consommation plasmatique du C3 et du C4, 48/87 patients IgAN transplantés rénaux ont une activation modérée du complément (C3a, Bb, sC5b-9 élevés) et 19/41 patients induisent des dépôts endothéliaux de complément. L'analyse génétique a révélé une prévalence plus élevée de variants rares du *CFH* chez les patients IgAN (4,6 % vs. 1,8 %, $p=0,034$), dont 4 altérant l'activité régulatrice du FH *in vitro*. L'haplotype H2 du *CFH* est protecteur vis-à-vis du risque de développer une IgAN et l'haplotype *MCP ggaac* est un facteur de risque d'insuffisance rénale terminale. Nos résultats appuient le rôle du complément dans la progression de l'IgAN.

Mots-clefs : Néphropathie à IgA, Complément, Génétique, Haplotypes, Facteur H, MCP

Abstract

The complement is activated in IgA nephropathy (IgAN). We conducted a comprehensive investigation of plasma complement activation biomarkers ($n=87$) using multiplex ELISA and a novel model measuring serum-induced complement deposition on endothelial cells by sera from patients ($n=41$). We also examined the impact of complement genetics on IgAN susceptibility and renal outcomes in 260 patients. Despite no C3 and C4 plasma consumption, 48/87 kidney transplant IgAN patients showed mild complement activation (elevated C3a, Bb, sC5b-9) and 19/41 patients induced endothelial complement deposition. Genetic analysis revealed a higher prevalence of rare *CFH* missense variants in IgAN patients (4.6% vs. 1.8% controls, $p=0.034$), with 4 variants impairing FH regulatory activity *in vitro*. The complement *CFH*-H2 haplotype protected against IgAN susceptibility, whereas the *MCP ggaac* haplotype increased the risk of end-stage-renal disease. Our findings highlight the role of complement in IgAN progression.

Key words: IgA nephropathy, complement, genetics, haplotypes, factor H, MCP