

UNIVERSITE PARIS V RENÉ DESCARTES

ÉCOLE DOCTORALE 420



DOCTORAT DE SANTÉ PUBLIQUE

ÉPIDÉMIOLOGIE ET RECHERCHE CLINIQUE

**Rôle Pronostic Des Anticorps Anti-HLA
En Transplantation Rénale : Approches En Population**

Alexandre Loupy

Thèse dirigée par le Pr Xavier Jouven

Présentée et soutenue publiquement le 4 avril 2014

Composition du Jury :

Directeur : Professeur Xavier Jouven

Président : Professeur Phil Halloran

Rapporteur : Professeur Daniel Abramowicz

Rapporteur : Docteur Yohann Foucher

Examineur: Professeur Jan VanderMulen

Examineur: Professeur Jean-Luc Taupin

Liste des publications relatives à la thèse

1. Lefaucheur C*, **Loupy A***, Vernerey D, Duong van Huyen JP, Suberbielle C, Anglicheau D, Verine J, Beuscart T, Nochy D, Bruneval P, Charron D, Delahousse M, Empana JP, Hill GS, Glotz D, Legendre C, Jouven X. Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study. *Lancet*. **2013 Jan 26;381(9863):313-9**
2. **Loupy A ***, Lefaucheur C *, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen JP, Mooney N, Suberbielle C, Frémeaux-Bacchi V, Anglicheau D, Charron D, Empana JP, Hill GS, Delahousse M, Legendre C, Glotz D, Zeevi A, Jouven X. Complement binding anti-HLA antibodies and kidney allograft survival. *N Engl J Med*. **2013 Sep 26;369(13):1215-26.**
3. **Loupy A***, C Lefaucheur*, D Vernerey, O Aubert, J Chang, LG. Hidalgo, T Beuscart, J Verine, S Dupleumortier, JP Duong van Huyen, X Jouven, D Glotz, Ch Legendre and PF Halloran. Molecular Microscope Strategy To Improve Risk Stratification In Early Antibody-Mediated Kidney Allograft Rejection. *JASN*. **2014**. *In press*.
4. **A Loupy***, D Vernerey*, C Tinel, C Gosset, D Viglietti, JP Duong van Huyen, M Rabant, P Bruneval, JP Empana, D Glotz, C Legendre, X Jouven, C Lefaucheur. Early Recognition of Subclinical Rejection and Outcome of Kidney Allografts. *Lancet*. *submitted*

* *co premier auteur*

Résumé

Contexte La réponse allo-immune induite par la transplantation à partir d'un donneur génétiquement différent est un obstacle majeur au succès de la greffe. Notre objectif est de caractériser les différents phénotypes de rejet d'allogreffe rénale et d'identifier la façon dont chacun est associé aux anticorps anti-HLA. Nous avons également évalué l'impact de certaines propriétés de ces anticorps, comme leur intensité ou leur capacité à fixer le complément, sur l'échec des allogreffes rénales. Pour finir, nous avons étudié l'impact pronostic des formes indolentes de rejets ainsi que l'apport des nouvelles technologies d'analyses transcriptomique des biopsies de patients transplantés.

Méthodes Nous avons utilisé une approche en population, basée sur l'étude de larges cohortes de receveurs de greffes rénales. L'étude concomitante des données immunologiques et histologiques, nous a permis de corrélérer les caractéristiques des anticorps anti-HLA circulants aux phénotypes lésionnels.

Résultats Nous avons identifié et caractérisé 4 types distincts de rejet : les rejets vasculaires médiés par les lymphocytes T (9%) et par les anticorps (21%), non reconnus par les classifications internationales, et les rejets cellulaires (46%) et humoraux sans vascularite (24%). Le risque de perte de greffons est le plus important dans les cas de rejet vasculaire médié par anticorps.

Les anticorps dirigés contre le donneur (DSA) fixant le complément induisent un phénotype histologique plus sévère, dominé par des lésions inflammatoires et plus de dépôts de la fraction C4d du complément dans les greffons. En leur présence, le risque de perte de greffons est augmenté de 3,7 fois (IC95 1,9-7,2). Les formes indolentes de rejet médié par les anticorps sont également associées à un risque accru de perte du greffon. L'utilisation d'approches moléculaires permet d'améliorer la stratification du risque au sein du groupe des patients présentant des rejets humoraux.

Conclusion Ce travail répond à un besoin clinique pressant dans le domaine de la transplantation, celui de déterminer l'impact clinique des anticorps anti-HLA et d'améliorer la stratification du risque immunologique en se basant sur leurs propriétés et l'utilisation de nouvelles technologies pour mieux caractériser l'activité et le stade des rejets humoraux.

Mot clés : anticorps anti-HLA, rejet médié par anticorps, transplantation rénale, survie des greffons, complément, C1q, histologie, classification de Banff.

Abstract

Background The alloimmune response induced by transplantation from a donor who differs genetically from the kidney recipient has always been the major obstacle to graft success. The present work aimed to improve characterization of kidney-allograft rejection phenotypes and identify how each one is associated with anti-HLA antibodies. We also sought to determine whether characteristics of these antibodies i.e., their levels or complement-binding ability, might play a role in kidney allograft failure. Finally, we evaluated the clinical relevance of indolent forms of ABMR and the clinical relevance of new genes expression technologies to stratify the kidney recipients at risk for failure.

Methods We used a population-based approach in precisely phenotyped cohorts of kidney recipients. The design of our study, which is based on the concomitant evaluation of immunologic and histologic data, permits a precise connection of circulating anti-HLA antibodies with a phenotype of graft injury.

Findings We identified four distinct patterns of kidney allograft rejection: T cell-mediated vascular rejection (9%), antibody-mediated vascular rejection (21%), not included in international classifications, T cell- (46%) and antibody-mediated rejection without vasculitis (24%). Risk of graft loss was 9.07 times (95CI 3.6-19.7) higher in antibody-mediated vascular rejection than in T-cell mediated rejections ($p < 0.0001$).

Patients with post-transplant complement-binding DSA had more severe graft injury phenotype with higher inflammation and increased deposition of complement fraction C4d. They have the poorest graft survival with 3.7 fold increased risk of graft loss (95CI 1.9-7.2). Subclinical ABMR is a truncated form of rejection associated with risk of kidney allograft failure. Gene expression assessment in kidney allografts with early ABMR improves classification of individuals at risk for kidney allograft loss.

Conclusion This work addresses the unmet need of the deleterious impact of anti-HLA antibodies and the improvement of risk stratification in kidney transplantation. Recognition of distinct phenotypes could lead to the development of new treatment strategies. Gene expression assessment appears useful to evaluate disease activity, disease state and prediction of failure.

Key-words: anti-HLA antibodies, antibody mediated rejection, kidney transplantation, graft survival, complement, C1q, histology, Banff classification.

Laboratoire d'accueil

Unité INSERM-UMRS 970

PARCC Centre de recherche cardiovasculaire de Paris

56 rue Leblanc, 75015 Paris

Equipe 4

Université Paris 5 – René Descartes

Ecole Doctorale ED 420

Liste des abréviations

HLA = Human Leucocyte Antigen
CMH = Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DSA = Anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur
PRA (Panel Reactive Antibodies
cPRA = Calculated Panel Reactive Antibodies
TGI = Taux de greffons incompatibles
LCT = Lymphocytotoxicité
CXM = Cross-Match
AMR = Rejet Médié par Anticorps
IgG, M = Immunoglobuline G, M
NK (Natural Killer cells) = Cellules tueuses naturelles
IL = Interleukine
IFN = Interféron
APC = cellule présentatrice d'antigène
Treg = lymphocyte T Régulateur
TCR (T Cell Receptor) = Récepteur des lymphocytes T
BCR (B cell receptor) = Récepteur des lymphocytes B
TNF (Tumor Necrosis Factor) = Facteur de nécrose tumorale

Table des matières

Introduction.....	9
1) <i>Insuffisance rénale terminale: définition et état des lieux.....</i>	9
2) <i>Données épidémiologiques de l'insuffisance rénale terminale.....</i>	9
3) <i>La transplantation rénale : traitement de choix de l'insuffisance rénale terminale.....</i>	10
4) <i>Grandes problématiques de la greffe du 21^e siècle : comment améliorer les résultats ?.....</i>	18
5) <i>Problématiques actuellement rencontrées dans le domaine du rejet médié par anticorps..</i>	33
Objectifs du travail.....	41
Méthodologie	42
1) <i>L'épidémiologie intégrative comme outil de recherche générant de nouvelles hypothèses de travail.....</i>	43
2) <i>Population d'étude : La cohorte DIVAT.....</i>	45
3) <i>Approches méthodologiques utilisées dans cette thèse.....</i>	50
4) <i>Déterminants des fonctions de survie en transplantation rénale.....</i>	55
5) <i>Analyses de stratification du risque.....</i>	60
6) <i>Analyses en composante principale</i>	66
RESULTATS.....	68
1) <i>Identification d'une nouvelle forme de rejet aigu en transplantation rénale</i>	68
2) <i>Rôle des anticorps anti-HLA fixant le complément et stratification du risque de perte du greffon.....</i>	84
3) <i>Intérêt du diagnostique précoce du rejet dans la survie des greffons.....</i>	101
4) <i>Intérêt de nouveaux outils en transplantation : apport du microscope moléculaire dans la stratification du risque de perte de greffon.....</i>	117
Discussion des travaux publiés.....	147
Discussion des travaux soumis ou en cours de publication	155

1) Apport du microscope moléculaire dans la stratification du risque	155
2) Impact du rejet humoral infraclinique dans la survie du greffon.....	156
Perspectives du travail de recherche	159
1) Compléter l'Intégration des données moléculaires dans le greffon rénal.....	160
2) Compléter la caractérisation des propriétés des anticorps anti-HLA pathogènes.....	161
3) Etendre cette approche translationnelle et intégrative aux autres domaines de la transplantation d'organe	161
4) Etendre de concepts de la transplantation rénale à la pathologie cardiovasculaire	162
Références de la thèse	163
Annexes.....	173

Introduction

1) Insuffisance rénale terminale: définition et état des lieux

L'insuffisance rénale terminale (IRT) correspond à un état d'altération de la fonction rénale requérant le recours à un traitement de suppléance, dialyse ou greffe. C'est le stade ultime d'évolution de la MRC évalué par un DFG < 15 ml/min/1.73 m². Entre 15 et 10 ml/min/1.73 m² de clairance de créatinine, c'est le stade de préparation au traitement de suppléance ¹.

Un traitement de suppléance est généralement institué dès lors que le DFG est inférieur à 10 ml/min/1.73 m². La tolérance clinique est essentielle pour décider du moment où il faut instituer la dialyse. Ainsi, ce seuil peut être plus élevé dans certains cas, en particulier chez les patients diabétiques. Le choix du traitement se porte alors entre deux options thérapeutiques : l'épuration extrarénale (EER) ou bien la greffe rénale. C'est le stade de l'insuffisance rénale terminale traitée (IRTT) ².

2) Données épidémiologiques de l'insuffisance rénale terminale

En 2001, l'insuffisance rénale chronique terminale a été déclarée en France priorité majeure de santé publique ³. Cette décision résulte d'une croissance régulière de l'incidence et de la prévalence de l'insuffisance rénale chronique terminale. En 2008, on estime à 68 000 le nombre de patients traités pour IRT par dialyse ou transplantation rénale, soit une prévalence brute de l'IRT traitée de 1 057 pmh. On note d'importantes variations selon les régions, les taux de prévalence allant d'un minimum de 875 pmh en Poitou-Charentes, à 1 179 pmh en Île-de-France et 1 792 pmh à la Réunion. Près de la moitié des patients (37 000, 54 %) sont traités par dialyse, l'autre moitié (31 000, 46 %) est constituée des patients porteurs d'un greffon fonctionnel. La part de la TR parmi les patients prévalents varie de 40,8 % en PACA à 53 % en Île-de-France en métropole, et elle n'est que de 23,9% à la

Réunion. Ces variations sont plus la conséquence des disparités de la dynamique du prélèvement et de la TR entre les régions que des différences de la démographie et de l'incidence de l'IRT. Les données évolutives, calculées sur les neuf régions contribuant au registre REIN depuis 2004, montrent l'augmentation de 3 % par an de la prévalence des patients IRT dialysés, et de 5 % par an de celle des patients greffés. L'effectif des patients dialysés a très fortement progressé dans les tranches d'âge 75-84 ans (+ 30 %) et au-delà de 84 ans (+ 133 %). Il augmente modérément dans les tranches 45-64 ans (+ 9 %) et 65-74 ans (+ 6,1 %), et diminue légèrement dans la tranche 20-44 ans (-5,3 %). En France, le coût global de la prise en charge par technique d'épuration extrarénale des patients insuffisants rénaux terminaux traités a été estimé à 2,145 milliards d'euros, soit 1,56 % de l'objectif national des dépenses de l'Assurance maladie. Ces considérations de coût doivent inciter à mieux prévenir la maladie rénale chronique ⁴.

3) La transplantation rénale : traitement de choix de l'insuffisance rénale chronique terminale

De tous les traitements de la maladie rénale chronique au stade V, la transplantation rénale est indiscutablement celui qui apporte au patient non seulement une meilleure qualité de vie mais aussi une prolongation de survie. En France, plus de 3000 transplantations rénales sont réalisées chaque année et plus de 33 000 patients vivent avec un greffon fonctionnel. Des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes du rejet et de la tolérance, dans le développement de nouveaux traitements immunosuppresseurs ainsi que dans la prévention de certains de leurs effets secondaires. Les principales difficultés demeurent la pénurie d'organes au regard du nombre de patients en attente d'une transplantation rénale, le nombre de pertes de greffon à long terme et enfin, les complications infectieuses, tumorales et cardiovasculaires des traitements immunosuppresseurs ⁴.

a) Historique de la transplantation rénale

L'activité médicale de transplantation rénale (TR) est née dans les années 1950, par des premières tentatives réussies. Dans les décennies qui suivirent, la mise en place de programmes de greffe a permis de l'ériger comme traitement reconnu des patients souffrant d'insuffisance rénale terminale (IRT). Sa dimension épidémiologique et de santé publique est plus récente ⁵. Elle s'est imposée du fait de l'explosion à la fin du XX^e siècle de l'épidémie de maladie rénale chronique ⁶ et de l'opportunité donnée en France d'offrir à tous les malades une possibilité de traitement de remplacement rénal, par dialyse ou TR. Plusieurs facteurs ont concouru pour renforcer l'attractivité de la greffe par rapport aux méthodes de dialyse :

l'amélioration spectaculaire de la qualité de vie produite par la TR, qui demeure la principale motivation des patients pour envisager une greffe;

L'amélioration des résultats de la TR. Longtemps, la crainte des risques de l'intervention, des complications et de l'échec a été, tant pour les patients que pour les médecins, un frein à l'inscription. À partir des années 1990, grâce notamment à la mise au point de traitements efficaces et bien tolérés, les résultats se sont très sensiblement améliorés, avec des taux de réussite atteignant 95 % dans la première année. Bien que le pronostic à long terme demeure obéré par le phénomène de la néphropathie chronique du transplant ⁶, les études concordent pour démontrer que la TR augmente l'espérance de vie des malades en IRT, quels que soient l'âge, la comorbidité du receveur et la qualité du greffon ⁷⁻¹⁰. Ce fait est lié en grande partie à la réduction du risque cardiovasculaire, majeur en dialyse, et qui s'estompe dès les premiers mois de la greffe après normalisation de la fonction rénale ¹¹.

• l'économie de santé induite, constamment démontrée par les études médico-économiques menées notamment par la Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés (CNAMTS). En France, le coût annuel moyen de la dialyse est évalué en 2007 (source : données CNAMTS) à 89 000 € par an et par patient traité par hémodialyse, et 64 000 € pour les patients traités par dialyse péritonéale. Le coût de la TR s'approche de celui de

l'hémodialyse la première année (85 000 €), mais est bien moindre les années suivantes (20 000 €). Face à l'accroissement du nombre de candidats à la greffe s'inscrivant sur la liste nationale d'attente, l'augmentation de l'activité de TR est loin de répondre aux besoins. En effet, le nombre de greffons disponibles, qu'ils soient prélevés chez des donneurs décédés ou vivants, est limité, ce qui engendre une situation de pénurie, des durées d'attente prolongées et des inégalités d'accès à la greffe. L'offre de TR en France, pourtant l'une des mieux étoffées et structurées dans le monde, est ainsi précarisée par sa dépendance directe de l'épidémiologie du prélèvement d'organes.

Ces aspects de santé publique de la greffe sont une des raisons expliquant la mise en place, en France comme dans la plupart des pays, d'agences nationales de transplantation. Les missions de l'Agence de la biomédecine couvrent toutes les thérapeutiques utilisant les produits du corps humain ; elle assure le recueil et l'évaluation des données de la TR et de l'IRT, elle est chargée d'évaluer les activités de greffe et leurs résultats, et elle intervient dans l'organisation et la coordination de la planification territoriale des équipes de greffe. Ces fonctions lui confèrent un rôle central dans le système de santé publique qui surveille, organise et régule les thérapeutiques coûteuses et sophistiquées de l'IRT.

b) Indications et principes généraux de la transplantation rénale

Une transplantation rénale peut être envisagée chez tout patient insuffisant rénal chronique, qu'il soit déjà en dialyse ou que celle-ci soit imminente (greffe préemptive), à condition qu'il en exprime la volonté, que les risques encourus n'excèdent pas les bénéfices escomptés et qu'il n'existe pas de contre-indications. L'âge limite a pu être régulièrement reculé au cours de la dernière décennie et certains patients de 80 ans ou plus ont pu être transplantés avec succès. L'âge en soi n'est donc plus un critère pertinent. La seule contre-indication absolue reste l'existence d'un cancer métastasé. Les contre-indications temporaires sont les infections tant qu'elles ne sont pas parfaitement guéries et les antécédents de cancer, le délai d'attente étant fonction du type de cancer. L'existence d'une sérologie VIH positive, à condition que la charge virale soit nulle, n'est plus une contre-indication car les résultats observés, en particulier en France, sont excellents. Il reste néanmoins quelques contre-indications relatives dont le cumul peut aboutir à une contre-indication absolue ou à une mauvaise indication : insuffisance cardiaque sévère, coronaropathie non stabilisée, maladie psychiatrique en évolution, etc. Il s'agit alors de peser le pour et le contre, ce qui est parfois difficile. Enfin, des doutes concernant l'observance d'un patient peuvent constituer sinon une contre-indication du moins une indication à attendre et à observer ^{12,13}.

c) Survie des greffons

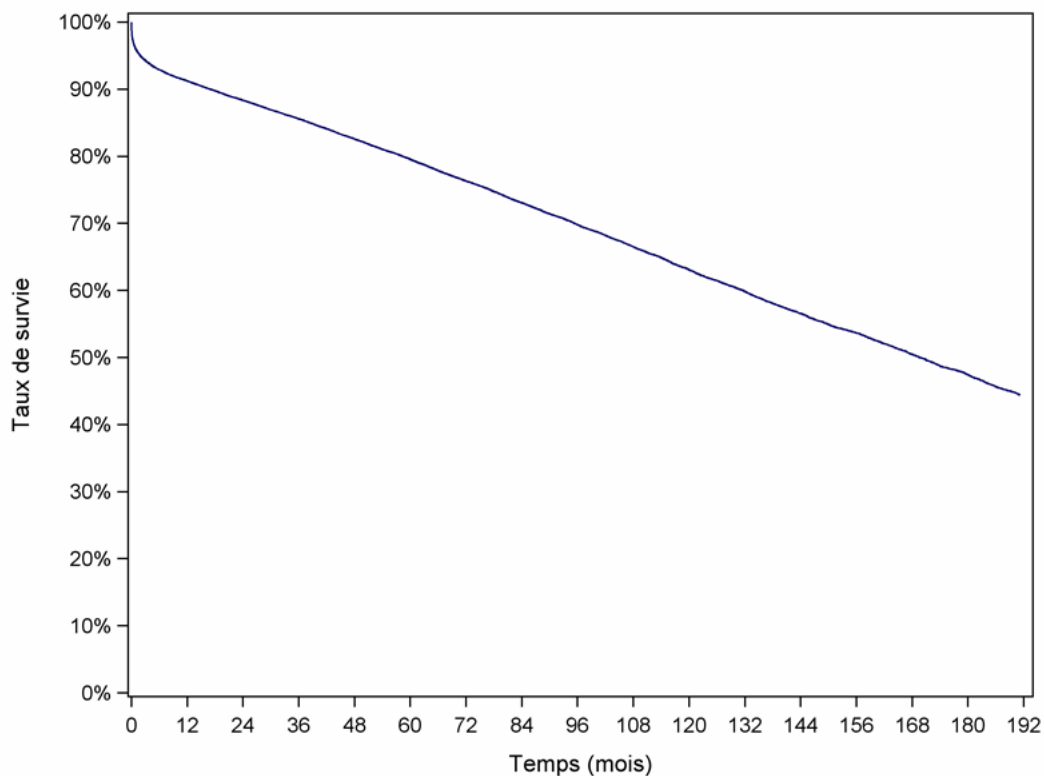
La comparaison des courbes de survie des greffons montre une amélioration significative de la survie à 1 an des greffons selon les dates de transplantation: 1986-1990, 1991-1995, 1996-2000, 2001-2005 et 2006-2008 avec des survies à 1 an de 83,6%, 86,3%, 91,0%, 92,2% et 92,6%, et des survies à 5 ans de 68,2%, 74,6%, 80,5%, 80,7% et 79,3%, respectivement. On observe cependant pour la cohorte 2009-2011 une légère diminution de la survie à 1 an avec un taux égal à 91,5% ⁴.

Pour la cohorte 1993-2011, le taux de survie à 10 ans est significativement meilleur pour les greffes à partir de donneur vivant (78,2 % contre 62,3% avec donneur décédé). Elle est en

revanche significativement diminuée chez les receveurs hyperimmunisés, pour les retransplantations et lorsque les greffons proviennent de donneurs à critères élargis. Enfin, la survie du greffon est moins bonne chez les receveurs de plus de 60 ans.

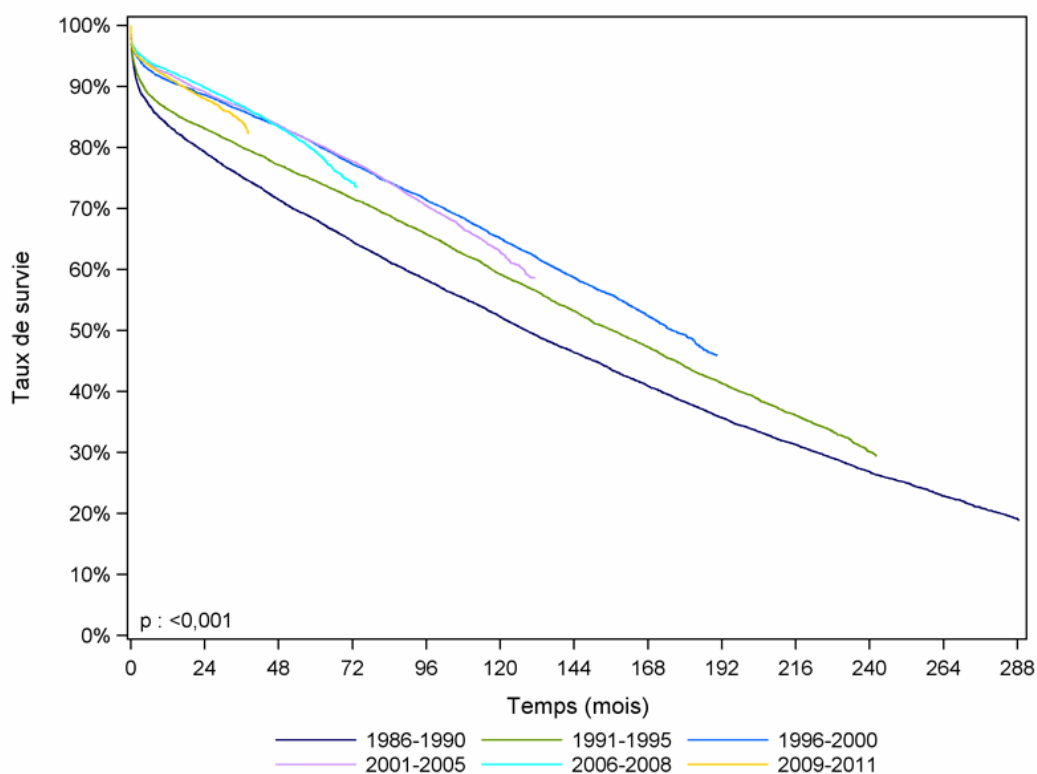
La non fonction primaire du greffon et le retard de fonction du greffon, tous deux facteurs de risque pour la durée de survie du greffon, et rares chez les receveurs de greffons de donneurs optimaux, augmentent chez les receveurs de greffons de donneurs à critères élargis et de donneurs décédés après arrêt cardiaque. La non fonction primaire est observée pour 1,8% des greffes à partir de donneurs vivants, 2,4% des greffes à partir de donneurs standards, 4,8% des greffes à partir de donneurs à critères élargis et 8,1% des greffes à partir de donneurs décédés après arrêt cardiaque. Le taux de reprise retardée de fonction est pour ces mêmes catégories respectivement de 9,2%, 24,6%, 33,2% et 78,7%. Le débit de filtration glomérulaire à 1 an, estimé par MDRD (Schwartz en pédiatrie) est supérieur à 60 ml/min chez 43,7% des receveurs de greffons issus de donneurs vivants, 43,4% des receveurs de greffons issus de donneurs standards, 12,6% des receveurs de greffons issus de donneurs à critères élargis et 21,0% des receveurs de greffons issus de donneurs décédés après arrêt cardiaque. Le résumé des données de survies issues du rapport de l'agence de la biomédecine est présenté dans les Figure 1 à 3 ci après.

Figure 1 : Survie globale du greffon (1993 – 2011)



Période de greffe	N	Survie à 1 mois	Survie à 1 an	Survie à 5 ans	Survie à 10 ans	Survie à 15 ans	Médiane de survie (mois)
1993-2011	42710	95,9% [95,8% - 96,1%]	91,2% [91,0% - 91,5%]	79,5% [79,1% - 79,9%]	63,1% [62,5% - 63,6%]	47,4% [46,6% - 48,2%]	169,5 [167,0 - 172,6]
nombre de sujets à risque*		40633	37359	22630	9883	2901	
<small> [] : Intervalle de confiance NO : non observable * : Nombre de malades restant à observer pour chaque temps et pour lesquels aucun événement n'est survenu </small>							

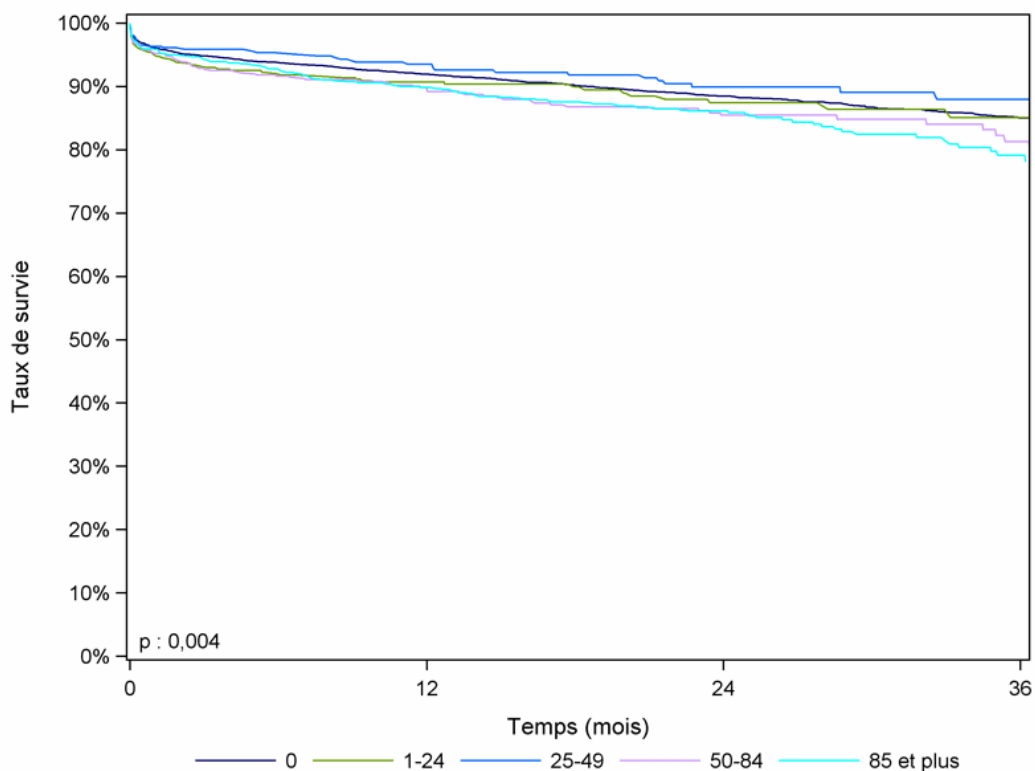
Figure 2 : Survie du greffon rénal selon la période de greffe



Période de greffe	N	Survie à 1 mois	Survie à 1 an	Survie à 5 ans	Survie à 10 ans	Survie à 15 ans	Médiane de survie (mois)
1986-1990	8671	93,3% [92,7% - 93,8%]	83,6% [82,8% - 84,4%]	68,2% [67,2% - 69,2%]	52,3% [51,2% - 53,3%]	38,3% [37,2% - 39,3%]	128,5 [124,4 - 132,8]
nombre de sujets à risque*		7851	7016	5668	4270	2868	
1991-1995	8821	94,2% [93,7% - 94,7%]	86,3% [85,5% - 87,0%]	74,6% [73,6% - 75,5%]	59,2% [58,1% - 60,2%]	44,0% [43,0% - 45,1%]	156,7 [151,3 - 161,1]
nombre de sujets à risque*		8253	7534	6451	4825	3258	
1996-2000	8970	95,9% [95,5% - 96,3%]	91,0% [90,4% - 91,6%]	80,5% [79,7% - 81,3%]	65,1% [64,1% - 66,1%]	49,3% [48,1% - 50,5%]	176,2 [171,8 - 182,0]
nombre de sujets à risque*		8601	8155	7138	5464	959	
2001-2005	11396	96,2% [95,8% - 96,5%]	92,2% [91,7% - 92,6%]	80,7% [80,0% - 81,4%]	62,8% [61,7% - 63,9%]	NO	NO
nombre de sujets à risque*		10952	10469	8883	1604	0	
2006-2008	8580	96,5% [96,0% - 96,8%]	92,6% [92,1% - 93,2%]	79,3% [78,3% - 80,2%]	NO	NO	NO
nombre de sujets à risque*		8268	7914	2812	0	0	
2009-2011	8694	96,0% [95,5% - 96,4%]	91,5% [90,9% - 92,1%]	NO	NO	NO	NO
nombre de sujets à risque*		8042	6454	0	0	0	

[] : Intervalle de confiance
 NO : non observable
 * : Nombre de malades restant à observer pour chaque temps et pour lesquels aucun événement n'est survenu

Figure 3 : Survie du greffon rénal selon l'immunisation du receveur (2009 – 2011)



Taux de greffons incompatibles** (%)	N	Survie à 1 mois	Survie à 1 an
0	6051	96,1% [95,6% - 96,6%]	91,9% [91,2% - 92,6%]
nombre de sujets à risque*		5622	4536
1-24	477	95,0% [92,5% - 96,6%]	90,7% [87,6% - 93,0%]
nombre de sujets à risque*		429	335
25-49	436	96,4% [94,0% - 97,8%]	93,6% [90,7% - 95,6%]
nombre de sujets à risque*		392	324
50-84	627	95,2% [93,2% - 96,7%]	89,4% [86,6% - 91,7%]
nombre de sujets à risque*		569	434
85 et plus	1103	95,9% [94,5% - 96,9%]	89,9% [87,9% - 91,5%]
nombre de sujets à risque*		1030	825

[] : Intervalle de confiance
 NO : non observable
 * : Nombre de malades restant à observer pour chaque temps et pour lesquels aucun événement n'est survenu
 ** le taux de greffons incompatibles est calculé sur la base des spécificités anticorps anti-HLA de classe I et II. L'analyse commence en 2009 car sa disponibilité dans Cristal au cours de l'année 2008.

4) Grandes problématiques de la greffe du 21^e siècle : comment améliorer les résultats ?

a) *Le rejet d'allogreffe: une problématique toujours majeure*

Le paysage du rejet d'allogreffe a beaucoup évolué grâce aux progrès considérables réalisés lors du dernier demi-siècle dans le domaine de la transplantation, plus précisément dans la compréhension du système immunitaire et dans l'amélioration du traitement immunosuppresseur. Toutefois, le rejet reste un obstacle majeur au succès de la greffe. Dans les années 1960, quand la pharmacopée pour les patients transplantés rénaux se réduisait à l'azathioprine et aux corticostéroïdes, le rejet aigu était commun (incidence de l'ordre de 80%) et se caractérisait classiquement par de la fièvre et une augmentation du volume du greffon. Ce tableau clinique a pratiquement disparu. Les progrès dans le traitement immunosuppresseur, accélérés par l'introduction des inhibiteurs de la calcineurine dans les années 1980 et le meilleur appariement immunologique des receveurs et des donneurs ont changé le paysage du rejet aigu. Le risque global de rejet aigu dans la première année post transplantation est actuellement inférieur à 15%. Néanmoins, les épisodes de rejet sont plus graves et plus complexes qu'auparavant et les taux de survie des greffons au-delà de 5 ans restent largement insuffisants.

Bien que la dysfonction du greffon révélée par l'élévation de la créatinine sérique soit le meilleur marqueur fonctionnel de rejet, nous et d'autres groupes avons démontré que la présence isolée de lésions histologiques spécifiques peut endommager d'une manière significative les greffons, même en l'absence d'insuffisance rénale franche au moment de la biopsie. Ainsi, la notion de rejet infraclinique s'est imposée comme une nouvelle forme clinique de rejet^{14,15}. Cette nouvelle entité conduit en pratique courante à définir le pronostic de la greffe et le choix thérapeutique sur la base de l'analyse histologique des biopsies du greffon, indépendamment de sa fonction¹⁶.

En dehors de son caractère clinique ou infraclinique, d'autres critères sont utilisés pour classer le rejet d'allogreffe rénale :

- Selon le moment de sa survenue, le rejet peut être considéré comme suraigu (quelques minutes), aigu (quelques jours à quelques semaines), aigu tardif (après 3 mois), ou chroniques (plusieurs mois ou années après la greffe).

Selon les modifications histologiques et le mécanisme immunologique imputé : médié par des lymphocytes T avec des lésions tubulo-interstitielles ou humoral avec des lésions endothéliales.

- Selon sa gravité : gradation des lésions histologiques élémentaires selon la classification internationale de Banff.

- Selon sa réponse au traitement : présence ou absence de réponse aux glucocorticoïdes.

Actuellement, la classification internationale largement utilisée dans le monde de la transplantation est la Classification de Banff. Elle est basée sur le travail et les recommandations des groupes d'experts internationaux réunis initialement en 1991 dans la ville de Banff et est réactualisée tous les deux ans, permettant d'harmoniser les données histologiques pour les essais cliniques ¹⁷⁻²⁰. Deux types de rejet sont reconnus par la classification en cours : le rejet cellulaire et le rejet médié par anticorps ¹⁹ (Table 1)

1. Rein normal

2. Anomalies à médiation humorale

Suspicion de rejet médié par anticorps : dépôt de C4d sans modification morphologique correspondant à un rejet actif

Forme aiguë de rejet médié par anticorps

C4d+, présence de DSA et de lésions aiguës, comme :

I Nécrose tubulaire aiguë-inflammation minime

II Cellules inflammatoires dans les capillaires péri-tubulaires-thromboses, MAT

III Lésions vasculaires sévères (v3)

Forme chronique-active de rejet médié par anticorps

C4d+, présence de DSA et de lésions chroniques, comme :

Glomérules avec doubles contours et/ou

Multilamellation de la membrane basale des capillaires péri-tubulaires et/ou

Endartérite fibroproliférative et/ou

Fibrose interstitielle et atrophie tubulaire

3. Lésions borderline : suspicion de rejet aigu cellulaire (<i1 ou <t1)

4. Rejet médié par les lymphocytes T

Rejet aigu à médiation cellulaire

IA : Infiltration cellulaire significative (i2/i3) et tubulite modérée multifocale (>4 lymphocytes/section tubulaire)

IB : Infiltration cellulaire significative (i2/i3) et tubulite sévère (>10 lymphocytes/section tubulaire)

IIA : Infiltration cellulaire significative (i2/i3) - artérite intinale (v1)

IIB : Artérite intinale sévère (>25% de la lumière vasculaire; v2)

III : Artérite transmurale ou nécrose fibrinoïde de la paroi musculaire (v3)

Rejet chronique actif à médiation cellulaire

Vasculopathie chronique du transplant avec endartérite fibroproliférante

5. Fibrose interstitielle et Atrophie tubulaire, sans élément d'orientation

Grade I Fibrose interstitielle discrète et atrophie tubulaire (<25% du cortex)

Grade II Fibrose interstitielle modérée et atrophie tubulaire (25-50% du cortex)

Grade III Fibrose interstitielle sévère et atrophie tubulaire (>50% du cortex)

6. Autres

Table 1 : Classification internationale des diagnostics histologiques portés sur des biopsies d'allogreffe rénale (réactualisation de la classification de Banff 2009). D'après Sis B. et al ²¹.

DSA - anticorps anti-HLA donneur spécifique. MAT - microangiopathie thrombotique. i - inflammation interstitielle. t – tubulite. v - endartérite.

b) Le rejet médié par des lymphocytes T

Le rejet médié par des lymphocytes T, nommé dans la pratique courante rejet cellulaire, est défini par l'accumulation de cellules mononucléaires, incluant des cellules CD4+ et CD8+, dans l'interstitium du parenchyme rénal. Dans le greffon sujet à un rejet aigu cellulaire, les lymphocytes T infiltrent l'interstitium et y prolifèrent (Figure 4B), d'où ils envahissent les tubules rénaux, provoquant les lésions de tubulite (Figure 4C). Classiquement, ce type de rejet répond au traitement par corticoïdes.

Les cellules T agressent le greffon directement par contact avec les cellules épithéliales tubulaires (cytotoxicité à médiation cellulaire) et à travers les effets locaux des cytokines libérées (Figure 4A). Elles ont aussi une capacité d'agression indirecte par l'activation des cellules endothéliales. Les cellules CD8+ qui ont une spécificité immunologique pour le greffon envahissent le parenchyme rénal, traversent la membrane basale des tubes et induisent leur apoptose. Elles libèrent des perforines et des granzymes A et B qui pénètrent dans les cellules et induisent l'apoptose médiée par les caspases. L'activation des récepteurs membranaires (FAS ou le récepteur de TNF- α) par l'interaction entre leur ligand (FAS-L ou TNF- α) et les cellules T entraîne l'oligomérisation du récepteur et induit ainsi le contact des protéines intracellulaires associées telles que les procaspases, ce qui déclenche l'apoptose de la cellule ²². Les cellules CD4+ peuvent aussi attaquer les cellules du greffon qui expriment les antigènes mineurs du CMH ²³ et sécréter les TNF- α et - β , qui provoquent aussi l'apoptose en se fixant sur leurs récepteurs des cellules endothéliales et tubulaires. Dans les modèles animaux, le blocage du TNF par un anticorps ou par des gènes knock-out des récepteurs du TNF prolonge la survie de l'allogreffe ²⁴. De plus, les cytokines inflammatoires produites par les cellules T situées dans l'interstitium activent des cellules épithéliales tubulaires, qui à leur tour attirent plus de lymphocytes T en sécrétant des chimiokines (CCL2, CCL5, CX3CL1) ²⁵. Les cellules tubulaires ainsi agressées peuvent aussi transformer leur phénotype épithélial natif en myofibroblastes mésenchymateux et participer à la progression de la fibrose interstitielle ²⁶. La nécrose des cellules épithéliales

tubulaires conduit à la dysfonction du greffon et à l'atrophie progressive des tubes rénaux qui accompagne la progression de la fibrose interstielle ²⁷.

L'inflammation interstielle et les lésions de tubulite sont gradées selon leur intensité par la classification de Banff de 0 à 3, permettant d'identifier 3 types histologiques de rejet médié par les lymphocytes T (Table 1).

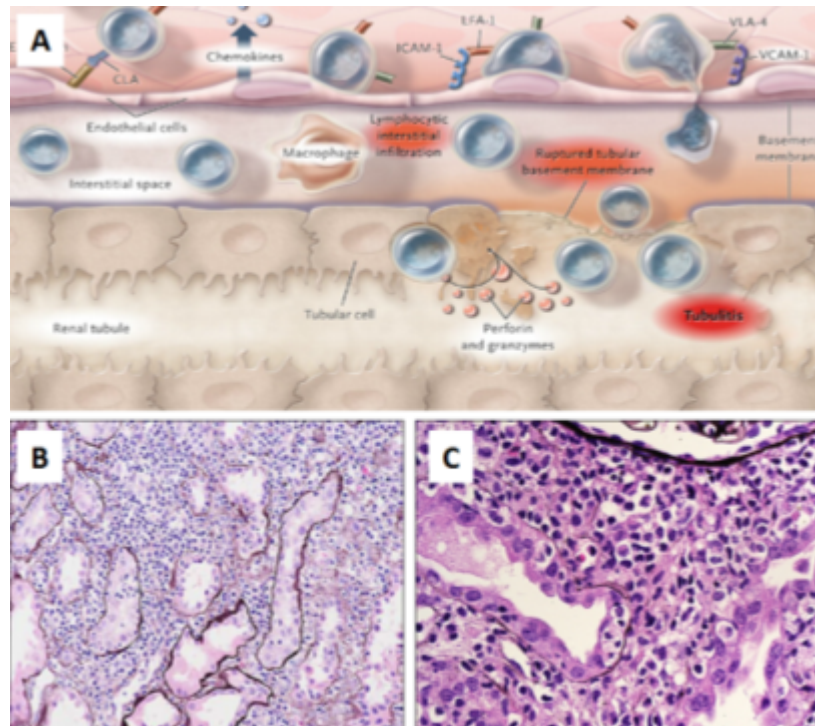


Figure 4. Rejet aigu cellulaire. Panel A : Migration des lymphocytes activés dans le greffon. Phase de reconnaissance et de ralentissement des lymphocytes circulants dans le flux sanguin au niveau du site d'inflammation. Ce phénomène est facilité par les sélectines, des protéines présentes au niveau de l'endothélium vasculaire. Ensuite, une interaction de plus forte affinité entre des intégrines exprimées à la surface des leucocytes comme LFA-1 et les molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 provoquent un arrêt complet des lymphocytes et permettent leur extravasation en dissociant transitoirement les cellules endothéliales *D'après Nankivell BJ* ²⁸. Panel B : infiltration massive par des lymphocytes T de l'interstitium du greffon rénal (i3). Panel C : lésions de tubulite (t2). Trichrome de Masson. *Photos par L-H Noël.*

c) Le rejet médié par anticorps

Les anticorps capables d'induire un rejet sont nombreux : ceux dirigés contre les molécules HLA, contre des antigènes endothéliaux ou contre des antigènes de groupe sanguin ABO. Néanmoins, les rejets dus aux anticorps anti-HLA représentent de loin la situation la plus fréquente et la plus redoutée en pratique courante. Le concept de médiation humorale a beaucoup évolué ces dernières années. Cette évolution est reflétée par les mises à jour successives de la classification de Banff depuis 1991. Initialement, la médiation humorale était uniquement évoquée comme mécanisme du rejet hyperaigu, survenant dans les heures qui suivent une transplantation. Les travaux de P. Terasaki ²⁹ ont fait le lien entre l'allo-immunisation et le rejet humoral, en démontrant qu'un test du cross match lymphocytaire positif en cytotoxicité était fortement prédictif de la survenue d'un rejet hyperaigu. Le test du cross match permet de mettre en évidence la présence d'anticorps anti-donneurs cytotoxiques préformés dans le sérum du receveur. Le mécanisme proposé pour ce type de rejet hyperaigu est le suivant : lors de la revascularisation, les allo-anticorps préformés se fixent sur l'endothélium du greffon et entraînent l'activation de la cascade du complément via la voie classique. Ceci aboutit à l'activation des cellules endothéliales qui expriment à leur surface des molécules d'adhésion et relarguent des facteurs procoagulants. La formation de complexes d'attaque membranaire détruisant les cellules endothéliales expose le sous-endothélium auquel vont se fixer les plaquettes. Ceci aboutit à la thrombose des artères et à la nécrose hémorragique du greffon, qui était considérée comme une signature du rôle des allo-anticorps. La généralisation de la négativité du cross-match comme prérequis à la transplantation a conduit à la disparition du rejet hyperaigu du paysage de la transplantation, sans pour autant éliminer d'autres formes de rejets liés aux anticorps anti-HLA ^{30,31}. Au contraire, l'augmentation des retransplantations et les progrès des traitements immunosuppresseurs, de plus en plus efficaces dans le blocage des réponses cellulaires, ont donné lieu à l'émergence de rejets résistants aux corticoïdes, en particulier ceux associés à la présence d'anticorps anti-HLA spécifiques du donneur.

Comme dans le cas du rejet hyperaigu historique, les allo-anticorps, préformés ou apparaissant *de novo* au décours de la transplantation, se fixent à la surface des cellules endothéliales et activent la voie classique du complément. Le processus, quoique similaire à celui des rejets hyperaigus, est toutefois moins violent, ce qui permet aux mécanismes de défense des cellules endothéliales d'être mis en jeu. Ces mécanismes dépendent de protéines membranaires agissant comme cofacteurs du facteur I pour dégrader le C3b et C4b (la protéine cofacteur de membrane MCP ou CD46) ou comme accélérateur de la dissociation des C3 et C5 convertases (le récepteur du complément CR1 et le facteur d'accélération de dissociation DAF). Comme la dégradation du C4b conduit à la génération de C4d se liant de manière covalente à la membrane cellulaire endothéliale, le marquage C4d a été proposé pour diagnostiquer les rejets humoraux (Figure 5A et B) ^{32,33}. En mettant en évidence la fixation covalente de la fraction C4d du complément à l'endothélium des capillaires péri-tubulaires du greffon, ce marquage a eu un rôle essentiel dans l'évolution du concept de médiation humorale. Il a permis, par des études d'association, de définir le phénotype particulier du rejet médié par anticorps, dominé par la présence de signes d'inflammation au niveau de la microcirculation (infiltration par des neutrophiles et des monocytes/macrophages des glomérules et/ou des capillaires péri-tubulaires) (Figure 5C et D) ³⁴⁻³⁷.

Aujourd'hui, le rejet médié par anticorps s'est imposé comme une entité distincte dans la classification de Banff ²¹ (Table1), bien définie selon des critères

- cliniques : dysfonction du greffon ;

histologiques : mis en évidence par l'analyse des biopsies du greffon d'une infiltration par des neutrophiles et des monocytes/macrophages des glomérules et/ou des capillaires péri-tubulaires, nécrose artérielle fibrineuse, thrombose des artérioles et/ou des capillaires ;

- immunohistologiques : positivité du marquage C4d dans les capillaires péri-tubulaires ;

- immunologiques : présence dans le sérum d'un anticorps circulant de type DSA.

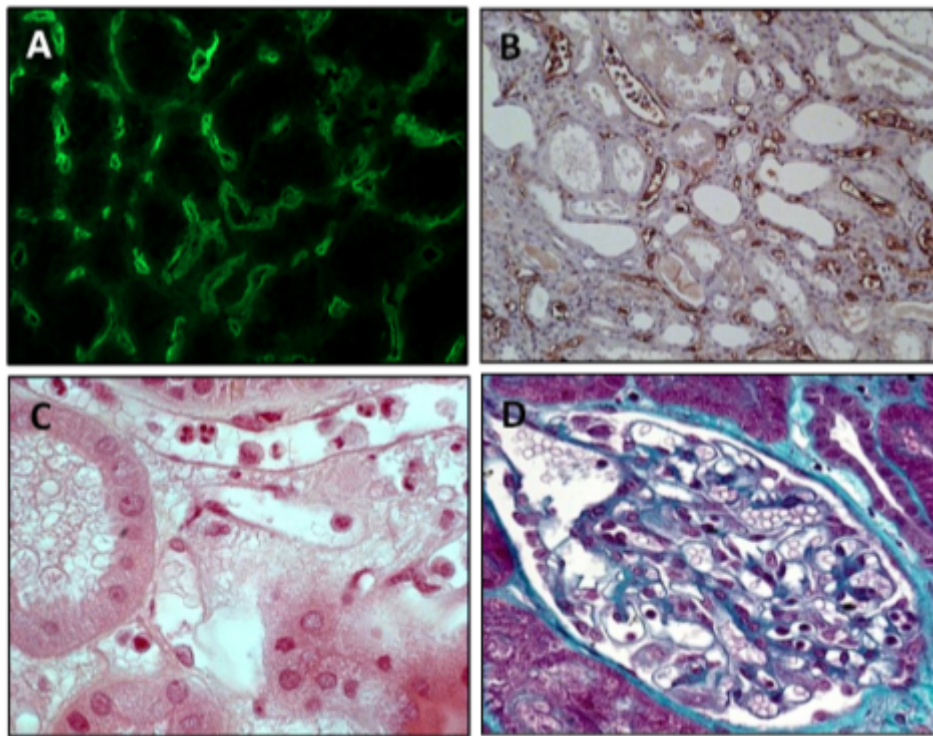


Figure 5. Rejet aiguë médié par anticorps. Marquage diffus et linéaire par le C4d dans les capillaires péri-tubulaires du greffon rénal par technique d'immunofluorescence indirecte (Panel A) et par technique d'immunoperoxidase (Panel B). Infiltration par des neutrophiles et des monocytes/macrophages des capillaires péri-tubulaires (cpt3) (Panel C) et des glomérules (g2) (Panel D). *Photos par D. Nochy.*

En l'absence d'études en population, la prévalence du rejet médié par anticorps reste difficile à estimer. Toutefois, le développement de la transplantation chez les patients immunisés et l'amélioration des techniques diagnostiques, notamment des techniques de détection des anticorps anti-HLA et de leur spécificité dirigée contre le donneur, laissent entrevoir une prévalence non négligeable de ce type de rejet. En effet, l'analyse de quelques cohortes de patients avec rejets, dont celle de l'Hôpital St Louis^{33,38}, indiquent que les rejets humoraux pourraient représenter plus de la moitié des rejets aigus documentés histologiquement. Ces résultats sont très hétérogènes, cela est en rapport avec la grande variabilité des critères et des techniques diagnostiques utilisés. En combinant les résultats

de plus de 1000 patients ^{33,36,38-41} provenant de différentes cohortes issues de la littérature, on montre que le rejet médié par anticorps pourrait représenter 30% des rejets aigus.

Le rejet médié par anticorps est un évènement majeur dans l'évolution des greffons. Il est reconnu comme non répondeur au traitement conventionnel (corticoïdes ou sérum antilymphocytaire) et responsable d'un nombre important de pertes de greffons. Les médecins transplantateurs ont alors mis au point des stratégies thérapeutiques de plus en plus spécifiquement orientées contre les anticorps anti-HLA, visant à les enlever ou les bloquer (immunoglobulines intraveineuses, plasmaphérèse) voir à inhiber leur production (rituximab, bortézomib) ^{33,38,42-46}. Ces thérapies ont améliorées significativement la survie des greffons à court terme ⁴⁶. Notre expérience entre 1998 et 2004 confirme l'évolution plus sévère des rejets médiés par anticorps par rapport à celle des rejets cellulaires, et cela malgré les progrès diagnostiques et thérapeutiques (Figure 6).

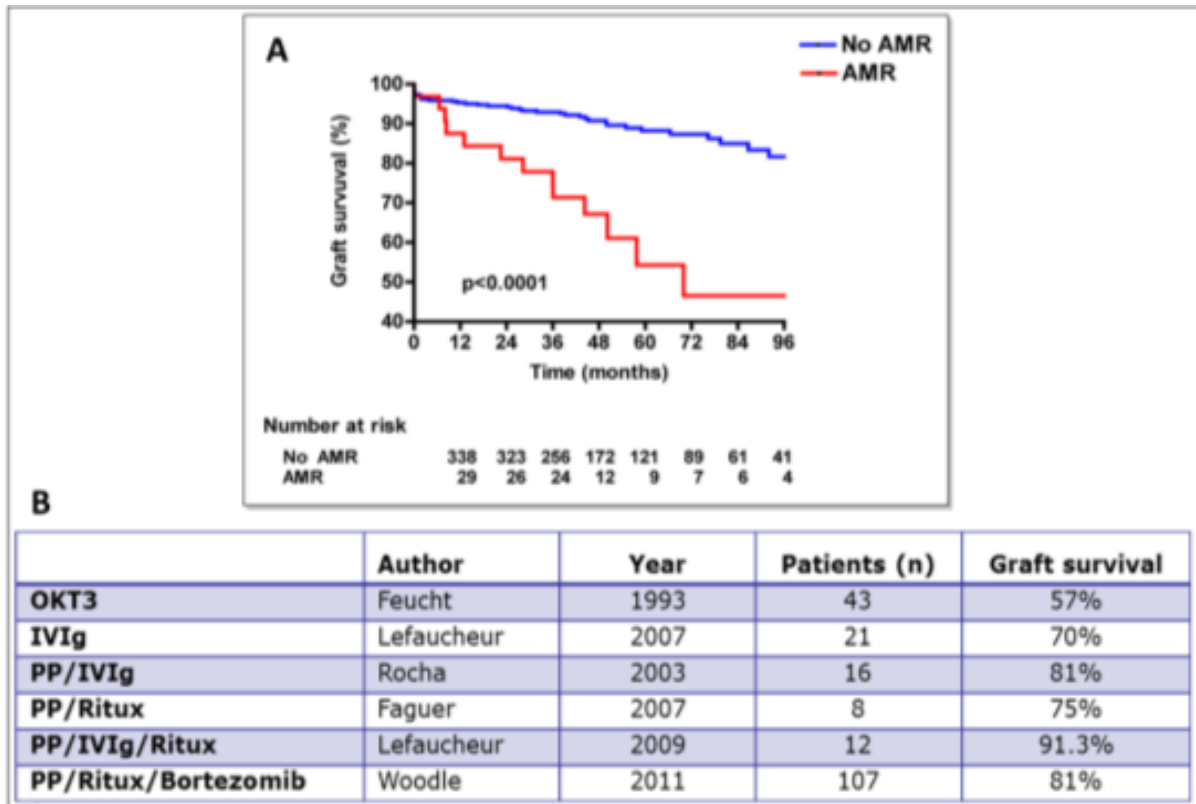


Figure 6. Rejet aiguë médié par anticorps. Diminution significative de la survie à long terme des greffons chez les patients ayant subi un épisode de rejet aigu médié par anticorps dans une cohorte de 367 transplantés rénaux⁴⁷ (Panel A). Impact du traitement sur la survie à court terme (1-3 ans) dans différentes cohortes significatives de la littérature (Panel B).

d) Allo-immunisation HLA

Les anticorps anti-HLA sont classiquement des allo-anticorps d'immunisation développés fréquemment dans les trois situations suivantes :

Les transfusions sanguines. Cette allo-immunisation est due à la présence de leucocytes résiduels dans les concentrés globulaires et plaquettaires. Les procédures de déleucocytation systématique de ces produits, l'utilisation à large échelle des agents stimulants l'érythropoïèse chez les patients porteurs d'une maladie rénale chronique et l'abandon des protocoles systématiques de transfusion en vue de la transplantation ont comme objectif de diminuer le risque d'immunisation.

Les grossesses. Ces anticorps apparaissent dès la première grossesse et près de 30% de femmes sont immunisées dès leur deuxième grossesse.

Les transplantations d'organes. Ces immunisations sont très larges et non exclusivement limitées aux spécificités incompatibles de classe I ou de classe II du greffon. Elles deviennent aujourd'hui, par leur persistance, leur polyspécificité et leur prévalence, la principale cause d'immunisation des patients inscrits sur liste d'attente de greffe rénale. Selon les données de l'Agence de la Biomédecine, 80% des patients inscrits pour une retransplantation sont immunisés dans le système HLA, majoritairement contre des molécules de classe II.

La définition du patient immunisé a été modifiée en 2009. Est considéré comme immunisé tout patient ayant un allo-anticorps d'isotype IgG dirigé contre un antigène HLA, quelle que soit la technique de dépistage utilisée.

e) Méthodes de détection des anticorps anti-HLA

Les méthodes de lymphocytotoxicité (LCT) permettent la mise en évidence des anticorps anti-HLA de classe I sur les lymphocytes T et de classe II sur les lymphocytes B par une réaction cytotoxique dépendante du complément. Elles permettent également de quantifier l'immunisation par un pourcentage (PRA, *panel reactive antibody*) correspondant au pourcentage de cellules du panel reconnues par les anticorps. Cette technique a été, jusque dans les années 2000, la technique de référence pour identifier les anticorps anti-HLA et évaluer le niveau d'immunisation des patients inscrits sur liste d'attente de greffe.

Depuis quelques années, de nouvelles techniques plus sensibles et plus spécifiques sont disponibles. Ce sont des techniques enzymatiques de type ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) et des techniques de fluorescence (cytométrie en flux ou technologie Luminex)⁴⁸.

Dans les techniques ELISA, les antigènes HLA purifiés de classe I ou de classe II sont fixés au fond des puits de microplaques et la révélation de la réaction antigène-anticorps est effectuée grâce à une antiglobuline anti-IgG humaine marquée par un fluorochrome⁴⁹.

La technologie Luminex⁵⁰ est une nouvelle méthode de cytométrie en flux permettant l'analyse de multiples réactions dans un seul tube. Il est ainsi possible d'analyser jusqu'à 100 types de microbilles par puits (chaque type de microbilles étant reconnaissable par son intensité de fluorescence et ses spécificités HLA).

Contrairement à la LCT, ces techniques permettent de mettre en évidence uniquement des anticorps d'isotype IgG, qu'ils soient cytotoxiques ou non, mais spécifiques des antigènes HLA de classe I et II.

Les recommandations publiées en 2011⁵¹ précisent que le dépistage d'anticorps anti-HLA de classe I et de classe II doit se faire sur au moins 2 sérums à 3 mois d'intervalle, par une technique sensible (ELISA ou Luminex) et une fois par an par LCT sur lymphocytes T ou totaux, avec et sans DTT, sur un panel représentatif. En cas de positivité, l'identification des

spécificités doit être réalisée par une technique sensible. En France, comme dans la plupart des laboratoires modernes d'histocompatibilité, l'identification des spécificités des anticorps anti-HLA se fait par technique Luminex Single Antigen.

A ce jour, l'immunisation anti-HLA des candidats à une transplantation d'organe est quantifiée différemment selon les pays. Même si dans de nombreux pays, elle est encore exclusivement quantifiée par le PRA IgG LCT, en France et aux Etats-Unis, ce PRA classique a été remplacé depuis 2009 par le TGI (Taux de greffons incompatibles, l'équivalent français du cPRA aux Etats-Unis)^{52,53}. Le TGI est un indicateur qui quantifie le pourcentage de donneurs incompatibles du fait des spécificités HLA saisies dans l'onglet « Immuno » de la base de données nationale *CRISTAL* parmi l'ensemble des donneurs isogroupes prélevés sur le territoire national au cours des 5 dernières années. Il est basé sur l'identification des spécificités HLA interdites par le biologiste du laboratoire d'histocompatibilité, saisies comme telles dans l'interface immunologique *CRISTAL*.

Malgré la multiplication des techniques de détection des anticorps anti-HLA, le cross-match négatif en lymphocytotoxicité (*IgG T-cell CDC CXM*) reste le gold standard de l'acceptation d'un greffon. Ce paradigme reste intact depuis 1969.

f) Impact des anticorps anti HLA dans le devenir du greffon

Les patients allo-immunisés dans le système HLA représentent la population à risque de développer, une fois greffés, ces différentes formes d'expression de rejet humoral avec des conséquences majeures en terme de survie des greffons, de coûts et de morbidités associées. L'impact clinique et l'ampleur des phénomènes déclenchés dans le greffon par la présence d'anticorps anti-HLA prennent une véritable dimension de santé publique au regard de la prévalence de l'allo-immunisation dans la population des patients insuffisant rénaux candidats à une transplantation.

L'analyse des registres (UNOS pour les Etats-Unis et l'Agence de la Biomédecine en France) révèle qu'un tiers des candidats à une transplantation est immunisé ^{54,55}. En France, on estime à plus de 5000 le nombre de patients immunisés inscrits sur liste d'attente. Cette prévalence augmente de manière significative dans les études de cohorte dans lesquelles la recherche d'anticorps anti-HLA a été systématiquement réalisée par des techniques en haute définition. Nous avons ainsi évalué à 50% le nombre de patients immunisés inscrits sur la liste d'attente de l'hôpital Saint-Louis, dont 24% sont considérés comme hyperimmunisés ⁵⁶. L'accès à la transplantation est particulièrement difficile pour ces patients et la difficulté augmente avec le niveau d'immunisation. Les durées médianes d'attente en France sont doublées, voire triplées chez les patients immunisés et ce malgré les politiques de priorisation et de mutualisation mises en place par l'Agence de la Biomédecine (en 2010, la durée médiane d'attente était estimée à 32,2 mois chez les patients immunisés contre 15,7 mois, chez les patients non immunisés) ⁵⁵. Il faut souligner que 10% des patients sur liste d'attente ont pour des raisons immunologiques un accès à la greffe quasi nul.

Cette situation a conduit les cliniciens à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Elles ont pour objectifs d'augmenter l'accès à la greffe des patients immunisés et de réduire le risque de survenue de rejets médiés par anticorps et de perte du greffon. Les premières approches avaient pour but la négativation du cross-match par des conditionnements

thérapeutiques avant la transplantation. Ces protocoles de désimmunisation ont émergés dans les années 1990 ^{57,58} et étaient fondés initialement sur l'efficacité *in vivo* et *in vitro* des IgIV pour moduler les anticorps anti-HLA (effet anti-idiotypique, activité anti-cytokinique, inhibition de l'activation du complément, effets sur les récepteurs T, les cellules dendritiques ou les Treg) ^{59,60}. Ces protocoles se sont intensifiés, en additionnant aux IgIV d'autres thérapies comme les plasmaphèreses ⁶¹ ou le rituximab ⁶². Actuellement, la désimmunisation est une technique thérapeutique validée ⁶³ et reconnue comme efficace pour diminuer le temps d'attente de greffe et améliorer la survie des patients ⁶¹.

Ces thérapies intensives ont ensuite été prescrites non seulement pour augmenter l'accès à la greffe des patients hyperimmunisés mais aussi pour diminuer le risque de rejet humoral chez les patients transplantés avec des DSA ⁶⁴. En ouvrant l'accès à la transplantation aux patients immunisés, ces nouvelles stratégies augmentent aussi le risque de conflit à médiation humorale après la greffe. Comprendre le phénomène humoral au cours de la transplantation d'organe est en effet essentiel pour engager une politique efficace. Pour chaque candidat immunisé, il faudra évaluer le bénéfice en terme morbi-mortalité d'une transplantation en présence d'anticorps anti-HLA, par rapport à l'absence de transplantation. Il ne faut pas non plus négliger l'enjeu de santé publique, dans le contexte actuel de pénurie d'organes (1 organe pour 3,4 receveurs potentiels) et de multiples contraintes logistiques et financières. Pour résoudre cette équation, nous avons besoin d'une évaluation pertinente du risque de rejet médié par anticorps et de perte de greffon chez les patients immunisés. Dans l'état actuel des connaissances, il n'existe aucun modèle validé épidémiologiquement de stratification du risque en transplantation fondé sur la présence et/ou les propriétés des anticorps anti-HLA. Dans le contexte actuel de développement important de la transplantation des patients immunisés, il devient indispensable d'améliorer la stratification du risque lié à la présence d'anticorps anti-HLA. Ce travail s'inscrit dans cet effort et propose d'affiner cette stratification en se basant sur des propriétés particulières de ces anticorps, comme leur spécificité, leur intensité ou leur capacité à fixer le complément.

5) Problématiques actuellement rencontrées dans le domaine du rejet médié par anticorps

a) Expansion du spectre du rejet médié par anticorps

Le développement de la transplantation chez les patients immunisés a modifié notre regard sur l'interaction entre les anticorps anti-HLA et le greffon. L'image de ce processus est aujourd'hui plus dynamique et intégrative. Nous avons compris que la présence d'anticorps anti-HLA pouvait s'accompagner d'un large spectre de manifestations cliniques ou histologiques, qui vont des formes cliniques silencieuses aux formes agressives conduisant à la perte rapide du greffon.

Les formes infracliniques / indolentes de rejet humoral

Les patients développant des DSA post-transplantation peuvent, certes, présenter des épisodes manifestes de rejet médié par anticorps, mais le plus souvent l'inflammation microvasculaire n'est responsable que de formes tronquées de rejet médié par anticorps, sans dysfonction aiguë du greffon, ni de protéinurie notable. Ces rejets médiés par anticorps sont dit alors infracliniques ou indolents (Figure 7) ¹⁴⁻¹⁶. L'évolution vers des lésions humorales chroniques est généralement précédée par la survenue d'au moins un épisode clinique de rejet humoral aigu. Bien que les stratégies thérapeutiques modernes puissent efficacement améliorer la dysfonction aiguë, elles ne parviennent généralement pas à dépléter efficacement les plasmocytes sécrétant des anticorps situés dans la rate et dans la moelle osseuse. En conséquence, les DSA restent détectables dans la circulation mais à titres variables et sont responsables de formes plus indolentes et lentement progressives de rejet médié par les anticorps. Elles se caractérisent par la persistance de lésions d'inflammation de la microcirculation (glomérulite, capillarite péri-tubulaire) et de dépôts plus ou moins intenses de complément (C4d) dans le greffon.

Notre groupe a clairement démontré que ces formes conduisent cependant à la perte des greffons, mais avec une issue finale plus lente ¹⁶. Un niveau insuffisant d'immunosuppression favorise probablement l'apparition des DSA *de novo*, un processus dynamique dont l'intensité est variable dans la durée ⁶⁵.

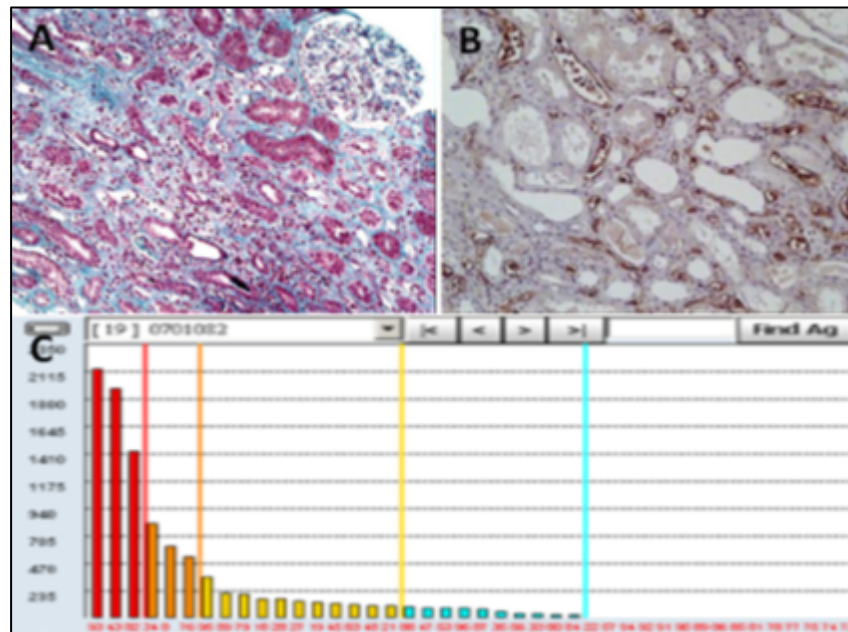


Figure 7. Rejet aigu infraclinique médié par anticorps. Diagnostic porté sur une biopsie du greffon rénal réalisée à 1 an post-transplantation chez patient présentant une fonction rénale stable. Lésions inflammatoires de la microcirculation (en microscopie optique, coloration par trichrome de Masson) (Panel A) associées au marquage C4d des capillaires peritubulaires (immunopéroxydase) (Panel B) et à la présence d'anticorps anti-HLA spécifiques du donneur détectés par technique Luminex (Panel C).

Le rejet médié par anticorps sans signes d'activation du complément

Alors que le marquage endothélial de l'activation du complément (le dépôt de la fraction C4d du complément dans les capillaires péritubulaires) s'est imposé comme un des principaux critères diagnostic de rejet médié par anticorps dans la classification de Banff et dans la pratique courante, nous et d'autres groupes avons accumulé un nombre non négligeable de données en faveur de sa faible sensibilité ^{16,66,67}. La positivité du marquage C4d apparaît

aujourd'hui comme la partie visible de l'iceberg représenté par les manifestations et les mécanismes impliqués dans le processus humoral. Ainsi, nous avons déterminé dans une cohorte de patients transplantés avec des DSA, que la sensibilité du marquage C4d pour le diagnostic de rejet médié par anticorps est faible (Se 0.69), alors que la spécificité est correcte (Sp 0.83). De plus, nous avons démontré que les lésions d'inflammation présentes au niveau de la microcirculation et les DSA circulants sont des facteurs significativement associés à la progression vers le rejet chronique, indépendamment du statut du C4d dans le greffon ¹⁶. L'équipe d'Edmonton confirme ces résultats par une approche moléculaire. Elle montre que le pronostic du greffon est significativement altéré par l'expression élevée des gènes endothéliaux (ENDAT) au niveau des greffons et qu'elle est associée à la présence de DSA circulants. Quant-au marquage C4d, il reste négatif chez plus de 60% des patients constituant le groupe de mauvais pronostic (ENDAT+/DSA+) ^{66,67}.

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'absence de dépôts de complément dans les biopsies des patients transplantés avec des DSA pour lesquels nous avons la preuve histologique de la persistance de lésions d'inflammation au niveau de la microcirculation du greffon. La faible sensibilité du marquage C4d tiendrait à sa variabilité dans le temps et/ou à des problèmes techniques. Une autre hypothèse serait l'existence de propriétés particulières des anticorps anti-HLA. Ainsi, certains DSA pourraient être capables d'activer les cellules endothéliales malgré une mauvaise capacité à fixer le complément. D'autres auteurs soutiennent l'existence de voies d'activation indépendantes du complément ⁶⁸. Une autre explication a émergé ces dernières années depuis l'utilisation des stratégies prophylactiques et curatives intensives, utilisant des immunoglobulines intraveineuses (IVIg) associées aux échanges plasmatiques et au rituximab. Ces thérapies pourraient diminuer l'activation du complément et expliquer ainsi les scores plus faibles du marquage C4d observés sur les biopsies systématiques réalisées chez des patients à risque immunologique, transplantés après des conditionnements immunosuppresseurs intensifs ⁶⁴. Associer les propriétés pathogènes des anticorps anti-HLA aux différents phénotypes d'agression endothéliale observés dans les greffons est donc essentiel. Compte tenu de

l'impact majeur des phénomènes humoraux en transplantation et des préoccupations actuelles concernant le rôle de l'activation du complément, la Conférence de Banff 2011 a établi un groupe de travail pour affiner les critères de diagnostic du rejet médié par anticorps et pour redéfinir la place du marquage C4d dans ce diagnostic ²⁰. Le travail de ma thèse s'inscrit dans cet effort et propose d'évaluer, sur les bases d'une étude en population, l'association entre la capacité des anticorps anti-HLA à fixer le complément, le phénotype des lésions histologiques en rapport avec ces anticorps et le pronostic des greffons. Ce travail apporte également des données méthodologiques solides permettant de mieux définir la place du marquage C4d parmi les outils diagnostiques du rejet aigu médié par anticorps.

L'atteinte endothéliale liée aux anticorps anti-HLA au niveau de la macrocirculation

Jusqu'à présent, pour étudier l'interaction entre les anticorps anti-HLA et leurs cibles endothéliales en transplantation d'organe, nous nous sommes focalisés sur les marqueurs endothéliaux de la microcirculation (capillaires glomérulaires et péri-tubulaires). L'atteinte de l'endothélium artériel (macrocirculation) liée aux anticorps anti-HLA reste très peu connue. C'est le cas en transplantation rénale, et d'une manière plus générale et surprenante, en transplantation cardiaque ou de celle d'autres organes solides pour lesquels l'expression vasculaire est au premier plan des manifestations de rejet.

Historiquement, la notion de « rejet vasculaire » a traversé les dernières décennies en s'associant à l'image d'un rejet très sévère ne répondant pas aux thérapies classiques ⁶⁹. Du point de vue histologique, ce type de rejet se caractérise par l'adhésion des cellules mononuclées à l'endothélium activé et par leur infiltration dans les couches sous endothéliales, l'intima et les cellules musculaires des parois des petites artères. Les formes sévères se caractérisent par la nécrose fibrinoïde des cellules musculaires de la media et peuvent conduire à la rupture des parois vasculaires. Jusqu'à présent, les lésions d'endartérite ont été attribuées aux lymphocytes T CD4+ et CD8+ et sont considérées par la classification internationale quasi exclusivement comme des formes de rejet à médiation cellulaire ²¹. Quelques cas isolés de rejets vasculaires associés aux anticorps anti-HLA ont

été rapportés dans la littérature. Lors d'un précédent travail chez des patients identifiés comme ayant un rejet humoral, nous avons été intrigués par la présence de ces lésions vasculaires, d'autant plus qu'elles étaient associées à une mauvaise évolution des greffons³⁸.

De récentes études réalisées sur des modèles murins renforcent l'hypothèse d'une composante immunologique médiée par les lymphocytes B dans l'agression de l'endothélium artériel⁷⁰ et la progression vers l'athérosclérose¹⁹. L'équipe de Necker apporte les premières données supportant un rôle possible des anticorps anti-HLA dans la progression des lésions vasculaires chez l'homme. En utilisant le modèle de la transplantation rénale et les biopsies sériées pratiquées chez des patients transplantés avec des DSA, les auteurs observent une accélération impressionnante des lésions d'artériosclérose en présence de DSA (28,8 années/année de transplantation). L'analyse histologique des artéioles des greffons rénaux provenant des patients transplantés avec des DSA révèle que leur intima interne est hypercellulaire, en rapport avec une prolifération active des myofibroblastes fixant le collagène. L'intima interne reste hypercellulaire tant que les lésions inflammatoires persistent au niveau de la microcirculation. Après extinction des marqueurs d'humoralité, cette hypercellularité disparaît, laissant place à des lésions non-spécifiques d'artériosclérose⁷¹. Ce phénomène d'artériosclérose accélérée en présence de DSA dépasse le champ de la transplantation rénale et ouvre la voie vers la compréhension d'autres phénomènes tels que les lésions coronariennes complexes observées chez les transplantés cardiaques.

En utilisant comme modèle la transplantation rénale, ce travail apporte la démonstration que les anticorps anti-HLA ont un impact pathogène sur les artéioles/artères des allo-greffons.

b) Le rejet médié par anticorps comme processus dynamique

Le rejet médié par anticorps ne doit pas être seulement compris comme un phénomène épisodique dans l'évolution du greffon. Il s'agit d'un processus évolutif qui ne démarre pas juste au moment du diagnostic histologique et ne s'achève pas à la fin du traitement.

Le premier élément de démonstration du caractère progressif du processus humoral est apporté par Colvin RB. En utilisant des biopsies sériées de greffons dans un modèle de rejet humoral chez des primates ayant subi une transplantation rénale, il observe que l'apparition des lésions inflammatoires dans la microcirculation précèdent la positivité du marquage C4d et la dégradation de la fonction rénale ⁷².

Les travaux de notre équipe ont permis d'entrevoir pour la première fois ce phénomène chez l'homme, en observant que les patients transplantés avec des DSA ont une moins bonne survie des greffons que les patients sans DSA, et cela même en absence de rejet aigu clinique ⁴⁷. Nous avons été capables d'interpréter ces résultats grâce à l'analyse des biopsies sériées réalisées chez les patients transplantés avec des DSA. Ces patients présentent des lésions histologiques monomorphes d'inflammation au niveau de la microcirculation dans 93% des cas. Alors que ces lésions restent stables dans le temps, nous observons une incrémentation significative des lésions chroniques entre les biopsies des greffons à 3 mois et les biopsies réalisées à 1 et 3 ans post transplantation. Ce processus évolutif est également supporté par les travaux de Haas et al. montrant par microscopie électronique que les premières modifications structurales conduisant aux lésions définies couramment comme chroniques (la glomérulopathie de transplant) apparaissent très précocement, dans les premières semaines après la transplantation ⁷³.

Le moment où le rejet médié par anticorps devient « clinique » et est responsable d'une dégradation fonctionnelle du greffon dépend pour beaucoup des politiques de transplantation des différents centres et du risque immunologique des populations étudiées. Les rejets précoces, survenant dans les 3 mois post transplantation, sont plus fréquents chez les patients transplantés avec des anticorps préformés. Notre centre étant l'un des

centres de référence en transplantation des patients immunisés, nous avons accumulé un nombre important de cas de rejets précoces. Mon expérience de la transplantation rénale et cette cohorte particulière m'ont permis de conduire ce travail sur le rejet aigu médié par anticorps anti-HLA.

Les formes tardives de rejet ont été décrites principalement par des équipes pratiquant des stratégies de transplantation à faible risque immunologique. Elles sont plutôt liées au développement de DSA *de novo*. Leurs caractéristiques histologiques sont similaires à celles des rejets précoces, en termes d'inflammation de la microcirculation et de dépôt de C4d, mais les lésions chroniques de fibrose interstitielle ou d'artériosclérose sont plus marquées⁷⁴.

Quelle que soit l'expression clinique du rejet médié par anticorps, formes précoces ou tardives, formes aiguës ou plus indolentes, la destruction et la perte du greffon restent une finalité (Figure 8).

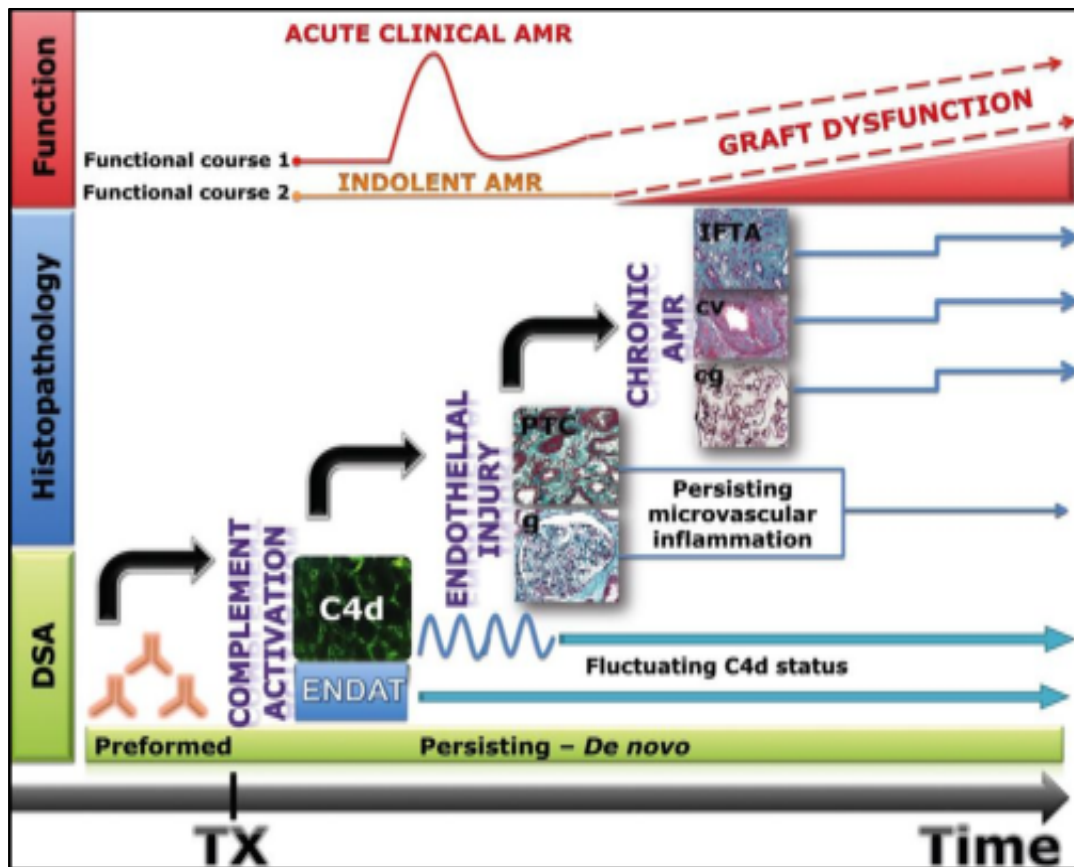


Figure 8. Histoire naturelle de la progression des lésions histologiques dues aux anticorps anti-HLA préformés ou de novo au niveau du greffon rénal.

AMR - rejet médié par anticorps. ENDAT - transcrits endothéliaux.

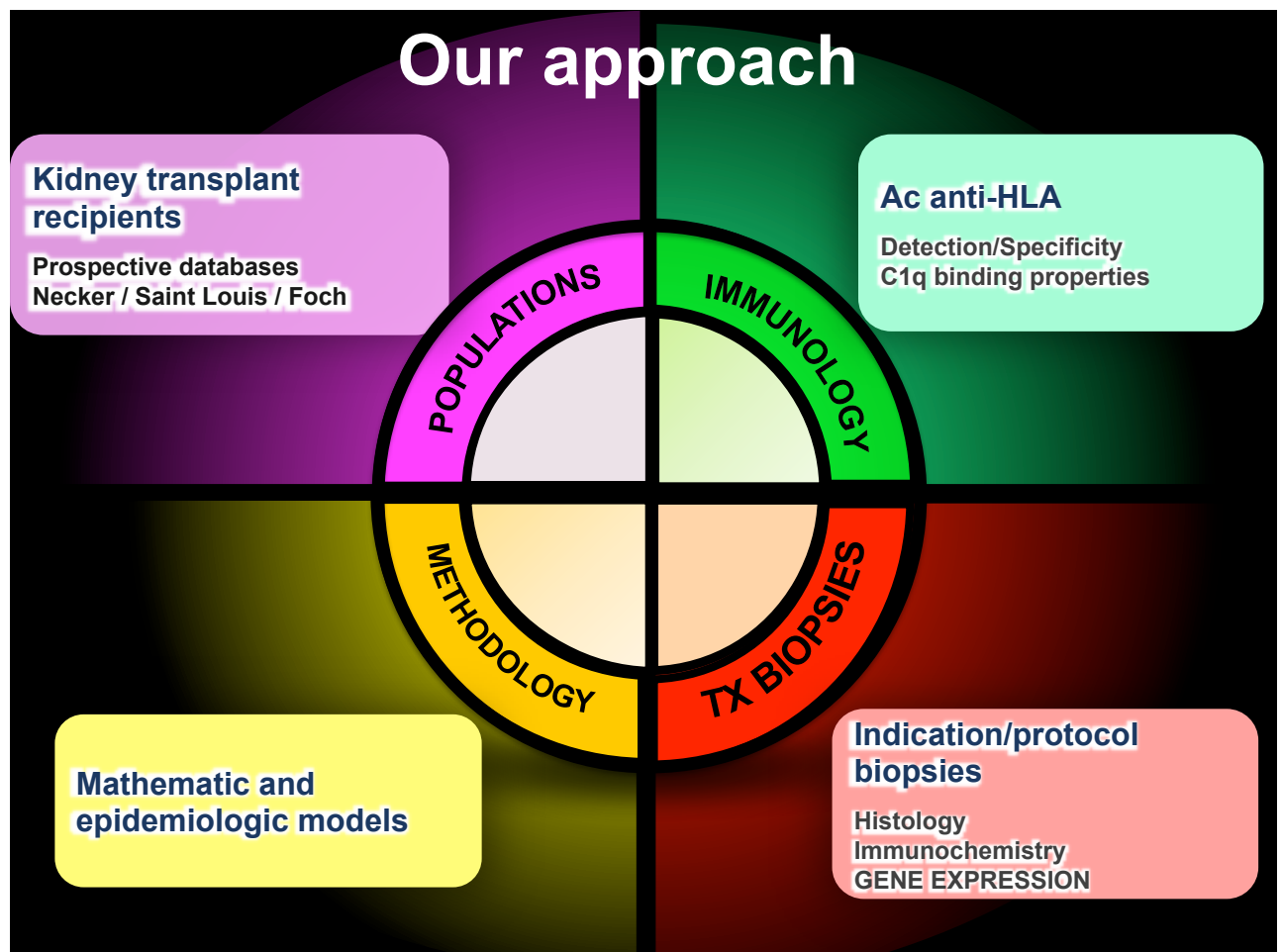
Objectifs du travail

Ce travail a pour objectif de définir la place des anticorps anti-HLA au cours des phénomènes de rejet et leur rôle dans les lésions conduisant à la perte prématurée des greffons. Il se place dans le contexte contemporain de la transplantation et intègre l'ensemble des progrès thérapeutiques, diagnostiques et de techniques. Je propose avec ce travail une approche translationnelle et intégrative qui utilise une méthode épidémiologique solide pour associer les données immunologiques aux données cliniques, histologiques et immunohistochimiques.

En partant d'une étude en population, nous utilisons les différentes caractéristiques de pathogénicité des anticorps anti-HLA pour identifier des populations « à risque » cliniquement pertinentes. Cette étude propose une association entre les différentes caractéristiques des anticorps anti-HLA et des phénotypes cliniques et lésionnels spécifiques. Elle est basée sur l'analyse systématique des anticorps anti-HLA circulants détectés après la transplantation et leurs effets histologiques sur les greffons.

Méthodologie

Notre stratégie globale de recherche est l'épidémiologie intégrative qui se veut par essence translationnelle. Dans cette configuration, nous amenons les différents acteurs de spécialités telles que l'anatomopathologie, l'immunologie, les sciences fondamentales, la néphrologie et la cardiologie à connecter leurs savoirs et données respectifs avec comme socle commun l'épidémiologie et la méthodologie statistique.



1) L'épidémiologie intégrative comme outil de recherche générant de nouvelles hypothèses de travail.

L'unité dans laquelle je travaille a développé au cours du temps une approche scientifique particulière en mêlant étroitement les investigations cliniques et statistiques. L'outil mathématique probabilistique est employé dans une démarche de pensée intégrative couplée en de multiples étapes aux questions, aux intuitions et investigations cliniques. Nous avons dénommé cette démarche « épidémiologie intégrative ».

Notre approche utilise en effet l'outil statistique et épidémiologique comme un moyen d'investigation de première ligne, générateur de nouvelles hypothèses et de nouvelles directions de recherche. L'épidémiologie devient ici une science « dure ».

L'épidémiologie est éclectique par essence car elle interagit avec plusieurs champs d'études afin d'isoler des facteurs causaux : investigations en biologie, en médecine, en biochimie, en génétique, et également recherche de facteurs démographiques, géographiques (pays en voie de développement), et historiques (maladies nouvellement négligées). L'épidémiologie s'exprime pleinement en développant une approche générale et transversale. Nous avons donc construit une approche véritablement multidisciplinaire associant des statisticiens et épidémiologistes à des médecins de diverses spécialités médicales. L'épidémiologie agrège alors autour d'elle plusieurs expertises en fonction des questions posées. L'épidémiologie devient ainsi doublement intégrative, par la transversalité des questions qu'elle se pose et par l'approche multidisciplinaire qu'elle organise. Parfois, cette démarche, probabilistique plutôt qu'exclusive, nous amène beaucoup plus loin qu'attendu et à découvrir des résultats non escomptés. En effet, en échappant aux limites habituellement acceptées séparant les spécialités médicales, l'approche transversale multiplie les degrés de liberté et dégage de nouvelles dimensions. Toute démarche scientifique commence par l'observation. C'est le cas en biostatistique où l'observation longue et soigneuse de la base de données permet l'étape descriptive qui précède l'analyse et la prédiction. Les modèles que nous utilisons peuvent être simples, multivariés, compétitifs, emboîtés, convergents ou non... Ils sont

indispensables à l'exploration et sont le support de toute analyse statistique. Ils doivent pourtant pouvoir –en partie- s'effacer au moment de la conclusion afin d'énoncer et de promouvoir un message simple au service de la clinique ou de la santé publique.

2) Population d'étude : La cohorte DIVAT

Constitution du Réseau DIVAT

L'Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN) du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nantes en collaboration avec l'hôpital Necker et les centres de transplantation de Nancy et Montpellier ont mis au point : (i) un logiciel DIVAT (Données Informatisées et VALidées en Transplantation) permettant la constitution d'une base de données informatique regroupant des informations recueillies dans les dossiers médicaux de patients ayant bénéficié de transplantations rénales et/ou pancréatiques ; et (ii) un logiciel permettant l'extraction des données de la base à des fins d'analyses d'épidémiologie clinique. Ces deux interfaces (base de production et base d'extraction) sont disponibles via une connexion internet sécurisée. La Commission Nationale Informatique et Libertés (CNIL) a été informée (Avis favorable du 17/09/2004 n°891735, Réseau DIVAT : 10.16.618). Un consentement préalable, écrit des patients quant à l'accès au dossier médical, au recueil et au traitement des données les concernant, est obligatoirement établi ainsi qu'un consentement spécifique pour les collections biologiques associées. Les données du dossier médical des patients sont anonymisées pour les extractions. Un numéro informatique (unique par patient) est créé systématiquement dans la base pour chaque patient, permettant si besoin les échanges d'informations en conservant l'anonymat des patients.

Objectifs du Réseau DIVAT

Les huit centres de transplantation rénale qui constituent aujourd'hui le Réseau DIVAT ont établi entre eux un accord de Consortium concernant les projets scientifiques reliés à DIVAT. Les objectifs du Réseau DIVAT sont multiples : pouvoir recueillir et échanger des informations, initier et mener des études épidémiologiques ou des essais cliniques en commun, utiliser les résultats pour des publications destinées à la communauté scientifique ou pour d'éventuels partenariats avec l'industrie pharmaceutique et créer une banque de

données biologiques liées aux données cliniques (pour Nantes, Necker et Lyon faisant partie du réseau CENTAURE, www.fondation-centaure.fr).

Fonctionnement

Les données de chaque centre participant sont enregistrées dans la base en temps réel par des Assistants de Recherche Clinique (ARC) spécifiquement formés, suivant un thésaurus mis au point en accord avec l'ensemble des centres et actualisé annuellement. Une réunion annuelle des ARCs permet de garantir l'homogénéité du remplissage des données (études de cas, problème spécifiques, discussion des résultats du croisement sur les remplissages d'item). Le contenu de ces rencontres fait l'objet de compte-rendus systématiques. Les ARCs complètent l'identité du patient et saisissent les antécédents, les données de base, les données immunologiques, les données cliniques et thérapeutiques avec leur suivi et les données anatomo-pathologiques. Ils saisissent également les paramètres relatifs au donneur tels que recueillis par l'Agence de la Biomédecine (ABM). Les données sont collectées en pré-greffe puis prospectivement en post-greffe après chaque visite de suivi des patients transplantés. Les visites programmées sont assez rapprochées au début du suivi (3 mois, 6 mois et 1 an), elles sont plus espacées ensuite (à chaque date anniversaire par rapport au jour de la transplantation). En plus de ces visites obligatoires, les patients peuvent également être revus au cours de visites intermédiaires motivées par une demande du patient, une modification de son état clinique, une perturbation biologique ou tout autre événement nécessitant une visite médicale. Ces visites intermédiaires ne font pas l'objet de rapports systématiques dans la base, cependant les éventuelles complications signalées sont consignées dans le suivi post-greffe. Le suivi du patient dans la base est maintenu tant qu'il garde un greffon fonctionnel et qu'il poursuit son suivi post-transplantation obligatoire. Si le suivi médical n'est pas interrompu par le patient (perte de vue), le report des informations dans la base est poursuivi jusqu'au moment où le patient retourne en dialyse suite à la perte définitive de son greffon. A partir de ce moment, le patient continue à être suivi médicalement par l'équipe, cependant les événements survenant après le retour en

dialyse ne sont plus collectés dans la base de données à l'exception de l'information éventuelle sur le décès du patient lorsqu'elle connue de l'équipe. De ce fait la base DIVAT permet d'analyser uniquement la mortalité des patients avec un greffon fonctionnel et non la mortalité globale. L'ensemble des modifications de la base de production et de la base d'extraction est tracé dans un document mis à jour bi-annuellement par l'ARC du Centre de Nantes. Ces modifications sont ensuite reportées dans le thésaurus lors de sa mise à jour annuelle. Ces documents (suivi des modifications et thésaurus) sont archivés sur le Centre de Nantes et partagés avec les autres centres par voie sécurisée via le site internet. Le système est validé par un audit annuel, réalisé par un ARC indépendant de l'équipe audité et diligenté par le Réseau pour cette mission. Chaque centre est responsable de la qualité de ses données et doit accepter de se soumettre aux audits. L'audit, tel qu'il s'organise aujourd'hui, se compose de plusieurs niveaux : (i) Un audit de dossiers qui vise à contrôler la qualité de saisie des données. Pour chaque centre, 30 dossiers sont tirés au hasard par le Responsable Informatique de DIVAT, 15 jours avant la réalisation de l'audit, parmi les dossiers de patients adultes, greffés à partir de l'année 2000, toujours vivants, non perdus de vue et avec un greffon fonctionnel. Pour chaque dossier, 30 items tirés au sort par le Responsable de la Cellule DIVAT-Biostat, parmi les items de base et de suivi, sont contrôlés. Les erreurs et données manquantes sont alors consignées dans une fiche d'audit. (ii) Un audit d'exhaustivité des données qui vise à contrôler le remplissage des données. Les critères des dossiers possiblement audités sont les mêmes que pour l'audit de dossiers. Pour les 10 dossiers tirés au sort, 5 items de suivi sont contrôlés pour toutes les dates de visite renseignées. (iii) Un audit des valeurs manquantes via l'édition d'une liste exhaustive des valeurs manquantes permet soit de compléter la base soit de valider que la donnée est réellement manquante. Les résultats de l'audit font l'objet d'un compte-rendu systématique rédigé par l'ARC du Centre de Nantes et présenté à l'ensemble du Réseau au cours d'une des réunions bi-annuelle du Conseil Scientifique du Réseau. L'audit est complété par des contrôles automatiques de cohérence portant sur les données à remplissage obligatoire. Ces contrôles, mis en place par le Responsable de la Cellule DIVAT-Biostat, sont générés

toutes les semaines pour chaque centre sous forme de rapports pdf qui signalent les données manquantes, les valeurs et dates incohérentes, les données suspectes et les pertes de vue. Des liens hypertextes permettent, directement à partir du rapport pdf, d'ouvrir la fiche électronique DIVAT à la page concernée par le problème et de le corriger le cas échéant. Enfin, si des erreurs de remplissage, des incohérences ou des données manquantes sont rencontrées lors des étapes de data-management (après l'extraction de données) en vue d'analyses statistiques, elles sont signalées au fil de l'eau, par la Cellule de Coordination du Réseau DIVAT, aux ARCs des centres concernés afin qu'ils puissent vérifier et éventuellement corriger les données. Chaque centre supporte ses propres coûts de saisie de données dans la base et s'occupe de trouver le financement de son ARC. Chaque centre est propriétaire de ses données, la base de chaque centre étant accessible uniquement par le centre concerné (code d'accès propre) et par le Responsable Informatique de DIVAT. Chaque centre a la libre utilisation et la libre disposition de ces propres données pour réaliser des études et des travaux. Cependant afin de mener des études en commun, les centres peuvent collaborer entre eux ou sur l'ensemble de la base. Cette collaboration est toujours formalisée par un document écrit : une proposition d'étude en collaboration est diffusée à tout le réseau, le formulaire est alors rempli obligatoirement par chaque centre qu'ils choisissent ou non de participer à l'étude proposée. Le centre initiateur du projet est alors autorisé à utiliser les données du ou des autres centres participants. Les publications se font sous la signature du centre initiateur du projet, suivie de celles des centres participants (au prorata du nombre de patients inclus dans la base par ordre décroissant).

Données disponibles dans DIVAT

La cohorte DIVAT n'est pas un simple registre car elle rassemble, depuis 1990, l'ensemble des paramètres cliniques et biologiques utiles à la prise en charge et au suivi médical du patient transplanté. Aujourd'hui, elle comporte plus de 300 variables, relatives au receveur, au donneur ou à la transplantation, disponibles pour réaliser des études épidémiologiques ou de recherche clinique. Les données sont collectées dans différentes "pages" de la base de production. Les pages principales qui aident à comprendre l'organisation de la base DIVAT sont les suivantes : Antécédents, Base, Donneur, Immunologie, Rejets, Biopsie, Infections, Complications, Survie et Suivi. Ces pages sont retrouvées selon la même arborescence dans la base d'extraction. Les données de la cohorte sont exhaustives depuis 1996 pour Nantes, Necker, Nancy et Montpellier, depuis 2003 pour Toulouse et depuis 2007 pour Lyon. Ainsi, si le nombre total de patients inscrits dépasse les 15000, le nombre de patients analysables pour des études varie de 3000 à 5000 environ en fonction du type d'analyse et en fonction des critères plus ou moins larges d'inclusion. De manière générale, seules les patients majeurs au moment de la transplantation, les transplantations d'un rein unique et les transplantés avec au moins une visite de suivi ou un événement connu après la transplantation sont inclus dans nos analyses. Pour les analyses multivariées, nous excluons généralement les patients avec au moins une donnée manquante sur les variables d'ajustement suivantes : âge et sexe du receveur, rang de la greffe, maladie initiale, comorbidités (antécédents de diabète, hypertension, maladie cardiovasculaire, hépatite B ou C et néoplasie), nombre d'incompatibilités HLA-ABDR, immunisation anti-HLA de classe I et II, temps d'ischémie froide, relation entre donneur et receveur et âge du donneur.

3) Approches méthodologiques utilisées dans cette thèse.

a) *Analyses de survie : modèles de cox et particularités des censures en transplantation rénale*

Les modèles de survie permettent d'étudier une variable aléatoire T représentant le temps jusqu'à la survenue d'un événement (perte du greffon, décès, complications, rejet aigu, . . .), souvent en fonction de certains facteurs explicatifs pouvant accélérer ou ralentir cette vitesse d'apparition. La particularité des données de survie est qu'elles sont le plus souvent incomplètes. On définit ainsi la censure à droite qui correspond soit à un individu qui n'a pas subi l'événement à la fin de l'étude (il est censuré à la date de point), soit à un individu qui est perdu de vue mais n'avait pas encore subi l'événement à sa dernière observation (il est censuré à la date de dernières nouvelles). A l'inverse, la censure à gauche correspond au cas où l'individu aurait subi l'événement avant un certain temps sans connaître ce temps avec exactitude. L'analyse de survie est souvent associée à un temps d'apparition d'un événement unique. Une hypothèse importante et souvent peu évaluée est l'indépendance entre le processus de censure et celui de l'événement étudié. Pour les études de survie en transplantation rénale, deux événements sont cependant en compétition : le retour en dialyse et le décès du patient avec un greffon fonctionnel. Dans la base DIVAT, les données de survie des patients retournés en dialyse ne sont pas collectées. Ainsi, seuls les décès des patients avec greffon fonctionnel sont pris en compte. En transplantation, trois choix de variables à expliquer sont généralement rencontrés, suivant les recommandations publiées par l'European Best Practice Guidelines for renal transplantation ⁷⁵.

Le délai entre la transplantation et le décès du patient avec un greffon fonctionnel, les retours en dialyse sont alors traités comme des censures à droite. On parle d'analyse de survie du patient ("patient survival"). Ainsi que nous l'avons signalé plus haut, avec la base de données DIVAT il n'est pas possible d'étudier la mortalité globale car l'information du décès est le plus souvent manquante pour les patients retournés en dialyse. Ainsi quand on étudie la mortalité sur les données de DIVAT, il s'agit toujours de la mortalité avec un

greffon fonctionnel. Les analyses concernant le décès du patient font l'objet de la dernière partie de la thèse (perspectives) dans laquelle nous nous intéressons aux déterminants des complications cardiovasculaires après la greffe et notamment les décès de cause cardiovasculaire.

Le délai entre la transplantation et le retour en dialyse : représente le critère de jugement principal des différentes études décrites dans cette thèse. Dans ce cas, les décès avec un greffon fonctionnel sont alors traités comme des censures à droite. On parle d'analyse de survie du greffon avec censure des décès ("death-censored graft survival"). Dans ce cas, tous les décès sont considérés comme indépendants de la transplantation. Néanmoins, on peut raisonnablement penser sur des arguments cliniques qu'un nombre non-négligeable de décès est dû à la transplantation ou à sa prise en charge. Il en résulte une surestimation de la survie du greffon. En effet, si tous les décès sont censurés, le modèle analysant la survie du greffon peut sous-estimer par exemple l'effet de l'âge ou de complications apparues en post-transplantation dont on peut penser qu'ils sont naturellement associés à la mortalité.

Le délai entre la transplantation et le premier des deux échecs possibles : retour en dialyse ou décès du patient avec un greffon fonctionnel. On parle d'analyse de survie du greffon sans censure des décès ("graft survival"), on parle également d'analyse de survie patient-greffon ("patient and graft survival") ou encore d'analyse de survie globale du greffon ("overall graft survival"). Ce cas est le plus pessimiste puisqu'il considère tous les décès comme liés à la transplantation alors que beaucoup d'entre eux sont indépendants. Il en résulte une sous-estimation de la survie du greffon. De plus, cette stratégie est synonyme de pertes d'informations puisqu'un effet moyen des facteurs de risque est modélisé, alors qu'une même variable peut avoir des effets différents selon l'échec.

En pratique, pour étudier la survie du greffon et modéliser les causes spécifiques de perte du greffon, il est admis dans la littérature de transplantation de censurer les décès avec greffons fonctionnel à la date du décès.

Différentes approches existent pour analyser les données de survie. On distingue deux grands types de méthodes, les méthodes paramétriques et les méthodes non paramétriques. Parmi les méthodes non-paramétriques, la plus connue est celle de Kaplan-Meier, la comparaison des courbes pouvant être réalisée grâce à un test du Log-rank ⁷⁶. Cet estimateur ne permet pas de prendre en compte plusieurs variables explicatives et d'estimer leur effet. Les méthodes paramétriques reposent en revanche sur des hypothèses concernant la distribution du temps T . L'effet d'un facteur explicatif peut être quantifié (en respectant le plus souvent l'hypothèse de proportionnalité des risques). A ces deux types de méthodes vient s'ajouter une méthode intermédiaire, dite semi-paramétrique. Il s'agit du modèle de Cox, pour lequel la fonction de risque n'a pas besoin d'être estimée grâce à la vraisemblance partielle.

Modèle semi-paramétrique de Cox

Le modèle semi-paramétrique à risques proportionnels proposé par Cox ⁷⁷ au début des années 1970 est dit semi-paramétrique. C'est le modèle le plus souvent rencontré dans le domaine médical car il permet de prendre en compte l'effet de plusieurs variables explicatives pour expliquer la survenue d'un événement (partie paramétrique) sans faire d'hypothèse sur la fonction de risque instantané de base (partie non-paramétrisée). Ces modèles évitent donc des hypothèses paramétriques inutiles lorsque le seul objectif est d'évaluer l'effet des facteurs qui accélèrent ou ralentissent le temps étudié (sans pour autant estimer les vitesses elles-mêmes). Le modèle de Cox décrit la fonction de risque instantané (Y) en fonction de prédicteurs. Il exprime la fonction de risque instantané de l'individu i ayant un vecteur de p variables explicatives $Z_i = (Z_{i1}, Z_{i2}, \dots, Z_{ip})$ sous une forme multiplicative $h(t) = h_0(t)\exp(\beta'Z_i)$, c'est-à-dire comme le produit d'une fonction de risque de base $h_0(t)$ commune à tous les individus, et d'une fonction de régression explicitée paramétriquement, $\exp(\beta'Z_i)$, où β' est un p -vecteur de coefficients de régression inconnus. À noter qu'en anglais, la fonction de risque instantané $h(t)$ se traduit instantaneous hazard. Ce modèle sous-tend 2 hypothèses :

– Il existe une relation log-linéaire entre fonction de risque instantané et covariables :

$$\log \frac{h_i(t)}{h_0(t)} = (\beta' Z_i)$$

– Le rapport des fonctions de risque instantané pour 2 sujets i et j de caractéristiques Z_i et Z_j ne dépend que de Z_i et Z_j et ne dépend pas du temps.

$$\frac{h_i(t; Z_i)}{h_j(t; Z_j)} = \frac{\exp(\beta' Z_i)}{\exp(\beta' Z_j)} = \exp(\beta' (Z_i - Z_j)) = K$$

C'est-à-dire que les fonctions de risque instantané des deux individus i et j sont proportionnelles, et que leur rapport de proportionnalité ne dépend pas du temps t. La quantité K représente le rapport des fonctions de risque instantané des individus ayant les caractéristiques Z_i et des individus ayant les caractéristiques Z_j . C'est le hazard ratio (noté HR) des Anglo-Saxons.

Modèle de Cox stratifié

Le modèle de Cox peut être stratifié sur une variable catégorielle. Il s'agit d'une solution possible lorsqu'une variable ne respecte pas l'hypothèse de proportionnalité des risques et/ou lorsque la mesure de son association avec la survie n'est pas nécessaire. C'est également une solution lorsque l'évaluation de l'association d'une variable avec la survie n'est pas éthique, par exemple pour ajuster sur un effet centre sans quantifier les écarts entre eux. Contrairement à la terminologie utilisée en épidémiologie, il ne s'agit pas de l'estimation d'un modèle entièrement différent par strate. Pour un modèle de Cox stratifié, chaque strate possède une fonction de risque instantané de base spécifique. En revanche, les coefficients de régression β sont le plus souvent supposés communs à l'ensemble des strates (même si une interaction entre variables et strates peut être introduite).

Hypothèse de proportionnalité des risques

Les modèles à risques proportionnels ont une interprétation en termes de rapport de risques (RR). Leur validité repose sur l'hypothèse d'un risque constant au cours du temps. Si z_1 est une variable à 2 modalités, $z_1 = \{1/0\}$, parmi les p variables explicatives, le RR associé à cette variable s'écrit :

$$RR_{z_1=1/z_1=0} = \frac{h_0(t_i) \exp(\beta_1) \exp\left(\sum_{j=2}^p \beta_j z_{i,j}\right)}{h_0(t_i) \exp\left(\sum_{j=2}^p \beta_j z_{i,j}\right)} = \exp(\beta_1) \quad \forall t_i$$

Les patients ayant la variable explicative $\{z_1 = 1\}$ ont $\exp(\beta_1)$ fois plus de risques d'échec que ceux ayant la variable explicative $\{z_1 = 0\}$. Le RR lié à la variable z_1 est dit ajusté sur toutes les autres variables, autrement dit toutes les autres variables étant constantes par ailleurs. Il est constant au cours du temps puisqu'il ne dépend que du coefficient de régression β_1 . L'hypothèse H_0 intéressante à tester est l'égalité des fonctions de risque de chaque modalité de la variable explicative z_1 : $\{\beta_1 = 0 \Leftrightarrow RR_{z_1=1/z_1=0} = 1\}$. L'hypothèse alternative H_1 est le plus souvent bilatérale, c'est à dire la non-égalité des fonctions de risque de chaque modalité de la variable explicative z_1 : $\{\beta_1 \neq 0 \Leftrightarrow RR_{z_1=1/z_1=0} \neq 1\}$. Si H_0 est rejetée, alors il semble qu'il y ait une différence de survie entre les 2 populations définies par la variable z_1 . Pour vérifier l'hypothèse de proportionnalité des risques, on peut utiliser deux méthodes complémentaires : graphique et analytique. La première consiste à tracer pour chaque groupe, les courbes du logarithme de la fonction de risque cumulé $\log(H(t))$ par rapport au temps t . Si les risques sont proportionnels, les courbes doivent avoir un écart constant au cours du temps. Si les courbes n'ont pas un écart constant, alors l'effet de la variable z_1 n'est pas proportionnel et le modèle à risques proportionnels n'est pas adapté. Cette approche graphique est subjective. De plus, elle ne permet de tester qu'une seule variable, sans ajustement.

La seconde méthode consiste en l'analyse des résidus de Schoenfeld ⁷⁶. Cette approche analytique est plus objective. Cependant, elle fait des hypothèses sur la forme de la corrélation entre les résidus et le temps. De plus, ce test est peu puissant : on pourra voir des courbes divergentes alors que l'analyse des résidus de Schoenfeld ne permet pas de rejeter la proportionnalité. En cas d'incohérence, dans la suite de ce rapport, entre les résultats graphiques et l'analyse par les résidus de Schoenfeld, on privilégiera l'analyse graphique qui permet d'évaluer la relevance clinique de prendre en compte ou pas une non-proportionnalité.

4) Déterminants des fonctions de survie en transplantation rénale

Afin de mieux comprendre et interpréter les développements qui vont suivre, nous décrivons ici les déterminants important (pré-greffe, à la greffe et post greffe) de l'évolution des patients transplantés rénaux disponibles dans DIVAT et qui seront intégrés dans les modèles de survie présentés dans les différents articles qui constituent cette thèse.

Variables relatives au receveur

(i) *Le sexe*. Son effet sur la survie du greffon a été retrouvé indépendamment du sexe du donneur. Il a été montré pour des premières transplantations que la perte des greffons est corrélée au sexe masculin du receveur ⁷⁸. Les receveurs femmes auraient un risque accru d'épisodes de rejet aigu (ERA) ⁷⁹. (ii) *L'âge*. Malgré une moindre incidence de rejet aigu chez les plus de 60 ans ⁸⁰, l'âge du receveur serait un facteur de risque de perte de greffon ⁸¹. Cet effet délétère de l'âge du receveur pourrait être liée à l'existence de lésions vasculaires avancées et d'altérations de la réponse immune favorisant le retard au démarrage du greffon. Pour d'autres auteurs, l'âge du receveur serait associé uniquement à la mortalité.

(ii) *La maladie initiale*. D'après les données du rapport REIN 2011, les néphropathies hypertensive et vasculaire (24%) et celles liées au diabète (22%) représentent près de la moitié des néphropathies initiales. Les glomérulonéphrites primitives qui représentaient il y a

quelques années encore près de 30% des causes d'IRT ⁸², sont aujourd'hui passées au second plan (11%). Viennent ensuite la polykystose (6%), les pyélonéphrites (4%) et toutes les autres causes parmi lesquelles les rares glomérulopathies d'origine immunologique (lupus, sclérodermie, périartérite noueuse). Il semble que la cause de la maladie rénale initiale soit inconnue pour 15% des patients à l'initiation du traitement de suppléance, souvent en l'absence de biopsie rénale. Certaines pathologies à l'origine de l'IRT sont susceptibles de récidiver sur le greffon notamment les maladies de système et autres maladies auto-immunes ou les glomérulonéphrites chroniques. L'impact des maladies récidivantes est supposé différent de celui des maladies non récidivantes mais selon les cas, le rôle supposé de la récurrence n'est pas toujours tranché.

(iii) Les antécédents. Un diabète, un antécédent cardiaque, un antécédent vasculaire ou une hypertension artérielle (HTA) chez le receveur sont corrélés à une plus grande mortalité post-transplantation ⁸³ et à une moins bonne survie du greffon. Certains auteurs décrivent une surmortalité des diabétiques par rapport aux non-diabétiques ⁸⁴ y compris pour les transplantations avec donneur vivant, en lien avec une survenue plus importante d'infections et de décès de causes cardiovasculaires. Les antécédents de néoplasie sont également associés à une augmentation du risque de décès en post-transplantation principalement en lien avec des récurrences.

(iv) L'Index de Masse Corporelle (IMC). L'obésité, définie par un IMC supérieur à 30 kg/m^2 , est associée à une incidence élevée d'HTA, de diabète, de maladies cardiovasculaires et de décès prématurés. Segev et al. ⁸⁵ ont montré à partir des données américaines de l'United Network for Organ Sharing (UNOS) que l'obésité était également associée à un moindre accès à la transplantation chez les patients inscrits sur liste avec un effet d'autant plus marqué que le degré d'obésité est important. En transplantation, le rôle de l'obésité est encore controversé. Cet effet serait en lien avec la survenue plus fréquente de retards au démarrage du greffons, de complications post-chirurgicales et/ou d'infections en post-transplantation ⁸⁶.

(v) *La présence d'anticorps anti HLA spécifiques du donneur.* Cette notion a été largement discutée dans l'introduction de cette thèse.

Variables relatives au donneur

(i) *Le sexe.* Plusieurs études ont rapporté une moins bonne survie des greffons à court et à long termes lors de la transplantation d'un greffon de donneur femme, en particulier pour un receveur homme ⁸⁷. Il pourrait être expliqué soit par une inadéquation entre le nombre de néphrons et la masse du receveur qui serait responsable d'un phénomène d'hyperfiltration, soit par une plus grande fréquence d'échecs par problèmes techniques au moment de la transplantation (le plus souvent attribués à l'âge du donneur ou à son état vasculaire) ou encore par une plus forte immunogénicité des greffons de femmes responsable d'une survenue plus fréquente d'épisodes de rejet aigu dans les trois premiers mois post-transplantation ⁸⁷.

(ii) *L'âge :* Quel que soit le groupe d'âge du receveur, la littérature est unanime sur le fait que la survie du greffon est significativement diminuée lorsque le donneur est plus âgé ⁸⁸.

(iii) *Le type de donneur : vivant ou décédé.* Les publications internationales montrent toutes que la survie des greffons issus de donneurs vivants est significativement meilleure que celle des greffons de donneurs décédés et ceci quel que soit l'âge du receveur excepté pour les patients de plus 70 ans ⁸⁹. La transplantation réalisée à partir de donneurs vivants, marginale en France jusqu'à la précédente révision des lois de bioéthique (2004), connaît un développement significatif depuis cette période. Cependant, en France, d'après les données du rapport REIN, la part prise par la transplantation de greffons provenant de donneurs vivants est de seulement 10% en 2011, expliquant en partie la pénurie d'organes observée en France. Sur DIVAT, les donneurs vivants représentaient 8,3% des greffes en 2002, ils étaient 15% en 2011. Cette proportion se situe loin derrière les Etats-Unis (40%), les pays d'Europe du Nord (32 %) ou encore la Grande-Bretagne (25 %).

(iv) *La cause du décès.* Le décès du donneur est classé selon son origine cérébrovasculaire ou non, sur la base de la définition américaine du donneur marginal ⁹⁰. En effet, il a été

montré que les décès de causes cardiovasculaires sont liés à une moins bonne survie des greffons à long terme mais également à une moins bonne survie des patients. Il faut noter que la cause de décès du donneur est très corrélée à l'âge du donneur (plus de traumatismes et moins de décès de causes cardiovasculaires chez les moins de 30 ans), ce qui pourrait expliquer en partie la meilleure survie des greffons issus de donneurs jeunes.

Variables relatives à la transplantation

(i) *Le rang de transplantation* : Le nombre de retransplantations a considérablement augmenté au cours des deux dernières décennies et de très nombreux auteurs se sont intéressés à comparer la survie des secondes et des premières transplantations. Les facteurs influençant la survie des secondes transplantations ont été bien étudiés et sont aujourd'hui assez clairement établis : une forte immunisation anti-HLA (PRA > 50%), des âges extrêmes du donneur (< 6 ans ou > 55 ans), la survenue d'ERA, une ischémie froide de plus de 24 heures, un donneur décédé, une survie courte du premier greffon, ainsi que des caractéristiques démographiques du patients au moment de sa première transplantation, etc. Pour Goldfarb et al.⁹¹ l'effet négatif de la retransplantation serait observé uniquement sur la survie du second greffon mais pas sur la survie du patient. Pour les troisièmes transplantations et plus en revanche, cet effet négatif serait observé sur la survie du greffon et du patient.

(ii) *Le nombre d'incompatibilité HLA* : Si la compatibilité HLA entre donneur et receveur en pré-transplantation demeure un critère immunologique d'appariement pour la répartition des greffons⁹², son impact sur la survenue d'ERA et sur la survie du greffon est aujourd'hui remis en cause parmi les patients ayant moins de 6 incompatibilités, y compris pour les transplantations avec donneurs vivants. Des données récentes indiquent que, chez le donneur vivant, la présence d'incompatibilités HLA serait associée à une moins bonne survie du greffon malgré une ischémie froide souvent plus courte mais n'aurait pas d'impact sur la mortalité⁹³.

(iii) *Le temps d'ischémie froide* : Il correspond au temps de conservation du greffon entre son clampage et son déclampage. L'ischémie froide est un des principaux facteurs de risque de survenue d'un retard au démarrage du greffon (DGF défini par la nécessité de recours à au moins une séance de dialyse dans la première semaine post-transplantation) avec un effet péjoratif sur la survie du greffon ⁹⁴ mais également sur la survie du patient. Cependant, l'effet péjoratif d'une ischémie froide de plus de 24 heures a été montrée même en l'absence de DGF ⁹⁵. Le seuil de durée d'ischémie froide critique définissant un groupe à risque varie selon les équipes cependant, en pratique, pour répondre à l'augmentation du risque de DGF en présence d'une ischémie prolongée, l'utilisation d'un traitement d'induction renforcé par Anti-Thymocyte Globuline (ATG) est parfois proposée ⁹⁶.

(iv) *La fonction du greffon* : Cet élément est un paramètre d'ajustement important pour déterminer en l'occurrence si à un temps T, la présence ou non de DSA et les caractéristiques de ces derniers sont associées à une progression plus rapide vers la perte du greffon, et ce, indépendamment du niveau concomitant de fonction du greffon. Dans nos analyses, nous avons catégorisé le niveau de fonction du greffon en utilisant les formules d'estimation basées sur la mesure de la créatinine plasmatique (eGFR) notamment la formule de MDRD. Les catégories utilisées se basent sur les recommandations d'experts internationaux de la National Kidney Foundation.

(v) *L'histologie du greffon* : Ces paramètres sont évalués à différents temps de la greffe : Lors du rejet aigu dont elles définissent le phénotype et/ou de façon systématique 1 an après la transplantation lors de biopsies qualifiées de biopsies de dépistage. Les lésions dites chroniques de fibrose interstitielle – atrophie tubulaire, d'artériosclérose, de duplication de la membrane basale glomérulaire sont également prises en compte dans nos modèles statistiques. L'ensemble des lésions élémentaires sont définies précisément dans la classification internationale de Banff (cf Table 1).

5) Analyses de stratification du risque

Au cours des dernières années, de nouveaux indices statistiques de discrimination notamment ont été développés (cf. paragraphes suivants). Pour rappel, la discrimination d'un modèle est sa capacité à discriminer les sujets faisant un évènement de ceux qui n'en font pas. Autrement dit, un modèle est discriminant s'il prédit une probabilité d'évènement plus importante à un sujet qui fait effectivement un évènement par rapport à celui qui n'en fait pas. Plusieurs méthodes de discrimination sont utilisées à l'heure actuelle dont l'aire sous la courbe ROC, le c de Harrell ⁹⁷, qui est une adaptation de la courbe ROC aux données censurées et les indices de reclassification ⁹⁸, d'apparition plus récente.

Courbe ROC

Classiquement, une courbe ROC est un graphique représentant la sensibilité d'un marqueur pour un diagnostic (axe des ordonnées) en fonction de 1-spécificité (axe des abscisses). Autrement dit, il s'agit du taux de vrais positifs en fonction du taux de faux positifs. On obtient alors la représentation graphique suivante (Figure 9). La courbe ROC est couramment utilisée pour évaluer la qualité d'un test diagnostique pour discriminer les malades des non-malades. L'indice qualitatif utilisé à cet effet est l'aire sous la courbe ROC (ou area under the ROC curve = AUC) qui représente la probabilité qu'un sujet malade ait un score au test plus élevé qu'un sujet non malade. Un test parfait ayant une sensibilité et une spécificité de 1 donnera une AUC de 1 (courbe A sur la Figure 9). Un test non discriminant ne fera pas mieux que le hasard et donnera une AUC de 0.5 (droite C). En pratique courante, l'AUC se situe entre 0.5 et 1 (courbe B). La courbe ROC est également utilisée en épidémiologie analytique afin d'évaluer les capacités discriminantes d'un modèle. L'AUC représente alors la probabilité que le modèle donne une probabilité prédite plus importante pour un cas que pour un non-cas.

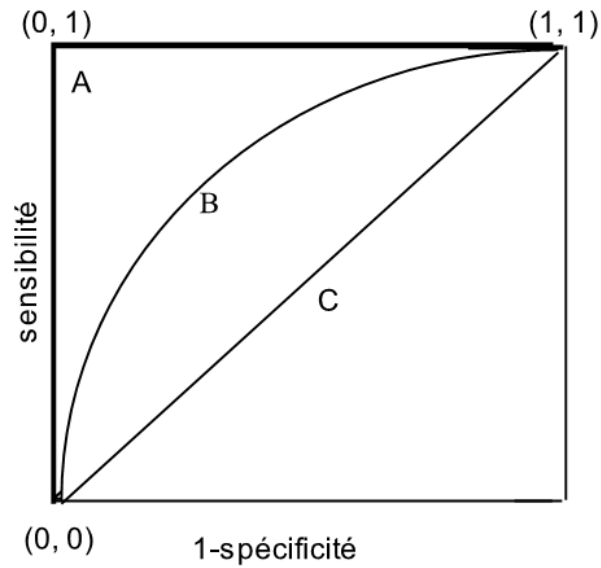


Figure 9 : Courbe ROC

Une des difficultés rencontrées avec la courbe ROC est son manque de sensibilité lié au fait qu'elle ne prend pas en compte la valeur des probabilités prédites par le modèle, mais uniquement les rangs des sujets en termes de probabilités prédites. De par cette caractéristique, l'AUC est peu sensible à l'ajout de nouveaux marqueurs dans un modèle, y compris ceux fortement associés à l'évènement. Il était donc nécessaire de développer de nouveaux indices plus sensibles.

Indice c de Harrell

L'indice c de Harrell est une extension de l'AUC adaptée aux données censurées ⁹⁷. Il est défini comme la proportion de paires de sujets comparables pour lesquelles les temps prédits (T) et observés (X) sont concordants. En pratique, une paire de sujets i et j est comparable si elle contient au moins un évènement (soit évènement + évènement, soit évènement + non-évènement) et si les 2 sujets ont des durées de suivi au moins égales, i.e. si au sein d'une paire, un sujet a présenté un évènement et que l'autre sujet est censuré avant la survenue de cet évènement, la paire n'est pas comparable. Une paire est concordante si pour $X_i < X_j$, on a $T_i < T_j$.

Outre le fait que comme l'AUC, le c de Harrell est basé sur les rangs des sujets en termes de délais prédits, c'est également un estimateur biaisé de la probabilité de concordance puisque toutes les paires de sujets ne sont pas comparables (censure avant évènement ou censure des 2 sujets à la date de point). Enfin, l'indice c est sensible à la durée de suivi de l'étude ⁹⁹. Pour déterminer l'intérêt d'un nouveau biomarqueur dans la prédiction individuelle du risque, on teste la différence à 0 de l'indice c de 2 modèles emboîtés, un modèle sans et un modèle avec le nouveau biomarqueur. Dans cette thèse, nous avons utilisé des méthodes de ré-échantillonnage (bootstrap) pour tester cette différence et obtenir un intervalle de confiance à 95% de la différence.

Méthodes de reclassification

Face aux limites rencontrées avec les précédents indices, certains auteurs ont proposé de nouvelles méthodes basées sur la quantité et la direction de la reclassification des sujets en termes de probabilité d'évènements après l'ajout d'un nouveau marqueur de risque à un modèle de prédiction ⁹⁸.

Net Reclassification Index (NRI)

Le NRI représente la proportion de sujets (cas et non cas) correctement reclassés en termes de risque après l'ajout du nouveau biomarqueur. Les sujets sont classés en catégories de risque selon leur probabilité d'évènement prédite par un 1^{er} modèle intégrant les facteurs de risque établi. La 2^{ème} étape consiste à reclasser les sujets partir d'un 2nd modèle de prédiction emboîté incluant le nouveau biomarqueur. Cette reclassification est effectuée séparément chez les cas et les non cas : un cas est considéré comme correctement reclassé si son risque prédit augmente après l'ajout du nouveau marqueur ; un non-cas est correctement reclassé si son risque diminue après la prise en compte du nouveau biomarqueur. On obtient ainsi la proportion globale de sujets correctement reclassés. A titre d'exemple, et se basant sur des données issues des sciences cardiovasculaires, les tableaux ci dessous illustrent le calcul du NRI utilisant les catégories de risque de Framingham pour la survenue d'évènements cardiovasculaires.

Reclassification chez les cas

		Modèle avec le nouveau marqueur		
		< 6%	6-20%	> 20%
Modèle sans nouveau marqueur	< 6%			
	6-20%			
	> 20%			

Reclassification chez les non-cas

		Modèle avec le nouveau marqueur		
Modèle sans nouveau marqueur		< 6%	6-20%	> 20%
marqueur				
< 6%				
6-20%				
> 20%				

Les sujets correctement reclassés sont représentés en vert et les sujets mal reclassés en rouge. Les sujets non reclassés sont en blanc. Le NRI se calcule séparément pour les cas et les non-cas.

$$NRI_{cas} = \frac{(N_{sup, cas} - N_{inf, cas})}{N_{total\ de\ cas}}$$

$$NRI_{non\ cas} = \frac{(N_{inf, non\ cas} - N_{inf, cas})}{N_{total\ de\ non\ cas}}$$

$$NRI_{global} = NRI_{cas} + NRI_{non\ cas}$$

Le NRI peut être testé simplement (hypothèse nulle : NRI = 0) à l'aide d'un paramètre z suivant une loi normale.

$$z = \frac{\widehat{NRI}}{\sqrt{\frac{\hat{p}_{up,events} + \hat{p}_{down,events}}{\# events} + \frac{\hat{p}_{up,nonevents} + \hat{p}_{down,nonevents}}{\# nonevents}}}$$

La réserve majeure faite au NRI est qu'il dépend fortement des catégories de risque choisies pour son calcul. En pratique, cette approche en catégorie (« NRI catégoriel ») suppose l'existence de catégories de risque préétablies dans la littérature. Typiquement, dans le domaine de la prédiction cardiovasculaire. Dans notre domaine d'application, afin de pallier l'absence de catégories de risque préétablies, des extensions récentes ont été proposées par Pencina et al ⁹⁸⁻¹⁰¹. Il s'agit du NRI continu ou de « Integrated Discrimination

Index ou Improvement (IDI) », indépendant des classes de risque, mais d'interprétation moins intuitive.

Integrated Discrimination Index (IDI)

L'IDI peut être considéré comme une version continue du NRI utilisant les différences de probabilités prédites au lieu de catégories de risque. Une autre définition de l'IDI est la différence des pentes de discrimination entre l'ancien et le nouveau modèle. La pente de discrimination d'un modèle est la différence moyenne entre les probabilités prédites chez les cas et les non-cas.

$$\widehat{IDI} = (\overline{\hat{p}}_{\text{new,events}} - \overline{\hat{p}}_{\text{new,nonevents}}) - (\overline{\hat{p}}_{\text{old,events}} - \overline{\hat{p}}_{\text{old,nonevents}})$$

De la même manière que le NRI, l'IDI peut être testé simplement à 0 à partir de la statistique de test suivante:

$$z = \frac{\widehat{IDI}}{\sqrt{(\widehat{se}_{\text{events}})^2 + (\widehat{se}_{\text{nonevents}})^2}}$$

6) Analyses en composante principale

Ces analyses font partie de la statistique descriptive multidimensionnelle. La statistique descriptive multidimensionnelle désigne l'ensemble des méthodes de la statistique descriptive permettant de traiter simultanément un nombre quelconque de variables (il s'agit d'aller au-delà de l'étude d'une seule ou de deux variables). Ces méthodes sont purement descriptives, c'est-à-dire qu'elles ne supposent, a priori, aucun modèle sous-jacent, de type probabiliste. (Ainsi, lorsqu'on considère un ensemble de variables quantitatives sur lesquelles on souhaite réaliser une A.C.P., il n'est pas nécessaire de supposer que ces variables sont distribuées selon des lois normales.) Le principe de l'ACP est d'étudier simultanément un nombre important de variables (ne serait-ce que 4 !), pour en faire un graphique global. La difficulté vient du fait que les individus étudiés ne sont plus représentés dans un plan de dimension 2, mais dans un espace de dimension plus importante (par exemple 4). L'objectif de l'Analyse en Composantes Principales est de revenir à un espace de dimension réduite (par exemple 2) en déformant le moins possible la réalité. Il s'agit donc d'obtenir le résumé le plus pertinent possible des données initiales. C'est la matrice des variances-covariances (ou celle des corrélations) qui va permettre de réaliser ce résumé pertinent, parce qu'on analyse essentiellement la dispersion des données considérées. De cette matrice, on va extraire, par un procédé mathématique approprié, les facteurs que l'on recherche, en petit nombre. Ils vont permettre de réaliser les graphiques désirés dans cet espace de petite dimension (le nombre de facteurs retenus), en déformant le moins possible la configuration globale des individus telle qu'elle est définie par l'ensemble des variables initiales (ainsi remplacées par les facteurs). C'est l'interprétation de ces graphiques qui permettra de comprendre la structure des données analysées. Cette interprétation sera guidée par un certain nombre d'indicateurs numériques, appelés aides à l'interprétation, qui sont là pour aider l'utilisateur à faire l'interprétation la plus juste et la plus objective possible. Sur le plan théorique, l'Analyse en Composantes Principales est une méthode relativement complexe, dans la mesure où elle fait appel à des notions mathématiques non élémentaires : celles de matrices, d'éléments propres. Néanmoins, il

n'est pas nécessaire de connaître ces notions pour comprendre le mécanisme d'une A.C.P. et donc pour l'utiliser correctement.

Sur le plan pratique, nous nous sommes appuyés sur ces analyses dans notre article du Lancet afin de déterminer des entités distinctes de rejet correspondant à des associations distinctes de lésions du greffon caractérisant des processus physiopathologiques distincts. Ainsi nous nous sommes affranchis de l'interprétation diagnostique de la classification de Banff en considérant les variables histologiques (glomérulite, capillarite peritubulaire, infiltration interstitielle, tubulite, artérite intimale, marquage C4d, et DSA

Il faut souligner que bien que ce type d'analyse soit utile pour définir des groupes distincts ou non de patients, elle ne permet pas de définir à elle seule de nouvelles entités diagnostiques et doit être complétée par d'autres analyses. Elle a néanmoins l'avantage d'être réalisée sans supervision et permet dans notre cas de s'affranchir de l'interprétation (parfois erronée) de la classification de Banff.

RESULTATS

1) Identification d'une nouvelle forme de rejet aigu en transplantation rénale

a) Positionnement du problème

Malgré les progrès importants réalisés dans la compréhension des mécanismes immunologiques en transplantation, la réponse allo-immune reste l'obstacle principal au succès de la transplantation rénale ²⁸. Le rejet d'allogreffe continue d'être une difficulté majeure en pratique courante. Bien que l'incidence des rejets aigus ait considérablement diminué grâce à l'amélioration de l'appariement des donneurs et des receveurs et grâce aux progrès des thérapies d'immunosuppression, les rejets sont aujourd'hui plus complexes et plus difficiles à classer. La survie à long terme des greffons reste insatisfaisante ^{47,102} et ne s'améliore pas de manière significative ^{103,104}.

Nous avons assisté lors de la dernière décennie à une évolution très dynamique du paysage du rejet. Le rejet aigu d'allogreffe a été considéré initialement comme un phénomène exclusivement médié par des lymphocytes T. Le rôle des mécanismes humoraux s'est progressivement imposé, même en dehors des greffes ABO-incompatibles ou des rejets hyperaigus. La réponse déclenchée par l'exposition à un antigène HLA génère une agression endothéliale conduisant à la dysfonction accélérée des greffons ^{68,105}. Le rejet aigu médié par anticorps (ABMR) est actuellement individualisé par la classification internationale de Banff ^{18,21} et reconnu de plus en plus comme un événement majeur dans l'évolution des greffes HLA-incompatibles, responsable d'un nombre important de pertes de greffons ^{102,106,107}.

Cette étude est fondée sur l'analyse des corrélations entre la présence d'anticorps anti-HLA détectés dans les sérums, leur capacité à activer la cascade du complément, l'histologie et

l'évolution clinique des greffons dans une cohorte de patients présentant un rejet aigu. Nous avons émis l'hypothèse que l'existence de phénotypes distincts de rejets aigus cliniquement pertinents pouvait être individualisée sur la base de critères histologiques et immunologiques. Nous avons conçu cette étude comme une réévaluation critique des différents types de rejet d'allogreffe rénale en utilisant des outils modernes appliqués à une large cohorte historique, reflet de 10 ans de rejet aigu en transplantation rénale.

b) Population de l'étude

Cette étude inclus tous les patients ayant présenté un épisode de rejet aigu confirmé histologiquement parmi l'ensemble des patients transplantés rénaux entre janvier 1998 et décembre 2008 dans deux centres de transplantation parisiens, l'Hôpital Necker et l'Hôpital Saint-Louis. 2079 transplantations rénales consécutives ont été réalisées dans les deux centres pendant cette période. Les patients ont été suivis jusqu'au 31 mars 2010. Nous avons validé nos résultats sur une cohorte externe indépendante constituée de 672 patients receveurs d'une transplantation rénale à l'Hôpital Foch entre janvier 2004 et décembre 2010.

Toutes les transplantations ont été ABO compatibles (groupes sanguins des donneurs et receveurs compatibles). La condition requise pour l'acceptation des greffons a été celle d'un cross match IgG T et B négatif par technique de cytotoxicité. Nous avons exclu les patients avec des non fonctions primaires des greffons liées aux complications chirurgicales vasculaires et urologiques précoces.

Les données cliniques des donneurs et des receveurs proviennent de 2 bases de données informatisées : Données Informatiques Validées en Transplantation ¹⁰⁸ et CRISTAL de l'Agence de la Biomédecine ¹⁰⁹, dans lesquelles les données sont entrées de manière prospective à des temps spécifiques pour chacun des patients : au moment de la transplantation, à 6 mois, à 1 an post-transplantation, puis annuellement. Les données de l'Hôpital Necker et de l'Hôpital Saint-Louis ont été extraites le 31 mars 2010. ; celles de l'Hôpital Foch l'ont été le 22 décembre 2011.

Nous avons identifié l'ensemble des patients qui ont bénéficié d'une biopsie de greffon dont l'indication a été clinique : dégradation aiguë de la fonction rénale ou protéinurie significative. Le diagnostic initial de rejet a été posé conformément à la classification internationale en vigueur au moment du diagnostic. Tous les patients inclus dans l'étude ont été analysés rétrospectivement afin de définir : 1) les paramètres histologiques et immunohistochimiques utilisés dans la classification actuelle de Banff ^{18,21} ; 2) la présence des anticorps anti-HLA-DSA identifiés au moment de la biopsie par techniques sensibles.

c) Techniques

Toutes les biopsies des greffons identifiées avec rejet ont été réexaminées rétrospectivement par deux pathologistes, en aveugle des données cliniques. Toutes les biopsies ont été classifiées et notées de 0 à 3 selon les critères actuels de Banff^{18,21} pour les lésions histologiques suivantes : inflammation glomérulaire (glomérulite, g), tubulite (t), inflammation interstitielle (i), capillarite péri tubulaire (ptc), endartérite (v), glomérulopathie du transplant (TG), fibrose interstitielle et atrophie tubulaire (FIAT), artériosclérose (cv) et hyalinose artériolaire (ah). Le score d'inflammation au niveau de la microcirculation a été défini comme la somme de la gradation de la glomérulite et de la capillarite péri tubulaire. Le marquage C4d a été réalisé par technique d'immunohistochimie sur des coupes de paraffine en utilisant un anticorps anti-C4d polyclonal humain (Biomedica Gruppe, Vienne, Autriche). La présence d'anticorps circulants anti-HLA-A, -B, -DR et -DQ spécifiques du donneur (DSA) a été analysée rétrospectivement sur les sérums concomitants aux biopsies par technique Luminex haute définition *Single Antigen* (One Lambda, Canoga Park, CA, Etats Unis) sur une plateforme Luminex. Toutes les billes présentant une MFI (*mean fluorescence intensity*) normalisée supérieure à 500 ont été considérées comme positives. Nous avons enregistré, pour chacun des patients, le nombre, les spécificités et les MFI des anticorps anti-HLA ainsi détectés. Nous avons gradé l'intensité de leur MFI au moment du rejet de 0 (absence de DSA), à 3 selon des niveaux pertinents prédéfinis.

Le typage HLA des receveurs a été réalisé par biologie moléculaire (Innolipa HLA Typing Kit, Innogenetics, Belgique). Pour les donneurs, le typage tissulaire a été initialement réalisé par technique de microlymphocytotoxicité et ultérieurement vérifié par biologie moléculaire.

d) Approche méthodologique

Pour définir le spectre des rejets en s'affranchissant de la classification internationale actuelle, nous avons utilisé une analyse par cluster hiérarchique et une analyse en composantes principales basées sur les critères diagnostiques histologiques, le marquage de la fraction C4d du complément dans le greffon et la présence de DSA. Pour l'analyse de cluster, nous avons utilisé le programme hcluster module du amap package (version 0.8-7) du logiciel R (version 2.10.1) et pour l'analyse en composante principale le module dudi.pca du ade4package (version 1.5-1) de R.

La survie des greffons a été estimée par des courbes de survie selon la méthode de Kaplan-Meier. La comparaison entre les survies en fonction des différents types de rejet a été réalisée par le test du log-rank. Nous avons considéré le rejet comme temps d'origine et la perte de greffon comme événement d'intérêt. En cas de décès avec greffon fonctionnel, nous avons censuré la survie des greffons au moment du décès. L'ensemble des résultats de cluster hiérarchique et de survie des greffons a été répliqué sur la cohorte de validation externe.

e) Résultats

Parmi les 2079 receveurs d'une greffe rénale dans les 2 centres de transplantation (Hôpital Necker et Hôpital Saint-Louis), 302 (15%) ont connu un épisode de rejet aigu documenté histologiquement. La Table 2 détaille les caractéristiques des donneurs et des receveurs au moment de la transplantation chez les patient ayant subi un épisode de rejet et dans le reste de la population générale. Les épisodes de rejet surviennent en moyenne à 3,1 mois après la transplantation (IQR 1-11,3). La médiane du suivi post transplantation a été de 43,7 mois (27,4-64,1) dans la population des patients avec rejet et de 49,5 mois (27,4-72,0) chez les patients sans rejet.

Caractéristiques	Patients	Patients	p *
	sans rejet	avec rejet	
Age du receveur — ans **	48,8 ± 13	45 ± 10	<0,001
Receveur de sexe masculin — no. (%)	1225 (69%)	148 (49%)	<0,001
Retransplantation — no. (%)	212 (27,8%)	122 (44,9%)	<0,0001
Durée début dialyse — mois **	51 ± 54	53 ± 62	NS
Age du donneur — (ans) **	51 ± 16	50 ± 12	NS
Donneur de sexe masculin — no. (%)	970 (54,6%)	169 (56%)	NS
Donneur cadavérique — no. (%)	1444 (8,2%)	239 (79%)	NS
Cause cardiovasculaire de décès du donneur —	622 (43,1%)	98 (41,0%)	NS
Ischémie froide — heures **	18,8 ± 10	17,8 ± 8	NS
Retard de prise de fonction — no. (%)	906 (50,9%)	177 (58,6%)	0,02
Etiologie de la néphropathie			
Diabètes — no. (%)	211 (12%)	18 (6%)	0,003
Vasculaire — no. (%)	164 (9,2%)	15 (5%)	0,02
Glomérulopathie — no. (%)	433 (24,4%)	125 (41,4%)	<0,001
Congénitale — no. (%)	291 (16,3%)	88 (29,1%)	<0,001
Autres — no. (%)	70 (3,9%)	14 (4,6%)	NS
Interstitielle — no. (%)	171 (9,6%)	35 (11,6%)	NS
Indéterminée — no. (%)	437 (24,6%)	7 (2,3%)	<0,0001
Immunologie			
HLA A+B mismatch **	2,05 ± 1,09	1.2 ± 0,4	NS
HLA DR mismatch **	0,8 ± 0,7	1.1 ± 0,3	NS
Groupe sanguin A/B/O/AB — no.	747/176/730/84 †	122/49/104/27	NS

Table 2 : Caractéristiques des receveurs d'une transplantation rénale au moment de la greffe * Test de χ^2 ; ** Valeurs moyennes \pm SD; † 40 patients avec données manquantes

En se basant sur l'analyse des 7 items utilisés pour le diagnostic de rejet aigu (DSA circulants, dépôt de C4d dans le greffon, glomérulite, capillarite péri-tubulaire, endartérite, tubulite et inflammation interstitielle), nous présentons dans la Figure 10 une photographie du rejet chez les 302 patients inclus dans notre étude. Le dendrogramme oriente vers l'existence de différentes signatures de rejet que nous allons identifier par analyse en composantes principales.

Dendrogram 2: Variables

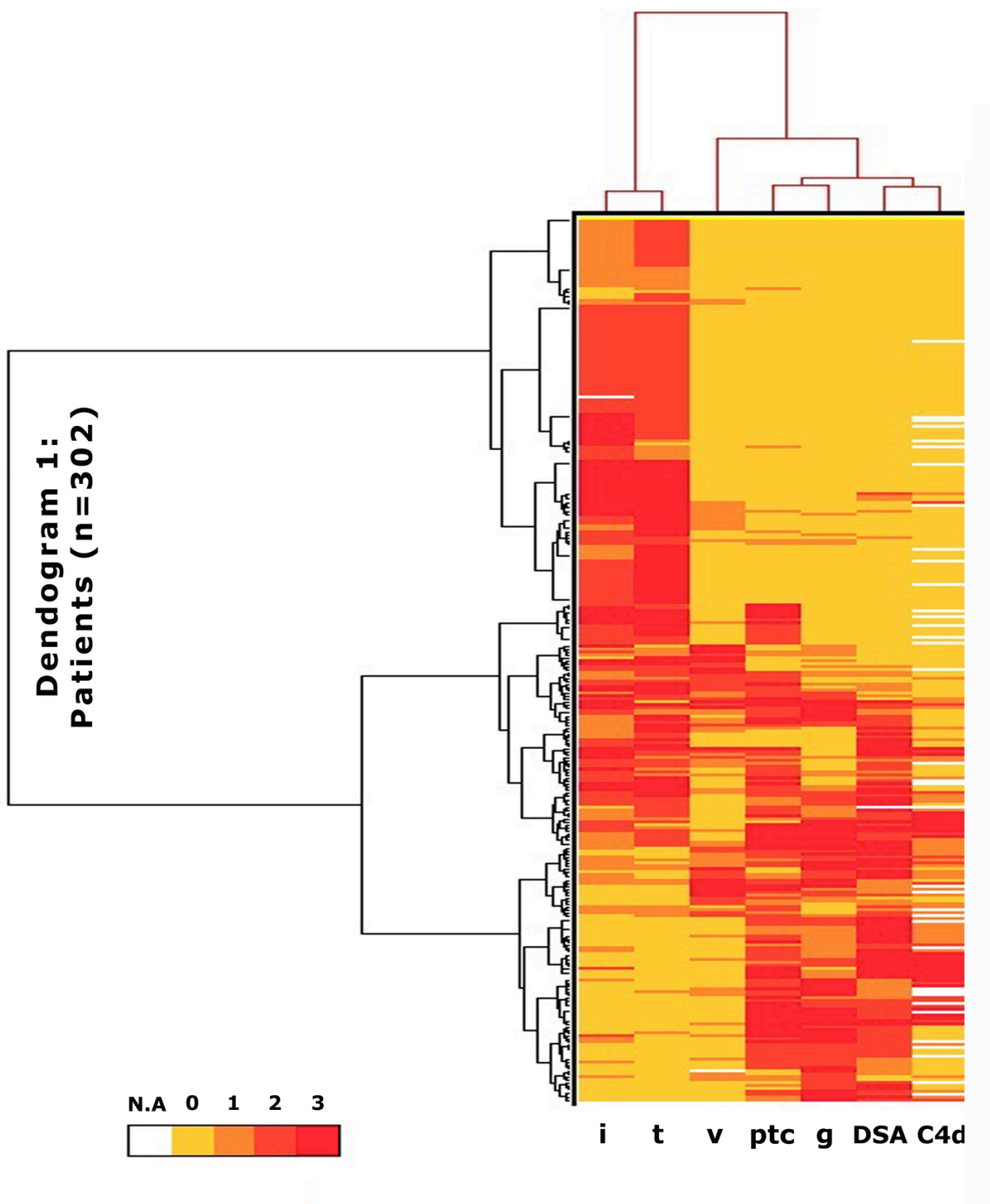


Figure 10 : Présentation des caractéristiques morphologiques et immunologiques de chacun des patients transplantés rénaux au moment de l'épisode de rejet aigu (1 ligne=1 patient). Analyse des profils des rejets par cluster non supervisé. La coloration de chacune des variables correspond à sa gradation de 0 à 3.

Nous avons ainsi identifié 4 types distincts de rejets : le rejet vasculaire médié par lymphocytes T (26 patients, 9%), le rejet vasculaire médié par anticorps (64 patients, 21%), le rejet cellulaire classique sans endartérite (139 patients, 46%) et le rejet médié par anticorps sans lésions d'endartérite (73 patients, 24%). La Figure 11A illustre la projection des patients selon 2 axes qui permettent de séparer au mieux (plus de 75%) les différents types de rejet. Le premier axe, l'axe horizontal, est déterminé par l'opposition de l'inflammation interstitielle et de la tubulite aux éléments qui constituent la signature humorale d'un rejet (DSA, C4d, glomérulite, capillarite péri-tubulaire). L'axe vertical est représenté par les lésions d'endartérite (Figure 11B). Comme illustré par le cercle de corrélations, la présence de DSA est l'élément diagnostique le plus discriminant pour séparer les 4 types de rejet. L'analyse en composantes principales réalisée sur la cohorte de validation (n=672) confirme que le rejet vasculaire médié par anticorps a un phénotype histologique et immunologique distinct par rapport aux 3 autres types de rejets identifiés.

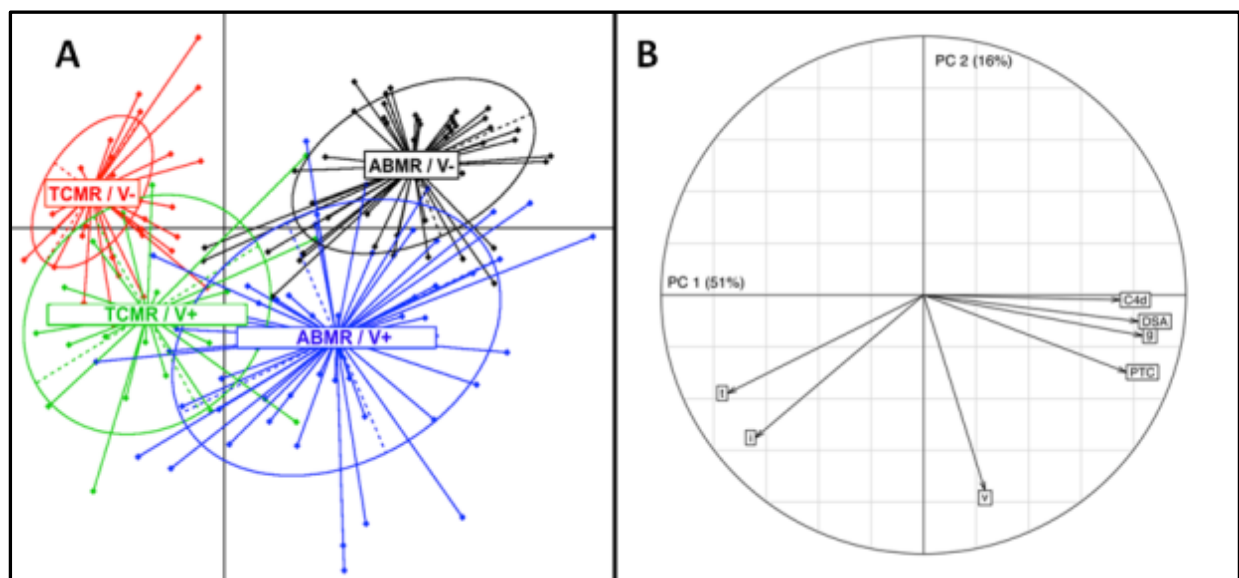


Figure 11: Analyse en composantes principales (ACP) des patients transplantés rénaux porteurs d'un diagnostic de rejet aigu d'allogreffe.

Panel A : L'ACP examine 302 patients avec diagnostic de rejet aigu confirmé histologiquement en utilisant 7 variables : DSA, glomérulite, inflammation interstitielle, tubulite, endartérite, capillarite péri-tubulaire et C4d.

TCMR/V- rejet médié par lymphocytes T sans endartérite, ABMR/V- rejet médié par anticorps sans endartérite, TCMR/V+ rejet vasculaire médié par lymphocytes T et ABMR/V+ rejet vasculaire médié par anticorps

Panel B : Le cercle de corrélations correspondant à l'ACP. L'axe horizontal est défini par DSA/glomérulite/capillarite péritubulaire/C4d en opposition à l'inflammation interstitielle/tubulite. L'axe vertical est défini par la présence de lésions d'endartérite.

Nous avons identifié l'existence de 2 nouveaux types de rejet, absents de la classification internationale en vigueur : le rejet vasculaire médié par anticorps et le rejet vasculaire médié par des lymphocytes T. Nous avons démontré que la présentation histologique et immunologique des 4 entités de rejets identifiées est aussi distincte (Figure 12). 20 (31%) des 64 patients avec rejet vasculaire médié par anticorps et 26 (36%) des 73 patients avec rejet aigu médié par anticorps sans atteinte vasculaire présentaient des DSA de classe I au moment du rejet. 44 patients (69%) avec rejet vasculaire médié par anticorps et 47 (64%) avec rejet médié par anticorps classique présentaient des DSA de classe II.

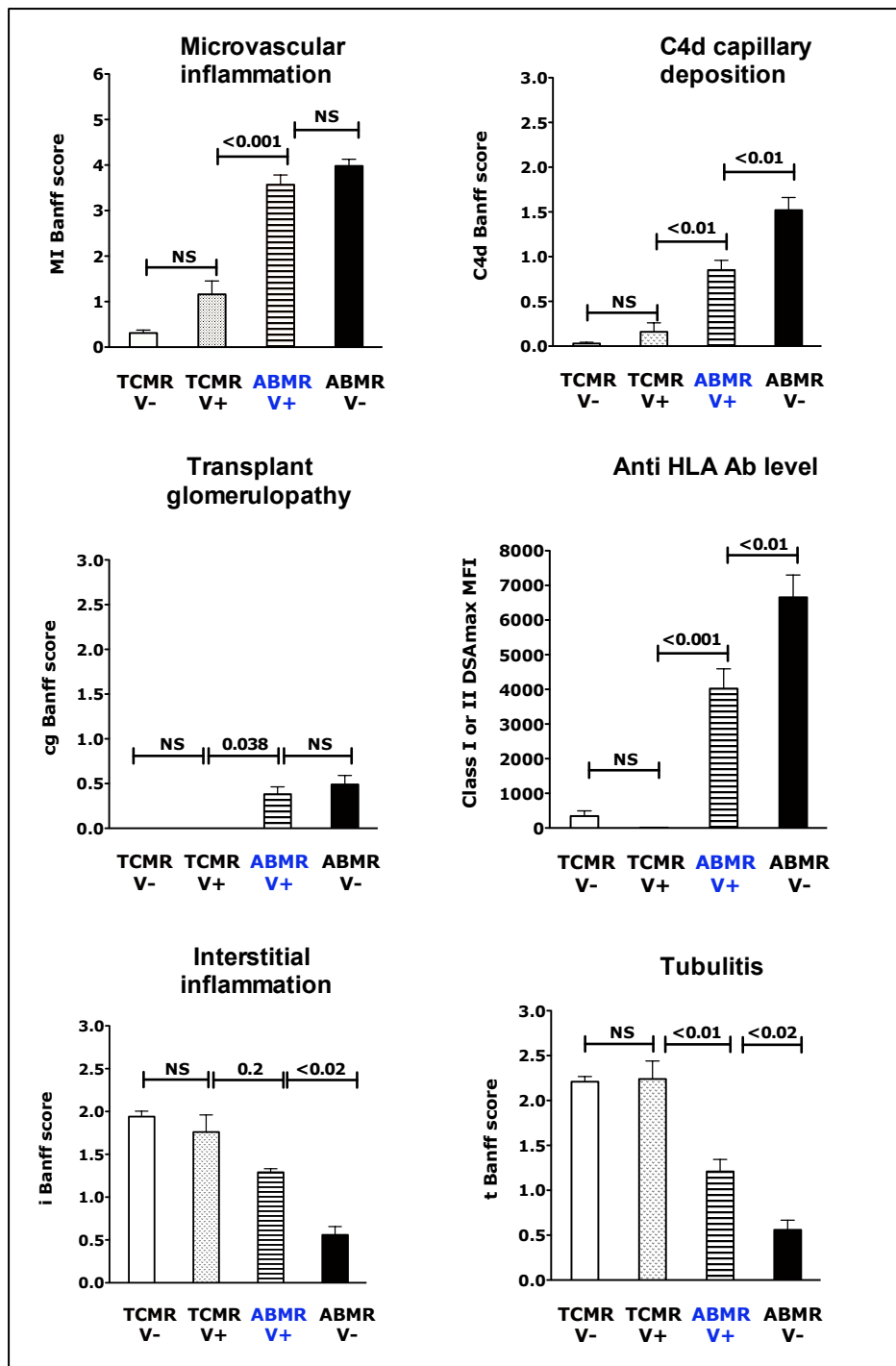


Figure 12 : Comparaison des paramètres morphologiques et immunologiques entre les 4 types de rejets aigus identifiés par l'analyse en composante principale. TCMR/V- rejet médié par lymphocytes T sans endartérite, **ABMR/V-** rejet médié par anticorps sans endartérite, **TCMR/V+** rejet vasculaire médié par lymphocytes T et **ABMR/V+** rejet vasculaire médié par anticorps

Histologiquement, le rejet vasculaire médié par anticorps se caractérise par la coexistence des lésions d'endartérite avec celles d'inflammation de la microcirculation (88%) caractéristiques d'une médiation humorale, mais aussi, et d'une manière plus surprenante, avec l'inflammation interstitielle (72%) et une tubulite modérée (62,5%) (Figure 13). Parmi les patients avec rejet vasculaire médié par anticorps, 33 (52%) présentent des lésions gradées selon la classification de Banff comme v1, 19 (30%) comme v2 et 12 (19%) comme v3. L'infiltration de l'intima artérielle est constituée de manière prédominante par des cellules CD68+, aussi présentes dans les glomérules et les capillaires péri-tubulaires. Le marquage classique des capillaires péri-tubulaires par le C4d a été positif chez 36 des patients avec rejet vasculaire médié par anticorps (56%). Toutefois, un dépôt focal ou diffus de la fraction C4d du complément a été observée dans l'intima des artères et des artérioles de la plupart des patients diagnostiqués avec un rejet vasculaire médié par les anticorps (Figure 13 panel D). Ce marquage est une démonstration du rôle pathogène du conflit antigène-anticorps et de l'activation du complément dans ce phénomène de rejet dominé par l'atteinte vasculaire.

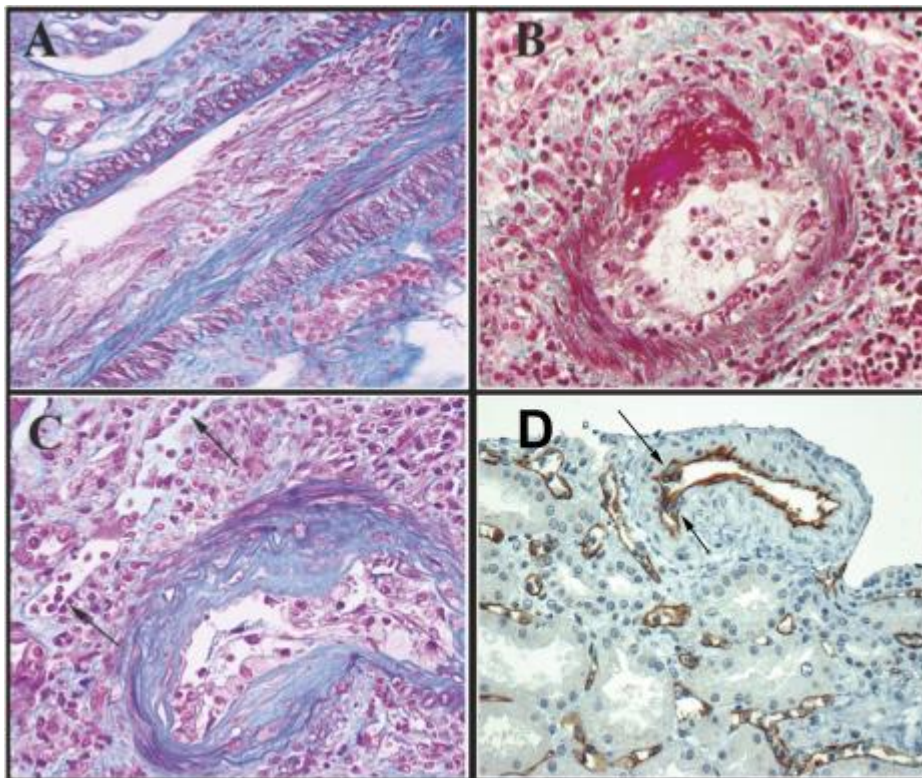


Figure 13 : Lésions histologiques et immunohistochimiques présentes dans le rejet vasculaire médié par anticorps. Panel A – Endartérite avec inflammation intimale (v2). Panel B – Artérite transmurale avec nécrose fibrinoïde (v3). Panel C – Prédominance des macrophages dans l'inflammation intimale concomitante à la capillarite péri tubulaire (flèches). Panel D – Dépôt diffus de la fraction C4d du complément au niveau de l'intima d'une coupe d'artère présentant des lésions d'endartérite (flèches). Marquage linéaire diffus concomittant des capillaires péri tubulaires .

L'identification et la caractérisation précise des rejets ont des conséquences cliniques majeures. Notamment, certains patients avec rejet vasculaire médié par anticorps (45,3 %) ont été diagnostiqués au moment de la biopsie rénale de manière erronée comme des rejets médiés par des lymphocytes T (Table 3). En conséquence, ces 42 patients ont reçu un traitement de type « rejet cellulaire » (corticoïdes, sérum anti-lymphocytaire, OKT3) et cela a eu un impact délétère significatif en termes de survie des greffons. Nous avons ainsi déterminé que les patients avec rejet vasculaire médié par anticorps qui reçoivent une thérapie de type « rejet cellulaire » ont un risque significativement plus important de perdre leur greffon que ceux qui reçoivent une thérapie de type « humorale », basée sur l'association d'échanges plasmatiques, d'IVIg et de Rituximab (log rank $p=0,35$).

	Nouvelle approche			
	TCMR/V- (n=139)	TCMR/V+ (n=26)	ABMR/V+ (n=64)	ABMR/V- (n=73)
Classification internationale				
Rejet cellulaire (n, %)	139 (100%)	24 (92,3%)	29 (45,3%)*	0
Rejet médié par anticorps (n, %)	0	2 (7,7%)	35 (54,7%)	73 (100%)
Stratégie thérapeutique				
st (n, %)	139 (100%)	19 (73%)	18 (28,1%) ^Y	0
st + [OKT3 / Thymo] (n, %)	0	5 (19,2%)	11 (17,2%) ^Y	0
st / IVIg (n, %)	0	2 (7,7%)	13 (20,3%)	29 (39,7%)
st / PP / IVIg / Rituximab (n, %)	0	0	22 (34,4%)	44 (60,3%)

Table 3 : Comparaison entre le diagnostic de rejet basé sur la classification internationale et le diagnostic proposé par la nouvelle approche.

TCMR/V- rejet médié par lymphocytes T sans endartérite, ABMR/V- rejet médié par anticorps sans endartérite, TCMR/V+ rejet vasculaire médié par lymphocytes T et ABMR/V+ rejet vasculaire médié par anticorps.

st – stéroïdes. Thymo – thymoglobuline. IVIg – immunoglobulines intraveineuses. PP – échanges plasmatiques.

* Cas de rejets vasculaires médiés par anticorps diagnostiqués comme des rejets cellulaires utilisant la classification de Banff.

^Y Cas de rejets vasculaires médiés par anticorps diagnostiqués comme des rejets cellulaires recevant une thérapie de type « rejet cellulaire ».

Les 4 entités de rejet que nous avons identifiées dans cette étude ont des profils évolutifs distincts. Nous avons déterminé que les patients porteurs d'un rejet vasculaire médié par anticorps ont la moins bonne survie des greffons (82,5% à 24 mois et 50,3% à 72 mois) par rapport aux patients avec rejet médié par anticorps sans endartérite (93,8% à 24 mois et 82,6% à 72 mois) et aux patients avec rejet cellulaire avec et sans endartérite (95,6% et 97,7% respectivement à 24 mois et 91,3% et 93,2% respectivement à 72 mois) ($p < 0,0001$). Cette population que nous avons identifiée comme ayant le risque le plus élevé de perte de greffons n'est actuellement pas reconnue par la classification internationale (Figure 14). Nous démontrons par analyse de Cox que le risque de perte de greffons est 9,07 fois plus élevé (95%CI 3,62-19,7) chez les patients avec rejet vasculaire médié par anticorps que chez les patients diagnostiqués avec rejet médié par des lymphocytes T ($p < 0,0001$). En comparaison, le rejet médié par anticorps sans endartérite augmente ce risque de seulement 2,93 fois (1,1-7,9 ; $p = 0,0237$).

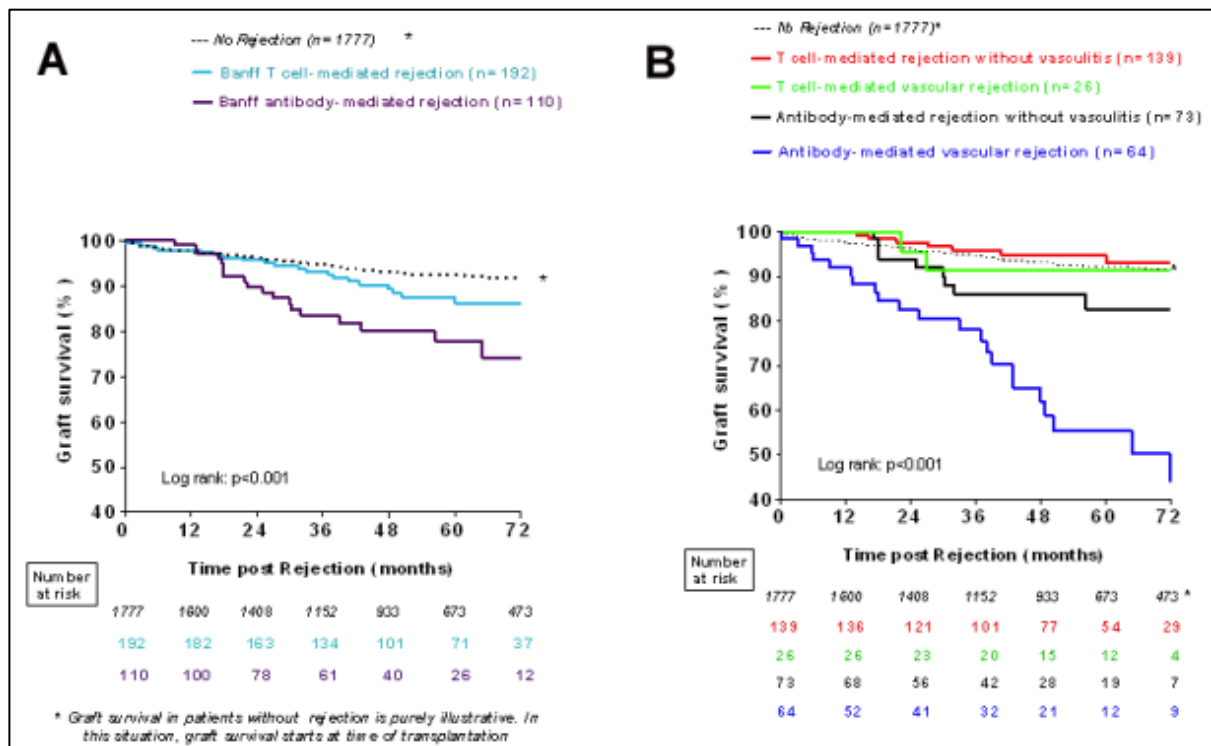


Figure 14 : Courbes de survie des greffons rénaux selon le phénotype de rejet : Panel A – diagnostics définis selon la classification internationale actuelle de Banff et Panel B – selon la nouvelle approche.

Afin de déterminer les facteurs associés au mauvais pronostic des rejets vasculaires médiés par anticorps, nous avons construit un modèle de Cox univarié, incluant l'ensemble des données cliniques au moment de la greffe (âge et sexe du donneur et du receveur, ischémie froide), associées aux données histologiques (paramètres histologiques gradés selon la classification de Banff), immunohistochimiques (C4d), immunologiques (présence et titre de DSA) et thérapeutiques. Les éléments pertinents ($p < 0,20$) ont été inclus dans une analyse multivariée de Cox. Nous avons ainsi démontré que l'existence d'un score élevé d'inflammation interstitielle et d'endartérite au moment des biopsies, que la présence de DSA à fort titre et que le type de traitement utilisé sont des facteurs indépendants associés à la perte de greffons chez les patients avec rejet vasculaire médié par anticorps (Table 4).

Variables	Nombre de patients	Nombre d'événements	Hazard Ratio	95% CI	p
Score d'inflammation interstitielle et tubulite †† ≤3	32	7	1	–	–
Score d'inflammation interstitielle et tubulite †† >3	32	14	4,33	1,5 – 12,1	0,005
Endartérite <3	52	15	1	–	–
Endartérite =3	12	6	5,17	1,8 – 14,6	0,002
DSA _{max} MFI <3000	38	9	1	–	–
DSA_{max} MFI >3000	20	12	3,88	1,5 – 9,8	0,004
Stéroïdes / IVIg	13	7	1	–	–
Stéroïdes ± [OKT3 / Thymo]	29	11	0,37	0,2 – 1,2	0,081
Stéroïdes/PP/IVIg/Rituximab	22	3	0,16	0,04 – 0,66	0,01

Table 4 : Facteurs associés à la perte de greffons chez les patients présentant un rejet vasculaire médié par anticorps : analyse multivariée

CI - intervalle de confiance

†† score d'inflammation interstitielle et de tubulite défini par la somme du score d'inflammation interstitielle et le score de tubulite, gradé de 0 à 6.

DSA_{max} MFI – MFI maximum des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur. IVIg – immunoglobulines intraveineuses. OKT3 – muromonab-CD3. Thymo – thymoglobuline. PP – échanges plasmatiques.

Conclusion de l'étude

Grâce à une approche en population, nous avons identifié 4 entités de rejets distinctes du point de vue clinique, histologique et immunologique qui ne sont pas reconnues comme telles par la classification internationale en vigueur.

Deux types de rejet sont associés à la présence de DSA : le rejet médié par anticorps « classique », sans lésions d'endartérite, et le rejet vasculaire médié par anticorps. Ces deux entités de rejet ont les survies de greffons les plus basses par rapport aux autres types de rejet et à la population générale des transplantés rénaux.

Nous apportons des données sur la performance des éléments utilisés pour leur diagnostic. Parmi eux, la détection des DSA est l'élément le plus informatif.

Cette étude démontre dans un modèle humain, que l'impact des DSA dépasse l'atteinte endothéliale de la microcirculation et est responsable d'une atteinte de l'endothélium au niveau de la macrocirculation. Ces résultats supportent les données apportées par les modèles murins sur l'existence d'une composante immunologique,

2) Rôle des anticorps anti-HLA fixant le complément et stratification du risque de perte du greffon

a) Positionnement du problème

Nous avons démontré dans le chapitre précédent que la présence ou l'absence d'anticorps anti-HLA spécifiques du donneur a une valeur prédictive modeste pour la survenue des rejets humoraux et pour la perte de greffons. Il existe un besoin évident de définir des profils distincts de DSA, en se basant sur leurs caractéristiques immunologiques et leur association à des phénotypes cliniques et histologiques distincts corrélés à l'évolution des greffons. Dans le contexte d'émergence de nouvelles thérapies, incluant les inhibiteurs du complément, l'identification d'une population à risque élevé de perte de greffon pourrait être particulièrement utile pour définir des stratégies thérapeutiques adaptées et ainsi augmenter la survie à long terme des greffons.

L'activation de la cascade du complément joue un rôle important dans le phénomène de rejet aigu humoral. Toutefois, dans une vision plus générale, le rôle du complément dans l'évolution de la greffe et dans le processus d'humoralité reste mal défini. Ceci est principalement dû au fait que, depuis 2 décennies, l'évaluation du complément dans la transplantation s'est limitée à celle du dépôt de la fraction C4d dans le greffon. Or nous avons compris récemment que le marquage C4d manque de sensibilité et qu'il n'est pas le meilleur marqueur, ni pour définir l'activité humorale, ni pour définir le pronostic des greffons. D'autres outils sont nécessaires pour évaluer le rôle de l'activation du complément en transplantation rénale.

Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur la première étape de l'activation du complément : la fixation de la fraction C1q du complément aux anticorps anti-HLA et nous avons corrélé ces propriétés des anticorps à l'histologie et au dépôt de C4d dans le greffon. Le C1q relie l'immunité humorale adaptative au système du complément en se fixant aux complexes antigènes-anticorps. C'est une molécule du complexe C1, qui comprend une

molécule C1q liée à deux molécules de chaque zymogène C1r et C1s. C'est un hexamère comportant 2 sous-unités formant un domaine globulaire avec une queue de type collagène en triple hélice. Dans l'hexamère de C1q, les six têtes sont liées entre elles par leur queue de type collagène qui entoure le complexe C1r-C1s (Figure 15). La liaison de plusieurs têtes de C1q à la région constante Fc des anticorps provoque un changement de conformation au niveau du complexe C1r- C1s qui déclenche l'activité autocatalytique des C1r. La forme active de C1r clive alors le C1s pour générer une sérine protéase active ¹¹⁰.

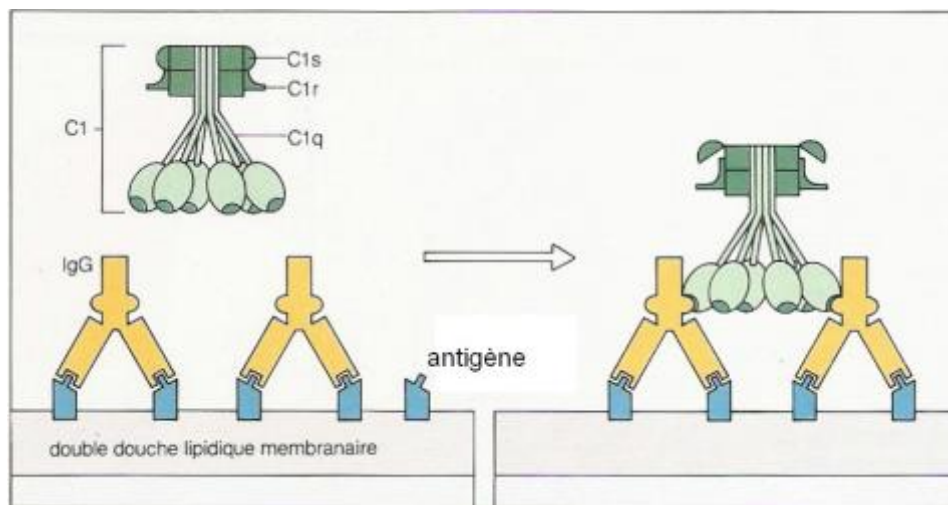


Figure 15 : Le C1 est la première protéine de la voie classique du complément. C'est un complexe constitué du C1q, du C1r et du C1s. Les têtes globulaires peuvent se lier aux régions constantes des immunoglobulines, ce qui change la conformation du C1r, qui peut alors cliver et activer le zymogène C1s.

L'objectif de cette étude est d'associer cette propriété des DSA à fixer le complément aux phénotypes histologiques, immunohistochimiques et cliniques pertinents Notre hypothèse est que la détection de la capacité des DSA à fixer le complément peut augmenter les performances prédictives de la détection d'anticorps anti-HLA.

b) Population d'étude

Cette étude en population inclut l'ensemble des patients qui ont reçu une greffe rénale entre janvier 2004 et janvier 2010 dans deux centres majeurs de transplantation en Ile de France (Hôpital Necker et Hôpital Saint-Louis). 1016 patients ont été inclus : 695 patients transplantés à l'Hôpital Necker et 321 à l'Hôpital Saint-Louis. Les résultats sont validés sur une cohorte externe, représentée par la population de patients transplantés rénaux à l'Hôpital Foch pendant la même période. Les patients ont été suivis jusqu'au 15 avril 2012. Le suivi moyen post transplantation a été de 4,75 ans (0,2-7).

La force de cette étude est de réaliser une analyse concomitante des caractéristiques des anticorps anti-HLA et de leurs conséquences dans le greffon. J'ai construit le design de cette étude en conséquence : l'ensemble des patients a été évalué au moment de la transplantation pour la présence de DSA, leurs MFI et leur propriété à fixer le complément. Tous les patients inclus dans cette étude ont été évalués en post transplantation pour la présence de DSA, leurs MFI, leur capacité à fixer le complément, l'histologie du greffon et la présence de C4d sur les biopsies. Cette évaluation a été faite au moment le plus informatif de la première année post transplantation : au moment du rejet (pour les 171 patients présentant un épisode de rejet aigu dans la première année) et à 1 an pour le reste de la population (Figure 16).

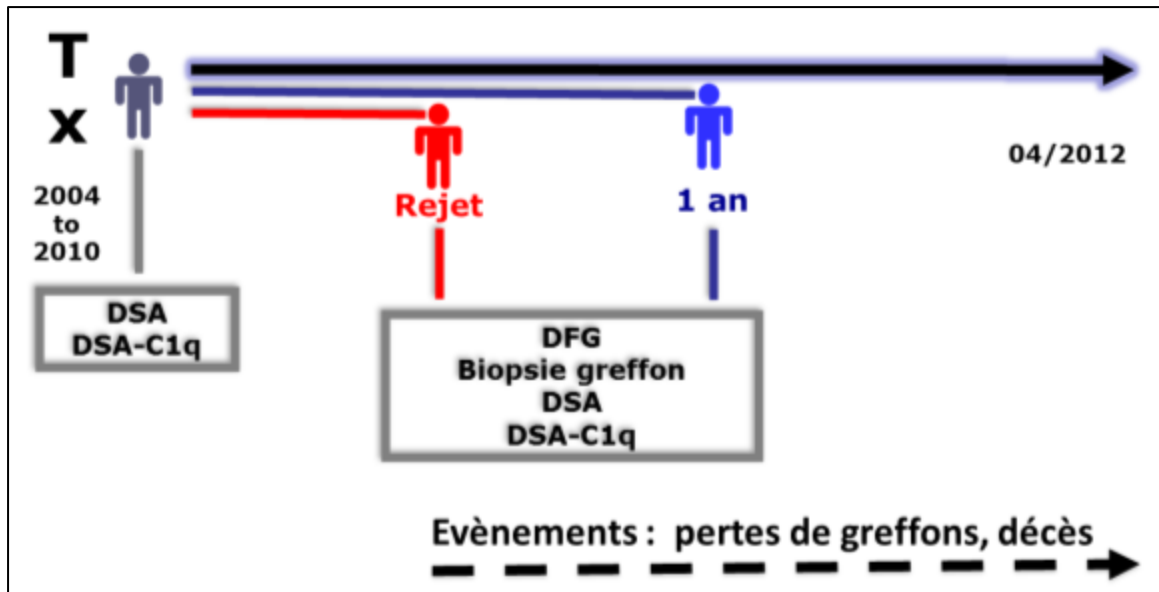


Figure 16 : Design de l'étude visant à déterminer le rôle des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur fixant le complément en transplantation rénale.

c) Techniques

La présence d'anticorps anti-HLA-A, -B, -DR et -DQ circulants spécifiques du donneur a été rétrospectivement analysée par technique Luminex haute définition *Single Antigen* (One Lambda, Canoga Park, CA, Etats Unis) sur une plateforme Luminex. Toutes les billes présentant une MFI normalisée supérieure à 500 ont été considérées comme positives. Nous avons enregistré, pour chacun des patients, le nombre, les spécificités, et les MFI des anticorps anti-HLA ainsi détectés.

Chez les patients chez qui nous avons mis en évidence la présence de DSA, nous avons analysé à l'aveugle leur capacité à fixer le complément en utilisant la même technique Luminex (C1qScreen™, OneLambda, Canoga Park, CA, USA). Brièvement, les sérums inactivés par la chaleur (56°C pendant 30 minutes) ont été incubés avec 150 µg/ml de C1q purifié humain dans un tampon HEPES (One Lambda) afin d'assurer l'égalité des quantités fonctionnelles de C1q par échantillon. Les billes, couvertes chacune d'une spécificité antigénique différente, ont été incubées pendant 20 min à température ambiante, avant d'y ajouter un anticorps anti-C1q humain conjugué à de la phycoérythrine. Les billes ont été

lavées 2 fois et analysées par le LABSan200. Les valeurs négatives varient entre 0 et 30 de MFI, la plupart avec des MFI < 10. Les billes présentant des MFI normalisées supérieures à 500 ont été considérées comme positives (Figure 17).

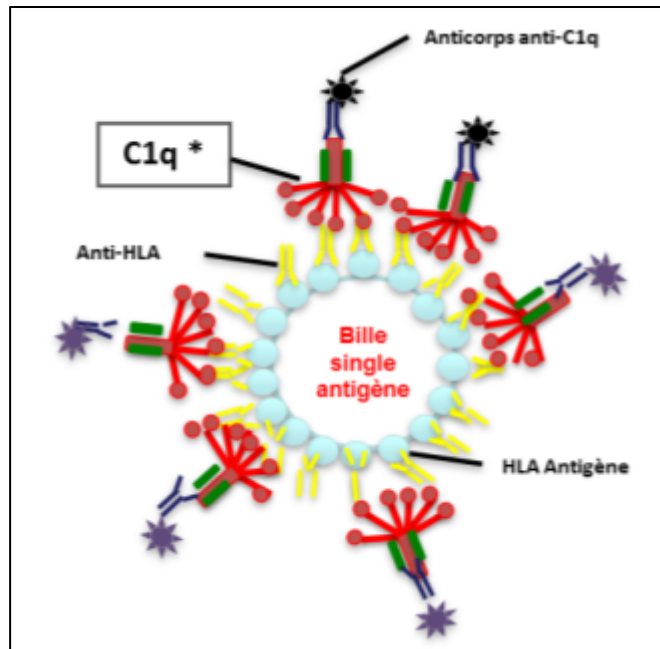


Figure 17 : Détection des anticorps anti-HLA fixant la fraction C1q du complément par technique Luminex Single Antigen.

Toutes les biopsies des greffons ont été réexaminées rétrospectivement par deux pathologistes, en aveugle des données cliniques. Nous avons intégré les données histologiques des biopsies des greffons réalisées concomitamment à la recherche des DSA : pour 171 patients, nous avons analysé les biopsies au moment du rejet et pour 845 patients les biopsies à 1 an. Toutes les biopsies ont été classifiées et notées de 0 à 3 selon les critères actuels de Banff ^{18,21} pour les lésions histologiques suivantes : inflammation glomérulaire (glomérulite, g), tubulite (t), inflammation interstitielle (i), capillarite péri tubulaire (ptc), endartérite (v), glomérulopathie du transplant (TG), fibrose interstitielle et atrophie tubulaire (FIAT), artériosclérose (cv) et hyalinose artériolaire (ah). Le score d'inflammation au niveau de la microcirculation a été défini par la somme de la gradation de la glomérulite et de la capillarite péri tubulaire. Le marquage C4d a été réalisé par technique

d'immunohistochimie sur des coupes de paraffine en utilisant un anticorps anti-C4d polyclonal humain (Biomedica Gruppe, Vienne, Autriche).

d) Approche méthodologique

La première partie de l'étude est une étude d'association qui corrèle la capacité des anticorps anti-HLA à fixer le complément à des profils histologiques et cliniques distincts.

Nous avons estimé l'impact du statut C1q des DSA sur la survie des greffons par analyse des courbes de survie selon la méthode de Kaplan-Meier et par analyses de Cox. Pour déterminer les facteurs indépendants associés à la perte de greffons, nous avons construit un modèle multivarié par blocs de variables, incluant l'ensemble des caractéristiques cliniques, histologiques, fonctionnelles et immunologiques. Le bloc immunologique intègre la présence de DSA et leur statut C1q au moment de la greffe et en post transplantation.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué le gain de performance prédictive ajoutée par l'intégration du test du C1q. Pour cela, nous avons comparé un modèle de stratification du risque « de référence » au modèle intégrant le test du C1q. En l'absence de modèle validé de prédiction du risque de perte de greffon en transplantation, nous avons constitué un modèle « de référence » basé sur le résultat de l'étude multivariée des facteurs prédictifs classiques. Nous avons comparé ce modèle à celui intégrant le statut C1q des DSA en évaluant leurs AUC (C statistics) et en déterminant les index de reclassification (NRI) et de discrimination (IDI) ¹¹¹.

e) Résultats

Nous avons identifié 3 groupes de patients selon le statut C1q des DSA détectés en post-transplantation : les patients sans DSA (DSA-, n=700, 69%), les patients avec des DSA qui ne fixent pas le complément (DSA+/C1q-, n=239, 23%) et les patients avec des DSA qui fixent le complément (DSA+/C1q+, n=77, 8%). Les anticorps qui fixent le complément représentent 24% de l'ensemble des DSA détectés dans la première année post transplantation.

La table 9 décrit l'ensemble des caractéristiques des 3 groupes de patients. Globalement, nous ne montrons pas de différences majeures entre les patients DSA+/C1q- et ceux DSA+/C1q+ en dehors de taux plus élevés de retransplantation et de receveurs immunisés dans le groupe DSA+/C1q+.

Patients	Population générale (N=1016)		DSA- (N=700)		DSA+ C1Q- (N=239)		DSA+ C1Q+ (N=77)		P ^Y
	N		N		N		N		
Age receveur — ans †	1016	47,6 ± 13	700	47,8 ± 13	239	46,5 ± 13	77	48,3 ± 13	0,2905
Receveur de sexe masculin — no. (%)	1016	599 (59%)	700	436 (62%) *	239	124 (52%)	77	39 (51%)	0,8506
Re-transplantation — no. (%)	1016	181 (18%)	700	78 (11%)***	239	70 (29%)	77	33 (43%)	0,0272
Durée dialyse — ans †	874	4,9 ± 4,7	593	4,4 ± 4 **	208	5,6 ± 5	73	6,5 ± 6	0,2592
Age donneur (ans) †	1016	51 ± 16	700	51,3 ± 16	239	50,1 ± 17	77	51,8 ± 16	0,4419
Donneur de sexe masculin — no. (%)	1016	559 (55%)	700	387 (55%)	239	129 (54%)	77	43 (56%)	0,7746
Donneur cadavérique — no. (%)	1016	835 (82%)	700	550 (79%)***	239	213 (89%)	77	72 (94%)	0,2606
Ischémie froide (heures) †	1016	17 ± 9,6	700	16,6 ± 10 *	239	18,1 ± 9	77	20,3 ± 9	0,0598
Etiologie de la néphropathie	1016		700		239		77		
Diabète — no. (%)		101 (9,9%)	-	76 (10,9%)	-	19 (8,0%)	-	6 (7,8%)	
Vasculaire — no. (%)		82 (8,1%)	-	57 (%)	-	19 (8,0%)	-	6 (7,8%)	
Glomérulopathie — no. (%)		267 (26,3%)	-	180 (25,7%)	-	65 (27,2%)	-	22 (28,6%)	
Congénitale — no. (%)		185 (18,2%)	-	131 (18,7%)	-	43 (18,0%)	-	11 (14,3%)	
Autre — no. (%)		48 (4,7%)	-	27 (3,9%)	-	15 (6,3%)	-	6 (7,8%)	
Interstitielle no. (%)		120 (11,8%)	-	82 (11,7%)	-	29 (12,1%)	-	9 (11,7%)	
Indéterminée — no. (%)		213 (21,0%)	-	147 (21,0%)	-	49 (20,5%)	-	17 (22,1%)	0,9923
Immunologie									
HLA A/B/DR mis match †	1016	3,2 ± 1,5	700	3,1±1,5 **	239	3,5±1,4	77	3,3±1,4	0,1791
Groupe sanguin receveur A/B/O/AB — no.	1016	461/94/424/37	700	312/58/305/25	239	115/27/87/10	77	34/9/32/2	0,8015
Ac anti-HLA à J0 — no. (%)	1016	345 (34%)	700	132 (19%)***	239	153 (64%)	77	60 (78%)	<0,0001
DSA à J0 — no. (%)	1016	196 (19%)	700	10 (1%)***	239	128 (54%)	77	58 (75%)	<0,0001
Classe DSA à J0 I/II/I+II — no	1016	125/246/82	700	8/6/5	239	81/98/57	77	36/42/20	0,8356

Table 5 : Caractéristiques de la population d'étude. Identification de 3 groupes de patients selon la détection d'anticorps anti-HLA spécifiques du donneur fixant le complément en post transplantation.

DSA- — patients sans DSA post transplantation. *DSA+/C1q-* — patients avec des DSA post transplantation qui ne fixent pas le complément. *DSA+/C1q+* — patients avec des DSA post transplantation fixant le complément. *J0* — jour de la transplantation.

p^Y — p résultant de la comparaison entre les patients *DSA+/C1q-* et *DSA+/C1q+*

* — $p < 0,01$. ** — $p < 0,001$. *** — $p < 0,0001$ — p résultant de la comparaison entre les patients *DSA-* et *DSA+*.

† — Moyennes \pm SD

Parmi les patients *DSA+/C1q-*, 128 (54%) étaient immunisés au moment de la greffe, dont 22 (8%) présentaient des DSA qui fixaient le complément le jour de la transplantation. Dans le groupe des patients *DSA+/C1q+*, 58 (77%) étaient immunisés au moment de la transplantation, dont seulement 23 (30%) avaient des DSA avec la capacité à fixer le complément. La plupart des patients *DSA+/C1q+* en post transplantation (54 pts, 70%) présentaient des DSA détectables par technique Luminex au moment de la greffe, mais ces anticorps n'avaient pas la propriété de fixer le complément au moment de la greffe.

Les caractéristiques des anticorps qui fixent le complément sont résumées dans la Table 6. Le plus souvent, dans 86% des cas, les patients présentent un seul DSA qui fixe le C1q dans la première année post transplantation. Dans notre cohorte, les *DSA/C1q+* sont majoritairement de classe II (69%) et ont des MFI plus élevées que celles des *DSA/C1q-*.

Caractéristiques		DSA+	DSA+	P
		C1q- (n=239)	C1q+ (n=77)	
Nombre DSA/patient	1	111 (46%)	66 (86%)	<0,0001
	≥ 2	128 (54%)	11 (14%)	
DSA Classe	Classe I	127 (53%)	29 (38%)	<0,001
	Classe II	183 (77%)	53 (69%)	
	Classe I&2	73 (31%)	5 (7%)	
C1q DSA à J0	1	116 (49%)	54 (70%)	<0,0001
	0	153 (64%)	23 (30%)	
DSA MFI	Moyenne ± sd	2748 ± 3052	9107 ± 4622	<0,0001

Table 6 : Caractéristiques des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur fixant le complément.

DSA+/C1q- — patients avec des DSA post transplantation ne fixant pas le complément

DSA+/C1q+ — patients avec des DSA post transplantation fixant le complément

La présence de DSA/C1q+ circulants post transplantation s'associe à la présence de lésions humorales dans les greffons. Parmi les patients DSA+/C1q+, 67 (87%) ont des lésions d'inflammation au niveau de la microcirculation, 28 (36%) ont une inflammation interstitielle avec un score ≥ 2 et 17 (22%) ont une glomérulopathie du transplant. Nous observons un dépôt de la fraction C4d du complément chez 47 (61%) des patients DSA+/C1q+. Les patients DSA+/C1q+ ont des scores d'inflammation de la microcirculation, de glomérulopathie du transplant et de C4d supérieurs à ceux des patients DSA+/C1q- et des patients DSA- (Figure 18).

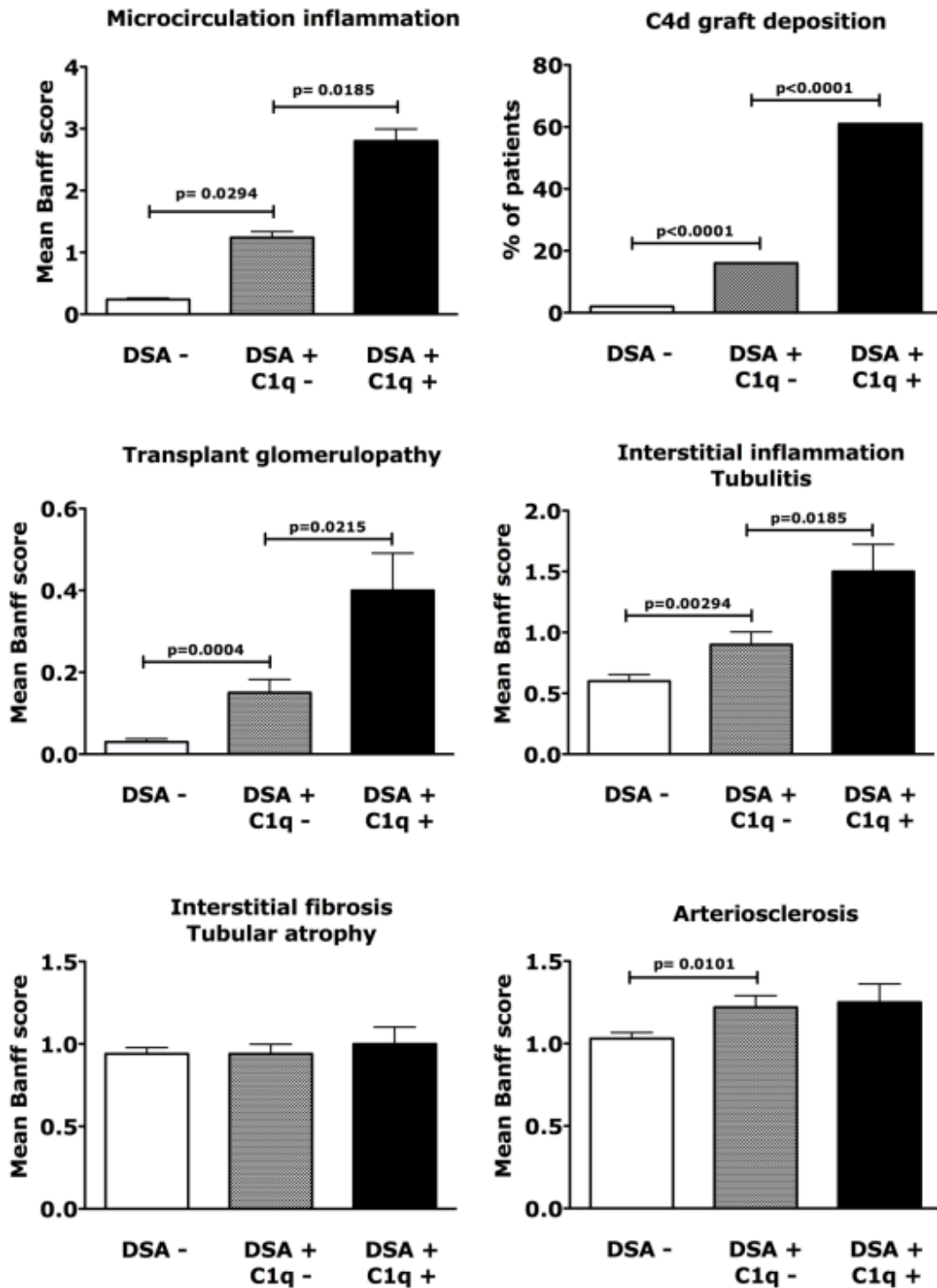


Figure 18 : Phénotype histologique des biopsies des greffons selon la présence de DSA et leur capacité à fixer le complément.

DSA+/C1q- — patients avec des DSA post transplantation ne fixant pas le complément

DSA+/C1q+ — patients avec des DSA post transplantation fixant le complément

DSA- — patients sans DSA

Les phénotypes immunologiques et histologiques s'associent aussi à des profils évolutifs distincts. La fonction rénale au moment des biopsies est significativement moins bonne chez les patients DSA+/C1q+ (DFG estimé à 42 ± 22 mL/min/1,73m²) que chez les patients DSA+/C1q- et chez les patients DSA- (DFG estimé à 51 ± 20 mL/min/1,73m² et 54 ± 19 mL/min/1,73m² respectivement, $p < 0,0001$). Aussi, en termes de survie à 5 ans des greffons, nous démontrons que les patients DSA+/C1q+ ont des survies significativement moins bonnes (54%) que celles des patients DSA+/C1q- et des patients sans DSA (93% et 94% respectivement) (Figure 19, $p < 0,0001$).

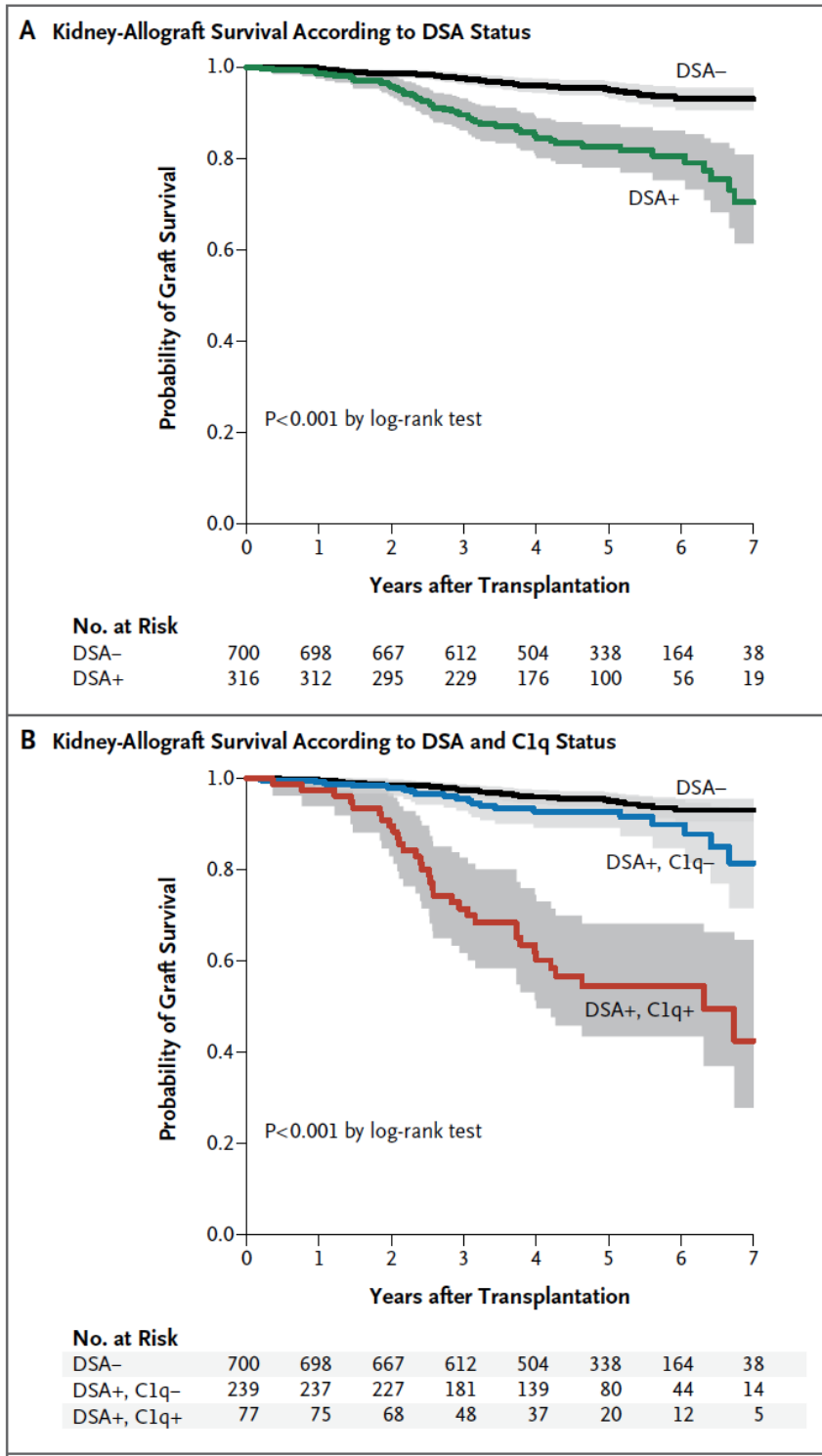


Figure 19 : Courbes de survie des greffons selon le statut des DSA détectés en post transplantation: (Panel A) approche classique qui consiste à détecter les DSA par technique Luminex SA (Panel B) nouvelle approche basée sur la propriété des DSA à fixer le complément.

Le risque de perte de greffons est 5,9 fois plus important chez les patients DSA+/C1q+ par rapport aux patients DSA-/C1q- (95%CI 3,4-10,2). Ce risque reste significativement plus élevé chez les patients DSA+/C1q+ et à un niveau comparable, indifféremment du moment de la détection des DSA /C1q en post transplantation : au moment du rejet (RR 4,630, 95% CI 1,83-11,24, p=0,0011) ou à 1 an post greffe (RR 5,69, 95%CI, 1,67-19,40, p=0,0054).

Pour 32% des patients avec des DSA dont les MFI sont supérieures à 6000 (considérés à haut risque selon les résultats de l'étude antérieure), les DSA n'ont pas la capacité à fixer le complément, et en conséquence leur risque de perte de greffons n'est pas plus élevé. Nous démontrons par une analyse de Cox que l'association des DSA+/C1q+ à la perte de greffons est indépendante des seuils des MFI des DSA détectés par Luminex SA (Table 7).

		Nombre de patients	Nombre d'événements	HR	95%CI	P
MFI DSA	< 2000	141	9	1		
	≥ 2000 – 6000	101	22	1,847	[0,779; 4,383]	
	≥ 6000	74	22	1,739	[0,659; 4,590]	0,3786
DSA C1q	Non	239	20	1		
	Oui	77	33	4,479	[2,233; 8,983]	<0,0001

Table 7 : Analyse d'association entre l'intensité des DSA en post transplantation (MFI), leur capacité à fixer le complément et le risque de perte de greffon.

Nous observons une variabilité de la capacité des DSA à fixer le complément entre le moment de la transplantation et en post transplantation. Les patients chez qui nous mettons en évidence l'apparition en post transplantation de cette propriété (DSA /C1q- à J0 devenant DSA /C1q+ en post transplantation) et les patients dont les DSA gardent cette capacité à fixer le complément en post transplantation (DSA /C1q+ à J0 restant DSA /C1q+ en post greffe) ont les risques les plus importants de perte de greffon (Figure 20).

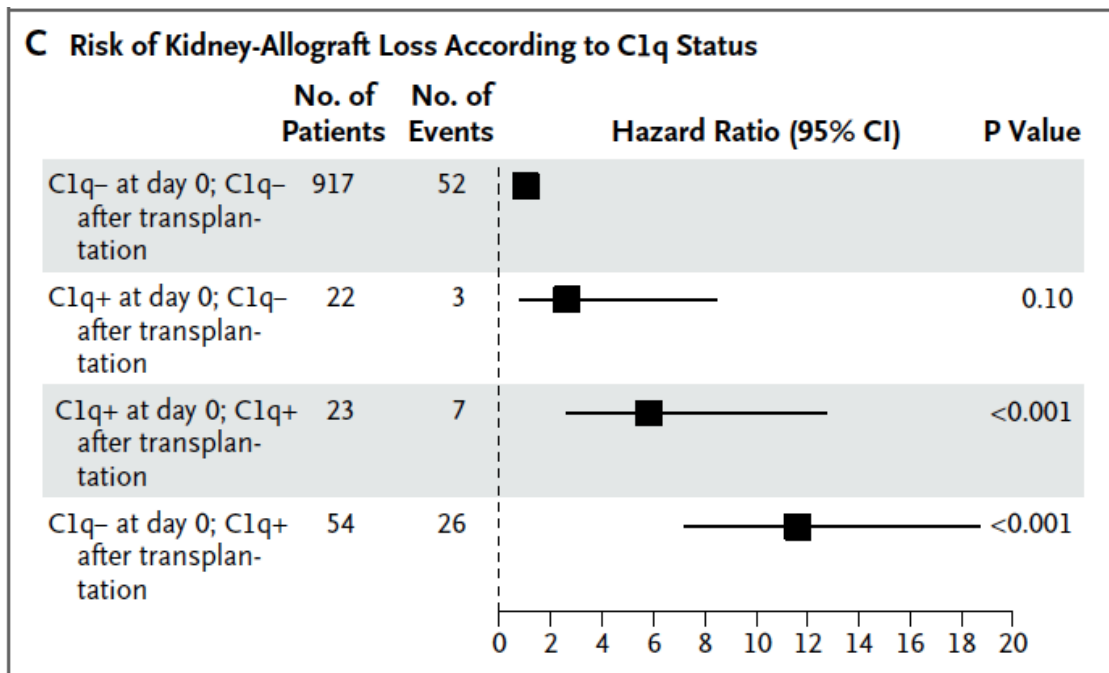


Figure 20 : Evaluation du risque relatif de perte de greffon selon l'évolution de la capacité des DSA à fixer le complément entre le moment de la greffe et en post-transplantation.

Le modèle multivarié final (backward stewise) est présenté en Table 8

Table 3. Clinical, Functional, Histologic, and Immunologic Factors Associated with Kidney-Graft Loss (Multivariate Analysis).*				
Variable	No. of Patients	No. of Events	Hazard Ratio (95% CI)	P Value
Estimated GFR at 1 yr				
≥60 ml/min/1.73 m ²	313	7	1.00	
≥30 and <60 ml/min/1.73 m ²	579	36	2.45 (1.09–5.53)	
<30 ml/min/1.73 m ²	111	42	12.49 (5.56–28.06)	<0.001
Interstitial fibrosis and tubular atrophy†				
Low score: 0 or 1	738	45	1.00	
High score: 2 or 3	265	40	2.22 (1.41–3.49)	0.005
Glomerular and peritubular inflammation and transplant glomerulopathy				
No	809	42	1.00	
Yes	194	43	2.26 (1.31–3.89)	0.003
C1q-binding donor-specific anti-HLA antibodies after transplantation				
No	928	52	1.00	
Yes	75	33	4.78 (2.69–8.49)	<0.001

* Risk factors were identified with the use of backward elimination, with a P value of 0.05 or lower for retention in the model.

† Banff scores range from 0 to 3, with higher scores indicating more severe abnormality.

Table 8 : Modèle final de l'analyse multivariée des facteurs associés à la perte de greffons. Le modèle final est constitué de l'ensemble des paramètres significativement associés à la perte de greffons dans chacun des blocs.

DFG — débit de filtration glomérulaire. *DSA* — anticorps anti-HLA spécifiques du donneur.

En se basant sur cette association forte, nous avons construit un modèle de stratification du risque en transplantation rénale. Nous proposons cette stratification dans la première année après la transplantation : au moment du rejet ou à 1 an post transplantation pour les patients sans rejet dans cette première année. Nous démontrons que l'addition de la propriété des DSA à fixer le complément augmente significativement les performances du modèle de référence, notamment sa capacité à discriminer les patients qui vont perdre ou non leur greffon (AUC 0,845 vs 0.834), la capacité de reclassification adéquate des patients (NRI 0,47, 85% CI 0,25-0,68) et leur discrimination (IDI 0,025, p=0,028).

Conclusion de l'étude

La propriété des DSA à fixer le complément augmente significativement le risque de perte de greffons dans les 5 ans post transplantation. Nous avons identifié une population de patients ayant développé dans la 1^{ère} année suivant la transplantation des DSA qui fixent le complément. Ils présentent un risque majeur de perte de greffons. Jusqu'à présent, l'impact de ces DSA ayant la propriété de fixer le complément, identifiés par des techniques sensibles, n'a pas été évalué.

En présence de DSA fixant le complément, le phénotype histologique observé dans les biopsies des greffons est dominé par la présence de lésions humorales.

Il n'existe pas de corrélation absolue entre la capacité des DSA à fixer le complément et le dépôt de la fraction C4d dans le greffon. Nous démontrons que la détection des DSA fixant le complément a une meilleure performance diagnostique que le C4d, marqueur classique d'activation du complément dans le greffon.

Nous démontrons que la capacité des DSA à fixer le complément augmente la performance pronostique des DSA en post transplantation.

3) Intérêt du diagnostique précoce du rejet dans la survie des greffons

a) *Positionnement du problème*

Avec l'amélioration majeure des résultats des greffes à court terme, la perte tardive des greffons est devenue la première cause d'échec de la transplantation rénale. Elle est la conséquence de multiples facteurs: d'une part des facteurs non immunologiques liés au donneur, aux séquelles de l'ischémie/reperfusion, à la toxicité rénale des immunosuppresseurs, et aux récurrences des maladies rénales sur le greffon, et d'autre part, des facteurs immunologiques regroupés sous le terme de rejet chronique.

Depuis 1991, la classification de Banff permet de quantifier les lésions et d'harmoniser les données histologiques afin de faciliter l'évaluation des nouveaux traitements immunosuppresseurs dans le cadre d'essais multicentriques. Elle repose sur une analyse méthodique des lésions histologiques de l'interstitium, des tubules, des glomérules et des vaisseaux, permettant d'établir des scores semi-quantitatifs. Depuis sa première version parue en 1993, la classification de Banff est rediscutée et améliorée à l'occasion d'une conférence internationale biennale ¹¹². Elle présente ainsi l'intérêt d'évoluer au rythme des connaissances et de la recherche. Au cours des 15 dernières années, les remaniements de la classification ont souligné l'importance du rôle des anticorps dans le processus de rejet. Ainsi en 2001, la description des dépôts de fragments du complément activé (C4d) sur les capillaires péritubulaires (cpt) a permis de décrire les lésions morphologiques en rapport avec un rejet humoral aigu ou chronique ¹¹². Puis en 2011, la 11^{ème} conférence a mis l'accent sur l'existence de rejets humoraux authentiques sans dépôt de C4d et sur les manifestations multiples du rejet humoral, notamment sur son rôle prépondérant dans le rejet chronique ²¹. Au total, l'expression clinique du rejet s'est considérablement modifiée, et les rejets suraigus historiques ont laissé place à des formes

plus indolentes, mais également plus difficiles à détecter par le monitoring conventionnel du débit de filtration glomérulaire (DFG).

La ponction biopsie rénale demeure donc la clé du diagnostic histologique des atteintes rénales en transplantation; elle est également un outil pronostique capital et permet de guider les choix thérapeutiques. On distingue les biopsies à visée diagnostique (ou « pour cause ») et les biopsies dites de dépistage (ou protocolaires) réalisées systématiquement par certaines équipes de greffe, dont celle de l'Hôpital Necker. Dans le travail de référence de Nankivell et coll. ¹¹³, des biopsies protocolaires séquentielles ont ainsi permis de démontrer que l'aggravation histologique précédait toujours la détérioration fonctionnelle. Ces lésions de rejet, qui ne se sont pas encore traduites par une dysfonction du greffon, ont alors permis de définir le terme de rejet infraclinique ou « subclinical rejection » ¹¹⁴.

Le rejet infraclinique, dont l'incidence varie de 15 à 50%, a été initialement attribué à un processus immunologique à médiation cellulaire. Les différentes études ont montré, d'une part que le rejet infraclinique était associé à une augmentation du risque de perte du greffon, et d'autre part que le traitement par corticostéroïdes de ces lésions pouvait permettre d'améliorer la fonction rénale.

Récemment, parmi les patients présentant des anticorps anti-HLA (Human Leukocyte Antigen) spécifiques du donneur préformés au moment de la transplantation, une nouvelle entité clinique a été mise en évidence: le rejet humoral infraclinique ¹⁶. En effet chez ces patients, il apparaît des lésions d'inflammation microcirculatoire (glomérulite et capillarite périlobulaire) associées ou non à une positivité du marquage C4d. Initialement, ces lésions ne s'accompagnent pas de modification de la fonction rénale. Cependant, au fil du temps vont apparaître des lésions de glomérulopathie chronique d'allogreffe (aspect en doubles contours des membranes basales glomérulaires, hyperplasie mésangiale, ou glomérulite macrophagique), autrement dit un rejet chronique. Il s'en suit une majoration du débit de protéinurie puis une dégradation de la fonction rénale.

Ce concept de rejet humoral infraclinique prend toute son importance dans le

contexte du nombre croissant de patients hyper-immunisés et du développement de greffes ABO incompatibles pour répondre à la pénurie de greffon. De plus, ces résultats ont été étendus à la transplantation cardiaque, permettant de généraliser l'idée d'un rôle prépondérant des anticorps dans la genèse des lésions post-transplantation.

A ce jour, quelques études ont suggéré que le rejet humoral infraclinique pouvait être associé au devenir du greffon et à la progression de la glomérulopathie chronique d'allogreffe^{16 14}. En conséquence, lors de la 12^{ème} conférence de Banff en août 2013, le comité d'experts réuni a discuté la reconnaissance du rejet humoral infraclinique comme une entité propre au sein de la nouvelle classification. Toutefois, il n'existe pas de preuve solide des conséquences du rejet humoral infraclinique sur la survie rénale du greffon. Dans ce travail, nous avons fait l'hypothèse que ce rejet infraclinique pouvait être identifié dès la 1^{ère} année post-transplantation chez des patients avec une fonction rénale stable, et que ce diagnostic histologique pourrait avoir des conséquences en terme de survie rénale.

Ainsi dans une population de patients transplantés rénaux, chez qui une biopsie de greffon était réalisée à un an de la transplantation, notre objectif a été de comparer la progression de l'insuffisance rénale et la survie du greffon, en fonction de la présence d'un rejet infraclinique cellulaire, ou humoral ou de l'absence de rejet.

b) Population de l'étude

Entre le 1^{er} janvier 2000 et le 1^{er} janvier 2010, 1307 patients ont reçu une transplantation rénale à l'Hôpital Necker-Enfants Malades (Paris). Nous avons inclus tous les patients ayant bénéficié à un an d'une biopsie de greffon protocolaire et adéquate, c'est à dire présentant au moins 10 glomérules et deux artères de moyen calibre, selon les critères de la classification de Banff. Toutes les greffes étaient de groupes sanguins ABO compatibles. Les cross-matches T et B devaient être négatifs en microlymphocytotoxicité.

Les critères d'exclusion étaient un suivi inférieur à un an (perte de greffon n=44, décès du patient n=27, perdu de vue n=38) mais également les patients chez qui la biopsie de dépistage était inadéquate (n=83) ou non réalisée (contre-indication ou refus n=144). L'étude a été approuvée par le comité d'éthique de l'hôpital Necker.

c) Techniques

Biopsies rénales

Toutes les biopsies ont été réalisées après consentement éclairé, chez des patients présentant une fonction rénale stable, c'est à dire avec une augmentation de la créatinine n'excédant pas 15% de la valeur de base au cours des 21 jours précédant la biopsie. Elles ont été analysées par des anatomo-pathologistes expérimentés puis cotées de 0 à 3 selon la classification de Banff pour les différentes lésions histologiques (annexe): glomérulite (g), tubulite (t), infiltrat interstitiel (i), artérite intimale (v), capillarite péri tubulaire (cpt), glomérulopathie chronique (cg), fibrose interstitielle (ci), atrophie tubulaire (ct) et artériosclérose (cv). Le score d'inflammation microcirculatoire était défini par la somme de l'inflammation glomérulaire (g) et capillaire péri tubulaire (cpt) et le score d'atteinte interstitielle et tubulaire par la somme de l'inflammation interstitielle (i) et tubulaire (t).

Définitions des rejets infracliniques

Le rejet cellulaire infraclinique ou « subclinical T-cell mediated rejection » (s-TCMR) était défini par une fonction rénale stable et la présence des lésions histologiques suivantes:

- un infiltrat interstitiel significatif (>25% du parenchyme atteint, i2 ou i3) et des foyers de tubulite modérée (t2)
- un infiltrat interstitiel significatif (>25% du parenchyme atteint, i2 ou i3) et des foyers de tubulite sévère (t3);

Le rejet humoral infraclinique ou « subclinical antibody-mediated rejection » (s-ABMR) était défini par une fonction rénale stable, la détection dans le sérum d'anticorps anti-HLA spécifiques du donneur ou « donor-specific antibody » (DSA), et la présence de lésions histologiques suivantes : une glomérulite (g) et/ou une capillarite péri-tubulaire (cpt). Nous avons également admis en tant que rejet humoral infraclinique C4d-négatif, les patients présentant une inflammatoire microcirculatoire (g +/- cpt), des DSA mais pas dépôt de C4d, tel que récemment défini dans la mise à jour 2013 de la classification de Banff.

Traitement immunosuppresseur d'induction et d'entretien

Tous les patients ont reçu un traitement d'induction par thymoglobulines (1,5 mg/kg/j pendant 10 jours) ou par basiliximab (20 mg à J0 et J4), selon le risque immunologique défini au moment de la transplantation. Le traitement d'entretien comprenait: 1) prednisone à dose décroissante; 2) mycophénolate mofétil (1000 mg deux fois par jour); 3) tacrolimus, à la dose nécessaire pour obtenir un taux sanguin résiduel de 8-10 ng/mL au cours des trois premiers mois, puis de 6-8 ng/mL après trois mois, ou ciclosporine, à la dose nécessaire pour obtenir un taux sanguin résiduel compris entre 800 et 1200 ng/mL au cours des trois premiers mois, puis entre 600 et 800 ng/mL après trois mois. De plus, les patients qui présentaient des DSA préformés (tels que détectés par les techniques disponibles au moment de la greffe), recevaient des cures d'immunoglobulines intraveineuses (2 g/kg de

poids corporel à J0, J21 et J40), associées ou non à deux injections de rituximab (375 mg/m² de surface corporelle à J0 et J7) en traitement prophylactique d'un rejet aigu.

Traitement immunosuppresseur des épisodes de rejet

Les épisodes de rejet aigu cellulaire étaient traités par bolus de méthylprednisolone (500 mg/j pendant trois jours). Les épisodes de rejet aigu humoral étaient traités par bolus de méthylprednisolone (500 mg/j pendant trois jours) et trois cures d'immunoglobulines intraveineuses (2 g/kg de poids corporel) à trois semaines d'intervalle. A partir de janvier 2005, ces patients recevaient en plus quatre échanges plasmatiques et deux injections de rituximab (375 mg/m² de surface corporelle) à une semaine d'intervalle.

Les patients présentant un rejet cellulaire infraclinique histologiquement prouvé, recevaient trois bolus de méthylprednisolone (500 mg/j pendant trois jours).

Enfin, la reconnaissance de l'entité « rejet humoral infraclinique » étant récente, il n'existait pas de prise en charge thérapeutique consensuelle. Néanmoins, la présence d'une inflammation microcirculatoire, de dépôts de C4d, ou l'apparition de DSA de novo a conduit au traitement de certains patients (détaillé plus bas).

Données cliniques

Les données cliniques des donneurs et des receveurs proviennent du registre DIVAT (Données Informatiques Validées en Transplantation), dans lequel les données sont recueillies prospectivement pour chaque patient: le jour de la transplantation, à six mois, à un an de la greffe puis mises à jours tous les ans. Un consentement écrit est donné par les receveurs le jour de la transplantation. Un audit annuel est réalisé portant sur la qualité de saisie des données de base et de suivi du receveur, la qualité de saisie des données relatives au donneur et l'exhaustivité du remplissage. La date de point est le 15 mai 2012. Les données non disponibles dans DIVAT telles que les épisodes de rejet au cours de la 1^{ère} année, ou le détail du traitement immunosuppresseur reçu après la biopsie protocolaire, ont été collectées dans les dossiers cliniques de chaque patient.

Critères d'évaluation

Les critères d'évaluation étaient la perte du greffon et l'évolution dans le temps du débit de filtration glomérulaire. Pour les analyses de survie rénale, l'origine était la date de greffe et l'événement d'intérêt la perte du greffon, définie par le retour en dialyse. Les patients décédés avec un greffon fonctionnel étaient censurés à la date du décès (n=73, 7%).

Détection des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur

La recherche de DSA était réalisée par le Laboratoire Régional d'Histocompatibilité de l'hôpital Saint Louis (Paris) par méthode Luminex®. Des sérums étaient prélevés prospectivement le jour de la transplantation, à trois mois, à un an, et après chaque événement immunisant. En cas de signe d'humoralité à la biopsie protocolaire, un sérum était prélevé rétrospectivement et analysé par méthode Single-Antigen Flow bead Assays (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, Etats Unis). Une intensité moyenne de fluorescence ou « mean fluorescence intensity » (MFI) supérieure à 500 était considérée comme significative.

Approche méthodologique

Les variables continues sont exprimées en moyennes \pm écarts-types à l'exception des moyennes d'intensité de fluorescence exprimées en erreurs-types à la moyenne. Les moyennes ont été comparées par test de Student et les proportions par un test de Chi-2. Le test ANOVA a été utilisé pour comparer les scores histologiques selon la classification Banff entre les différents groupes. L'analyse de la survie a été réalisée entre le jour de la transplantation et un suivi maximal de huit ans avec la perte de greffon comme événement d'intérêt. Les survies rénales selon le phénotype de rejet ont été représentées par une courbe de Kaplan Meier et comparées par un test de Log-rank. Une analyse univariée a été réalisée à la recherche de facteurs de risque de perte du greffon, parmi des paramètres cliniques, histologiques, fonctionnels ou immunologiques. Les facteurs de risque retenus (p

$\leq 0,10$) ont été inclus dans une analyse multivariée de Cox pour évaluer les facteurs prédictifs indépendants de perte du greffon rénal. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels SAS (Statistical Analysis System, Cary, NC, Etats-Unis), version 9.2 et R (Free Software Foundation), version 2.10.1. Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative.

d) Résultats

Caractéristiques cliniques et biologiques des patients selon le phénotype histologique

Parmi les 1001 patients inclus dans l'étude, nous avons déterminé trois groupes de patients, selon le phénotype présenté sur la biopsie protocolaire à un an: 1) patients ne présentant pas de rejet ($n=727$, 72,6%) ; 2) patients présentant un rejet cellulaire infraclinique (s-TCMR, $n=132$, 12,2%); et 3) patients présentant un rejet humoral infraclinique (s-ABMR, $n=142$, 14,2%). Parmi le groupe des patients sans rejet, 80 (11%) présentaient une nécrose tubulaire aiguë, 35 (4,8%) des lésions « borderline » non traitées (qui n'ont pas été considérées comme un TCMR), 55 (7,5%) des lésions de toxicité des inhibiteurs de calcineurine, 39 (5,4%) une récurrence de leur maladie rénale, 26 (3,6%) une néphrite interstitielle d'origine virale, 160 (22%) une fibrose interstitielle avec atrophie tubulaire (FIAT), 61 (8,4%) un diagnostic autre. Les 246 (33,8%) autres patients présentaient une biopsie considérée comme normale. Le tableau 1 indique les principales caractéristiques cliniques et biologiques des donneurs et des receveurs au moment de la transplantation, selon le phénotype histologique.

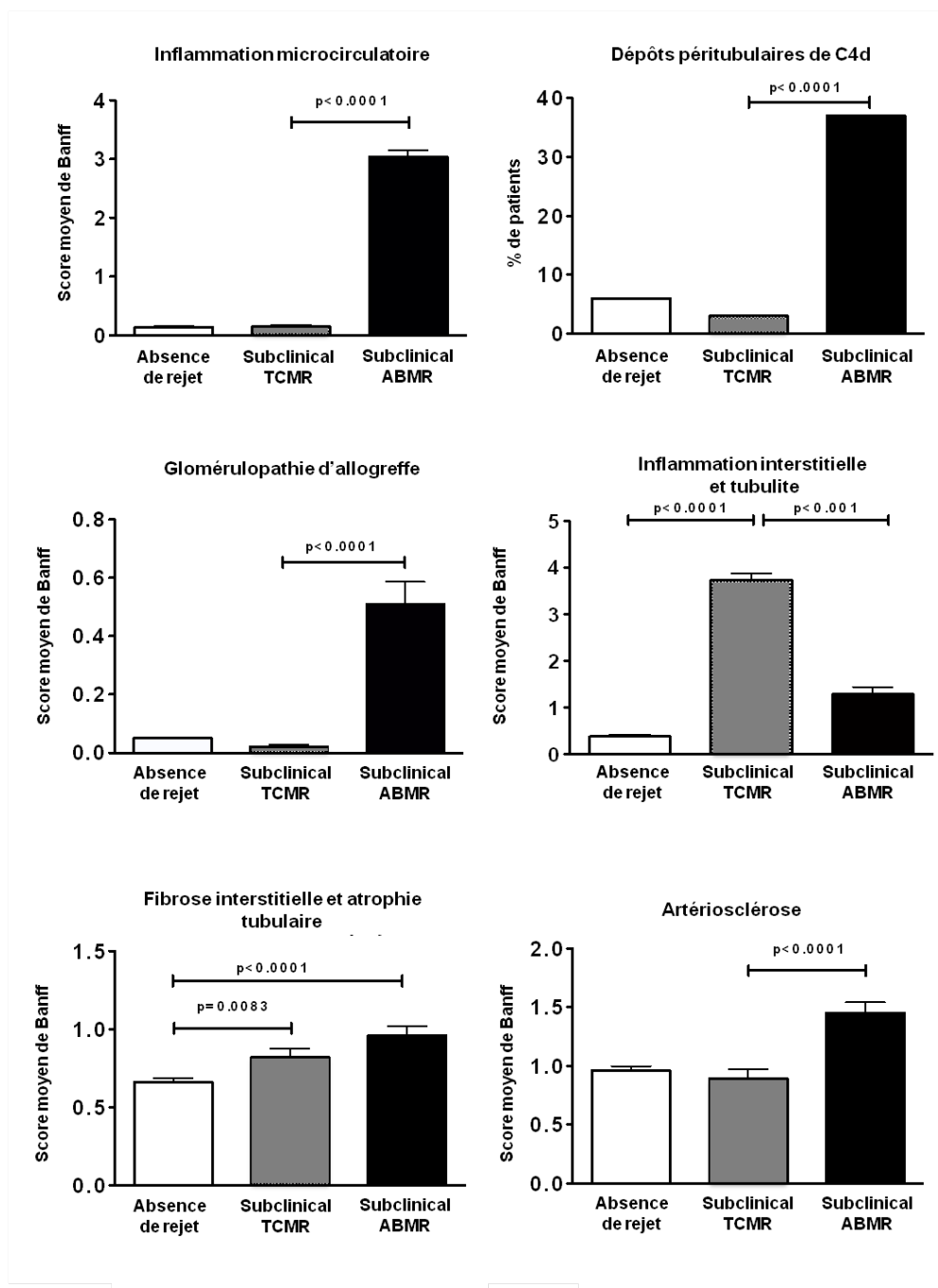
Tableau 1: Caractéristiques des donneurs et des receveurs, selon le phénotype histologique.

Caractéristiques des patients	Population de l'étude (n = 1001)		Absence de rejet (n = 727)		Subclinical TCMR (n = 132)		Subclinical ABMR (n = 142)		p
	n		n		n		n		
Age du receveur — années	1001	47.9 ± 13	727	47.5 ± 13.4	132	47.7 ± 13.4	142	49.8 ± 12.4	p = 0.1547
Sexe du receveur (masculin) — no. (%)	994	582 (59%)	721	421 (58%)	132	88 (67%)	141	73 (52%)	p = 0.0437
Rang transplantation >1 — no. (%)	1001	190 (19%)	727	117 (16%)	132	16 (12%)	142	57 (40%)	p < 0.0001
Temps passé en dialyse — mois	866	5.04 ± 4.4	623	4.9 ± 4.3	114	4.6 ± 0.3	129	6.1 ± 5.2	p = 0.0094
Age du donneur — années	991	50 ± 16	718	50 ± 16	131	51 ± 17	141	51 ± 16	p = 0.7368
Sexe du donneur (masculin) — no. (%)	979	553 (56%)	710	402 (57%)	131	72 (55%)	138	79 (57%)	p = 0.9221
Donneur décédé — no. (%)	1001	819 (82%)	727	519 (80%)	132	116 (88%)	142	124 (87%)	p = 0.0141
Donneur décédé de cause cardiovasculaire — no. (%)	1001	446 (45%)	727	311 (43%)	132	68 (52%)	142	67 (47%)	p = 0.1413
Durée d'ischémie froide (heures)	970	19 ± 10	701	18 ± 10	130	19 ± 9	139	21 ± 10	p = 0.0039
Reprise retardée de fonction — (n, %)	995	219 (22%)	722	149 (21%)	132	36 (27%)	141	34 (24%)	p = 0.1934
Survie du greffon — (n, %)	1001	865 (86%)	727	646 (89%)	132	111 (84%)	142	99 (70%)	p < 0.0001
Survie du patient — (n, %)	1001	928 (93%)	727	680 (94%)	132	122 (92%)	142	126 (89%)	p = 0.1306
Néphropathie causale	1001		727		132		142		
Diabète — no. (%)		85 (8.5%)		64 (9%)		13 (10%)		8 (6%)	
Vasculaire — no. (%)		68 (6.8%)		46 (6%)		11 (8%)		11 (8%)	
Glomérulopathie — no. (%)		316 (31.6%)		226 (31%)		47 (36%)		43 (30%)	
Congénital — no. (%)		205 (20.4%)		156 (21%)		24 (18%)		25 (17%)	
Autre — no. (%)		7 (0.7%)		5 (1%)		1 (1%)		1 (1%)	
Néphropathie interstitielle — no. (%)		123 (12.3%)		85 (12%)		15 (11%)		23 (16%)	
Indéterminée — no. (%)		197 (19.7%)		145 (20%)		21 (16%)		31 (22%)	p = 0.7796
Immunologie									
HLA A+B mismatch	986	2 ± 1.1	715	2.0 ± 1.1	131	2.1 ± 1.0	140	2.0 ± 1.1	p = 0.6231
HLA DR mismatch	987	0.8 ± 0.7	715	0.8 ± 0.7	132	0.8 ± 0.6	140	0.8 ± 0.6	p = 0.6574

Caractéristiques histologiques selon le phénotype de rejet infraclinique

Tous les patients avec un diagnostic de s-ABMR présentaient une inflammation microcirculatoire (g et cpt), 52 (38%) présentaient une inflammation interstitielle (i) et tubulaire (t) minime, 6 (4%) présentaient des lésions d'artérite intinale (v), 72 (54%) présentaient des lésions d'artériosclérose (cv) modérées à sévères, 29 (21%) présentaient des lésions de fibrose modérée à sévère (FIAT grade II ou III), et 45 (37%) présentaient des dépôts de C4d dans les capillaires péri-tubulaires. Les patients du groupe s-ABMR présentaient des scores d'inflammation microcirculatoire, de dépôts de C4d, de glomérulopathie d'allogreffe et d'artériosclérose plus élevés que ceux des groupes s-TCMR et absence de rejet (Figure 2)

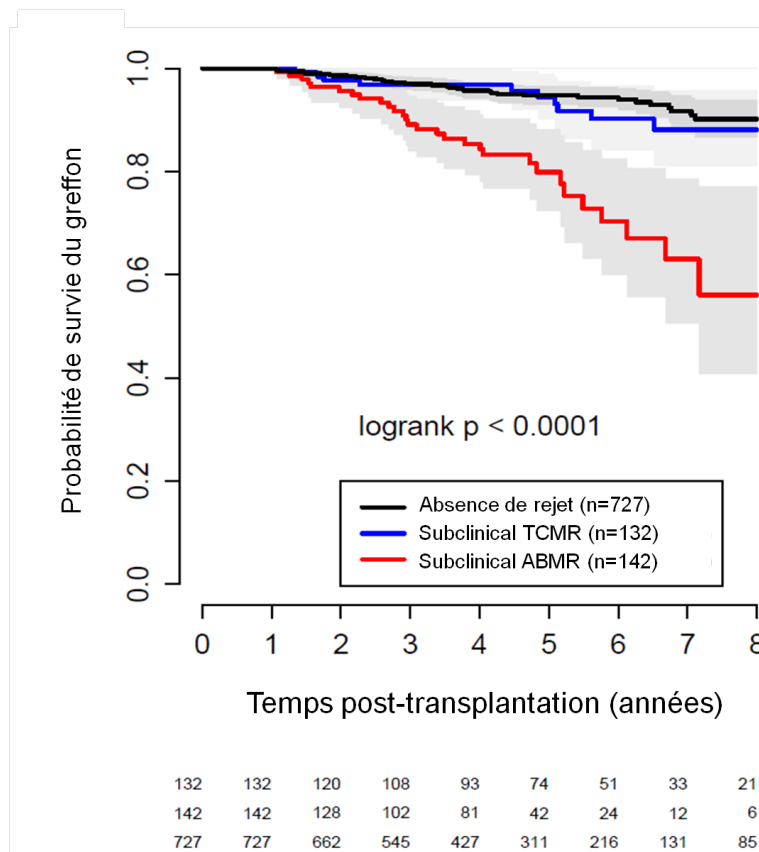
Figure 2 : Caractéristiques histologiques des biopsies protocolaires à un an



Survie rénale selon le phénotype de rejet infraclinique

La durée médiane de suivi post-transplantation était de 4,6 ans (écart interquartile 0,24 - 8,0) dans l'ensemble de la population de l'étude, 4,2 ans (2,0 - 5,2) dans le groupe s-ABMR, 5,2 ans (3,7 – 6,9) dans le groupe s-TCMR, et 4,6 ans (3,0 – 6,4) dans le groupe absence de rejet (p=NS). Les patients du groupe s-ABMR présentaient une moins bonne survie rénale à huit ans, comparée aux patients des groupes s-TCMR et absence de rejet: respectivement 56%, 88% et 90%, p<0.0001 (Figure 4).

Figure 4 : Survie du greffon selon le phénotype de rejet



Le tableau 2A résume les différents paramètres cliniques, fonctionnels, histologiques et immunologiques qui ont été pris en considération pour l'analyse des facteurs de risque de perte du greffon. En analyse univariée, les facteurs prédictifs de perte du greffon étaient l'âge du donneur ($p=0.0114$), le temps d'ischémie froide ($p=0.0121$), le rang de transplantation >1 ($p=0.0472$), la reprise retardée de fonction ($p=0.0076$), le DFG à un an ($p<0.0001$), le degré de FIAT ($p=0.0005$), la positivité du C4d ($p=0.0004$), et le phénotype s-ABMR ($p<0.0001$).

En analyse multivariée, les paramètres indépendamment associés à la perte du greffon étaient un DFG à un an <30 mL/min (HR 19.4, 95% CI 7.9 - 46.9), un DFG à un an compris entre 30 et 60 mL/min (HR 3.2, 95% CI 1.4 - 7.7, $p<0.0001$) et le phénotype s-ABMR (HR 3.5, 95% CI 2.1 - 5.7, $p<0.0001$) (Tableau 2B). Le phénotype s-ABMR restait associé à un risque plus élevé de perte du greffon, indépendamment du DFG estimé au moment de la biopsie (figure 5).

Tableau 2A:

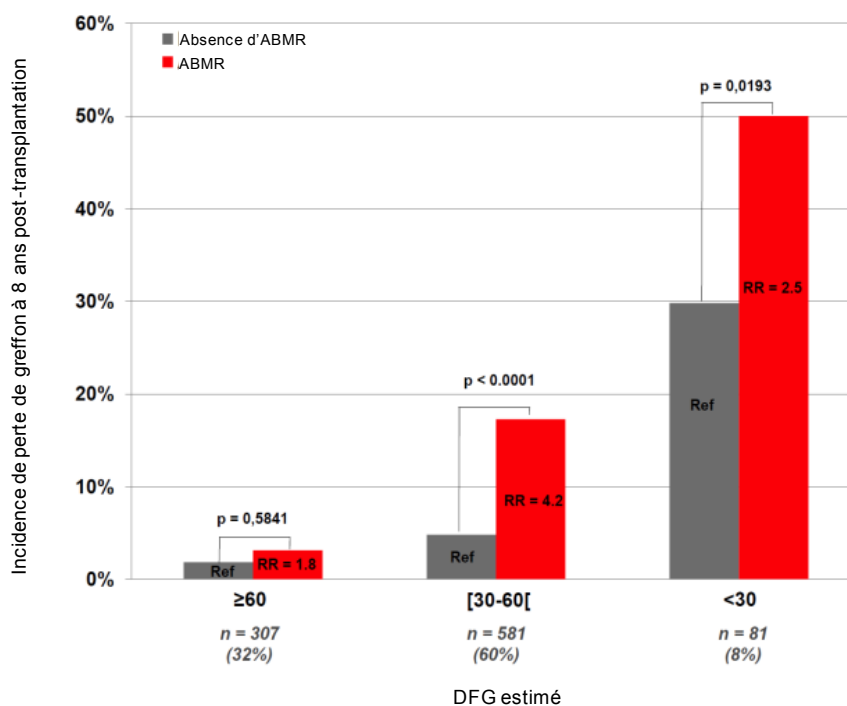
		N	Nombre d'événements	HR	95% IC	p	
Paramètres du Donneur et du Receveur	Age du receveur (années)	1001	77	1.01	(0.99; 1.03)	0.2095	
	Sexe du receveur	Masculin	582	49	1	-	-
		Féminin	412	28	0.81	(0.51; 1.28)	0.3652
	Age du donneur (années)	990	75	1.02	(1.004; 1.035)	0.0114	
	Sexe du donneur	Masculin	553	40	1	-	-
		Féminin	426	34	1.11	(0.70; 1.75)	0.6535
Type de donneur	Vivant	182	8	1	-	-	
	Décédé	819	69	1.87	(0.9; 3.9)	0.0930	
Caractéristiques de l'Allogreffe	Durée d'ischémie froide (min)	970	76	1.000	(1.000; 1.001)	0.0121	

	Rang de transplantation	Première	811	55	1	-	-
		> 1	190	22	1.65	(1.0; 2.7)	0.0472
HLA A/B/DR mismatch			988	76	1.1	(0.9;1.3)	0.3126
	Reprise retardée de fonction	Non	776	48	1	-	-
		Oui	219	27	1.9	(1.2; 3.0)	0.0076
Paramètres cliniques	DFG à 1 an	DFG ≥ 60	307	6	1	-	-
		30 ≤ DFG < 60	581	38	3.4	(1.5; 8.2)	-
		DFG < 30	81	29	22.9	(9.5; 55.1)	<0.0001
	Episode de rejet précédent*	Non	796	53	1		
		Oui	205	24	1.9	(1.2; 3.2)	0.0051
Paramètres histologiques	FIAT	Grade ≤1	862	59	1	-	-
		Grade >1	117	16	2.2	(1.4; 3.5)	0.0005
	Artériosclérose	Grade ≤1	606	45	1	-	-
		Grade >1	307	27	1.5	(0.9; 2.4)	0.1017
	Subclinical TCMR	Non	869	67	1	-	-
		Oui	132	10	0.8	(0.4; 1.6)	0.6182
Subclinical ABMR	Non	859	48	1	-	-	
	Oui	142	29	4.4	(2.8; 7.0)	<0.0001	
	Dépôt de C4d	Non	656	41	1	-	-
		Oui	81	12	3.2	(1.7; 6.1)	0.0004

Tableau 2B:

		Nombre de patients	Nombre d'événements	HR	95% IC	p
DFG à 1 an	DFG ≥ 60	307	6	1	-	-
	30 ≤ DFG < 60	581	38	3.2	(1.4 - 7.7)	-
	DFG < 30	81	29	19.4	(7.9 - 46.9)	<0.0001
Subclinical ABMR	Non	832	46	1	-	-
	Oui	137	27	3.5	(2.1 - 5.7)	<0.0001

Figure 5: Incidence de perte du greffon selon le DFG estimé à un an



Survie rénale dans le groupe subclinical ABMR selon le traitement reçu

Parmi les 142 patients présentant un s-ABMR, 56 (39,4%) ont reçu un traitement à visée humorale compte tenu des résultats de la biopsie protocolaire à un an. Ce traitement comportait quatre cures d'immunoglobulines intraveineuses (à la dose de 2 g/kg de poids corporel administrées sur 96 heures), cinq échanges plasmatiques, et du rituximab (à la dose de 375 mg/m² de surface corporelle). Les 86 (60,6%) autres patients présentant un s-ABMR n'ont pas reçu de traitement spécifique à visée humorale: 25 ont reçu des bolus de méthylprednisolone seuls, et 61 n'ont reçu aucun traitement supplémentaire après leur biopsie protocolaire.

Parmi les 56 patients qui ont reçu un traitement à visée humorale, 8 (14,29%) ont perdu leur greffon. Parmi les 86 patients qui n'ont pas reçu de traitement spécifique, 21 (24,42%) ont perdu leur greffon. On observe donc une tendance non significative à un meilleur pronostic rénal lorsque les lésions de S-ABMR sont traitées (p=0,14).

Conclusion de l'étude

A partir d'une large cohorte de biopsies protocolaires parfaitement phénotypées, nous avons étudié les conséquences du rejet infraclinique d'allogreffe rénale. Nous avons déterminé que la nouvelle entité récemment décrite de « rejet humoral infraclinique » était fortement et indépendamment associée à un pronostic rénal péjoratif.

Le rejet demeurant la principale cause de perte de greffon, la détection du rejet humoral infraclinique pourrait permettre d'aider le clinicien à identifier les patients à haut risque d'échec de greffe, et ainsi d'appliquer des mesures thérapeutiques précoces et ciblées, qui restent encore à définir.

4) Intérêt de nouveaux outils en transplantation : apport du microscope moléculaire dans la stratification du risque de perte de greffon

a) Positionnement du problème

L'évaluation du rejet humoral par l'histologie ^(1,2,3,4,5,6), en dépit de son utilité clinique, fait face à de sérieuses limitations en termes de précision diagnostique et de prédiction du risque. Ces limitations ont clairement été soulignées lors de la dernière conférence internationale de Banff au Brésil, en 2013, dont le consortium d'experts a indiqué comme une des priorités le développement d'approches complémentaires dans le domaine du rejet d'organe.

Le rejet humoral et sa complexité tant dans sa présentation clinique que dans l'hétérogénéité phénotypique reflète la nécessité d'avoir de meilleurs supports diagnostiques et pronostiques que ceux apportés par l'évaluation histopathologique conventionnelle. Cependant, plus que l'ajustement des techniques existantes, il semble nécessaire d'ouvrir la voie vers l'utilisation de nouvelles technologies. La limitation des tests conventionnels peut être corrigée en introduisant l'étude moléculaire des biopsies c'est à dire de l'expression de gènes dans le tissu. Cette approche in situ a comme mérite de se positionner là où se trouve la maladie dans une pathologie où l'atteinte vasculaire sans traversée et invasion de l'épithélium tubulaire (à contrario du rejet cellulaire) rend peu probable l'intérêt de biomarqueurs urinaires. Ce diagnostic moléculaire a été développé en utilisant des données de cohortes rigoureusement définies, comme illustré par l'expérience du cancer ^(7,8). Dans cette spécialité, les mesures moléculaires des biopsies utilisent des scores dérivés de population bien phénotypées permettant la définition de profils de risque distincts et a ainsi permis la modification de pratiques cliniques comme identifier les répondeurs ou non répondeurs à des thérapeutiques anti tumorales ^(7,9). En transplantation, les stratégies de profilage moléculaires à l'aide de puces à ADN ont donné des résultats prometteurs avec, comme nouvelle dimension, la possibilité d'évaluer les biopsies de greffons par une cartographie moléculaire représentant des probsets pathogéniques de gènes (PBT's). L'équipe de Phil Halloran à Edmonton a développé depuis plusieurs années un « microscope

moléculaire », afin d'explorer la pathologie du patient transplanté et d'apporter un outil complémentaire à l'histologie conventionnelle ^{10,11,12,13}. Dans cette étude, nous avons utilisé la stratégie utilisant le « microscope moléculaire » afin d'évaluer l'intérêt de cet outil dans le rejet humoral pour affiner la prédiction du risque de perte du greffon et de progression de la maladie. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur des cohortes de malades des Hopitaux Necker et Saint Louis très bien phénotypées auxquelles les outils conventionnels ont été complétés par l'étude systématique de l'expression de gènes dans le greffon.

b) Population de l'étude

A partir de 939 patients qui ont reçu un greffon rénal à l'hôpital Necker (Paris, France) entre janvier 2004 et octobre 2010, nous avons identifié 101 (10,7%) patients avec un rejet humoral prouvé à la biopsie durant la première année de transplantation. Vingt-sept patients ont été exclus en raison de l'absence de matériel adéquate pour réaliser l'analyse moléculaire (14 avec du matériel mais dont la qualité ne permettait pas la réalisation de l'étude moléculaire et 13 patients pour lesquels seul un fragment fixé avait été réalisé). Ainsi, 74 patients avec rejet humoral aigu ont été inclus dans l'étude (Table supplémentaire 1). Nous avons utilisé une cohorte de validation externe consistant en 321 patients transplantés à l'hôpital Saint Louis (Paris, France) entre le 1^{er} janvier 2006 et le 1^{er} janvier 2010. Parmi ces patients, 54 (16,8%) avaient un rejet humoral précoce prouvé par biopsie et du matériel adéquate pour la réalisation d'analyse moléculaire (Méthodes Supplémentaires). Les patients ont été suivis jusqu'au 15 avril 2013.

Tous les patients transplantés étaient ABO compatibles et avaient un cross match cytotoxique IgG T et B négatifs au moment de la transplantation

c) Données cliniques

Les données cliniques des donneurs et receveurs de notre cohorte principale (Hôpital Necker) et de la cohorte de validation (Hôpital Saint Louis) ont été obtenus à partir de 2 registres nationaux ; les Données Informatiques Validées en Transplantation (Hôpital Necker) et l'Agence de la Biomédecine (Hôpital Saint Louis) pour lesquels les données sont entrées de manière prospectives à des moments donnés spécifiques (Jour 0, 6 mois et un an post-transplantation) et complétées annuellement par la suite. (Méthodes Supplémentaires). Le développement et la validation des données de ces cohortes ont été extraits de la base de données le 15 avril 2012.

Les données concernant la détérioration de fonction ou les lésions histologiques des patients ayant un rejet humoral ont été enregistrées en accord avec le consensus impliquant

la classification internationale de Banff ²⁰. Nous avons reconnu comme rejet humoral aigu les patients avec rejet C4d-négatif lorsqu'il y avait une évidence diagnostique de rejet histologique et la présence de DSA circulants ¹⁴

Les patients avec rejets humoraux ont reçu un traitement associant des bolus de méthylprednisolone (500 mg/jour durant 3 jours) et une dose élevée d'immunoglobuline intraveineuse (IVIg) (2g/kg par semaine durant 3 semaines). La ciclosporine a été remplacée par du tacrolimus pour les patients recevant de la ciclosporine. De plus, les patients ont reçu 4 échanges plasmatiques et deux doses hebdomadaires de rituximab (375mg/m², MabThera ; Roche, Meylan, France). Le traitement du rejet humoral était standardisé entre les centres. Les conséquences mesurées dans cette étude étaient la perte du greffon définie par le retour en dialyse et la progression de la glomérulopathie du transplant définie par l'augmentation du score cg de Banff, vu en microscopie optique.

Les patients avec rejets humoraux ont été reclassés rétrospectivement pour les critères diagnostiques conventionnels et le marquage C4d par relecture histologiques et l'identification des anticorps dirigés contre le donneur sur les sérums réalisés au même moment que chaque biopsie du greffon. En plus des biopsies réalisées au moment du diagnostic du rejet humoral, nous avons déterminé le moment de l'augmentation du score de glomérulopathie du transplant en utilisant 178 biopsies de suivi réalisées après le diagnostic de rejet humoral. Le score de glomérulopathie du greffon (cg) était défini par l'apparition de doubles contours de la membrane basale glomérulaire en accord avec la classification de Banff. La microscopie électronique n'a pas été réalisée dans cette étude.

Toutes les biopsies ont été relues par 2 anatomopathologistes spécialisés en néphropathologie et en aveugle pour les données cliniques. Les biopsies étaient gradées de 0 à 3 selon la classification de Banff : glomérulite, tubulite, inflammation interstitielle, endartérite, capillarite péri-tubulaire, la glomérulopathie d'allogreffe, la fibrose interstitielle, l'atrophie tubulaire, l'épaississement fibreux de l'intima des artères et la hyalinose artériolaire. Le marquage C4d était réalisé par immuno-histochimie sur paraffine en utilisant l'anticorps polyclonale humain C4d (BiomedicaGruppe, Australie. Le marquage C4d

était coté de 0 à 3 en fonction du pourcentage de capillaires péri-tubulaires ayant un marquage linéaire. Seuls les scores à 2 ou 3 étaient considérés comme positifs. Nous avons intégré les paramètres humoraux (g, cpt, v, cg, C4d) dans un score histologique Humoral défini par la somme de ces variables.

La présence de DSA circulants au moment de la transplantation (jour 0) et au moment de la biopsie a été analysée en utilisant la technique single-antigen (One Lambda Canoga Park, CA, USA) sur une plateforme Luminex comme cela a déjà été décrit. Les billes montrant une intensité moyenne de fluorescence normalisée (MFI) supérieure à 500 étaient considérées comme positives. Pour chaque patient, nous avons enregistré le nombre, la classe, la spécificité et la MFI de tous les anticorps anti-HLA dirigés contre les donneurs. Le maximum de MFI pour les DSA (DSA avec MFI maximale) était défini comme l'anticorps dirigé contre le donneur avec la MFI la plus élevée. Le typage HLA des donneurs et des receveurs était réalisé en utilisant une technique de typage génétique (Innolipa HLA typing kit, Innogenetics, Belgique).

d) Extraction de RNA procedure d'analyse en microarray

Une biopsie supplémentaire à partir d'un pistolet à biopsie de 16 gauges a été obtenue au moment de la biopsie et conservée à – 80°C dans de l'OCT pour l'analyse de l'expression des gènes. Toutes les biopsies adéquates réalisées au moment du rejet humoral ont été traitées pour l'analyse moléculaire comme décrit précédemment. L'extraction des RNA, l'étiquetage et hybridation au HG_U133_Plus_2.0 GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA) ont été réalisés en accord avec les protocoles du fabricant. Les puces ont été scannées en utilisant le scanner Gene Array (Affymetrix) et traitées avec le GeneChip Operating Software Version 1.4.0 (Affymetrix). Les fichiers comprenant les résultats des puces étaient postés sur le site Internet Gene Expression Omnibus sous le numéro d'accessibilité GSE36059.

Les fichiers comprenant les données des puces pour 126 biopsies ont été traités en utilisant le système Robust Multiarray Analysis de Bioconductor ¹⁰ Les caractéristiques

moléculaires des biopsies étaient rendues grâce à des lots de transcrits basés sur la pathogénie (PBTs) reflétant les processus biologiques connus comme étant pertinents dans la pathogénie de l'inflammation rénale et des lésions en transplantation. Ici, nous avons appliqué le suivi des PBTs : le score moléculaire du rejet humoral ¹² et les transcrits endothéliaux DSA-sélectifs (eDSAST) ^{15,16}. Les gènes les plus exprimés dans le score moléculaire du rejet humoral et le eDSAST comprennent de nombreux transcrits endothéliaux (cf DARC, VWF et ROBO4), transcrits NK, transcrits de production et d'induction de IFNG (cf CXCL11) et transcrits liés à la cytotoxicité (cf granulysin [GNLY] et FGF2¹⁷). Ceux-ci sont résumés dans les Tables Supplémentaire 2 et 3. De plus, le taux des transcrits des cellules natural killer (NK) ¹⁸, le taux des transcrits des cellules T et les transcrits de l'insuffisance rénale aiguë (IRRAT)¹³ ont été évalués. L'information sur les lots et les algorithmes pour la création du PBT sont disponibles sur la page web : (<http://www.atagc.med.ualberta.ca/Research/Genelists/Pages/default.aspx>).

e) Analyses statistiques

Nous avons fournis les valeurs en moyenne et déviations standard pour la description des variables continues. Nous avons comparé les moyennes et les proportions des phénotypes des greffons rénaux en utilisant le test T de Student, le test ANOVA et le Chi². Un modèle de Cox a été utilisé pour quantifier HR et intervalles de confiance à 95% (ICs) pour les facteurs associés à la perte du greffon. Les paramètres atteignant une p value $\leq 0,10$ étaient utilisées pour entrer dans un seul modèle multivarié de Cox.

Pour déterminer l'apport du nouveau test (microscope moléculaire) aux tests conventionnels dans la stratification du risque et la reclassification des patients selon leur risque de perte de greffon, nous avons utilisé comme décrit dans les matériels et méthodes les analyses de (NRI), (IDI) ainsi que le C statistic ¹⁹.

f) RESULTATS

Caractéristiques des patients

Parmi 939 patients qui ont reçu une transplantation rénale à l'hôpital Necker entre 2004 et 2010, 472 patients ont eu 583 biopsies réalisées durant la première année suivant la greffe. 77 biopsies (13,2%) retrouvaient de la nécrose tubulaire aiguë, 48 (8,2%) ont isolé de la fibrose interstitielle et de l'atrophie tubulaire, 51 (8,7%) avaient un rejet cellulaire, 43 (7,4%) avaient des lésions borderline, 48 (8,2%) avaient des effets toxiques des inhibiteurs des calcineurines, 26 (4,4%) avaient une récives de leur néphropathie initiale, 23 (3,9%) avaient une néphropathie à BK virus et 56 (9,6%) avaient d'autres lésions histologiques. Les rejets humoraux prouvés par biopsies ont été diagnostiqués pour 101/939 patients dans la première année, représentant une incidence de 10,7%. Parmi ces 101 rejets humoraux, 74 (73,3%) avaient le matériel nécessaire pour une évaluation moléculaire et ont été inclus dans l'étude. La Table 1 montre les caractéristiques cliniques et les résultats de la biopsie au moment de la transplantation pour les 74 patients qui ont eu un épisode de rejet humoral durant la première année. La médiane de rejet humoral était à 3,1 (rang 0,2-12,0) mois post-transplantation. Tous les patients étaient immunisés avant la transplantation avec un PRA lymphocytotoxique entre 5 et 100%. Au moment de la transplantation, 68 des 74 patients (91,9%) avaient des DSA détectables dont 44 patients (64,7%) avec 1 DSA et 24 patients (35,3%) avec au moins 2 DSA (rang : 2 – 4). Le DSA immunodominant (DSA avec la plus grande MFI) était de classe I chez 25/68 patients (36,8%) et de classe II chez 43/68 patients (63,2%). La moyenne de MFI de l'immunodominant était de 5548 ± 562 . La médiane de suivi après la transplantation était de 59,3 (rang : 47-79) mois.

Table 1: Caractéristiques de base des patients avec rejet humoral aigu

Patients	n=74
Moyenne d'âge des receveurs (années)*	48.4 ± 13
Ischémie froide (heures)*	21.4 ± 12
Créatinine du donneur au moment de la transplantation (µmol/L)*	83.8 ± 41
Reprise retardée de fonction (n, %)	27 (36.4%)
Nombre de dialyses post-transplantation*	1.2 ± 1.9
Nombre de transplantation (>1)	34 (48.6%)
Donneurs décédés (n, %)	67 (90.5%)
Néphropathie initiale	
Néphropathie diabétique	1 (1.3%)
Hypertension / Néphroangiosclérose	4 (5.4%)
Glomérulite / vascularite	21 (28.4%)
Néphropathie interstitielle / pyélonéphrite	13 (17.6%)
Autres	11 (14.9%)
Indéterminées	24 (32.4%)
Moyenne d'âge des donneurs (années)*	51.1 ± 14
Sexe du donneur (male, n, %)	43 (58.1%)
IMMUNOLOGIE	
HLA-A mismatch*	0.8 ± 0.6
HLA-B mismatch*	1.1 ± 0.7
HLA-DR mismatch*	0.8 ± 0.6
DSA au moment de la transplantation	
PRA Lymphocytotoxique (% , moyenne)*	27 ± 29
cPRA (% , moyenne)* [€]	73
DSA circulants (n,%)	68 (91.9%)
Nombre de DSA (=1 ; ≥2)	44(64.7%) ; 24 (35.3%)
DSA max classe (classe I/ classe II (n,%))	25 (36.8%) / 43 (63.2%)
DSAm _{max} de Classe I MFI**	2641 ± 410
DSAm _{max} de Classe II MFI**	3783 ± 602
DSAm _{max} de classe I ou II MFI**	5548 ± 562
Caractéristiques au moment de la biopsie	(n=74)
Creatinine (µmol/L)*	203 ± 142
eGFR (mL/min/1.73 m ²)*	44.8 ± 17
Proteinurie (g/L)*	0.31 ± 0.58
Patients (%) avec protéinurie >0.15 g/L	38 (51%)
DSA circulants (n,%)	74 (100%)
Nombre de DSA (=1 ; ≥2)	56 (75.7%) ; 18 (24.3%)
DSA max classe (classe I/ classe II (n,%))	(26, 35.1% / 48, 64.9%)
DSAm _{max} de Classe I MFI**	2315 ± 568
DSAm _{max} de Classe II MFI**	3732 ± 641
DSAm _{max} de Classe I ou II MFI**	3859 ± 471

* variables continues exprimées en moyenne \pm déviation standard

** variables continues exprimées en moyenne \pm erreur standard

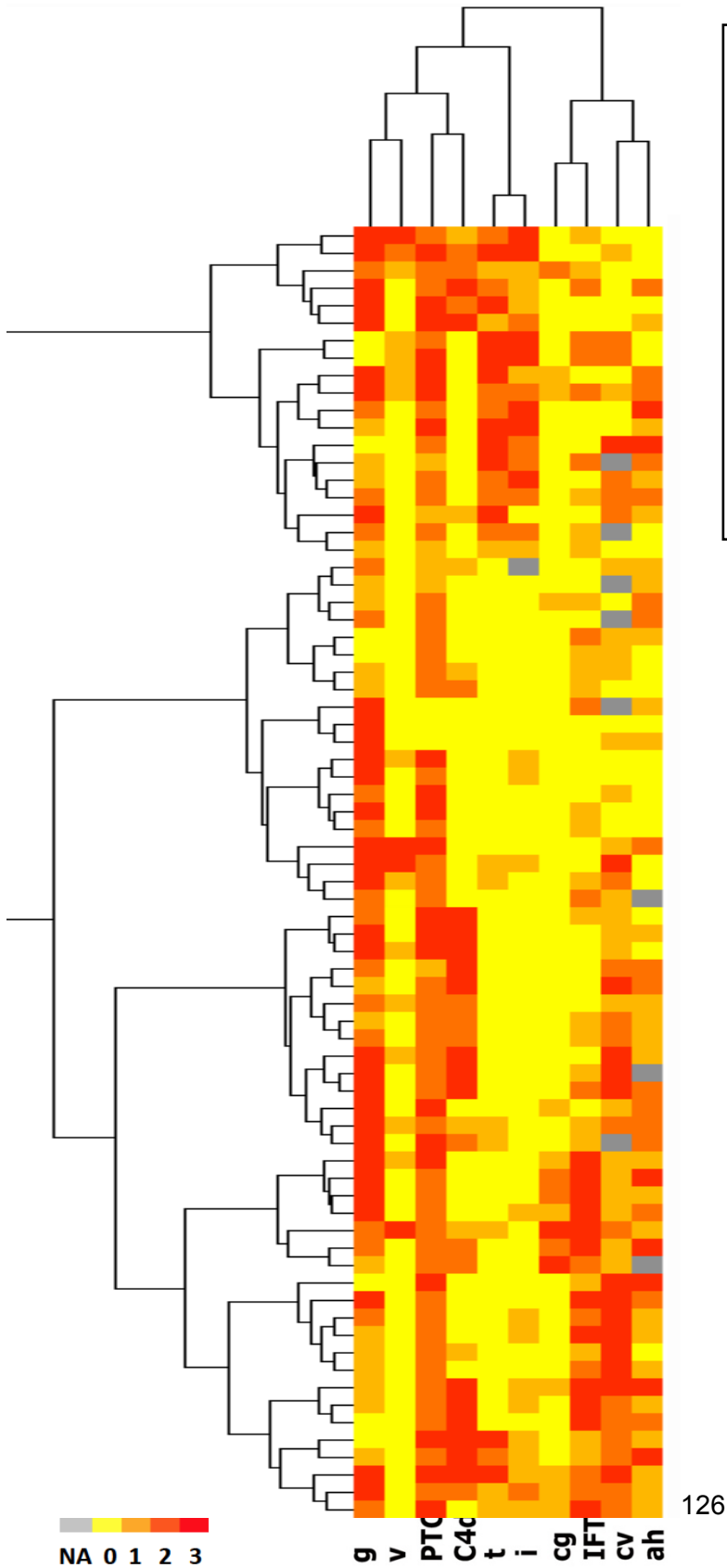
€ PRA calculé réalisé chez les patients transplantés après le 01/01/2009 n=11

Caractéristiques histologiques et immunologiques des rejets humoraux

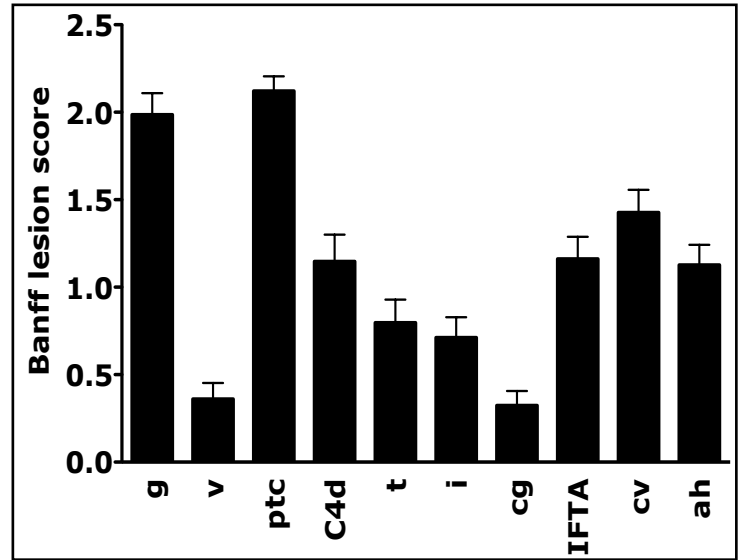
En histologie, les 74 biopsies au moment du diagnostic de rejet humoral retrouvaient une inflammation microvasculaire intense avec une moyenne de glomérulite (score g) de $1,9 \pm 1,1$ et une moyenne de capillarite péri-tubulaire (score cpt) de $2,1 \pm 0,7$. La déposition du C4d dans les capillaires péri-tubulaires était présente chez 34/74 patients (45,9%). Au moment du diagnostic, 46/74 (62,2%) reins avaient quelques lésions fibreuses et atrophiques. Parmi les 68 biopsies comprenant les artères adaptés pour analyse (73,5%), 50 avaient des lésions d'épaississement fibreux de l'intima des artérioles (artérioscléroses). La Figure 1 représente l'histologie du greffon rénal au moment du rejet. Le DSA immunodominant au moment du rejet humoral prouvé par biopsie était de classe I pour 26 des 74 patients (35,1%) et de classe II pour 48 des 74 patients (64,9%) avec une moyenne de MFI pour les DSA de classe I ou II de 3859 ± 471 .

Figure 1: Histologie des greffons rénaux au moment du rejet: Carte de chaleur colorés par seuil représentant (A) les caractéristiques histologiques des patients avec rejets et (b) la moyenne du score de Banff.

A



B



Evaluation de l'expression des gènes chez les patients avec rejet humoral aigu

Nous avons comparé le phénotype moléculaire avec les paramètres conventionnels (Table 2). Le score moléculaire du rejet humoral aigu et les transcrits endothéliaux DSA-sélectifs étaient fortement corrélés ensemble ($r=0,737$, $p<0,0001$) et avec le transcrit NK ($r=0,8415$, $p<0,0001$). Le score moléculaire du rejet humoral était corrélé avec le niveau de DSA circulant au moment du diagnostic de rejet humoral ($r=0,44$, $p=0,01$) et avec les dépôts de C4d dans les capillaires péri-tubulaires ($r=0,33$, $p=0,01$). Les transcrits endothéliaux DSA-sélectifs montraient des corrélations avec le score de glomérulopathie du transplant (cg) ($r=0,242$, $p=0,04$) et l'hyperplasie de la matrice mésangiale ($r=0,287$, $p=0,04$). Il y a avait une faible corrélation entre le score moléculaire du rejet humoral aigu ou les transcrits endothéliaux DSA-sélectifs et les lésions histologiques démontrant de l'inflammation microvasculaire et de l'inflammation interstitielle ou de la tubulite (Table 2).

Table 2: Résultats du microscope moléculaire au moment du rejet et corrélation avec les paramètres concomitant cliniques, histologiques et immunologiques.

Variables	Score moléculaire du rejet humoral aigu	Transcrits endothéliaux DSA-sélectifs
CLINIQUES		
eGFR au moment de la biopsie ($\mu\text{mol/L}$)	0.002	0.009
Proteinurie au moment de la biopsie (g/L)	0.030	0.076
IMMUNOLOGIQUES		
DSA avec MFI _{max} de classe I ou II au moment du rejet	0.442**	0.273*
HISTOLOGIQUES		
Glomérulite (g score)	0.036	0.030
Capillarite péri-tubulaire (cpt score)	0.171	0.207
Inflammation Interstitielle (i score)	-0.087	-0.031
Tubulite (t score)	-0.227	-0.094
Fibrose Interstitielle / Atrophie Tubulaire (ci, ct scores)	0.247	0.119
Endartérite fibreuse (cv)	0.112	-0.084
Glomérulopathie du transplant (cg score)	0.135	0.242*
Hypertrophie de la matrice mésangiale (mm score)	0.254	0.287*
Dépôts de C4d dans les capillaires du greffon (C4d Banff score)	0.328*	0.181
Score histologique humoral (g+ptc+v+cg+c4d)	0.069	0.163
MOLECULAIRE		
Score moléculaire du rejet humoral	1.000	0.737**
Transcrits endothéliaux DSA-sélectifs	0.737**	1.000
Transcrits NK	0.841**	0.613*
Transcrits des cellules T	0.123	0.172
Score de l'insuffisance rénale aiguë	0.171	0.125

Notes: Corrélation de Spearman avec correction de Bonferroni pour les comparaisons multiples

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Déterminants de la perte du greffon

Vingt et une dysfonctions du greffon rénal sont survenues après une médiane de suivi de 54 (rang 38-66) mois après le diagnostic initial de rejet humoral. La survie du greffon après censure de la mortalité était de 90,5%, 63,0% et 49,6% à 2, 6 et 8 ans respectivement après le diagnostic de rejet humoral (Figure 2A). L'analyse par modèle de Cox univarié des caractéristiques conventionnelles (Table 3) montrait que l'âge du donneur, l'eGFR au moment du diagnostic du rejet humoral aigu, le score de fibrose interstitielle et d'atrophie tubulaire (FITA), le score de glomérulopathie du transplant (cg) et les dépôts de C4d étaient significativement associés avec la perte du greffon rénal. Le score histologique humoral était aussi associé avec l'augmentation du risque de perte du greffon. Les paramètres moléculaires associés avec la perte du greffon étaient le score moléculaire de rejet humoral aigu et les transcrits endothéliaux DSA-sélectifs. Le score étudiant la charge des cellules T et le score d'insuffisance rénale aiguë (IRRAT) n'étaient pas associés avec le risque de perte du greffon.

Dans le modèle multivarié de Cox, les facteurs indépendamment associés avec la perte du greffon comprenaient les facteurs traditionnels suivants (âge du donneur, le score histologique humoral (g+cpt+v+cg+C4d), le score moléculaire de rejet humoral aigu (HR=2,22 ; 95%IC=1,37 - 3,58 , p=0,001) (Table 4A) et les transcrits endothéliaux DSA-sélectifs (HR=3,02 ; 95%IC=1,0 - 9,16 , p=0,049) (Table 4B).

Déterminants de la progression de la dysfonction chronique du greffon

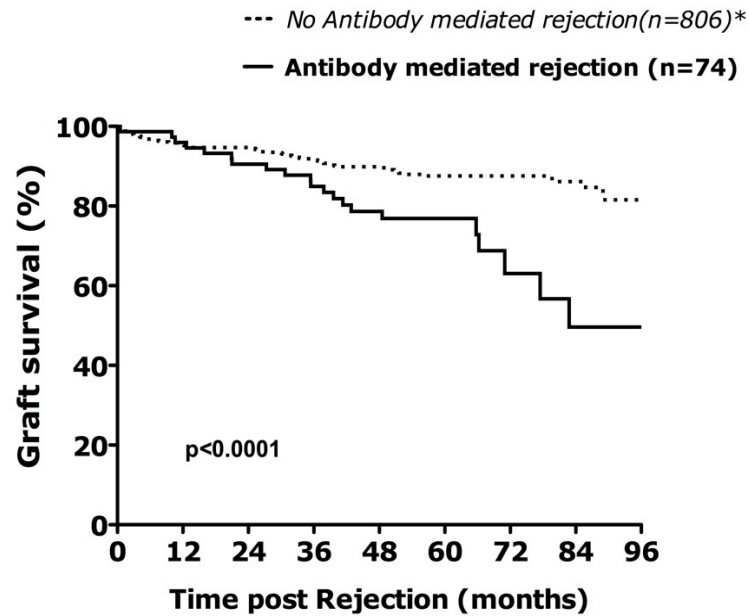
Cette analyse intégrait le suivi des biopsies réalisées après le diagnostic initial du rejet humoral. A 1 an et 2 ans après le rejet humoral, 35% et 68% des patients avaient une augmentation des lésions de glomérulopathie du transplant, définies par une augmentation de score cg du Banff ≥ 1 (Figure 2B).

Le temps médian de survenue d'une augmentation du score cg était de 16,6 mois après le diagnostic initial de rejet humoral aigu. L'analyse par Kaplan-Meier montrait que le score

moléculaire de rejet humoral aigu, les transcrits endothéliaux DSA-sélectifs, le score de capillarite péri-tubulaire et les dépôts de C4d étaient associés avec le délai d'augmentation des lésions de glomérulopathie du transplant (Figure 3).

Figure 2: Date de la perte du greffon renal (A) et date de la progression des lésions de glomérulopathie du transplant après le rejet humoral (B)

A



Number at risk

No ABMR	806	713	679	343	127	92	6	*
ABMR	74	71	67	44	30	6	3	

* Graft survival in patients without antibody mediated rejection is purely illustrative. In this situation, graft survival starts at time of transplantation

B

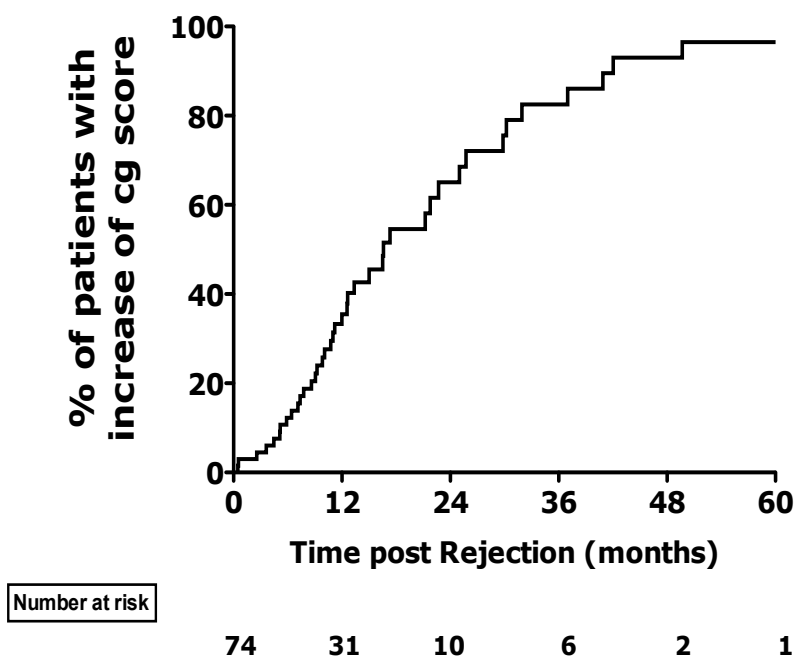


Table 3: Déterminants des conséquences du rejet humoral sur le greffon rénal: analyse univariée

			HR	95%IC	Valeur de p
Paramètres cliniques	Age du receveur (années)		1.02	0.98 - 1.06	0.308
	Ischémie froide (min)		1.007	0.97 - 1.05	0.713
	Age du donneur (années)	<60 years	1	-	
		≥60 years	3.58	1.45 - 8.87	0.006
	Proteinurie au moment de la biopsie	<0.15 g/L	1	-	
≥0.15 g/L		1.52	0.82 - 2.81	0.179	
Paramètres immunologiques	DSA† MFI immunodominant au moment du rejet		1.00004	0.99 - 1.0001	0.423
Paramètres fonctionnels	eGFR* à 1 an	eGFR ≥ 30	1	-	
		eGFR <30	3.04	1.28 - 7.22	0.012
Paramètres histologiques	Score de l'endartérite fibreuse (cv)		0.96	0.64 - 1.44	0.862
	Score de la glomérulopathie du transplant (cg)		1.85	1.18 - 2.90	0.007
	Fibrose interstitielle / Atrophie tubulaire (FIAT)		1.84	1.21 - 2.78	0.010
	Score de l'inflammation interstitielle (i)		0.75	0.45 - 1.24	0.261
	Score de tubulite (t)		0.66	0.39 - 1.11	0.119
	Score d'endothélite (v) §		1.20	0.45 - 3.08	0.134
	Score de glomerulite (g)		1.45	0.89 - 2.35	0.134
	Score de capillarite péri-tubulaire (cpt)		1.99	0.97 - 4.07	0.060
	Score du C4d ^Ω de Banff		1.47	1.03 - 2.08	0.032
	Score humoral histologique ^Υ		1.36	1.08 - 1.71	0.010
Paramètres moléculaires	score du rejet humoral aigu		8.82	1.82 - 42.73	0.007
	Transcrits endothéliaux DSA-sélectifs		2.94	1.00 - 8.69	0.050
	Transcrits NK		1.61	0.81 - 3.22	0.177
	Transcrits des cellules T		0.93	0.50 - 1.73	0.833
	Score de l'insuffisance rénale aiguë		1.17	0.63 - 2.18	0.607

Notes:

† DSA: Anticorps dirigés contre le donneur

* eGFR: DFG estimé selon la formule MDRD

§ Tous les épisodes de rejet avec endothélite dans cette étude ont été traités par une stratégie ciblant les anticorps. ²

^Ω C4d: score C4d de Banff

^Υ Score humoral histologique défini par g+ptc+v+cg+score C4d du Banff

Table 4: Déterminants des conséquences du rejet humoral sur le greffon rénal (modèles multivariés) utilisant le score moléculaire du rejet (A) et les transcrits endothéliaux DSA-sélectifs (B)

A

		Nombre de patients	Nombre d'évènements	HR	95% IC	Valeur de p
Age du donneur (années)	<60 ans	54	11	1	-	-
	≥60 ans	20	10	3.84	[1.48 – 9.96]	0.006
eGFR* au moment du rejet	≥30 mL/min	52	10	1		
	<30 mL/min	22	11	1.74	[0.70 - 4.35]	0.232
Score humoral (g+ptc+v+cg+c4d)	histologique	74	21	1.43	[1.09 – 1.90]	0.011
Score du rejet humoral		74	21	2.22	[1.37 - 3.58]	0.001

B

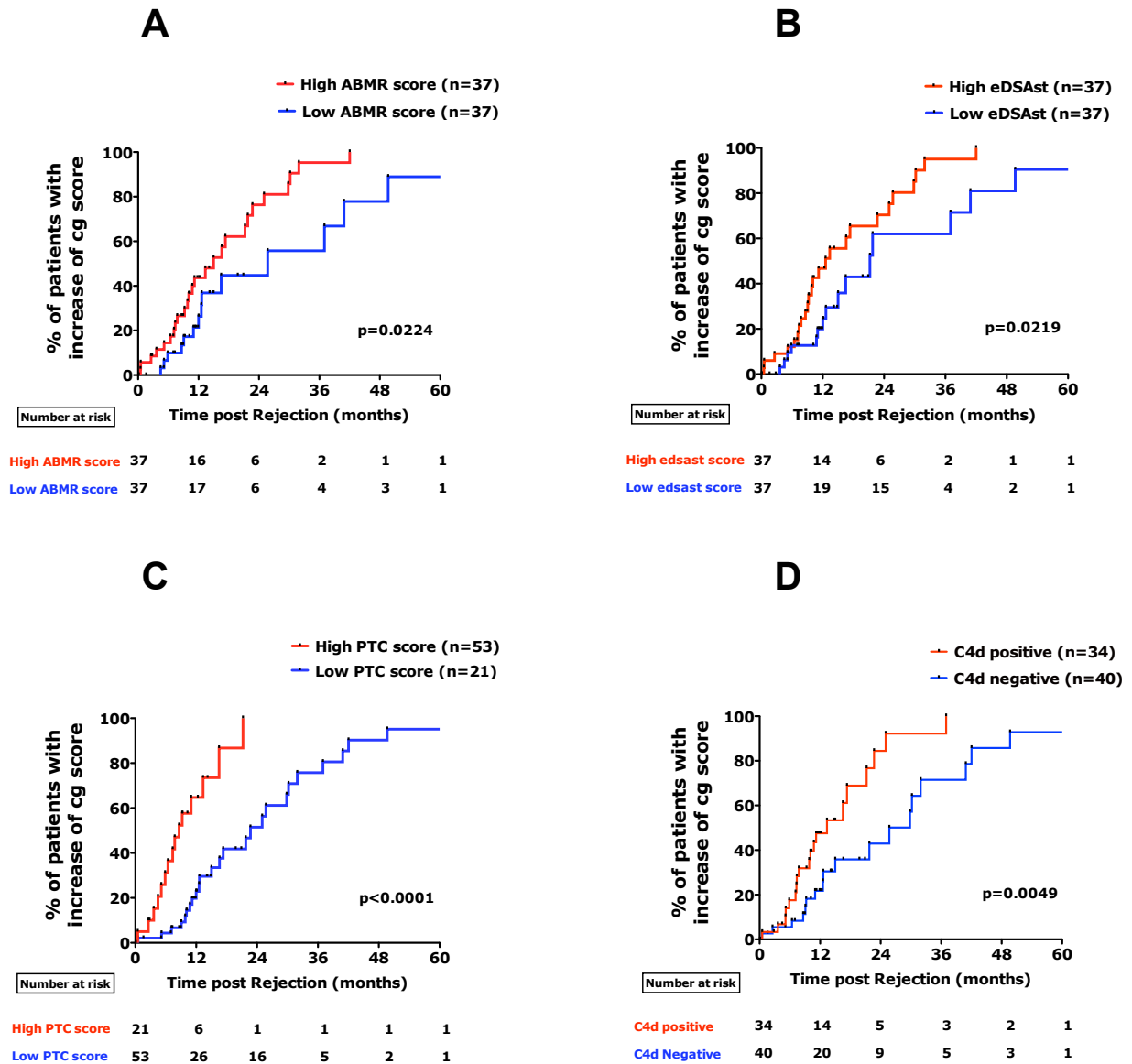
		Nombre de patients	Nombre d'évènements	HR	95% IC	Valeur de p
Age du donneur (années)	<60 ans	54	11	1	-	-
	≥60 ans	20	10	3.03	[1.16 – 7.90]	0.023
eGFR* au moment du rejet	≥30 mL/min	52	10	1		
	<30 mL/min	22	11	2.07	[0.74 - 5.84]	0.166
Score humoral (g+ptc+v+cg+c4d)	histologique	74	21	1.22	[0.94 – 1.60]	0.135
Transcrits endothéliaux DSA-sélectifs		74	21	3.02	[1.00 – 9.16]	0.049

Apport additif du microscope moléculaire pour prédire la perte du greffon rénale

L'inclusion du score moléculaire de rejet humoral aigu dans le modèle de référence permettait une augmentation de la capacité discriminative du modèle (c'est-à-dire sa capacité de distinction entre les patients qui ont perdu leur greffon et les autres), avec une augmentation significative de la C statistique passant de 0,770 à 0,8102 (Différence moyenne bootstrap = 0,0496505 ; 95%IC= 0,0473 – 0,0519). L'inclusion du score moléculaire du rejet humoral dans le modèle de référence permettait également de reclasser les patients à faible risque (absence de perte du greffon) et les patients à risque élevé (perte du greffon), avec un NRI = 1,0135 (95% IC= 0,5696 – 1,4573, $p < 0,0001$). L'addition du microscope moléculaire permettait de reclasser dans le bon sens (diminution du risque) 42 des 53 patients (79,2%) n'ayant pas présent de perte du greffon et inversement permettait de reclasser dans le bon sens (augmentation du risque) 15 des 21 patients (71,4%) présentant une perte du greffon (Figure 4). L'IDI était de 0,1579, $p = 0,00015$.

Ces analyses démontrent que l'addition du score moléculaire de rejet humoral aigu à l'approche conventionnelle améliorait la stratification du risque de dysfonction du greffon.

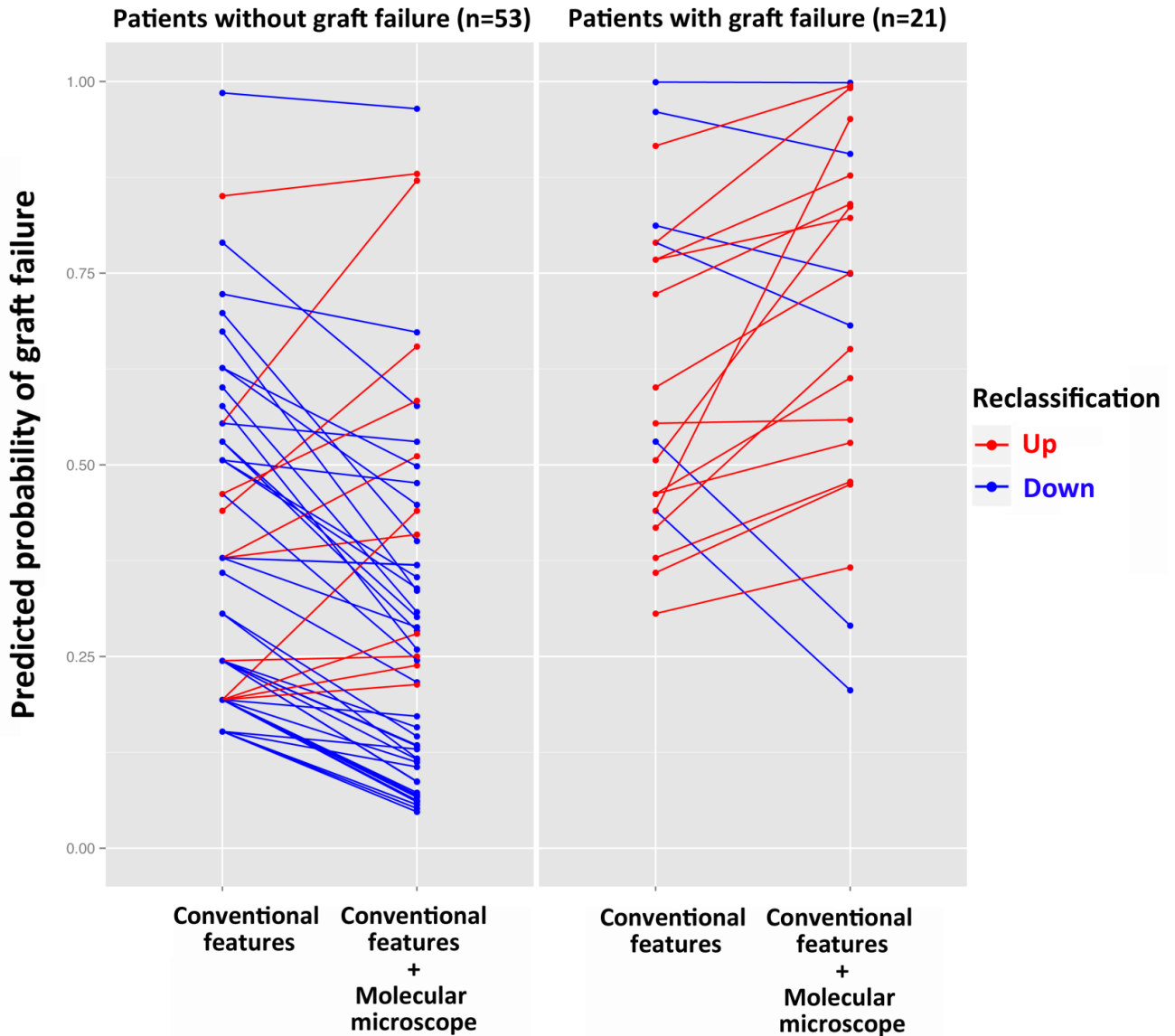
Figure 3: Temps de progression des lésions de glomérulopathie du transplant après rejet aigu humoral en fonction du score moléculaire du rejet humoral aigu (Panel A), des transcrits endothéliaux DSA-Sélectifs (Panel B), du score cpt de Banff (Panel C) et du marquage C4d dans les capillaires péri-tubulaires (Panel D)



Notes: La progression des lésions de glomérulopathie du transplant est définie par l'augmentation du score cg de Banff ≥ 1 . Les valeurs hautes et basses du score moléculaire du rejet aigu humoral et des transcrits endothéliaux DSA-sélectifs ont été définies en utilisant comme seuil les valeurs médianes pour le rejet aigu humoral et les transcrits endothéliaux DSA-sélectifs. Un score élevé de cpt était défini par un score cpt de Banff ≥ 2 en comparaison avec un faible score de cpt (< 2). Le marquage C4d était coté de 0 à 3 en fonction du pourcentage de capillaires péri-tubulaires ayant un marquage linéaire. Les grade 2 et 3 ont été considérés comme positifs.

Figure 4: Valeur additive du microscope moléculaire (score du rejet humoral aigu) pour la reclassification du risqué de perte du griffon (NRI continu).

Les lignes bleues chez les patients sans perte du griffon indiquent un mouvement de la prédiction du risque par le microscope moléculaire dans la bonne direction (vers le bas) ($42/53 = 79.2\%$). Inversement, les lignes rouges chez les patients avec perte du greffon indiquent une correction, vers le haut, modification de l'évaluation du risque lorsqu'on utilise le microscope moléculaire. ($15/21 = 71.4\%$).



Validation externe

La cohorte de validation externe était composée de 321 patients transplantés rénaux de l'hôpital Saint Louis entre le 1^{er} janvier 2006 et le 1^{er} janvier 2010. Il comportait 54 patients avec un rejet humoral précoce prouvé par la biopsie. Les caractéristiques cliniques et immunologiques des patients de la cohorte de validation sont détaillées dans la table supplémentaire 4. La médiane de suivi après la transplantation était de 54,5 (rang : 42-69) mois. Le score moléculaire de rejet humoral aigu et les transcrits endothéliaux DSA-sélectifs étaient associés de manière indépendante avec la perte du greffon (HR=4,45 ; 95%IC=1,01 – 19,95, p=0,049 pour le score moléculaire de rejet humoral aigu (Table supplémentaire 5A) et HR=6,68 ; 95%IC= 1,36 – 32,93, p=0,02 pour les transcrits endothéliaux DSA-sélectifs (Table supplémentaire 5B)).

Conclusion de l'étude

L'évaluation de l'expression des gènes dans le rejet humoral en transplantation rénale, permet d'identifier indépendamment des paramètres conventionnels les patients avec un risque élevé de perte du greffon rénal. Le système utilisant le microscope moléculaire donne au-delà de l'approche classique histologique et permet une stratification du risque qui peut guider la prise en charge clinique et les essais cliniques en transplantation.

Références concernant l'article sur le score moléculaire (JASN sous presse)

1. Garcia GG, Harden P, Chapman J. The global role of kidney transplantation. *Lancet*. 2012;379(9820):e36-8. Epub 2012/03/13.
2. Lefaucheur C, Loupy A, Vernerey D, Duong-Van-Huyen JP, Suberbielle C, Anglicheau D, et al. Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study. *Lancet*. 2013;381(9863):313-9. Epub 2012/11/28.
3. Einecke G, Sis B, Reeve J, Mengel M, Campbell PM, Hidalgo LG, et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009;9(11):2520-31. Epub 2009/10/22.
4. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL, Fieberg AM, Leduc R, Cosio FC, et al. Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. *Transplantation*. 2010;90(1):68-74. Epub 2010/05/14.
5. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *The New England journal of medicine*. 2010;363(15):1451-62. Epub 2010/10/12.
6. Montgomery RA, Lonze BE, King KE, Kraus ES, Kucirka LM, Locke JE, et al. Desensitization in HLA-incompatible kidney recipients and survival. *The New England journal of medicine*. 2011;365(4):318-26. Epub 2011/07/29.
7. Hartmann S, Gerber B, Elling D, Heintze K, Reimer T. The 70-Gene Signature as Prognostic Factor for Elderly Women with Hormone Receptor-Positive, HER2-Negative Breast Cancer. *Breast Care (Basel)*. 2012;7(1):19-24. Epub 2012/05/04.
8. Yang M, Rajan S, Issa AM. Cost effectiveness of gene expression profiling for early stage breast cancer: a decision-analytic model. *Cancer*. 2012;118(20):5163-70. Epub 2012/02/24.
9. Prat A, Parker JS, Fan C, Cheang MC, Miller LD, Bergh J, et al. Concordance among gene expression-based predictors for ER-positive breast cancer treated with adjuvant

- tamoxifen. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23(11):2866-73. Epub 2012/04/26.
10. Reeve J, Sellares J, Mengel M, Sis B, Skene A, Hidalgo L, et al. Molecular diagnosis of T cell-mediated rejection in human kidney transplant biopsies. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013;13(3):645-55. Epub 2013/01/30.
11. Halloran PF, Pereira AB, Chang J, Matas A, Picton M, De Freitas D, et al. Microarray diagnosis of antibody-mediated rejection in kidney transplant biopsies: an international prospective study (INTERCOM). *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013;13(11):2865-74. Epub 2013/10/15.
12. Sellares J, Reeve J, Loupy A, Mengel M, Sis B, Skene A, et al. Molecular diagnosis of antibody-mediated rejection in human kidney transplants. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013;13(4):971-83. Epub 2013/02/19.
13. Famulski KS, de Freitas DG, Kreepala C, Chang J, Sellares J, Sis B, et al. Molecular phenotypes of acute kidney injury in kidney transplants. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2012;23(5):948-58. Epub 2012/02/22.
14. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2014;14(2):272-83. Epub 2014/01/30.
15. Hidalgo LG, Sis B, Sellares J, Campbell PM, Mengel M, Einecke G, et al. NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2010;10(8):1812-22. Epub 2010/07/28.

16. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009;9(10):2312-23. Epub 2009/08/18.
17. Ogawa K, Tanaka K, Ishii A, Nakamura Y, Kondo S, Sugamura K, et al. A novel serum protein that is selectively produced by cytotoxic lymphocytes. *J Immunol*. 2001;166(10):6404-12. Epub 2001/05/09.
18. Hidalgo LG, Sellares J, Sis B, Mengel M, Chang J, Halloran PF. Interpreting NK cell transcripts versus T cell transcripts in renal transplant biopsies. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012;12(5):1180-91. Epub 2012/03/07.
19. Pencina MJ, D'Agostino RB. Overall C as a measure of discrimination in survival analysis: model specific population value and confidence interval estimation. *Statistics in medicine*. 2004;23(13):2109-23. Epub 2004/06/24.

Table supplémentaire 1: Caractéristiques des patients inclus et exclus de l'étude

Variabes	Patients inclus n= 74	Patients exclus n= 27	p
CLINIQUES			
Age du receveur (<i>années</i>)	48.4 ± 13	47.2 ± 14	NS
Reprise de fonction retardée (<i>n, %</i>)	27 (36.4%)	8 (29.6%)	NS
Nombre de dialyse post-transplantation	1.2 ± 1.9	1.4 ± 3.5	NS
Rang de la transplantation (>1)	34 (48.6%)	9 (33.3%)	NS
Donneurs décédés (<i>n, %</i>)	67 (90.5%)	24 (88.8%)	NS
Sexe du receveur (<i>% male</i>)	43 (58.1%)	14 (51.8%)	NS
Moyenne de suivi post-transplantation (<i>mois</i>)	61 ± 20	52 ± 22	0.021
RESULTATS			
Moyenne de suivi post-transplantation (<i>mois</i>)	59 ± 20	52 ± 22	0.021
Pertes de greffon après le dernier suivi	21/74 (28.3%)	6/27 (22.2%)	NS
Patients décédés après le dernier suivi	5/74 (6.7%)	2/27 (7.4%)	NS
Délai entre la transplantation et le suivi (<i>mois</i>)	9.1 ± 14	7.7 ± 14	NS
HISTOLOGIE au moment du rejet			
Score de glomérulite (g)	1.9 ± 1.1	1.4 ± 0.9	NS
Score de capillarite péri-tubulaire (ptc)	2.1 ± 0.7	2.1 ± 0.7	NS
Score d'endothélite (v)	0.4 ± 0.8	0.5 ± 1.0	NS
Score de glomérulopathie du transplant (cg)	0.3 ± 0.7	0.3 ± 0.9	NS
Score de l'inflammation interstitielle (i)	0.7 ± 1.0	0.4 ± 0.8	NS
Score de tubulite (t)	0.8 ± 1.0	0.5 ± 0.9	NS
Score de fibrose interstitielle/ atrophie (FIAT)	1.2 ± 1.0	1.3 ± 1.0	NS
Score d'épaississement fibro-intimal (cv)	1.4 ± 1.1	0.8 ± 1.2	NS
Score du C4d	1.2 ± 1.3	1.1 ± 1.0	NS
GFR au moment du rejet	44.8 ± 17	46.9 ± 16	NS
DSA au moment du rejet (positif)	74 (100%)	27 (100%)	NS
DSA max de Classe I ou II (MFI)	3859 ± 471	3259 ± 567	NS

Table supplémentaire 2: Gènes inclus dans le score ABMR

Lot de la sonde Affymetrix	Nom du gène	Symbole du gene
204726_at	cadherin 13	CDH13
211122_s_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	CXCL11
208335_s_at	Duffy blood group, chemokine receptor	DARC
219584_at	phospholipase A1 member A	PLA1A
226028_at	roundabout homolog 4	ROBO4
221841_s_at	Kruppel-like factor 4 (gut)	KLF4
228489_at	transmembrane 4 L six family member 18	TM4SF18
204115_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11	GNG11
206210_s_at	cholesteryl ester transfer protein, plasma	CETP ^c
226303_at	phosphoglucomutase 5	PGM5
203065_s_at	Caveolin 1	CAV1
205898_at	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	CX3CR1
223869_at	sclerostin	SOST ^c
228339_at	endothelial cell-specific chemotaxis regulator	ECSCR
227188_at	chromosome 21 open reading frame 63	C21orf63
204533_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10
204677_at	cadherin 5, type 2	CDH5
205984_at	corticotropin releasing hormone binding protein	CRHBP ^c
218736_s_at	palmdelphin	PALMD
210873_x_at	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	APOBEC3A
223836_at	fibroblast growth factor binding protein 2	FGFBP2
204103_at	chemokine (C-C motif) ligand 4	CCL4
228698_at	SRY (sex-determining region Y)-box 7	SOX7
37145_at	granulysin	GNLY
239942_at	-	-
205326_at	receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 3	RAMP3
205619_s_at	mesenchyme homeobox 1	MEOX1
213830_at	T cell receptor delta locus	TRDa
202112_at	von Willebrand factor	VWF
204681_s_at	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5	RAPGEF5

Table supplémentaire 3: Transcrits endothéliaux DSA-sélectifs

Lot de la sonde Affymetrix	Nom du gène	Symbole du gène
208335_s_at	Duffy blood group	DARC
213620_s_at	intercellular adhesion molecule 2	ICAM2
226028_at	roundabout homolog 4, magic roundabout (Drosophila)	ROBO4
204677_at	cadherin 5, type 2, VE-cadherin (vascular epithelium)	CDH5
209373_at	T-cell differentiation protein-like	MALL
211343_s_at	collagen, type XIII, alpha 1	COL13A1
204726_at	cadherin 13, H-cadherin (heart)	CDH13
206702_at	TEK tyrosine kinase, endothelial (venous malformations, multiple coetaneous and mucosal)	TEK
228698_at	SRY (sex-determining region Y)-box 7	SOX7

Table supplémentaire 4: Caractéristiques de bases pour la cohorte de validation ayant présenté un rejet humoral aigu à l'hôpital Saint Louis.

Patients	n=54
Moyenne d'âge du receveur (années)	49.4 ± 14
Ischémie froide (heures)	17.2 ± 7
Rang de la transplantation (>1)	11 (21.2%)
Donneurs décédés (n, %)	50 (96.2%)
Néphropathie initiale	
Néphropathie diabétique	5 (9.6%)
Hypertension / Néphroangiosclérose	8 (15.4%)
Glomerulonephrite / vascularite	12 (23.1%)
Néphropathie interstitielle / pyelonephrite	5 (9.6%)
Autres	10 (19.2%)
Indéterminées	12 (23.1%)
Moyenne d'âge du donneur (années)	51.6 ± 16
Sexe du donneur (male, n, %)	31 (59.6%)
IMMUNOLOGIE	
HLA-A, B, DR mismatch	4 ± 1.3
Statut du DSA au moment de la transplantation	
PRA lymphocytotoxique (% , moyenne)*	23 ± 30
cPRA (% , moyenne)*€	70
DSA circulants (n)	46 (85.2%)
DSAmx de classe I (n)	21
DSAmx de classe II (n)	25
Caractéristiques au moment de la biopsie	(n=54)
Creatinine (µmol/L)*	ND
eGFR (mL/min/1.73 m ²)*	37.0 ± 18
Proteinurie (g/L)*	NA
Patients (%) avec protéinurie >0.15 g/L	8/25 [§] (32%)
DSA circulants (n,%)	54 (100%)
Nombre de DSA (=1 ; ≥2)	33 (61%) ; 21 (39%)
DSA max : classe I / class II (n,%)	(25, 46.3% / 29, 53.7%)
DSAmx de classe I (MFI)**	3680 ± 1000
DSAmx de classe II (MFI)**	4137 ± 702
DSAmx de classe I ou II (MFI)**	4873 ± 899

€ PRA calculé chez les patients transplanté après le 01/01/2009 (n=5)

* variables continues exprimées en moyenne ± déviation standard

** variables continues exprimées en moyenne ± erreur standard

§ 29 données manquantes pour la protéinurie

ND = Non disponible

Table supplémentaires 5: Déterminants des conséquences du rejet humoral sur le greffon rénal (modèles multivariés) utilisant le score moléculaire du rejet (A) et les transcrits endothéliaux DSA-sélectifs (B)

A

		Nombre de patients	Nombre d'évènements	HR	95% IC	Valeur de p
Age du donneur (années)	<60 ans	38	16	1	-	-
	≥60 ans	16	10	2.17	[0.87 – 5.40]	0.097
GFR* au moment du rejet	≥30 mL/min	32	10	1	-	-
	<30 mL/min	22	16	4.72	[1.83 - 12.13]	0.001
Score humoral histologiques (p+ptc+v+cg+c4d)		54	26	1.07	[0.80 - 1.42]	0.649
Score moléculaire du rejet humoral (gu)		54	26	4.45	[1.01 - 19.95]	0.049

B

		Nombre de patients	Nombre d'évènements	HR	95% IC	Valeur de p
Age du donneur (années)	<60 ans	38	16	1	-	-
	≥60 ans	16	10	2.38	[0.96 – 5.94]	0.062
GFR* au moment du rejet	≥30 mL/min	32	10	1	-	-
	<30 mL/min	22	16	5.92	[2.15 – 16.31]	0.001
Score humoral histologique (p+ptc+v+cg+c4d)		54	26	1.05	[0.79 -1.40]	0.750
Transcrits endothéliaux DSA-sélectifs		54	26	6.68	[1.36 - 32.93]	0.020

Discussion des travaux publiés

Ce travail apporte une vision contemporaine du rejet aigu d'allogreffe en transplantation rénale. Grâce à une approche innovante intégrant des outils mathématiques, immunologiques et histologiques appliquée à une large cohorte de patients transplantés, nous avons individualisé 4 profils distincts de rejets : le rejet médié par des lymphocytes T sans endartérite (46%), le rejet médié par anticorps sans endartérite (24%), le rejet vasculaire médié par anticorps (21%) et le rejet vasculaire médié par des lymphocytes T (9%). Les deux dernières entités sont absentes de la classification internationale actuelle puisque jusqu'à présent, le diagnostic de rejet opposait le rejet médié par des lymphocytes T au rejet médié par anticorps. Cette étude met en lumière un nouveau profil de rejet de greffe, appelé rejet vasculaire. Il se caractérise par une inflammation de la paroi des artères des greffons en réponse à la présence d'anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur (rejet vasculaire médié par anticorps) ou à l'agression par les lymphocytes T (rejet vasculaire médié par des lymphocytes T sans endartérite). Ce travail démontre l'intérêt majeur de l'identification précise de ces nouvelles entités de rejet en termes de pronostic des transplantations. Le rejet vasculaire médié par anticorps a un effet extrêmement péjoratif dans l'évolution d'une greffe, justifiant clairement de l'individualiser des autres rejets aigus d'allogreffe.

L'attention des équipes de transplantation s'est focalisée depuis longtemps sur les lésions de rejet vasculaire, en raison de leur présentation et de leur sévérité^{115,116}. La sévérité de l'endartérite est gradée selon la classification de Banff de v1 à v3. Jusqu'à présent, les lésions d'endartérite font partie des critères diagnostiques de rejet médié par les lymphocytes T : grade IIA pour les patients avec des lésions v1 et grade IIB pour les patients avec des lésions v2. Seuls les cas de nécrose fibrinoïde et d'artérite transmurale (v3) peuvent être considérés aujourd'hui comme composante des deux types de rejets, médié par lymphocytes T de grade III ou médié par anticorps^{18,21}.

Toutefois, dans une de nos précédentes études des biopsies de patients chez lesquels le diagnostic retenu était celui de rejet humoral, nous avons remarqué que ces lésions d'endartérite étaient fréquemment associées aux lésions d'inflammation de la microcirculation. 57,1% des patients avec un rejet médié par anticorps avaient des lésions v1 ou v2, et ces lésions étaient associées à une mauvaise évolution ³⁸. Notre étude permet donc d'individualiser ces lésions de « rejet vasculaire » en deux profils distincts : le rejet vasculaire médié par anticorps et le rejet vasculaire médié par les lymphocytes T. L'endartérite s'associe le plus souvent (74%) à la présence d'anticorps anti-HLA circulants dirigés contre le donneur. De la même manière, elle s'accompagne fréquemment de lésions d'inflammation de la microcirculation des greffons (88%), même si elles sont moins sévères que celles observées au cours du rejet humoral classique. L'activation par les anticorps anti-HLA de la voie classique du complément, mise en évidence par le marquage usuel du C4d dans les capillaires péri-tubulaires, est présente chez seulement 56% des patients avec un rejet vasculaire médié par anticorps. Toutefois, nous observons, dans 75% des cas de rejet vasculaire médié par anticorps, un dépôt de la fraction C4d du complément dans l'endothélium artériel. Ces résultats confirment les données moléculaires sur l'expression des gènes d'activation endothéliale ^{67,74} et soutiennent notre hypothèse sur la capacité des anticorps anti-HLA à activer à la fois l'endothélium de la micro et de la macrocirculation. Les anticorps anti-HLA peuvent donc induire des lésions d'endartérite, y compris modérées (v1, v2). Ces lésions ne doivent plus être interprétées comme des arguments directs en faveur du diagnostic de rejet médié par les lymphocytes T, comme c'est actuellement le cas dans la classification internationale. Elles font partie du spectre général de modifications inflammatoires de l'endothélium en réponse aux anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur.

D'autres travaux ont mis en lumière la capacité de différents acteurs de la réaction allo-immune à induire des lésions vasculaires. En effet, des arguments expérimentaux soulignent maintenant le rôle des anticorps anti-HLA, des lymphocytes T et B, des cellules NK ou de l'interféron- γ dans le phénomène de vasculopathie de rejet ^{117,118}. Néanmoins, les mécanismes sous-jacents sont insuffisamment précisés. Dans un modèle murin de transplantation cardiaque, Uehara S et al suggèrent que le rôle des anticorps anti-HLA de classe I dans le développement de l'artériopathie en transplantation passe par l'activation de la voie classique du complément ¹¹⁹. D'autres études mettent en avant plutôt des effets indépendants de l'activation du complément (fonctions Fc indépendantes) tels que l'activation de la prolifération et/ou la migration des cellules endothéliales induites par les anticorps anti-HLA de classe I ¹²⁰⁻¹²². Nos résultats ont des implications thérapeutiques majeures. Le rejet vasculaire est traditionnellement considéré comme une forme clinique sévère de rejet ne répondant pas au traitement classique. Il nécessite des thérapeutiques immunosuppressives puissantes, comme l'OKT3 ou le sérum anti-lymphocytaire (Thymoglobuline) ⁶⁹, avec néanmoins une efficacité aléatoire. L'individualisation précise de ces formes de rejet et leur caractérisation physiopathologique ouvrent la voie à des progrès thérapeutiques conséquents. Leur caractérisation physiopathologique permettra de développer des stratégies thérapeutiques rationnelles et leur individualisation au sein du spectre du rejet d'allogreffe permettra de correctement évaluer l'efficacité de ces traitements, à l'image des progrès réalisés ces dernières années pour les rejets humoraux. La résistance de ces rejets aux thérapies classiques, dirigées contre les rejets médiés par des lymphocytes T, est connue depuis les années 90 ¹²³. Les progrès réalisés dans le diagnostic du rejet médié par anticorps ont permis d'amélioration des résultats thérapeutiques ^{42,43,46,124-126}.

Le principe du traitement du rejet médié par anticorps est fondé sur la diminution des taux d'anticorps anti-HLA circulants et de leur production. Dans l'état actuel des connaissances,

ce traitement associe des échanges plasmatiques ou de l'immunoabsorption, de fortes doses d'IVIg, du rituximab (anti-CD20) et plus récemment l'inhibiteur du protéasome (bortezomib) ou de l'activation du complément⁶³. Le choix de la stratégie thérapeutique est déterminant pour l'évolution des rejets vasculaires médiés par anticorps. Les patients traités exclusivement par une thérapie de type rejet cellulaire ont un risque significativement plus important de perte de greffon que les patients recevant une thérapie intensive ciblant les anticorps anti-HLA de type rejet humoral. L'identification précise des rejets vasculaires et de leurs mécanismes devrait ainsi permettre la mise en place de stratégies thérapeutiques spécifiques permettant d'améliorer leur pronostic. Notre étude permet aussi de hiérarchiser les éléments qui individualisent les différents profils de rejets. Ainsi, nous avons déterminé que la meilleure capacité discriminatoire appartient aux anticorps anti-HLA spécifiques du donneur et aux lésions inflammatoires de la micro et de la macrocirculation qu'ils induisent. De manière peu surprenante, la fixation de la fraction C4d du complément par l'endothélium des capillaires péri-tubulaires ne devrait plus être considérée comme le principal élément discriminatoire dans le diagnostic de rejet. Dans notre étude, 26,2% des rejets humoraux classiques et 42,9% des rejets vasculaires médiés par anticorps sont C4d négatif. Plusieurs groupes s'accordent sur le caractère spécifique du marquage C4d comme témoin de l'activation de la voie classique du complément par le conflit antigène-anticorps anti-HLA. Toutefois, ce marquage a une faible sensibilité, une large variabilité dans le temps et il reste insuffisamment corrélé à l'activité de la maladie^{36,39,127}. Nos données renforcent ces récentes observations sur une très large cohorte de rejets humoraux. Elles convergent vers la possibilité de développement de lésions spécifiques induites par les anticorps anti-HLA en l'absence de marquage C4d dans les greffons.

Nous avons besoin en transplantation d'une évaluation plus précise du rôle de l'activation du complément dans les phénomènes de rejet, et de manière plus générale dans le processus humoral, sans se limiter au dépôt de la fraction C4d du complément dans le greffon. D'autres marqueurs doivent être utilisés pour comprendre les mécanismes sous-jacents déclenchés par la présence d'anticorps anti-HLA et améliorer les performances diagnostiques des

marqueurs actuels. Il est reconnu depuis 40 ans que les anticorps cytotoxiques présents au moment de la transplantation sont responsables d'une forme violente de rejet d'allogreffe ²⁹. Toutefois, les tests de cytotoxicité dépendante du complément qui sont utilisés en pratique souffrent d'un manque de sensibilité et de spécificité. Leur utilisation à grande échelle pour le suivi immunologique en post transplantation est inadaptée en raison des réserves limitées de cellules B et T des donneurs. Parmi les 3 voies d'activation du complément, c'est la voie classique qui dépend de l'action des anticorps et de la fixation de la fraction C1q. La liaison de l'antigène à l'anticorps d'une manière permettant la fixation du C1q déclenche l'activation de la cascade du complément ³⁷. La liaison des C1q aux régions constantes des immunoglobulines change la conformation de C1r, qui peut alors activer le zymogène C1s. Une fois activé, C1s agit sur les deux composants suivants de la voie classique en clivant le C4, puis le C2 pour donner deux grands fragments C4b et C2b qui forment la C3 convertase de la voie classique (Figure 21) ¹²⁸.

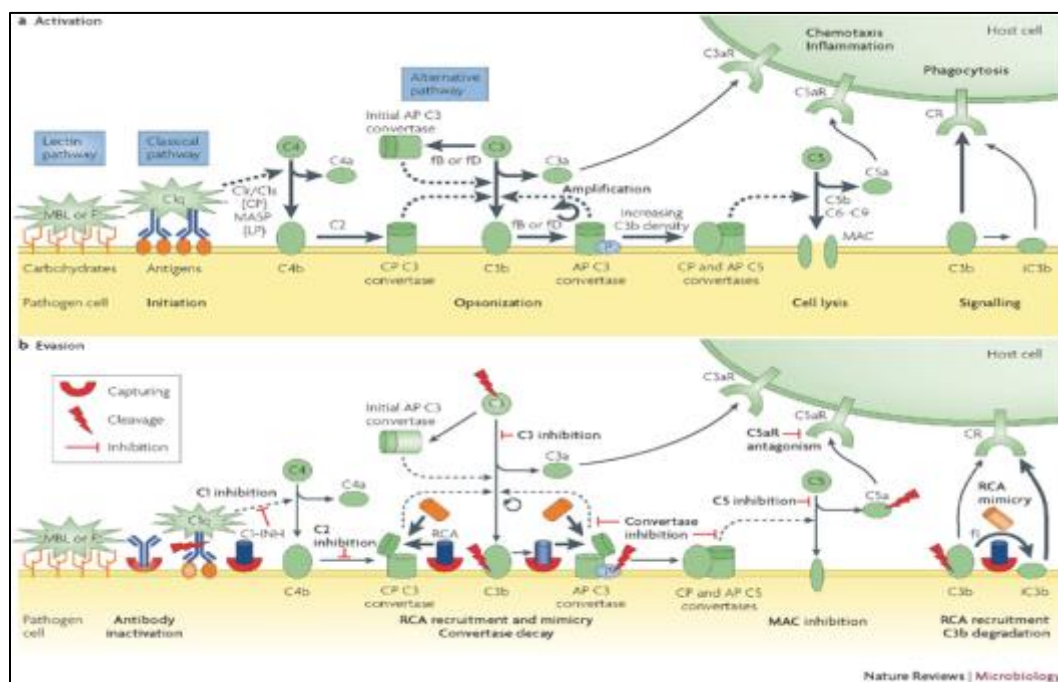


Figure 21 : La voie classique de l'activation du complément déclenchée par le complexe C1 génère la convertase C3. Panel a : celle-ci clive de nombreuses molécules de C3 en C3b qui se fixent à la surface des cellules et vont générer l'activité de la C5 convertase et du C3a, un médiateur de l'inflammation. Panel b : inhibition et modulation de l'activation du complément par des agents intervenant à différents moments de la cascade du complément.

Ainsi, dans la deuxième partie de ce travail, nous avons remonté la cascade du complément jusqu'au premier composant, le complexe C1, qui déclenche l'activation de la voie classique. Nous avons étudié la propriété des anticorps anti-HLA à fixer le complément et nous l'avons confrontée aux conséquences histologiques observées dans les biopsies et au dépôt de C4d dans les greffons. Nous avons utilisé la même approche qui consiste à intégrer des données immunologiques, histologiques, cliniques et épidémiologiques sur de larges cohortes de patients. Le protocole prévu pour cette étude permet d'associer les informations sur les caractéristiques des anticorps circulants aux phénotypes histologiques observés de manière concomitante dans les greffons. Nous proposons ainsi un modèle humain pertinent permettant d'analyser l'interaction des anticorps anti-HLA avec le greffon.

Déterminer la capacité des DSA à fixer le C1q par technique sensible permet d'identifier précocement le potentiel cytotoxique des anticorps anti-HLA avant qu'ils ne déclenchent la cascade du complément. Jusqu'à présent, seules quelques données suggèrent que l'existence d'une liaison spécifique du C1q aux DSA pourrait être plus précise pour définir le rejet humoral que la simple détection des immunoglobulines G¹²⁹. Ainsi, la détection des DSA qui fixent le complément pourrait avoir un impact sur l'évaluation de la survie des greffons^{130,131}.

Dans ce travail, les anticorps anti-HLA spécifiques du donneur ont été détectés par des tests hautement sensibles et spécifiques utilisant la technologie Luminex, largement répandue aujourd'hui dans tous les laboratoires d'histocompatibilité modernes. Les antigènes HLA purifiés sont coatés sur les billes, chaque type de bille étant l'équivalent d'une suspension de lymphocytes de phénotype HLA connu de classe I et/ou de classe II. Nous avons utilisé la même technologie Luminex pour définir la capacité de ces anticorps anti-HLA à fixer la fraction C1q du complément¹³². En comparaison au test conventionnel qui détecte l'ensemble des spécificités IgG d'anticorps anti-HLA, le test C1q a été adapté à la détection d'un sous-ensemble d'anticorps anti-HLA, ceux qui ont la propriété de fixer cette fraction du complément.

Parmi les patients présentant des DSA détectables dans la première année post transplantation, seulement 24,4% ont des DSA fixant le complément. Ces anticorps sont responsables de lésions monomorphes dans le greffon, avec des signes d'inflammation de la microcirculation (dans 87% des cas) et, dans une moindre mesure, dans l'interstitium.

Nous démontrons une étroite association entre la capacité des DSA à fixer le complément et l'augmentation dramatique du risque de perte de greffon. Grâce à cette capacité des DSA nous isolons dans cette étude un groupe de patients qui présente un risque majeur de perte de greffons dans les 5 premières années de greffe. Ce risque est 11,2 fois plus important que chez les patients avec des DSA ne fixant pas le complément. Ces patients ne sont pas identifiés par l'approche actuelle qui consiste à détecter les DSA et éventuellement leur MFI en post greffe. Nous apportons donc un nouveau marqueur du risque immunologique indépendant des marqueurs actuellement utilisés. Nous proposons par ailleurs un modèle de stratification du risque de perte de greffons dans la première année de greffe. Par une approche méthodologique solide, nous montrons que cette propriété des DSA augmente significativement la performance du modèle de stratification.

Nous démontrons que la détection en post transplantation des DSA fixant le complément représente l'élément immunologique le plus informatif en termes d'échec de la transplantation. Il s'ajoute ainsi aux deux critères classiquement reconnus dans la littérature et utilisés comme « *surrogate markers* » dans les protocoles interventionnels : le débit de filtration glomérulaire et le degré de fibrose interstitielle à la fin de la première année post transplantation^{113,133}.

Ces anticorps anti-HLA qui fixent le complément ont quelques particularités notables. Ils sont pour la plupart de classe II (dans 69% des cas), avec des MFI supérieures à celles des DSA qui ne fixent pas le complément. Toutefois, leur association au risque de perte de greffon est indépendante des niveaux de MFI de ces DSA. Les deux tests apportent des informations complémentaires sur les caractéristiques des DSA : l'un sur la spécificité, l'autre sur le potentiel cytotoxique de ces anticorps.

Cela n'exclue pas l'existence d'une corrélation entre le taux d'anticorps et leur capacité à fixer le complément. Néanmoins, cette relation ne peut pas être évaluée sur la base du rapport aux MFI des DSA, car les MFI ne représentent en aucun cas une évaluation quantitative des DSA circulants.

Nous mettons aussi en évidence une autre caractéristique importante de ces anticorps anti-HLA qui fixent le complément, celle de leur variabilité dans le temps. Ainsi, 70% des DSA qui fixent le complément en post transplantation ne présentent pas cette capacité au moment de la greffe ; ces anticorps sont associés au risque le plus élevé de perte de greffons. Aussi, nous observons que la moitié des DSA qui fixent le complément le jour de la transplantation perdent cette propriété ultérieurement, très probablement en raison du traitement immunosuppresseur utilisé pour la transplantation. Ces patients ont un risque faible de perte de greffons. La compréhension de cette variabilité est essentielle pour pouvoir envisager des stratégies thérapeutiques ciblées. Des données de l'équipe de Pittsburgh¹³⁴ suggèrent que certaines thérapies visant à diminuer le taux d'anticorps anti-HLA, comme les échanges plasmatiques associés au bortézomib, peuvent conduire à la perte de la capacité des DSA à fixer le complément et améliorent ainsi le pronostic de la greffe.

En stratifiant le risque de perte précoce du greffon et en démontrant l'impact majeur de la capacité des DSA à fixer le C1q sur la survie, nous ouvrons, pour cette population à haut risque, la voie à de futures études thérapeutiques, telles que l'inhibition de la cascade du complément (inhibiteur de la C1-estérase, inhibiteur de la phase terminale, anti-C5)¹³⁵⁻¹³⁷ ou sa modulation (Figure 21, Panel b). Ces thérapies pourront désormais être évaluées de manière plus rationnelle grâce à l'identification précise des populations cibles. L'approche par stratification que nous proposons répond donc à un besoin clinique réel du monde de la transplantation d'organe : celui de la mise en place de stratégies thérapeutiques et d'études randomisées pour améliorer le succès des greffes des patients immunisés.

Discussion des travaux soumis ou en cours de publication

1) Apport du microscope moléculaire dans la stratification du risque

Dans une population consciencieusement phénotypée de patients transplantés rénaux, pour lesquels un diagnostic de rejet humoral aigu prouvé par une biopsie rénale a été réalisé, nous avons démontré l'utilité de la mesure des transcrits par étude moléculaire des biopsies en complément de l'approche traditionnelle dans la stratification du risque de perte du greffon.

Notre étude examine le risque de perte du greffon dans une large cohorte de patients présentant des rejets humoraux précoces avec un suivi important et une prise charge standardisée utilisant une stratégie thérapeutique approuvée par le FDA. Dans cette population, nous avons utilisé des outils contemporains afin de préciser le phénotype du greffon en association à une évaluation systématique de l'expression de ses gènes pour représenter le spectre complet du rejet humoral. Cette étude a utilisé un modèle de maladie précoce utilisant une cohorte unique comportant des rejets précoces, ce qui nous a permis de nous concentrer sur la progression de la maladie en rapport avec le processus humoral. Un des atouts de cette cohorte de patients est de s'affranchir au maximum des interférences potentielles d'autres maladies associées aux rejets humoraux

Nous avons utilisé dans cette étude une approche méthodologique pour la reclassification, la distinction et les analyses de performances, dans le but d'évaluer le bénéfice du microscope moléculaire à travers les outils conventionnels. Ceci démontre un bénéfice individuel de l'approche utilisant le microscope moléculaire lorsqu'il est associé aux caractéristiques conventionnelles. L'évaluation conventionnelle permet effectivement de diagnostiquer le rejet humoral aigu mais est insuffisante pour l'estimation précise du risque.

Notre hypothèse est que le score moléculaire du rejet humoral aigu et les transcrits endothéliaux reflètent un remodelage actif de la microcirculation, secondaires aux agressions récentes des anticorps et de ses mécanismes effecteurs. Ce score peut donc être utilisé comme compagnon des paramètres conventionnels comme l'histologie.

Cette étude renforce la notion que la classification des critères histologique d' « activité », incluant la glomérulite, la capillarite, le C4d et l'endartérite pourrait ne pas être adapté pour stratifier le risque à l'intérieure de la maladie. Cette situation diffère clairement de la comparaison entre la maladie et l'absence de maladie (ici le rejet humoral et une autre maladie) où ces paramètres sont constamment et fortement associés avec l'augmentation du risque de perte du greffon.

2) Impact du rejet humoral infraclinique dans la survie du greffon

Dans l'étude sur le rejet humoral indolent, portant sur une large cohorte de transplantés rénaux, nous démontrons que la nouvelle entité récemment décrite « rejet humoral infraclinique » était indépendamment associée à un pronostic rénal péjoratif à long terme.

A un an de la transplantation, alors que leur fonction rénale était parfaitement stable, 27% des patients présentaient un rejet infraclinique qui n'aurait pas pu être détecté en absence de biopsie protocolaire. Et 48,2% de ces rejets infracliniques étaient à médiation humorale (s-ABMR). Nous avons également montré que les patients du groupe s-ABMR progressaient vers la perte du greffon rénal quelque soit le degré de fibrose interstitielle et quelque soit le DFG au moment de la biopsie.

De plus nous observons que la créatinine, marqueur de référence de la fonction rénale, est un indicateur biologique très peu sensible, en particulier pour un DFG compris entre 50 et 90 mL/min, ce qui est la situation la plus fréquente pour les patients à un an de la transplantation rénale.

Ainsi, l'intérêt des biopsies protocolaires est de dresser un état des lieux histologique du greffon et de déterminer les lésions infracliniques à un stade précoce et potentiellement accessible à un traitement. Il n'existe à l'heure actuelle aucun consensus fort quant à la réalisation systématique de biopsies de dépistage dans toutes les équipes de greffe, notamment par crainte des complications du geste. Toutefois, la survenue d'effets indésirables après biopsie de greffon reste faible, autour de 2% selon les principales séries dont celle réalisée à l'Hôpital Necker.

De plus, il n'existait pas d'association entre s-TCMR détecté à un an de greffe et survie rénale à long terme. Ceci confirme les études récentes qui montrent que lorsqu'il est traité de manière précoce et adéquate, le s-TCMR n'est pas associé une augmentation du risque de perte du greffon. Néanmoins lorsque le s-TCMR apparaît plus tardivement, il peut refléter une mauvaise observance thérapeutique, et avoir alors un impact très péjoratif sur la survie du greffon en précipitant l'apparition de DSA et la survenue d'un ABMR.

Enfin ce travail met en exergue le manque de précision autour des définitions du rejet « borderline » et du TCMR. L'appréciation de ces lésions et les décisions thérapeutiques associées reste à la discrétion du clinicien. En effet dans cette série, 35 patients inclus dans le groupe « sans rejet » présentaient des lésions « borderline » sans modification de leur fonction rénale. Ils n'ont reçu en conséquence aucun traitement spécifique. A l'opposé, d'autres patients présentant les mêmes lésions (c'est-à-dire des foyers de tubulite (t1, t2 ou t3) et un infiltrat interstitiel mineur (i0 ou i1) ou un infiltrat interstitiel (i2, i3) associé à des foyers de tubulite t1) ont bien reçu un traitement et ont alors été inclus dans le groupe s-TCMR. Ce problème a déjà été soulevé par Halloran et coll. qui propose un outil moléculaire pour lever l'ambiguïté de définition histologique.

Les résultats de cette étude monocentrique devront être confirmés dans d'autres centres avant de pouvoir être généralisés. Ainsi une cohorte de validation de 321 patients

greffés entre le 1^{er} janvier 2006 et le 1^{er} janvier 2010, est actuellement en cours de constitution à l'Hôpital St Louis.

Notre étude apporte des arguments en faveur du bénéfice de la détection précoce de modifications histologiques secondaires un rejet humoral infraclinique. Cette situation clinique risque d'être de plus en plus fréquente, compte tenu du nombre croissant de patients hyperimmunisés inscrits sur liste d'attente, et susceptibles de recevoir une greffe HLA-incompatible.

Enfin cette stratégie de dépistage systématique précoce avec détermination du phénotype de rejet infraclinique pourrait permettre une intervention thérapeutique personnalisée, et ciblée sur les anticorps telle que des immunoglobulines intraveineuses, des échanges plasmatiques, du rituximab, des inhibiteurs de protéasome (bortezomib), ou des agents ciblant le complément par exemple un anticorps monoclonal anti-C5 (eculizumab) ou anti-C1.

La principale limite de cette étude est l'incapacité à définir la meilleure stratégie thérapeutique pour les patients du groupe s-ABMR. En effet, nous avons observé une tendance à une diminution du taux de perte de greffon chez les patients qui avaient reçu un traitement à visée humorale, comparativement aux patients du même groupe qui n'ont reçu aucun traitement spécifique. Clairement, notre étude n'était pas été conçue pour répondre à cette question, mais elle a permis d'établir des bases pour de futures études interventionnelles concernant le traitement du rejet humoral infraclinique.

Perspectives du travail de recherche

Ce travail illustre l'approche que notre équipe développe depuis 4 ans en transplantation rénale, intégrant les outils immunologiques, histologiques, mathématiques à nos compétences en néphrologie et en biologie. Nous partons de larges cohortes de patients transplantés, permettant une approche épidémiologique des variabilités interindividuelles et nous identifions des populations à risque définies par des phénotypes immunologiques et histologiques distincts. Nous avons ainsi défini des entités pertinentes cliniquement, comme le rejet vasculaire médié par anticorps, le rejet humoral infraclinique ou le développement en post transplantation d'anticorps anti-HLA potentiellement cytotoxiques fixant la fraction C1q du complément (Figure 22). L'identification de ces populations à risque constitue un enjeu de santé publique majeur pour le développement de stratégies thérapeutiques adaptées.

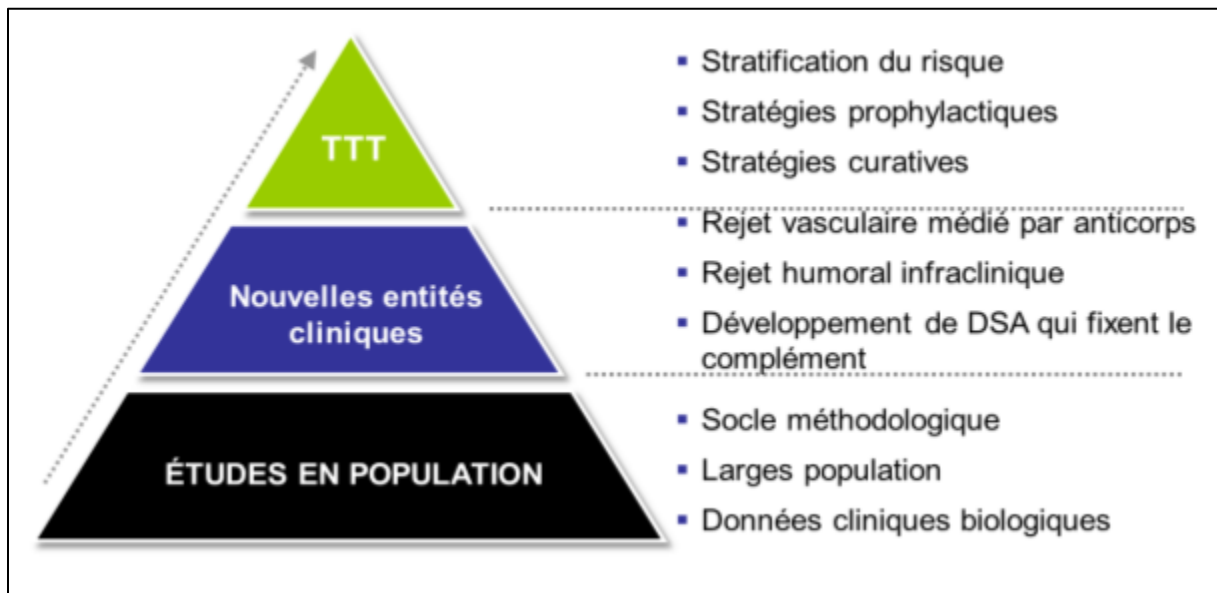


Figure 22 : Développement de notre stratégie de recherche en transplantation. Discussion des travaux en cours de publication et soumis pour publication

1) Compléter l'Intégration des données moléculaires dans le greffon rénal

La dernière décennie a été marquée par l'apparition de nouveaux outils de recherche, regroupés sous le terme anglo-saxon *omics*, ayant la particularité de tester de façon globale la réponse à une situation pathologique. Si la génétique et la génomique ont été les premières technologies à être appliquées au champ de la transplantation, la protéomique, puis la métabolomique sont venues enrichir notre arsenal. La technologie des puces à ADN, ou *DNA microarray*, permet d'analyser l'expression des gènes à très large échelle. Nous envisageons d'intégrer aux données immunologiques et histologiques actuelles l'analyse des transcrits au niveau des biopsies rénales.

L'objectif est double :

- apporter un éclairage complémentaire sur les processus pathologiques d'allogreffe déclenchés par les anticorps anti-HLA. Nous comptons analyser l'expression des gènes du complément, de l'activation endothéliale et des transcrits NK de biopsies de greffons de patients qui développent des DSA en post transplantation. Nous allons comparer le profil des transcriptomes des patients avec des DSA fixant le complément à ceux de patients avec des DSA ne fixant pas le complément et intégrer ces données dans des phénotypes immuno-histo-cliniques pertinents.
- définir des signatures moléculaires de rejet humoral et identifier des éléments d'activité de la maladie. Les marqueurs utilisés aujourd'hui (histologiques, C4d, détection et MFI des DSA) permettent de poser le diagnostic de rejet humoral, avec une bonne performance, sans toutefois pouvoir prédire l'activité de la maladie et la réponse au traitement. Cela permettrait d'intégrer la notion du phénomène humoral dans un processus dynamique et évolutif, et de fournir des éléments utiles au suivi des patients après la transplantation.

Ce projet sera réalisé en collaboration avec l'équipe du Pr P. Halloran (Laboratory of Transplant Applied Genomic Center, University of Alberta, Edmonton, Canada).

2) Compléter la caractérisation des propriétés des anticorps anti-HLA pathogènes

Ce travail a démontré que le pouvoir pathogène des anticorps anti-HLA dépend de leur spécificité, de leur taux (exprimé par les MFI) et de leur potentiel cytotoxique défini par leur capacité à fixer le complément. Dans un premier temps, nous allons identifier le rôle des sous-classes d'immunoglobulines G (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) et le corrélérer à la capacité des anticorps anti-HLA à fixer le complément et aux phénotypes histologiques observés dans les greffons. Nous allons analyser le phénomène de variabilité de cette capacité à fixer le complément, en utilisant les profils évolutifs identifiés dans l'étude présentée antérieurement. Une deuxième étape consistera à analyser la relation quantitative et d'affinité entre les anticorps anti-HLA et leur capacité à fixer le complément.

3) Etendre cette approche translationnelle et intégrative aux autres domaines de la transplantation d'organe

- *En transplantation pulmonaire.* Dans l'état actuel des connaissances, en transplantation pulmonaire, le rejet humoral n'est pas reconnu comme une entité distincte, malgré l'accumulation de cas de rejets sévères associés aux anticorps anti-HLA. La littérature actuelle ne propose que des corrélations limitées entre la présence d'anticorps et le profil évolutif ou histologique. Nous proposons une approche par analyse en composantes principales qui intègre l'ensemble des données disponibles actuellement pour identifier des phénotypes pertinents de rejet en transplantation pulmonaire.

- *En transplantation cardiaque.* Pour analyser la progression de l'atteinte des macro et micro vaisseaux induite par la présence d'anticorps anti-HLA, nous allons utiliser le modèle de la transplantation cardiaque. Il permettra d'étudier de manière longitudinale à la fois l'évolution des modifications histologiques et la progression des lésions vasculaires identifiées par coronarographie.

4) Etendre de concepts de la transplantation rénale à la pathologie cardiovasculaire

Nous avons vu que le rejet médié par les anticorps était capable d'induire dans le rein transplanté une artériosclérose et athéromatose accélérée. Une hypothèse de travail est donc de déterminer si cette maladie retrouvée dans l'organe transplanté pouvait être étendue à une atteinte plus diffuse et systémique pouvant avoir des conséquences sur d'autres organes que le rein.

Ce projet étudiera sur l'ensemble des patients du réseau DIVAT (8500 patients transplantés rénaux), l'association entre le rejet et les évènements cardiovasculaires à savoir infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral, artérite des membres inférieurs. Cette étude prendra en compte l'ensemble des facteurs de risques et comorbidités cardiovasculaires colligées dans la base de données. Cette étude est actuellement en cours de réalisation et en cas de réponse positive, elle permettra pour la première fois dans un modèle humain et en population d'étayer l'hypothèse d'une association entre allo-anticorps et risque cardiovasculaire, ouvrant de larges implications dans le domaine de la transplantation mais également de la cardiologie et la pathologie vasculaire.

Références

1. Levey AS, Coresh J, Balk E, et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 2003;139:137-47.
2. Froissart M, Rossert J, Jacquot C, Paillard M, Houillier P. Predictive performance of the modification of diet in renal disease and Cockcroft-Gault equations for estimating renal function. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:763-73.
3. Kouchner B. [Chronic renal insufficiency: towards a public health policy]. *Presse medicale* 2002;31:165-6.
4. Rapport Annuel de l'Agence de la biomédecine 2009
5. Hiesse C. [Kidney transplantation]. *La Revue du praticien* 2007;57:269-79.
6. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Kaplan B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant* 2004;4:1289-95.
7. Bayat S, Kessler M, Briancon S, Frimat L. Survival of transplanted and dialysed patients in a French region with focus on outcomes in the elderly. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2010;25:292-300.
8. Oniscu GC, Brown H, Forsythe JL. Impact of cadaveric renal transplantation on survival in patients listed for transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1859-65.
9. Savoye E, Tamarelle D, Chalem Y, Rebibou JM, Tuppin P. Survival benefits of kidney transplantation with expanded criteria deceased donors in patients aged 60 years and over. *Transplantation* 2007;84:1618-24.
10. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999;341:1725-30.
11. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Reed A, Kaplan B. Kidney transplantation halts cardiovascular disease progression in patients with end-stage renal disease. *Am J Transplant* 2004;4:1662-8.
12. Sayegh MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises. *N Engl J Med* 2004;351:2761-6.
13. Knoll GA. Kidney transplantation in the older adult. *Am J Kidney Dis* 2013;61:790-7.

14. Haas M, Montgomery RA, Segev DL, et al. Subclinical acute antibody-mediated rejection in positive crossmatch renal allografts. *Am J Transplant* 2007;7:576-85.
15. Lerut E, Naesens M, Kuypers DR, Vanrenterghem Y, Van Damme B. Subclinical peritubular capillaritis at 3 months is associated with chronic rejection at 1 year. *Transplantation* 2007;83:1416-22.
16. Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, et al. Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *Am J Transplant* 2009;9:2561-70.
17. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003;3:708-14.
18. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008;8:753-60.
19. Ait-Oufella H, Herbin O, Bouaziz JD, et al. B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice. *J Exp Med* 2010;207:1579-87.
20. Mengel M, Sis B, Haas M, et al. Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2012;12:563-70.
21. Sis B, Mengel M, Haas M, et al. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant* 2010;10:464-71.
22. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2002;2:401-9.
23. Zorn E, Miklos DB, Floyd BH, et al. Minor histocompatibility antigen DBY elicits a coordinated B and T cell response after allogeneic stem cell transplantation. *J Exp Med* 2004;199:1133-42.
24. Imagawa DK, Millis JM, Seu P, et al. The role of tumor necrosis factor in allograft rejection. III. Evidence that anti-TNF antibody therapy prolongs allograft survival in rats with acute rejection. *Transplantation* 1991;51:57-62.
25. Robertson H, Kirby JA. Post-transplant renal tubulitis: the recruitment, differentiation and persistence of intra-epithelial T cells. *Am J Transplant* 2003;3:3-10.
26. Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest* 2009;119:1417-9.
27. Bonsib SM, Abul-Ezz SR, Ahmad I, et al. Acute rejection-associated tubular basement membrane defects and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2000;58:2206-14.
28. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med* 2010;363:1451-62.
29. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969;280:735-9.

30. Halloran PF, Wadgyamar A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I antibody response. I. Clinical and pathologic features of anti-class I-mediated rejection. *Transplantation* 1990;49:85-91.
31. Halloran PF, Schlaut J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I response. II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I-like antibody. *Transplantation* 1992;53:550-5.
32. Feucht HE, Felber E, Gokel MJ, et al. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin Exp Immunol* 1991;86:464-70.
33. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int* 1993;43:1333-8.
34. Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, et al. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2208-14.
35. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S, et al. Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:574-82.
36. Mauiyyedi S, Crespo M, Collins AB, et al. Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:779-87.
37. Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol* 2005;5:807-17.
38. Lefaucheur C, Nochy D, Hill GS, et al. Determinants of poor graft outcome in patients with antibody-mediated acute rejection. *Am J Transplant* 2007;7:832-41.
39. Bohmig GA, Exner M, Habicht A, et al. Capillary C4d deposition in kidney allografts: a specific marker of alloantibody-dependent graft injury. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1091-9.
40. Herzenberg AM, Gill JS, Djurdjev O, Magil AB. C4d deposition in acute rejection: an independent long-term prognostic factor. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:234-41.
41. Nickenleit V, Zeiler M, Gudat F, Thiel G, Mihatsch MJ. Detection of the complement degradation product C4d in renal allografts: diagnostic and therapeutic implications. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:242-51.
42. Rocha PN, Butterly DW, Greenberg A, et al. Beneficial effect of plasmapheresis and intravenous immunoglobulin on renal allograft survival of patients with acute humoral rejection. *Transplantation* 2003;75:1490-5.
43. Faguer S, Kamar N, Guilbeaud-Frugier C, et al. Rituximab therapy for acute humoral rejection after kidney transplantation. *Transplantation* 2007;83:1277-80.
44. Everly MJ, Everly JJ, Susskind B, et al. Bortezomib provides effective therapy for antibody- and cell-mediated acute rejection. *Transplantation* 2008;86:1754-61.

45. Everly MJ, Everly JJ, Arend LJ, et al. Reducing de novo donor-specific antibody levels during acute rejection diminishes renal allograft loss. *Am J Transplant* 2009;9:1063-71.
46. Lefaucheur C, Nochy D, Andrade J, et al. Comparison of combination Plasmapheresis/IVIg/anti-CD20 versus high-dose IVIg in the treatment of antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2009;9:1099-107.
47. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:1398-406.
48. Cesbron Gautier A, Gagne K, Retière C, Devys A, Bignon J. Système HLA. EMC 2007.
49. Zachary AA, Ratner LE, Graziani JA, Lucas DP, Delaney NL, Leffell MS. Characterization of HLA class I specific antibodies by ELISA using solubilized antigen targets: II. Clinical relevance. *Hum Immunol* 2001;62:236-46.
50. Pei R, Lee JH, Shih NJ, Chen M, Terasaki PI. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. *Transplantation* 2003;75:43-9.
51. Recommandations pour le suivi immunologique des patients en attente de greffe d'organes ou greffés : http://www.agence-biomedecine.fr/uploads/document/Recommandations_guide_HLA_juin_2010VDEFWeb.pdf.
52. Cecka JM. Calculated PRA (CPRA): the new measure of sensitization for transplant candidates. *Am J Transplant* 2010;10:26-9.
53. Cecka JM, Kucheryavaya AY, Reinsmoen NL, Leffell MS. Calculated PRA: Initial Results Show Benefits for Sensitized Patients and a Reduction in Positive Crossmatches. *Am J Transplant* 2011;11:719-24.
54. Organ Procurement and Transplantation network. Scientific registry of transplant recipients. (Accessed June 23, 2008, at <http://www.optn.org/data/>).
55. Rapport 2011 de l'activité de prélèvement et de greffe de l'Agence de la Biomédecine (<http://www.agence-biomedecine.fr/Rapport-annuel-2011>).
56. Lefaucheur C, Antoine C, Suberbielle C, Glotz D. Mastering the risk of HLA antibodies in kidney transplantation: an algorithm based on pretransplant single-antigen flow bead techniques. *Am J Transplant* 2011;11:1592-8.
57. Glotz D, Antoine C, Julia P, et al. Desensitization and subsequent kidney transplantation of patients using intravenous immunoglobulins (IVIg). *Am J Transplant* 2002;2:758-60.
58. Jordan SC, Tyan D, Stablein D, et al. Evaluation of intravenous immunoglobulin as an agent to lower allosensitization and improve transplantation in highly sensitized adult patients with end-stage renal disease: report of the NIH IG02 trial. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:3256-62.

59. Kazatchkine MD, Kaveri SV. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N Engl J Med* 2001;345:747-55.
60. Kaveri SV. Intravenous immunoglobulin: exploiting the potential of natural antibodies. *Autoimmun Rev* 2012;11:792-4.
61. Montgomery RA, Lonze BE, King KE, et al. Desensitization in HLA-incompatible kidney recipients and survival. *N Engl J Med* 2011;365:318-26.
62. Vo AA, Lukovsky M, Toyoda M, et al. Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation. *N Engl J Med* 2008;359:242-51.
63. Archdeacon P, Chan M, Neuland C, et al. Summary of FDA antibody-mediated rejection workshop. *Am J Transplant* 2011;11:896-906.
64. Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Zuber J, et al. Combined posttransplant prophylactic IVIg/anti-CD 20/plasmapheresis in kidney recipients with preformed donor-specific antibodies: a pilot study. *Transplantation* 2010;89:1403-10.
65. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant* 2012;12:1157-67.
66. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant* 2009;9:2312-23.
67. Sis B, Halloran PF. Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection. *Curr Opin Organ Transplant* 2010;15:42-8.
68. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1046-56.
69. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004;351:2715-29.
70. Hirohashi T, Uehara S, Chase CM, et al. Complement independent antibody-mediated endarteritis and transplant arteriopathy in mice. *Am J Transplant* 2010;10:510-7.
71. Hill GS, Nochy D, Bruneval P, et al. Donor-specific antibodies accelerate arteriosclerosis after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:975-83.
72. Smith RN, Kawai T, Boskovic S, et al. Four stages and lack of stable accommodation in chronic alloantibody-mediated renal allograft rejection in *Cynomolgus* monkeys. *Am J Transplant* 2008;8:1662-72.
73. Haas M, Mirocha J. Early ultrastructural changes in renal allografts: correlation with antibody-mediated rejection and transplant glomerulopathy. *Am J Transplant* 2011;11:2123-31.
74. Sis B, Einecke G, Chang J, et al. Cluster analysis of lesions in nonselected kidney transplant biopsies: microcirculation changes, tubulointerstitial inflammation and scarring. *Am J Transplant* 2010;10:421-30.

75. Transplantation EGoR. European best practice guidelines for renal transplantation. Section IV: Long-term management of the transplant recipient. IV.13 Analysis of patient and graft survival. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association 2002;17 Suppl 4:60-7.
76. Bland JM, Altman DG. The logrank test. *Bmj* 2004;328:1073.
77. Cox D. Regression models and life-tables. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 1972;34:187-220.
78. Campos EF, Tedesco-Silva H, Machado PG, Franco M, Medina-Pestana JO, Gerbase-DeLima M. Post-transplant anti-HLA class II antibodies as risk factor for late kidney allograft failure. *Am J Transplant* 2006;6:2316-20.
79. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Leavey SF, et al. Gender differences in the risk for chronic renal allograft failure. *Transplantation* 2001;71:429-32.
80. Meier-Kriesche HU, Ojo A, Hanson J, et al. Increased immunosuppressive vulnerability in elderly renal transplant recipients. *Transplantation* 2000;69:885-9.
81. Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Cibrik DM, et al. Relationship of recipient age and development of chronic allograft failure. *Transplantation* 2000;70:306-10.
82. Briganti EM, Russ GR, McNeil JJ, Atkins RC, Chadban SJ. Risk of renal allograft loss from recurrent glomerulonephritis. *N Engl J Med* 2002;347:103-9.
83. Brar A, Jindal RM, Elster EA, et al. Effect of peripheral vascular disease on kidney allograft outcomes: a study of U.S. Renal data system. *Transplantation* 2013;95:810-5.
84. Cosio FG, Hickson LJ, Griffin MD, Stegall MD, Kudva Y. Patient survival and cardiovascular risk after kidney transplantation: the challenge of diabetes. *Am J Transplant* 2008;8:593-9.
85. Segev DL, Simpkins CE, Thompson RE, Locke JE, Warren DS, Montgomery RA. Obesity impacts access to kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:349-55.
86. Meier-Kriesche HU, Arndorfer JA, Kaplan B. The impact of body mass index on renal transplant outcomes: a significant independent risk factor for graft failure and patient death. *Transplantation* 2002;73:70-4.
87. Neugarten J, Srinivas T, Tellis V, Silbiger S, Greenstein S. The effect of donor gender on renal allograft survival. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:318-24.
88. Rao PS, Schaubel DE, Guidinger MK, et al. A comprehensive risk quantification score for deceased donor kidneys: the kidney donor risk index. *Transplantation* 2009;88:231-6.
89. Cecka JM, Terasaki PI. The UNOS scientific renal transplant registry. United Network for Organ Sharing. *Clin Transpl* 1995:1-18.
90. Sellers MT, Velidedeoglu E, Bloom RD, et al. Expanded-criteria donor kidneys: a single-center clinical and short-term financial analysis--cause for concern in retransplantation. *Transplantation* 2004;78:1670-5.

91. Goldfarb-Rumyantzev AS, Hurdle JF, Baird BC, et al. The role of pre-emptive re-transplant in graft and recipient outcome. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2006;21:1355-64.
92. Cicciarelli J, Cho Y. HLA matching: univariate and multivariate analyses of UNOS Registry data. *Clin Transpl* 1991:325-33.
93. Montgomery JR, Berger JC, Warren DS, James NT, Montgomery RA, Segev DL. Outcomes of ABO-incompatible kidney transplantation in the United States. *Transplantation* 2012;93:603-9.
94. Giral M, Bertola JP, Foucher Y, et al. Effect of brain-dead donor resuscitation on delayed graft function: results of a monocentric analysis. *Transplantation* 2007;83:1174-81.
95. Quiroga I, McShane P, Koo DD, et al. Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2006;21:1689-96.
96. Kyllonen LE, Eklund BH, Pesonen EJ, Salmela KT. Single bolus antithymocyte globulin versus basiliximab induction in kidney transplantation with cyclosporine triple immunosuppression: efficacy and safety. *Transplantation* 2007;84:75-82.
97. Harrell FE, Jr., Lee KL, Mark DB. Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat Med* 1996;15:361-87.
98. Pencina MJ, D'Agostino RB, Sr., D'Agostino RB, Jr., Vasan RS. Evaluating the added predictive ability of a new marker: from area under the ROC curve to reclassification and beyond. *Stat Med* 2008;27:157-72; discussion 207-12.
99. Uno H, Cai T, Pencina MJ, D'Agostino RB, Wei LJ. On the C-statistics for evaluating overall adequacy of risk prediction procedures with censored survival data. *Stat Med* 2011;30:1105-17.
100. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988;44:837-45.
101. Cook NR. Use and misuse of the receiver operating characteristic curve in risk prediction. *Circulation* 2007;115:928-35.
102. Einecke G, Sis B, Reeve J, et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant* 2009;9:2520-31.
103. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 2004;4:378-83.

104. Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche HU. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am J Transplant* 2011;11:450-62.
105. Racusen LC, Haas M. Antibody-mediated rejection in renal allografts: lessons from pathology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:415-20.
106. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL, et al. Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. *Transplantation* 2010;90:68-74.
107. Sellares J, de Freitas DG, Mengel M, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant* 2012;12:388-99.
108. Données Informatiques VALidées en Transplantation: <http://divat.idbc.fr/>.
109. CRISTAL, Agence Biomédecine: <https://http://www.sipg.sante.fr/portail/>.
110. Janeway C, Murphy K, Travers P, Walport M. *Immunobiologie*. De Boeck 2009.
111. D'Agostino R, Nam B. *Handbook of Statistics*. Vol. 23. Amsterdam: Elsevier; 2004. Evaluation of the performance of survival analysis models: discrimination and calibration measures.
112. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007;7:518-26.
113. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349:2326-33.
114. Rush DN, Henry SF, Jeffery JR, Schroeder TJ, Gough J. Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. *Transplantation* 1994;57:208-11.
115. Loucaidou M, McLean AG, Cairns TD, et al. Five-year results of kidney transplantation under tacrolimus-based regimes: the persisting significance of vascular rejection. *Transplantation* 2003;76:1120-3.
116. Shimizu T, Ishida H, Shirakawa H, et al. Clinicopathological analysis of acute vascular rejection cases after renal transplantation. *Clin Transplant* 2010;24 Suppl 22:22-6.
117. Middleton J, Patterson AM, Gardner L, Schmutz C, Ashton BA. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* 2002;100:3853-60.
118. Sun Q, Liu ZH, Ji S, et al. Late and early C4d-positive acute rejection: different clinico-histopathological subentities in renal transplantation. *Kidney Int* 2006;70:377-83.
119. Uehara S, Chase CM, Cornell LD, Madsen JC, Russell PS, Colvin RB. Chronic cardiac transplant arteriopathy in mice: relationship of alloantibody, C4d deposition and neointimal fibrosis. *Am J Transplant* 2007;7:57-65.

120. Lepin EJ, Zhang Q, Zhang X, et al. Phosphorylated S6 ribosomal protein: a novel biomarker of antibody-mediated rejection in heart allografts. *Am J Transplant* 2006;6:1560-71.
121. Zhang X, Rozengurt E, Reed EF. HLA class I molecules partner with integrin beta4 to stimulate endothelial cell proliferation and migration. *Sci Signal* 2010;3:ra85.
122. Valenzuela NM, Reed EF. The link between major histocompatibility complex antibodies and cell proliferation. *Transplant Rev (Orlando)* 2011;25:154-66.
123. Trpkov K, Campbell P, Pazderka F, Cockfield S, Solez K, Halloran PF. Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor-specific antibody, Analysis using the Banff grading schema. *Transplantation* 1996;61:1586-92.
124. Montgomery RA, Zachary AA, Racusen LC, et al. Plasmapheresis and intravenous immune globulin provides effective rescue therapy for refractory humoral rejection and allows kidneys to be successfully transplanted into cross-match-positive recipients. *Transplantation* 2000;70:887-95.
125. Becker YT, Becker BN, Pirsch JD, Sollinger HW. Rituximab as treatment for refractory kidney transplant rejection. *Am J Transplant* 2004;4:996-1001.
126. Bohmig GA, Wahrmann M, Regele H, et al. Immunoabsorption in severe C4d-positive acute kidney allograft rejection: a randomized controlled trial. *Am J Transplant* 2007;7:117-21.
127. Kayler LK, Kiss L, Sharma V, et al. Acute renal allograft rejection: diagnostic significance of focal peritubular capillary C4d. *Transplantation* 2008;85:813-20.
128. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunologie*. 3ème édition. De Boeck 2002.
129. Chin C, Chen G, Sequeira F, et al. Clinical usefulness of a novel C1q assay to detect immunoglobulin G antibodies capable of fixing complement in sensitized pediatric heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant* 2011;30:158-63.
130. Yabu JM, Higgins JP, Chen G, Sequeira F, Busque S, Tyan DB. C1q-fixing human leukocyte antigen antibodies are specific for predicting transplant glomerulopathy and late graft failure after kidney transplantation. *Transplantation* 2011;91:342-7.
131. Sutherland SM, Chen G, Sequeira FA, Lou CD, Alexander SR, Tyan DB. Complement-fixing donor-specific antibodies identified by a novel C1q assay are associated with allograft loss. *Pediatr Transplant* 2012;16:12-7.
132. Chen G, Sequeira F, Tyan DB. Novel C1q assay reveals a clinically relevant subset of human leukocyte antigen antibodies independent of immunoglobulin G strength on single antigen beads. *Hum Immunol* 2011;72:849-58.
133. Schnitzler MA, Lentine KL, Axelrod D, et al. Use of 12-month renal function and baseline clinical factors to predict long-term graft survival: application to BENEFIT and BENEFIT-EXT trials. *Transplantation* 2012;93:172-81.

134. Zeevi A, Lunz J, Feingold B, et al. Persistent strong anti-HLA antibody at high titer is complement binding and associated with increased risk of antibody-mediated rejection in heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2013;32:98-105.
135. Stegall MD, Diwan T, Raghavaiah S, et al. Terminal complement inhibition decreases antibody-mediated rejection in sensitized renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2011;11:2405-13.
136. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [online], <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01147302> 2011.
137. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [online], <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01134510> 2012.

Annexes

- Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study. **The Lancet. 2013 Jan 26;381(9863):313-9**
- Antibody-mediated vascular rejection from association to causation. **The Lancet. 2013 (Editorial)**
- Complement binding anti-HLA antibodies and kidney allograft survival. **N Engl J Med. 2013 Sep 26;369(13):1215-26.**
- C1q-Binding Antibodies in Kidney Transplantation. **N Engl J Med. 2013 (Editorial)**
- Molecular Microscope Strategy To Improve Risk Stratification In Early Antibody-Mediated Kidney Allograft Rejection. **JASN. 2014.** In press.
- Early Recognition of Subclinical Rejection and Outcome of Kidney Allografts. **The Lancet. submitted**