



**HAL**  
open science

# Recherche d'un effet protecteur de HLA-G membranaire et soluble vis-à-vis de la toxicité des anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur en transplantation rénale

Laure-Emmanuelle Croze

## ► To cite this version:

Laure-Emmanuelle Croze. Recherche d'un effet protecteur de HLA-G membranaire et soluble vis-à-vis de la toxicité des anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur en transplantation rénale. Médecine humaine et pathologie. 2011. dumas-00633892

**HAL Id: dumas-00633892**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00633892>**

Submitted on 19 Oct 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Recherche d'un effet protecteur de HLA-G membranaire et soluble contre la toxicité des anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur en transplantation rénale**

---

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement à la Faculté de Médecine de Grenoble

Le 17 Octobre 2011

Pour l'obtention du

**DOCTORAT EN MEDECINE**

**DIPLOME D'ETAT**

Par

**Laure-Emmanuelle CROZE**

**Née le 28 Juillet 1984 à Clermont-Ferrand**

Devant le jury composé de :

Président de jury :	P. ZAOUI	Professeur Universitaire
Directrice de thèse :	R. TETAZ	Assistante Chef de Clinique
Membres du jury :	C. DROUET	Professeur Universitaire
	C. MARIAT	Professeur Universitaire
	F. BAYLE	Praticien Hospitalier
	P. MALVEZZI	Praticien Hospitalier

# Remerciements

---

Merci aux membres du jury

**Monsieur le Professeur Philippe Zaoui.** Pour sa disponibilité et son soutien. Avec toute mon estime.

**Messieurs les Professeurs Christian Drouet et Christophe Mariat.** Pour avoir accepté de juger ce travail. Avec tout mon respect.

**Monsieur le Docteur François Bayle.** Pour son ouverture d'esprit et sa vision optimiste de la médecine. Avec toute mon admiration.

**Monsieur le Docteur Paolo Malvezzi.** Pour ses avis éclairés et son soutien énergique. Avec toute mon amitié.

**Mademoiselle le Docteur Rachel Tetaz.** Pour son dynamisme et avoir su me guider tout au long de ce travail. Avec toute ma considération.

Je remercie également

**Matthieu Roustit.** Pour son accueil et son aide précieuse à l'élaboration des résultats.

**Nicole Pinel et Maud Rabeyrin.** Pour leur indispensable collaboration.

**Dominique Masson.** Pour son aide et ses explications sur le système HLA.

**Candice Trocmé.** Pour son investissement dans ce projet et ses conseils.

Je dédie cette thèse

**A mes parents.** Pour leur amour et leur confiance en moi à toute épreuve qui m'ont été essentiels/indispensables, sans lesquels rien n'aurait été possible. Pour ce qu'ils ont su faire de moi / m'avoir fait telle que je suis/ avoir fait celle que je suis aujourd'hui.

**A Philippe.** Pour sa présence et son optimisme.

**A Mimi.** Pour son soutien et l'intérêt qu'elle a toujours su porter à mon travail.

**A ma grand-mère.** Pour son écoute.

**A tous mes amis.** Pour tous les bons moments passés ensemble et ceux à venir.

**A Wen.** Pour son soutien inébranlable et sa bonne humeur.

**A Isabelle.** Pour son amitié et son enseignement qui m'a été essentiel (à mon cursus).

**A tous mes anciens et actuels co-internes.** Pour le plaisir que j'ai eu à travailler avec eux.

**A Mathieu.** Pour son amour et sa présence à mes côtés.

# Liste des Professeurs Universitaires et des Praticiens Hospitaliers

---

Université Joseph Fourier

Faculté de Médecine de Grenoble

Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté de Médecine :

Monsieur le Professeur Jean-Paul ROMANET

## Professeurs des Universités – Praticiens Hospitaliers

ALBALADEJO	Pierre	Clinique d'Anesthésie
ARVIEUX-BARTHELEMY	Catherine	Clinique de Chirurgie et de l'Urgence
BACONNIER	Pierre	Biostatistiques et Informatique Médicale
BAGUET	Jean-Philippe	Clinique de Cardiologie / Hypertension Artérielle
BALOSSO	Jacques	Radiothérapie
BARRET	Luc	Clinique Médecine Légale
BAUDAIN	Philippe	Clinique Radiologie et Imagerie Médicale
BEANI	Jean-Claude	Clinique Dermatologie, Vénérologie, Photobiologie
Allergologie		
BENHAMOU	Pierre-Yves	Clinique Endocrino Diabéto Nutrition Education
Thérapeutique		
BERGER	François	Oncologie Médicale
BLIN	Dominique	Clinique Chirurgie Cardiaque
BOLLA	Michel	Centre Coord. Cancérologie
BONAZ	Bruno	Clinique Hépato Gastro Entérologie
BOSSON	Jean-Luc	Dpt de Méthodologie de l'Information de Santé
BOUGEROL	Thierry	Psychiatrie d'Adultes
BRAMBILLA	Elisabeth	Dpt Anatomie et Cytologie Pathologiques
BRICHON	Pierre-Yves	Clinique de Chirurgie Vasculaire et Thoracique
BRIX	Muriel	Clinique Chirurgie Maxillo-Faciale
CAHN	Jean-Yves	Cancérologie
CARPENTIER	Patrick	Clinique Médecine Vasculaire
CARPENTIER	Françoise	Clinique Urgence
CESBRON	Jean-Yves	Immunologie
CHABARDES	Stéphane	Clinique de Neurochirurgie
CHABRE	Olivier	Clinique Endocrino Diabéto Nutrition Education
Thérapeutique /		
Endocrinologie		
CHAFFANJON	Philippe	Clinique Chirurgie Thoracique, Vasculaire et Endocrinienne
CHAVANON	Olivier	Clinique de Chirurgie Cardiaque
CHIQUET	Christophe	Clinique Ophtalmologique
CHIROSEL	Jean-Paul	Anatomie
CINQUIN	Philippe	Dpt d'Innovations Technologiques
COHEN	Olivier	Délégation – HC Forum
COUTURIER	Pascal	Clinique Médecine Gériatrique
CRACOWSKI	Jean-Luc	Laboratoire de Pharmacologie
DE GAUDEMARIS	Régis	Dpt Médecine et Santé du Travail
DEBILLON	Thierry	Clinique Réa. et Médecine Néonatale
DEMATTEIS	Maurice	Clinique de Médecine Légale
DEMONGEOT	Jacques	Biostatistiques et Informatique Médicale
DESCOTES	Jean-Luc	Clinique Urologie
ESTEVE	François	Dir Equipe 6 U836 – ID17 / ESRF
FAGRET	Daniel	Clinique de Médecine Nucléaire
FAUCHERON	Jean-Luc	Clinique de Chirurgie Digestive et de l'Urgence
FAVROT	Marie-Christine	Dpt de Biologie Intégrée / Cancérologie
FERRETTI	Gilbert	Clinique Radiologie et Imagerie Médicale
FEUERSTEIN	Claude	GIN
FONTAINE	Eric	Clinique Nutrition Artificielle
FRANCOIS	Patrice	Dpt de Veille Sanitaire
GARNIER	Philippe	Surnombre
GAUDIN	Philippe	Clinique de Rhumatologie
GAY	Emmanuel	Clinique Neurochirurgie
GRIFFET	Jacques	Chirurgie Infantile
HALIMI	Serge	Clinique Endocrino Diabéto Nutrition
HOMMEL	Marc	Clinique de Neurologie
JOUK	Pierre-Simon	Département Génétique et Procréation
JUVIN	Robert	Clinique de Rhumatologie
KAHANE	Philippe	Clinique de Neurologie
KRACK	Paul	Clinique de Neurologie
KRAINIK	Alexandre	Clinique Neuroradiologie et IRM
LANTUEJOL	Sylvie	Département d'Anatomie et Cytologie Pathologiques
LE BAS	Jean-François	Clinique Neuroradiologie et IRM
LEBEAU	Jacques	Clinique Chir. Maxillo-Faciale
LECCIA	Marie-Thérèse	Clinique Dermatologie Vénérologie Photobiologie
Allergologie		
LEROUX	Dominique	Département Biologie et Pathologie de la Cellule
LEROY	Vincent	Clinique d'Hépato Gastro Entérologie

LETOUBLON	Christian	Clinique Chirurgie Digestive et Urgence
LEVERVE	Xavier	Laboratoire Thérapeutique UFR Biologie
LEVY	Patrick	Physiologie
LUNARDI	Joël	Biochimie ADN
MACHECOURT	Jacques	Clinique de Cardiologie
MAGNE	Jean-Luc	Clinique Chirurgie Vasculaire et Thoracique
MAITRE	Anne	Médecine du Travail EPSP / Dpt de Biologie Intégrée
MASSOT	Christian	Clinique Médecine Interne
MAURIN	Max	Département des Agents Infectieux / Bactériologie
MERLOZ	Philippe	Clinique Chir. Orthopédie Traumatologie
MORAND	Patrice	Dpt des Agents Infectieux / Virologie
MOREL	Françoise	
MORO-SIBILOT	Denis	Pneumologie Phtysiologie
MOUSSEAU	Mireille	Oncologie Médicale
MOUTET	François	Chir. Plastique et Reconstructrice et Esthétique
PASSAGIA	Jean-Guy	Anatomie
PAYEN DE LA GARANDERIE	Jean-François	Clinique Réanimation
PELLOUX	Hervé	Département des Agents Infectieux Parasitologie et Mycologie
PEPIN	Jean-Louis	Clinique Physiologie Sommeil et Exercice
PERENNOU	Dominique	Clinique MPR
PERNOD	Gilles	Clinique de Médecine Vasculaire
PIOLAT	Christian	Clinique de Chirurgie Infantile
PISON	Christophe	Clinique Pneumologie
PLANTAZ	Dominique	Clinique Médicale Pédiatrie
POLACK	Benoît	Département de Biologie et Pathologie de la Cellule
POLLAK	Pierre	Neurologie
PONS	Jean-Claude	Clinique Universitaire Gynécologie Obstétrique
RAMBEAUD	Jean-Jacques	Clinique Urologie
REYT	Emile	Clinique ORL
RIGHINI	Christian	Clinique ORL
ROMANET	Jean-Paul	Clinique Ophtalmologique
SARAGAGLIA	Dominique	Clinique Orthopédique et Traumatologie
SCHAAL	Jean-Patrick	Clinique Universitaire Gynécologie Obstétrique
SCHMERBER	Sébastien	Clinique ORL
SEIGNEURIN	Daniel	Dpt Anatomie et Cytologie Pathologiques
SEIGNEURIN	Jean-Marie	
SELE	Bernard	Dpt Génétique et Procréation
SESSA	Carmine	Chirurgie Thoracique Vasculaire
STAHL	Jean-Paul	Clinique Infectiologie
TIMSIT	Jean-François	Clinique Réanimation Médicale
TONETTI	Jérôme	Clinique Orthopédique et Traumatologie
TOUSSAINT	Bertrand	Biochimie et Biologie Moléculaire
VANZETTO	Gérald	Clinique de Cardiologie
VUILLEZ	Jean-Philippe	Biophysique et Traitement de l'Image
ZAOUI	Philippe	Clinique Néphrologie
ZARSKI	Jean-Pierre	Clinique Hépato Gastro Entérologie



## Maîtres de Conférence Universitaires – Praticiens Hospitaliers

BOTTARI	Serge	Biologie Cellulaire
BOUTTONAT	Jean	Département de Biologie et Pathologie de la Cellule
BRENIER-PINCHART	M. Pierre	Parasitologie
BRICAULT	Ivan	Radiologie et Imagerie Médicale
BRIOT	Raphaëlle	Départ. De Cancérologie et d'Hématologie
CALLANAN-WILSON	Mary	Génétique
CROIZE	Jacques	Bactériologie – Virologie
DERANSART	Colin	Cancérologie et Hématologie
DETANTE	Olivier	Neurologie LAPSEN
DUMESTRE-PERARD	Chantal	ImmunologieSUD
EYSSERIC	Hélène	Médecine Légale
FAURE	Anne-Karen	Département de Génétique et Procréation
FAURE	Julien	Département Génétique et Procréation
GARBAN	Frédéric	Unité Clinique Thérapie Cellulaire
GAVAZZI	Gaëtan	Médecine Interne Gériatrique
GILLOIS	Pierre	Information et Informatique Médicale
GRAND	Sylvie	Radiologie et Imagerie Médicale (IRM)
HENNEBICQ	Sylviane	Biologie du Développement et de la Reproduction
HOFFMANN	Pascale	Gynécologie Obstétrique
JACQUOT	Claude	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale
LABARERE	José	Dpt de Veille Sanitaire
LAPORTE	François	Pathologie Cellulaire
LARDY	Bernard	Laboratoire d'Enzymologie
LARRAT	Sylvie	Biochimie et Biologie Moléculaire
LAUNOIS-ROLLINAT	Sandrine	Lab. Explorations Fonctionnelles Cardio-Respiratoires
MALLARET	Marie-Reine	Epidémiologie, Economie de la Santé (Mal. Inf.)
MAUBON	Danièle	Département des Agents Infectieux Parasitologie Mycologie
MOREAU-GAUDRY	Alexandre	Département d'Innovations Technologiques
MOUCHET	Patrick	Physiologie
PACLET	Marie-Hélène	Biochimie et Biologie Moléculaire
PALOMBI	Olivier	Clinique de Neurochirurgie
PASQUIER	Dominique	UM Ana. Path.
PELLETIER	Laurent	Biologie Cellulaire
PAYSANT	François	Clinique de Médecine Légale
RAY	Pierre	Génétique BDR
RENVERSEZ	Jean-Charles	Biochimie et Biologie Moléculaire
RIALLE	Vincent	Information et Informatique Médicale
SATRE	Véronique	Génétique Chromosomique
STANKE-LABESQUE	Françoise	Laboratoire de Pharmacologie
STASIA	Marie-Josée	UM Diagnostic et Recherche Granulomatose Septique
TAMISIER	Renaud	Physiologie
WEIL	Georges	Biostatistiques et Informatique Médicales

# Sommaire

---

<b>1. Introduction</b> .....	
1.1. Généralités.....	
1.2. Allo-immunisation post-greffe.....	
1.2.1. Généralités.....	
1.2.2. Techniques de détection des anticorps anti-HLA.....	
1.2.3. Impact des allo-anticorps détectés par technique sensible Luminex®	
1.2.4. Etat d'accommodation	
1.3. Human Leukocyte Antigen G	
1.3.1. Généralités	
1.3.2. Fonctions immunitaires	
1.3.3. Implications cliniques	
<b>2. Objectifs de l'étude</b>	
2.1. Objectif principal	
2.2. Objectifs secondaires	
<b>3. Matériels et méthodes</b>	
3.1. Patients	
3.1.1. Critères d'inclusion et d'exclusion	
3.1.2. Traitement immunosuppresseur	
3.1.3. Suivi clinique et biologique	
3.1.4. Suivi immunologique : détection des Anticorps anti-HLA par technique Luminex®	
3.1.5. Suivi histologique : biopsies de greffon	
3.2. Etude de HLA-G	
3.2.1. HLA-G soluble	
3.2.2. HLA-G membranaire	
3.3. Analyses statistiques	
3.4. Design de l'étude	
<b>4. Résultats</b>	

#### 4.1. Analyse descriptive de la population

4.1.1. Caractéristiques des patients inclus

4.1.2. Données liées à la transplantation rénale

4.1.3. Fonction du greffon à 3 mois de greffe

4.1.4. Caractéristiques immunologiques des patients immunisés en post-greffe

4.1.5. Description des épisodes de rejet

#### 4.2. HLA-G

4.2.1. HLA-G soluble

4.2.2. HLA-G membranaire

#### 4.3. Fonction rénale

### 5. Discussion

5.1. Etat d'accommodation versus rejet

5.2. HLA-G soluble

5.2.1. Principaux résultats

5.2.2. Comparaison aux précédentes études

5.3. HLA-G membranaire

5.3.1. Principaux résultats et comparaison aux précédentes études

5.3.2. Site d'expression de HLA-G membranaire

5.3.3. Facteurs inducteurs d'expression de HLA-G membranaire

5.4. Allo-immunisation post-greffe : importance des antigènes HLA classe II

5.5. Limites de l'étude

5.6. Perspective

### 6. Conclusion

### 7. Bibliographie

# Glossaire

---

<b>CDC</b>	Complement-dependent cytotoxicity
<b>CMV</b>	Cytomégalo­virus
<b>DAB</b>	Diaminobenzidine tetrahydrochloride
<b>DCA</b>	Dysfonction chronique d'allogreffe
<b>DS</b>	Dé­viation standard
<b>DSA</b>	Donor specific antibodies
<b>EFS</b>	Etablissement Français du Sang
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>FACS</b>	Flow cytometric crossmatch assay
<b>HLA</b>	Human leukocyte antigen
<b>HLA-G</b>	Human leukocyte antigen G
<b>IgG</b>	Immunoglobuline G
<b>IL2-RA</b>	Interleukin 2 receptor antagonist
<b>ILT2R</b>	Immunoglobulin-like transcript 2 receptor
<b>IQ</b>	Interquartile
<b>KIR2DL4</b>	Killer cell immunoglobulin-like receptor, 2 domains, long cytoplasmic tail 4
<b>LCT</b>	Lymphocytotoxicité
<b>MFI</b>	Mean fluorescence intensity
<b>MMF</b>	Mycophénolate mofétil
<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin
<b>NK</b>	Natural killer
<b>NS</b>	Non significatif
<b>PBG</b>	Ponction biopsie de greffon
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PNA</b>	Pyélonéphrite aiguë
<b>PRA</b>	Panel reactive antibodies
<b>rATG</b>	Rabbit anti-thymocyte globulin

# 1. Introduction

---

## 1.1. Généralités

La greffe rénale a considérablement amélioré le devenir des patients atteints de maladie rénale chronique terminale et représente le traitement de choix de celle-ci en terme de survie, de morbidité, de réhabilitation et de coût.

Cependant, malgré le développement de thérapeutiques immunosuppressives ayant permis une diminution importante du nombre de rejets, les succès actuels de la transplantation restent encore limités dans le temps en raison de la survenue d'une fibrose progressive du greffon associée à un déclin fonctionnel, appelée dysfonction chronique d'allogreffe (DCA). Celle-ci représente la première cause de retour prématuré en dialyse <sup>[1, 2]</sup>.

Physiopathologiquement, cette dysfonction chronique d'allogreffe apparaît multifactorielle.

D'une part, interviennent des facteurs non immunologiques tels que les lésions liées à l'ischémie-reperfusion, aux facteurs athérogènes ou à la néphrotoxicité des anti-calcineurines, pilier actuel du traitement immunosuppresseur.

D'autre part, participent des facteurs immunologiques impliquant la réponse immunitaire cellulaire mais également humorale.

La réactualisation de la classification de Banff publiée en 2007 a permis de bien séparer ces différents phénomènes (*tableau 1*).

Catégorie	Lésions histologiques
<b>1</b>	<b>Rein normal</b>
<b>2</b>	<b>Rejet à médiation humorale</b> * aigu I - II – III * chronique actif
<b>3</b>	<b>Lésions borderline</b>
<b>4</b>	<b>Rejet médié par les lymphocytes T</b> * aigu IA - IB - IIA - IIB – III * chronique actif
<b>5</b>	<b>Fibrose interstitielle et atrophie tubulaire (FIAT)</b> I - II – III
<b>6</b>	<b>Autres (hypertension, infections, lymphome...)</b>

*Tableau 1. Classification de Banff 2007*



## 1.2. Allo-immunisation post-greffe

### 1.2.1. Généralités

En parallèle du rôle bien connu de l'immunité cellulaire, l'allo-immunisation post-greffe, en particulier l'apparition d'anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur (donor specific antibodies, DSA), avec pour principale conséquence la survenue de rejets humoraux<sup>[3]</sup> représente un facteur important de cette dysfonction chronique du greffon<sup>[4]</sup>.

En effet, l'émergence de DSA en post-greffe rénale est associée à un risque accru de survenue d'épisodes de rejet aigu<sup>[5-7]</sup> et leur présence au moment du diagnostic d'un rejet est prédictive d'un moins bon pronostic<sup>[8]</sup>. Certains auteurs tels que Lachmann et al.<sup>[9]</sup> et Lee et al.<sup>[10]</sup> ont également rapporté que l'apparition de DSA est un facteur inversement corrélé à la survie à long terme de la greffe rénale<sup>[9-14]</sup>.

### 1.2.2. Techniques de détection des anticorps anti-HLA

L'amélioration récente des méthodes de détection des anticorps anti-HLA, avec de nouvelles technologies telles que le Luminex®, est à l'origine d'une meilleure compréhension du rôle de l'immunité humorale dans la survie au long cours du greffon.

Les anticorps anti-HLA peuvent être détectés par deux types de tests, cellulaires ou en phase solide.

Les tests cellulaires incluent la technique de référence de « complement dependent cytotoxicity » (CDC) et la technique de crossmatch en cytométrie de flux.

Les tests en phase solide comprennent les techniques ELISA (« enzyme-linked immunosorbent assay ») et Luminex®.

Cette dernière, qui sera détaillée ultérieurement, permet de déceler des anticorps anti-HLA en dessous du seuil de détection des autres techniques et de mieux préciser la spécificité de ces anticorps.

### 1.2.3. Impact des allo-anticorps détectés par technique sensible Luminex®

De nombreuses questions ont émergé avec le développement de cette technique particulièrement sensible que constitue le Luminex® du fait de données parfois contradictoires concernant l'impact clinique des allo-anticorps détectés par cette méthode.

Tout d'abord, de nombreuses études publiées au cours des dernières années ont retrouvé un moins bon pronostic rénal chez les greffés ayant développé des DSA en post-transplantation dépistés par Luminex® [9, 10, 12, 15].

Ainsi, Lachmann et al. [9] a étudié l'impact sur la fonction rénale de l'émergence d'anticorps anti-HLA recherchés à un délai médian de 5 ans après la greffe chez 1014 patients. Des DSA ont été retrouvés chez 21% des 212 patients ayant perdu leur greffon contre 6% chez les patients avec une fonction rénale stable.

Terasaki et al. [15] a analysé les sérums de 502 patients sur lesquels ont été recherchés des DSA en technique Luminex® à différents moments post-greffe et a également rapporté une moindre survie du greffon à un an dans le groupe de patients ayant développé des anticorps (64% versus 95%,  $p=0.008$ ).

Cependant, un certain nombre d'autres publications ont mis en évidence que tous les DSA révélés par technique Luminex® ne sont pas forcément délétères pour le greffon [16-18].

Ainsi, Bartel et al. [17] en étudiant l'apparition des DSA et leurs conséquences cliniques chez 164 greffés rénaux, a montré que les patients ayant développé des anticorps sans épisode de rejet associé et avec une fonction rénale stable gardent le même pronostic à un an que ceux sans DSA.

Ceci soulève donc la question de l'impact des DSA détectés par technique sensible sur la survie du greffon en l'absence de rejet associé.

#### 1.2.4. Etat d'accommodation

L'un des enjeux actuels de la transplantation est de comprendre pourquoi les DSA qui apparaissent en post greffe sont, avec des classes d'immunosuppresseurs similaires, dans certaines circonstances toxiques pour le greffon alors que dans d'autres cas, leur présence ne s'accompagne d'aucun signe clinique, biologique ou histologique de rejet.

Ceci pose l'hypothèse d'un état de « pseudo-tolérance » décrit par Colvin et al. comme phénomène d'accommodation <sup>[4]</sup>.

Cet état d'accommodation, défini par une bonne fonction du greffon et l'absence d'épisode de rejet malgré la présence d'allo-anticorps circulants dirigés contre le donneur, possède une physiopathologie complexe qui reste incomprise.

En effet, il n'existe actuellement aucun moyen univoque permettant de prédire parmi ces anticorps anti-HLA lesquels seront toxiques, et donc susceptibles d'entraîner la survenue d'épisodes de rejets aigus ou chroniques humoraux.

Connaissant les propriétés immuno-modulatrices de HLA-G découvertes lors de la grossesse et que nous allons détailler, nous avons fondé notre étude sur l'hypothèse d'un effet protecteur de cet antigène HLA contre la toxicité sur le greffon des allo-anticorps spécifiques d'antigènes du donneur.

## 1.3. Human Leukocyte Antigen G

### 1.3.1. Généralités

« Human Leukocyte Antigen G » (HLA-G) est une molécule HLA classe I non classique découverte en 1990, dont le gène est localisé sur le bras court du chromosome 6 dans la région codante du complexe majeur d'histocompatibilité <sup>[19]</sup>.

Elle a été qualifiée de « non classique » car elle diffère par sa diversité génétique, son expression, sa structure et ses fonctions.

En effet, HLA-G possède un très faible polymorphisme avec uniquement 7 variants protéiques (versus 462 pour HLA-A et 789 pour HLA-B) <sup>[19]</sup>.

Par ailleurs, tandis que les molécules HLA classe I classiques sont exprimées sur toutes les cellules nucléées, celle-ci possède physiologiquement une distribution restreinte sur certaines cellules et tissus, tels que le trophoblaste, le thymus, la cornée, et les cellules souches mésenchymateuses. Cependant, son expression est également inductible dans des conditions pathologiques variées telles que la transplantation d'organes solides, les infections virales, les pathologies malignes et les maladies auto-immunes <sup>[19]</sup>.

Il existe au moins sept isoformes de HLA-G générés par épissage alternatif à partir d'un seul transcrite primaire. Quatre d'entre elles sont liées à la membrane cellulaire (HLA-G1 à HLA-G4) et les trois autres sont des protéines solubles (HLA-G5 à HLA-G7). La protéine complète HLA-G1 et l'isoforme soluble correspondant HLA-G5 semblent être les principales formes fonctionnelles et sont les mieux connues en termes d'expression et de fonction <sup>[20]</sup>.

### 1.3.2. Fonctions immunitaires

Contrairement aux molécules HLA classe I classiques, HLA-G ne semble pas posséder de fonctions stimulatrices de l'immunité, et il n'a pas été rapporté de réponse allogénique dirigée contre HLA-G. En revanche, elle a la capacité commune aux molécules HLA classe I de se lier à des récepteurs inhibiteurs.

Trois récepteurs de HLA-G ont été décrits <sup>[21]</sup> :

- « immunoglobulin-like transcript 2 receptor » (ILT2R)
- « immunoglobulin-like transcript 4 receptor » (ILT4R)
- « killer cell immunoglobulin-like receptor, 2 domains, long cytoplasmic tail 4 » (KIR2DL4).

ILT2R est exprimé à la surface des lymphocytes B, des cellules dendritiques et de certains lymphocytes T et « natural killer » (NK) <sup>[22]</sup>. Le récepteur ILT4R est lui spécifiquement présent sur les cellules myéloïdes et exprimé par les cellules dendritiques <sup>[23]</sup>. Concernant KIR2DL4, son expression est majoritairement restreinte à certaines cellules NK <sup>[24, 25]</sup>.

Les propriétés immuno-régulatrices de HLA-G reposent sur la modulation des fonctions de ces différents effecteurs cellulaires de l'immunité que représentent les cellules NK, les lymphocytes T (CD4 et CD8) et les cellules dendritiques <sup>[26]</sup>. Tous ces types cellulaires expriment au moins un récepteur pour HLA-G <sup>[27]</sup>.

Un des mécanismes de cette modulation est basé sur le blocage par HLA-G de l'activité cytolytique des lymphocytes T et NK via sa liaison aux différents récepteurs inhibiteurs exprimés à leur surface <sup>[21, 28]</sup>.

HLA-G soluble peut aussi se lier au co-récepteur CD8, entraînant alors l'apoptose des cellules T et NK <sup>[29, 30]</sup>.

D'autre part, il peut supprimer la prolifération cellulaire T CD4+ et CD8+ en réponse à une stimulation allogénique en bloquant la progression dans le cycle cellulaire des cellules T activées et en induisant des cellules T suppressives <sup>[31-34]</sup>.

Enfin, HLA-G conduit au développement de cellules dendritiques de phénotype «tolérogène» qui induisent l'anergie des lymphocytes T CD4+ et CD8+ <sup>[29]</sup>.

### 1.3.3. Implications cliniques

En exerçant, via ces récepteurs, des fonctions inhibitrices sur les principales cellules effectrices impliquées notamment dans le rejet d'allogreffe, HLA-G possède des propriétés immuno-régulatrices, découvertes initialement pour leur participation dans la tolérance immunitaire materno-fœtale.

En effet, durant la grossesse, la molécule est exprimée à la surface du cytotrophoblaste où elle inhibe la cytotoxicité maternelle médiée par les cellules NK et contribue ainsi à la tolérance du fœtus semi-allogénique<sup>[35]</sup>.

Désormais, il est couramment accepté que HLA-G se comporte comme une molécule immuno-modulatrice en favorisant également la tolérance des allogreffes, en diminuant les réponses immunitaires et inflammatoires et en contribuant à l'échappement des cellules tumorales ou infectées par un virus au système immunitaire<sup>[36]</sup>. Ceci a été confirmé par des études *in vivo* sur modèle animal au cours desquelles une injection unique de HLA-G prolongeait significativement la survie de greffes de peau allogéniques chez la souris<sup>[37]</sup>.

En transplantation d'organes, des études ont montré une augmentation d'expression de HLA-G sérique et membranaire dans les biopsies de greffon de transplantés cardiaques<sup>[38]</sup>, pulmonaires<sup>[39]</sup>, hépatiques<sup>[40]</sup> et foie-rein<sup>[41, 42]</sup>, avec des propriétés tolérogènes puisque ces patients exprimant HLA-G avaient une incidence moindre de rejet aigu et/ou chronique.

Concernant la transplantation rénale et rein-pancréas, une étude publiée en 2009 a mis en évidence que les patients ayant présenté un ou plusieurs épisodes de rejet avaient un taux de HLA-G soluble plus bas en pré- et post-greffe que ceux sans épisode de rejet. HLA-G soluble ressortait alors comme un facteur protecteur avec un cut-off défini à 11.5 ng/mL (sensibilité, 60%; spécificité, 80.4%)<sup>[43]</sup>.

Par ailleurs, dans une étude menée par Qiu et al. en 2006<sup>[44]</sup>, une association négative a été retrouvée entre l'expression de HLA-G soluble chez des transplantés rénaux et la survenue de rejet ainsi que le développement d'anticorps anti-HLA en post-greffe. En effet, une expression de HLA-G soluble a été retrouvée chez 20.5% des 39 patients

ayant présenté un rejet chronique contre 50% des 26 greffés avec une fonction rénale stable. De plus, 80% des receveurs ayant développé des anticorps anti-HLA en post-greffe n'exprimaient pas HLA-G soluble, tandis que 81.4% des patients avec une expression positive n'ont pas présenté d'anticorps anti-HLA.

L'expression de HLA-G membranaire a également été étudiée en greffe rénale dans une étude de Crispim et al. portant sur 73 biopsies de greffon rénaux<sup>[45]</sup>.

Celle-ci mettait en évidence que son expression était significativement augmentée sur les prélèvements ne présentant pas de signes de rejet (72%), comparativement à ceux avec des signes de rejet aigu (20%) ou de néphropathie chronique d'allogreffe (15%).

## **2. Objectifs de l'étude**

---



## 2.1. Objectif principal

Compte tenu des propriétés tolérogènes de HLA-G, l'**objectif principal** de notre étude est de montrer l'effet protecteur de HLA-G soluble et/ou membranaire vis-à-vis de la cytotoxicité des allo-anticorps HLA spécifiques du donneur développés en post-greffe.

Nous espérons ainsi améliorer la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'état d'accommodation.

Ce potentiel effet d'immuno-modulation de HLA-G n'a, à notre connaissance, jamais été publié à ce jour.

## 2.2. Objectifs secondaires

Les **objectifs secondaires** sont :

- identifier d'éventuels facteurs inducteurs d'expression de HLA-G soluble et/ou membranaire, grâce au recueil des caractéristiques cliniques des patients.
- rechercher un effet protecteur de HLA-G soluble et/ou membranaire vis à vis du risque d'émergence des DSA.

## **3. Matériels et méthodes**

---

## 3.1. Patients

### 3.1.1. Critères d'inclusion et d'exclusion (figure 1)

Notre étude est une analyse rétrospective monocentrique menée à partir de la cohorte des 462 patients receveurs d'une allogreffe rénale entre le 1<sup>er</sup> janvier 2005 et le 31 décembre 2009 au centre hospitalier universitaire de Grenoble.

Le jour de la greffe, l'ensemble des crossmatches étaient négatifs en Immunoglobulines G (IgG) sur les lymphocytes T par technique de micro-lymphocytotoxicité (LCT) complément dépendante.

Le typage HLA-A/B/DQ/DR du donneur et du receveur a été réalisé par biologie moléculaire à l'aide du kit Inno-Lipa HLA® (Innogenetics, Belgique) jusqu'au 1<sup>er</sup> janvier 2009 puis avec le kit Luminex LABType® SSO (One Lambda, Etats-unis).

Tous les patients sur liste d'attente ont bénéficié régulièrement d'une recherche d'anticorps anti-HLA classe I et II par technique sensible Luminex®. Notre étude portant uniquement sur les patients sans immunisation pré-greffe, 179 patients ont été exclus du fait de la présence d'anticorps anti-HLA avant la transplantation.

Les autres critères d'exclusion sont :

- La perte précoce du greffon du fait d'une complication vasculaire (thrombose de l'artère et/ou de la veine du greffon) (n = 8)
- Le décès avec un greffon fonctionnel dans les 3 mois post-greffe (n = 3)
- L'absence de suivi post-transplantation dans notre centre (n = 2).

Au final, 270 patients receveurs d'une allogreffe rénale et non immunisés au moment de la greffe ont donc été inclus dans l'analyse statistique.

Ces 270 patients ont été divisés en 2 groupes distincts :

➤ **le groupe des « non immunisés » en post-greffe (n=22)**

Ils sont caractérisés par l'absence d'apparition d'anticorps anti HLA tout au long du suivi immunologique post-greffe.

Seuls les patients ayant le matériel nécessaire à l'analyse du HLA-G membranaire et soluble ont pu être inclus. Cela nécessite d'une part, une sérothèque disponible à l'Etablissement Français du Sang (EFS) de Grenoble et d'autre part, une ponction biopsie du greffon informative. Celle-ci a été effectuée dans le cadre d'un protocole de biopsie systématique au troisième mois post-greffe, mis en place dans notre centre à compter du 1<sup>er</sup> janvier 2009.

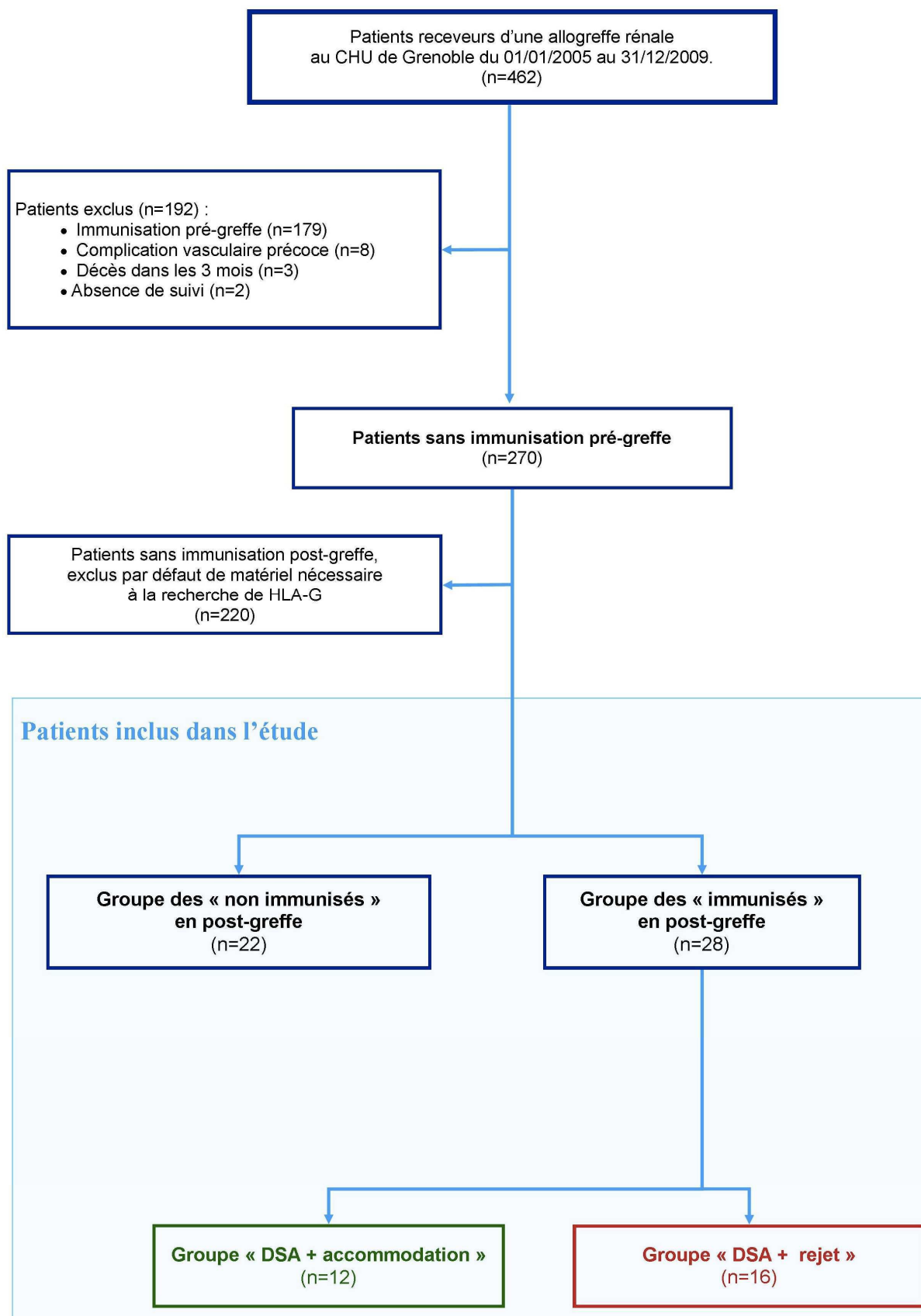
➤ **le groupe des « immunisés » en post-greffe (n=28)**

Il comprend l'ensemble des patients de la cohorte initiale ayant développé des anticorps anti-HLA dirigés contre les antigènes du donneur (DSA) en post-transplantation.

Ce groupe a lui même été divisé en deux sous-groupes :

- Les patients immunisés ayant présenté au moins un épisode de rejet prouvé histologiquement par une ponction-biopsie de greffon (**groupe « DSA + rejet », n=16**)
- Les patients immunisés sans aucun stigmate clinique, biologique ou histologique de rejet, en faveur d'un état de « pseudo-tolérance » encore appelé état d'accommodation (**groupe « DSA + accommodation », n=12**).

La durée médiane de suivi est de 2 années (1.7-4.6).



*Figure 1. Organigramme descriptif de l'étude*

## 3.1.2. Traitement immunosuppresseur

### a. Traitement d'induction

Les patients ont reçu un protocole d'induction adapté à leur risque immunologique. 60% des receveurs ont été traités par anticorps polyclonaux « rabbit anti-thymocyte globulin » (rATG) à une posologie variant entre 0.7 et 1 mg/kg/jour du jour (J) 0 à J5. 36% des greffés ont reçu des anticorps dirigés contre le récepteur de l'interleukine 2 (« interleukin 2 receptor antagonist », IL2-RA), essentiellement basiliximab à la posologie de 20 mg à J0 et J4 pour 16 patients, ou daclizumab dans le cadre de protocoles de recherche clinique pour les 2 autres patients. L'induction par IL2-RA a été réservée aux receveurs considérés comme présentant un faible risque immunologique. 2 greffés n'ont reçu aucune thérapie d'induction du fait d'un risque immunologique considéré comme particulièrement faible (donneur vivant HLA semi-identique).

### b. Corticothérapie

Tous les patients ont reçu une corticothérapie à forte dose par voie intra-veineuse dès la période pré-opératoire, suivie d'une décroissance progressive avec relais oral par prednisone au 6<sup>ème</sup> jour de greffe. 20% des patients ont été sevrés précocement des corticostéroïdes entre J4 et J10 du fait d'un diabète.

### c. Traitement d'entretien

Le traitement immunosuppresseur d'entretien repose pour une majorité de receveurs (68%) sur une combinaison d'inhibiteurs de la calcineurine (tacrolimus, 82% ou ciclosporine, 18%), de mycophénolate mofétil (MMF), avec (24%) ou sans (76%) corticostéroïdes. Les posologies de tacrolimus et de ciclosporine sont ajustées pour maintenir des taux résiduels (tacrolimus) entre 10 et 15 µg/L, et des concentrations sériques 2 heures après la prise (ciclosporine) entre 500 et 800 ng/mL durant le premier mois, puis entre 4 et 9 µg/L et entre 350 et 450 ng/mL respectivement.

Seuls deux greffés reçoivent un schéma associant tacrolimus et azathioprine et un patient est sous monothérapie par tacrolimus.

Les 13 autres patients reçoivent un traitement d'entretien par inhibiteurs de mTOR (mammalian target of rapamycin) : everolimus ou sirolimus, en association pour 8 d'entre eux avec le MMF seul et pour les 5 autres avec MMF et corticoïdes.

Pour tous ces patients, les inhibiteurs de mTOR ont été débutés après la greffe en remplacement des anti-calcineurines. Cette conversion a été réalisée à un délai variable post-transplantation compris entre 3.5 et 44.2 mois avec une médiane de 5.2 mois (3.6-9.1).

La méthode de conversion utilisée dans notre centre repose sur un arrêt brutal des anti-calcineurines avec remplacement soit par l'everolimus soit par le sirolimus. Afin d'améliorer la tolérance des inhibiteurs de mTOR, les corticostéroïdes sont repris ou augmentés à la posologie de 0.5 mg/kg/jour durant la première semaine, diminués ensuite à 0.1 mg/kg/jour et selon les patients arrêtés ou non après un mois.

Les posologies d'everolimus ou de sirolimus sont adaptées pour maintenir des concentrations résiduelles sériques entre 3 et 8 ng/mL et entre 5 et 10 ng/mL respectivement.

Les patients pour lesquelles cette conversion des anti-calcineurines aux inhibiteurs de mTOR a été réalisée ont été sélectionnés comme étant ceux avec un faible risque immunologique, une fonction rénale stable et sans épisode de rejet préalable.

La principale raison pour cette conversion avant 2009 était l'apparition d'une néoplasie en post-greffe. En revanche, à partir du 1<sup>er</sup> janvier 2009, un protocole de biopsie systématique du greffon à 3 mois post-greffe a été instauré. Cette conversion a alors été envisagée de manière systématique 15 jours après cette biopsie si le patient était considéré comme étant à faible risque immunologique et sans aucun signe de rejet décelé sur la biopsie.

### **3.1.3. Suivi clinique et biologique**

L'ensemble des patients inclus a bénéficié d'un suivi clinique et biologique régulier en post-greffe, comprenant le monitoring des traitements immunosuppresseurs et l'évaluation de la fonction rénale par le taux de créatinine sérique ( $\mu\text{mol/L}$ ) et la protéinurie (g/L) sur échantillon urinaire.

### 3.1.4. Suivi immunologique : détection des anticorps anti-HLA par technique Luminex®

La recherche d'anticorps anti-HLA a été effectuée à 3, 6, 12 et 24 mois après la greffe ainsi qu'à chaque fois que celle-ci était cliniquement indiquée (augmentation de la créatinine sérique faisant suspecter un épisode de rejet).

Cette recherche a été réalisée par la technique sensible en phase solide Luminex® avec le kit « LAB-Screen Mixed Beads » (One Lambda Inc., USA).

La **technologie Luminex®** est une technique de cytométrie en flux permettant l'étude de multiples réactions dans un seul micro-puits. Il s'agit d'un système multi-analytique constitué d'un cytomètre de flux à 2 lasers (un laser rouge à 633 nm et un laser vert à 532 nm), d'un ensemble de microsphères et d'un lecteur de plaque 96 puits piloté par un ordinateur permettant l'acquisition des données et leur analyse.

Les microsphères sont marquées par incubation dans des bains renfermant un mélange de deux solutions fluorescentes. En variant la proportion des 2 fluorochromes dans les bains, on obtient une gamme de 100 catégories de microsphères caractérisées par un code-couleur différent selon l'intensité de la fluorescence émise par les 2 fluorochromes dans leur spectre d'émission respectif (*figures 2 et 3*).

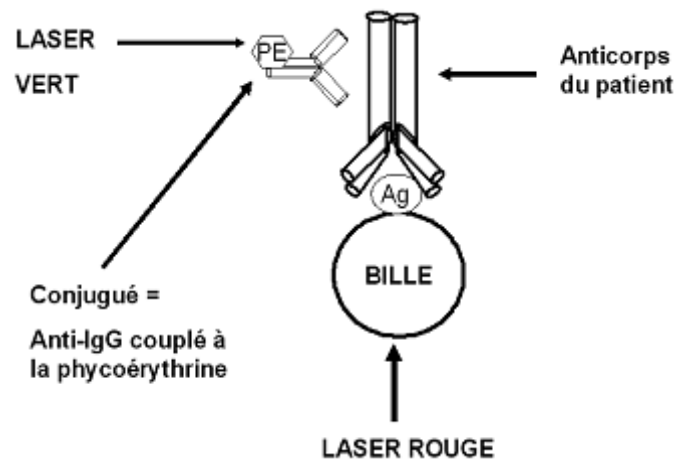


*Figures 2 et 3. Les microsphères*



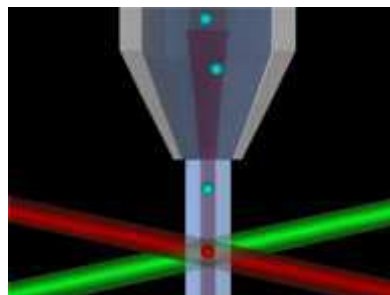
Pour la recherche d'anticorps anti-HLA, les microsphères sont couplées par le fabricant à des antigènes HLA purifiés. Chaque type de bille est l'équivalent d'une suspension de lymphocytes de phénotype HLA connu classe I et/ou classe II.

Après incubation avec le sérum à tester, les anticorps fixés aux microsphères sont révélés par un anticorps secondaire qui est une immunoglobuline de chèvre anti-IgG humaine marquée à la phycoérythrine (*figure 4*).



*Figure 4. Détection d'anticorps à l'aide de la technologie Luminex®*

Lors du passage dans le cytomètre, le laser rouge excite les molécules à l'intérieur des microsphères à 635 nm et permet ainsi leur identification par une double classification d'après l'intensité des signaux émis à 2 longueurs d'ondes. Le laser vert excite quant à lui la phycoérythrine à 532 nm ce qui permet de mesurer l'intensité de la réaction (*figure 5*).



*Figure 5. Lasers rouge et vert du cytomètre excitant une microsphère*

Les valeurs mesurées sont rapportées en « mean fluorescence intensity » (MFI).

Les billes avec des valeurs normalisées de MFI supérieures ou égales à **1000** sont définies comme positives par notre laboratoire HLA.

Pour chaque antigène, la valeur de MFI recueillie est la valeur la plus élevée parmi toutes les billes présentant les différents allèles du même antigène.

Les échantillons revenus positifs avec la technique de dépistage sont testés en technique « single antigen flow beads » (une spécificité antigénique sur chaque microsphère) permettant de déterminer les spécificités des anticorps.

Les billes positives sont ensuite analysées selon les incompatibilités HLA entre donneur et receveur pour identifier les anticorps dirigés spécifiquement contre des antigènes du donneur.

Le logiciel d'analyse permet d'obtenir une identification des spécificités des anticorps ainsi que le pourcentage de réactivité (« panel reactive antibodies » ou PRA), déterminé par la proportion de microsphères qui réagissent positivement avec le sérum.

La puissance de ce système réside dans le fait qu'il est possible d'analyser jusqu'à 100 types de microsphères par puits.

### 3.1.5. Suivi histologique : biopsies de greffon

Dans le groupe des patients « **non immunisés** » (n=22), la ponction-biopsie de greffon (PBG) a été réalisée à 3 mois de greffe dans le cadre de notre protocole de biopsie systématique mis en place à partir du 1<sup>er</sup> janvier 2009 afin de dépister d'éventuels épisodes de rejet infra-clinique.

4 greffés parmi les 22 du groupe ont été biopsiés une deuxième fois au cours du suivi pour une suspicion clinique de rejet à un délai médian de 5.5 mois (1.9-11) après la première PBG.

Concernant le groupe des patients « **immunisés** », seuls 2 greffés parmi les 28 ayant développé des DSA n'ont pas bénéficié de la réalisation d'une PBG du fait d'un traitement par anticoagulant oral avec un rapport bénéfice/risque considéré comme défavorable. Pour les 26 autres patients, la PBG a été réalisée à un délai médian de 2.2 mois (0-6.7) après l'apparition des DSA.

Tous les épisodes de rejet ont été histologiquement prouvés et typés selon la classification de Banff 97 révisée en 2007 <sup>[46]</sup> par une analyse en microscopie optique et en immunofluorescence indirecte.

Pour la microscopie optique, le matériel est fixé dans l'AFA (acide acétique, formol, alcool absolu), inclus en paraffine et coupé en sections de 2 micromètres d'épaisseur. Ces sections sont ensuite colorées avec les colorations standard, à savoir l'hématoxyline éosine (HES), l'acide périodique de Schiff (PAS), le trichrome de Masson et la coloration argentique de Jones.

Pour l'immunofluorescence, une méthode indirecte en deux étapes est utilisée sur matériel congelé avec un anticorps monoclonal dirigé contre le C4d (anti-C4d monoclonal de lapin, Biomeda).

## 3.2. Etude de HLA-G

### 3.2.1. HLA-G soluble

#### a. Méthodologie

Le niveau d'expression de HLA-G soluble est mesuré en technique ELISA grâce au kit « sHLA-G ELISA » (kit commercial Biovendor, République Tchèque) contenant un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'isoforme soluble humaine HLA-G5 (sHLA-G5).

Les sérums testés proviennent de la sérothèque du laboratoire HLA de l'EFS de Grenoble.

La méthodologie utilisée respecte les instructions du fabricant et les étapes sont les suivantes :

- Dépôt de 100 µL des sérums de chaque patient et des calibrateurs internes (solutions contenant une concentration connue de HLA-G obtenues par dilution en cascade d'une solution mère) dans les puits dans lesquels est fixé l'anticorps monoclonal anti-sHLA-G5.
- Incubation entre 2 et 8°C pendant 16-20 heures.
- Lavage par le tampon de lavage à 5 reprises.
- Ajout de 100 µL de la solution contenant l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase du raifort.
- Incubation pendant 60 minutes à température ambiante.
- Lavage par le tampon de lavage.
- Ajout de 100 µL de solution substrat (tetramethylbenzidine) dégradée par la peroxydase du raifort conjuguée aux anticorps fixés dans les puits.
- Développement de la réaction enzymatique pendant 25 minutes à température ambiante.

- Arrêt de la réaction par addition de 100 µL d'acide sulfurique.
- Détermination de la densité optique de la coloration bleue résultante par spectrophotométrie à 450 nm.

Les concentrations de HLA-G soluble des sérums testés sont proportionnelles aux valeurs de densité optique mesurées et peuvent alors être obtenues grâce à la courbe standard tracée à partir des valeurs d'absorbance des calibrateurs.

Pour chaque sérum, le dosage est effectué en double pour plus de précisions.

### **b. Temps de dosage de HLA-G soluble dans l'étude**

Les dosages de HLA-G soluble sont réalisés pour chaque patient sur plusieurs sérums prélevés à différents temps post-greffe afin de suivre l'évolution du HLA-G, à savoir :

- Dans le groupe des patients « immunisés » :
  - Au moment de l'**apparition des DSA** (J0 DSA) pour tous les patients.
  - Le jour de la **biopsie du greffon** (J PBG) pour 11 d'entre eux car celle-ci avait été réalisée tardivement par-rapport à J0.
  - **3 mois** après l'apparition des DSA (M3 post-DSA).
  - Entre **12 et 18 mois** après l'émergence des DSA (M12-M18 post-DSA).
- Dans le groupe des patients « non immunisés » :
  - Au **3<sup>ème</sup> mois post-greffe** (M3 post-greffe), correspondant à la date de la biopsie du greffon.
  - Au **18<sup>ème</sup> mois post-greffe** (M18 post-greffe) correspondant au délai médian d'apparition des DSA par rapport au jour de greffe (623 jours, 309-1008) dans le groupe des patients « immunisés ». Cette dernière valeur permet ainsi de comparer les taux de HLA-G soluble du groupe « non immunisé » à ceux du groupe « immunisé » au jour d'apparition des DSA.

## 3.2.2. HLA-G membranaire

### a. Méthodologie

L'expression de HLA-G membranaire est recherchée sur les coupes en paraffine des biopsies de greffon par technique immuno-histochimique à l'aide de l'anticorps monoclonal murin anti-HLA-G / clone MEM-G/02® (Exbio, République Tchèque).

Celui-ci reconnaît la chaîne lourde de toutes les isoformes de HLA-G membranaire.

La méthodologie utilisée, respectant les instructions du fabricant, est la suivante :

- Déparaffinage des lames de 2 µm d'épaisseur au toluène et réhydratation.
- Prétraitement des coupes dans un bain de tampon citrate à pH 6 pendant 5 minutes à la cocotte minute puis refroidissement pendant 20 minutes.
- Rinçage des lames à l'eau.
- Saturation des peroxydases endogènes avec du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à 1% dans de l'eau distillée pendant 5 minutes.
- Rinçage des lames à l'eau.
- Saturation des sites non spécifiques afin de diminuer le « bruit de fond » par du lait sans matière grasse à 2% dans du tampon phosphate salin (« phosphate buffered saline », PBS) à pH 7.4 pendant 30 minutes.
- Incubation de l'anticorps primaire murin anti HLA-G / clone MEM-G/02® au 1/200<sup>ème</sup> ou du témoin négatif (IgG de souris non immune à 2 µg/mL) pendant 12 heures à 4°C.
- Lavage au tampon PBS à pH 8.6 afin de diminuer le « bruit de fond » en rompant les liaisons non affines.
- Surfixation au glutaraldéhyde à 0.05 % dans du tampon PBS à pH 8.6 pendant 5 minutes.
- Lavage au tampon PBS à pH 8.6.
- Incubation de l'anticorps secondaire pur N-Histofine® Simple stain MAX PO (Nichirei Biosciences Inc.) qui est un polymère marqué à la peroxydase fixé à une IgG de chèvre anti-murine pendant 30 minutes à température ambiante.
- Lavage au tampon PBS à pH 8.6.
- Surfixation au glutaraldéhyde à 0.05 % dans du tampon PBS à pH 8.6 pendant 5 minutes afin de consolider la liaison antigène-anticorps.
- Lavage au tampon PBS à pH 8.6.
- Lavage au tampon tris à pH 7.6 afin d'optimiser la réaction enzymatique

peroxydase-DAB® et le marquage.

- Révélation en DAB® (Diaminobenzidine Tetrahydrochloride) pendant 5 minutes.
- Arrêt de la révélation à l'eau courante.
- Contre coloration nucléaire à l'hématoxyline de Harris® afin de faciliter la lecture des lames.
- Analyse du marquage en microscopie optique. L'intensité du marquage est gradée semi-quantitativement de 0 à \*\*\* (0, \*, \*\*, et \*\*\*).

Pour valider notre technique, nous avons effectué des **témoins négatifs** en remplaçant l'anticorps anti-HLA-G par des IgG de souris non immunes comme décrit plus haut.

Des **témoins positifs** ont également été réalisés en effectuant cet immuno-marquage sur des sections de tissu trophoblastique fixés en paraffine.

#### **b. Critères de positivité**

Nous avons considéré comme expression positive du HLA-G membranaire un marquage d'intensité \*\* ou \*\*\* localisé au niveau des cellules épithéliales tubulaires, qu'il soit :

- cytoplasmique avec un minimum de 5 tubes marqués par fragment,
- ou para-nucléaire avec un minimum de 5 % de l'ensemble des tubes marqués.

Les deux types de marquages peuvent être associés sur un même échantillon.

### c. Temps de recherche de HLA-G membranaire dans l'étude

L'expression de HLA-G membranaire est étudiée sur les biopsies de greffon réalisées à différents temps post-greffe.

➤ Dans le groupe des patients « non immunisés » :

- A **trois mois post-greffe** (PBG M3) pour l'ensemble des patients.
- Sur une **deuxième PBG** pour 4 patients, réalisée à un délai médian de 5.5 mois (1.9-11) après la première biopsie.

➤ Dans le groupe des patients « immunisés » :

- A **trois mois post-greffe** chez les 6 patients greffés en 2009 ayant bénéficié du protocole de biopsie systématique.
- **Avant l'apparition des DSA** pour 10 patients du groupe « DSA + rejet » et 7 patients du groupe « DSA + accommodation », à un délai médian de - 9.3 mois (7.4 -16.8) de PBG J0 DSA.
- **Après l'apparition des DSA** (PBG J0 DSA) pour tous les patients.
- En **post-traitement du rejet** pour les 10 patients du groupe « DSA + rejet » ayant eu une PBG de contrôle, à un délai médian de 55 jours (31-91) de PBG J0 DSA.
- **Tardivement** à 317 et 322 jours après le diagnostic de rejet pour 2 greffés du groupe « DSA + rejet ».

Afin de conserver l'exhaustivité de notre cohorte avec un minimum d'une biopsie par patient, les analyses statistiques ont été effectuées à partir des résultats de HLA-G membranaire présent sur les biopsies de M3 du groupe « non immunisé » et du jour de l'émergence des DSA du groupe « immunisé ».



### 3.3. Analyses statistiques

Les variables quantitatives sont exprimées selon la moyenne  $\pm$  déviation standard (DS) ou la médiane (premier quartile-troisième quartile) en cas de distribution non gaussienne de la valeur dans la population. Les variables qualitatives sont décrites en effectif et pourcentage.

Les groupes sont comparés en utilisant le test-t pour les variables continues et le test exact de Fisher ou du Khi-deux de Pearson pour les variables catégorielles. La comparaison des taux de HLA-G soluble entre les groupes est effectuée par le test U de Mann et Whitney.

Les variations de créatininémie sont étudiées avec un modèle d'analyse de variance à un facteur (« one-way anova »).

Le seuil de significativité retenu pour la valeur de p est 0.05.

Toutes les analyses statistiques sont effectuées grâce au logiciel SPSS.

### 3.4. Design de l'étude (figure 6)

50 patients sont inclus dans l'étude avec un suivi médian de 2 ans (1.7-4.6) après la greffe.

Ils sont divisés en trois groupes :

- Groupe des greffés « **non immunisés** » (n=22) caractérisé par l'absence d'immunisation post-greffe.
- Groupe « **DSA + rejet** » (n=16) défini par l'émergence de DSA en post-greffe avec pour conséquence au moins un épisode de rejet aigu, cellulaire ou humoral.
- Groupe « **DSA + accommodation** » (n=12) constitué de patients ayant développé des DSA en post-greffe mais sans épisode de rejet associé.

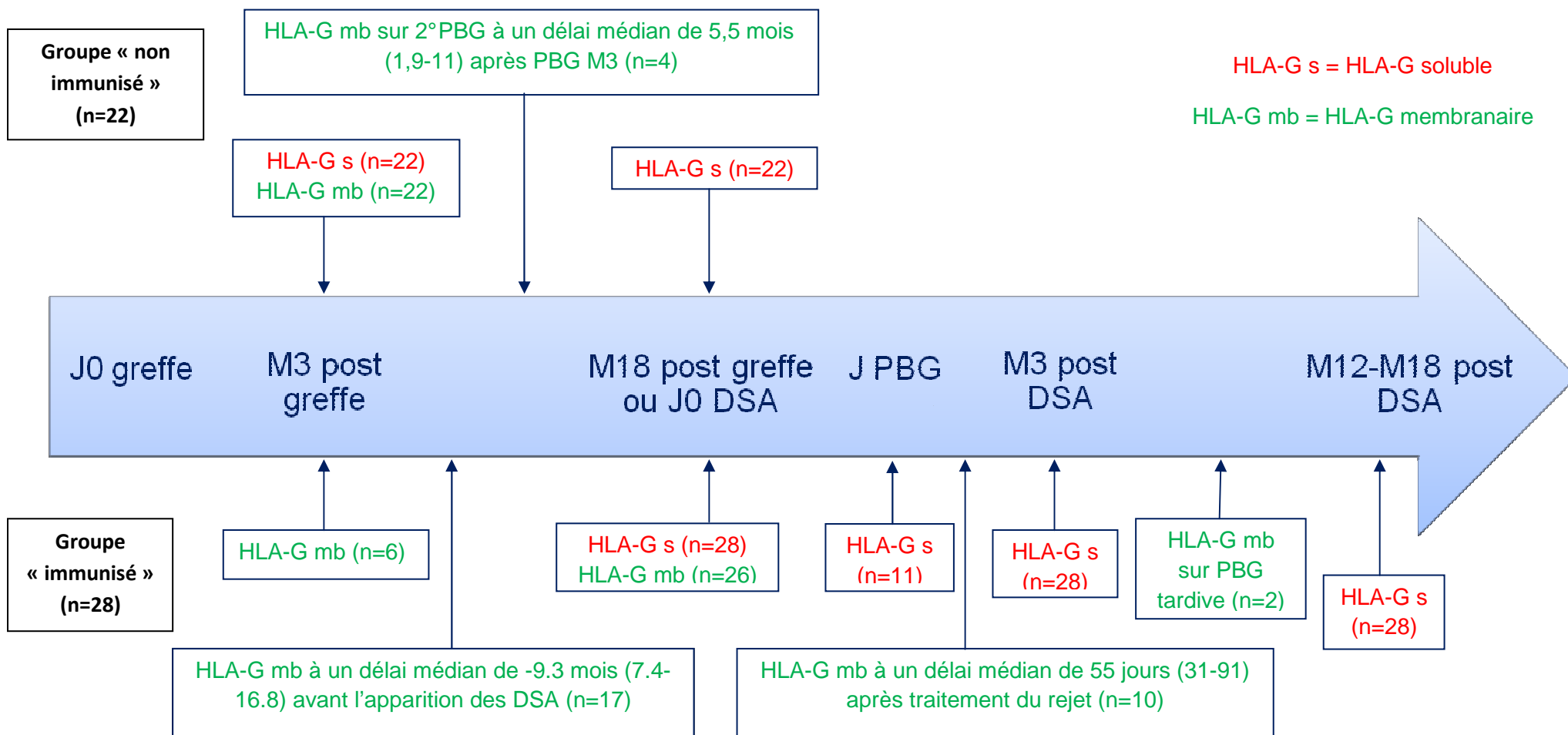


Figure 6 : Chronologie des recherches de HLA-G membranaire et soluble

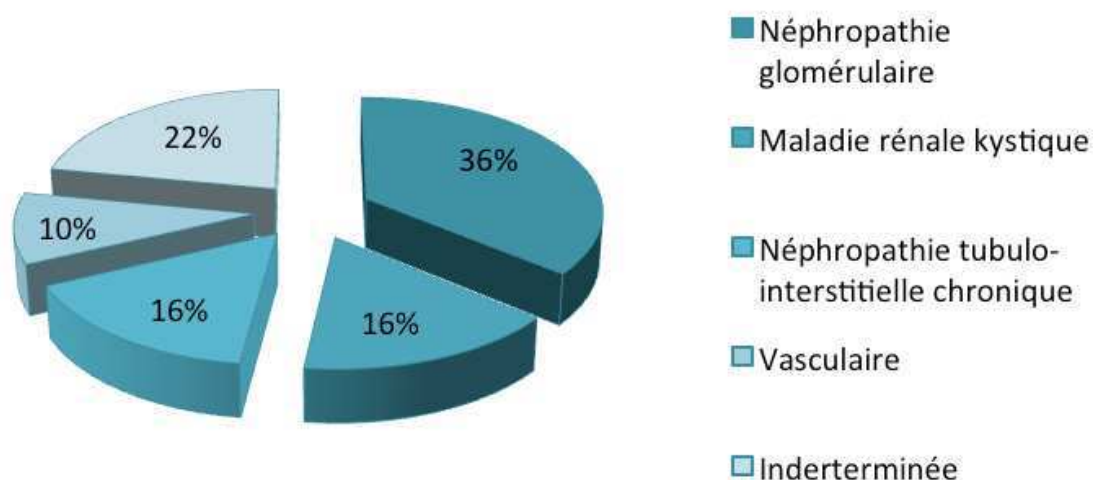
## 4. Résultats

---

## 4.1. Analyse descriptive de la population (tableau 2)

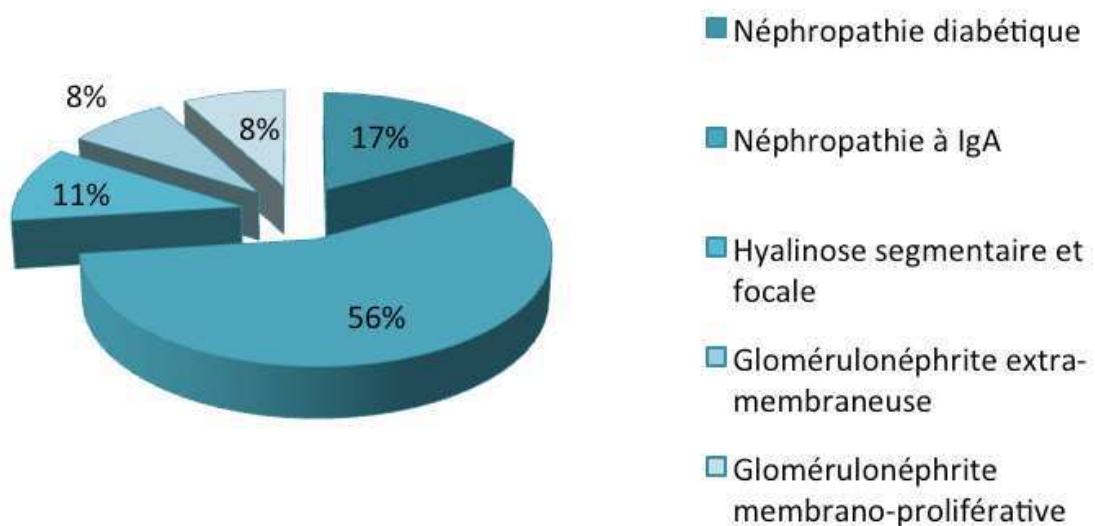
### 4.1.1. Caractéristiques des patients inclus

Les néphropathies glomérulaires représentent la principale cause d'insuffisance rénale chronique terminale de notre cohorte (36%), suivies des maladies rénales kystiques (16%), des néphropathies tubulo-interstitielles chroniques (16%) et des néphropathies vasculaires (10%) (*figure 7*).



*Figure 7. Néphropathie initiale : répartition dans la population*

La néphropathie à dépôts mésangiaux d'IgA représente 56% des causes glomérulaires, suivie par la néphropathie diabétique (17%) et la hyalinose segmentaire et focale (11%). (*figure 8*).



**Figure 8. Etiologies des néphropathies glomérulaires**

L'âge moyen au moment de la greffe est de  $49.5 \pm 14.5$  ans avec des extrêmes variant de 20 à 76.3 ans.

Il s'agit pour la majorité des patients d'une première greffe rénale, à l'exception d'un patient qui bénéficie d'une deuxième transplantation.

Des antécédents d'événements immunogènes tels qu'une transfusion ou une grossesse avant la transplantation ont été retrouvés chez 32% des greffés.

### 4.1.2. Données liées à la transplantation rénale

Seuls 12% des patients ont été greffés à partir d'un donneur vivant apparenté.

26% de notre cohorte a reçu un greffon provenant d'un « donneur limite » défini par un âge supérieur à 60 ans ou compris entre 50 et 60 ans avec au moins deux facteurs de risque associés parmi :

- hypertension artérielle
- créatinine sérique supérieure à 250  $\mu\text{mol/L}$
- décès secondaire à un accident vasculaire cérébral.

Les receveurs avaient en moyenne  $4.3 \pm 2.2$  incompatibilités HLA avec le donneur réparties comme suit :

- incompatibilités classe I :  $2.4 \pm 0.9$
- incompatibilités DQ :  $0.8 \pm 0.6$
- incompatibilités DR :  $1.1 \pm 0.6$

Les patients des groupes « DSA + rejet » et « DSA + accommodation » avaient des valeurs moyennes d'incompatibilités DQ significativement plus élevées que celle du groupe « non immunisé » ( $1 \pm 0.5$  et  $1.1 \pm 0.5$  versus  $0.4 \pm 0.5$ ,  $p=0.005$ ).

La durée médiane d'ischémie froide était de  $16.1 \pm 8.7$  heures avec des extrêmes compris entre 1 et 44.1 heures.

20% des patients ont présenté un retard de reprise de fonction défini par la nécessité de réaliser au moins une séance d'épuration extra-rénale durant la première semaine post-greffe.

Durant le suivi post-greffe, 22% des receveurs ont présenté une complication infectieuse de type primo-infection ou réactivation à cytomégalovirus (CMV) ou à virus BK (BKV), ou pyélonéphrite aiguë (PNA).

Les 3 populations sont comparables concernant le traitement immunosuppresseur d'induction et d'entretien.

En revanche, on retrouve une proportion significativement plus élevée de sevrage précoce des corticoïdes avant J10 dans le groupe « non immunisé » (36.4%) comparativement aux groupes « DSA + rejet » (12.5%) et « DSA + accommodation » (0%) ( $p=0.037$ ).

Il n'existe pas d'autre différence significative entre les 3 groupes.

#### **4.1.3. Fonction du greffon à 3 mois de greffe**

Celle-ci est évaluée par :

- la créatininémie ( $\mu\text{mol/L}$ )
- la protéinurie sur échantillon urinaire (g/L)
- les résultats histologiques d'une biopsie du greffon à 3 mois de transplantation pour 31 patients (62%), gradés selon la classification de Banff 2007.

Selon ces critères, les groupes de patients ont une fonction de greffon comparable à 3 mois de greffe.



	Total (n=50)	Non immunisés (n=22)	Immunisés (n=28)	p	
			DSA + rejet (n=16)	DSA + accommodation (n=12)	
<b>Age (années), moyenne (±DS)</b>	49.5 (±14.5)	56 (±12.3)	47.7 (±15.3)	43.1 (±15.2)	NS
<b>Sexe: proportion d'hommes</b>	40 (80%)	17 (77.3%)	13 (81.3%)	10 (83.3%)	NS
<b>Première greffe rénale</b>	49 (98%)	21 (95.5%)	16 (100%)	12 (100%)	NS
<b>Néphropathie initiale</b>					NS
Néphropathie glomérulaire	18 (36%)	8 (36.4%)	5 (31.4%)	5 (41.7%)	
Maladie rénale kystique	8 (16%)	4 (18.2%)	3 (18.7%)	1 (8.3%)	
Néphropathie tubulo-interstitielle chronique	8 (16%)	3 (13.6%)	3 (18.7%)	2 (16.7%)	
Néphropathie vasculaire	5 (10%)	2 (9.1%)	2 (12.5%)	1 (8.3%)	
Indéterminée	11 (22%)	5 (22.7%)	3 (18.7%)	3 (25%)	
<b>Événement immunogène (transfusion/grossesse)</b>	16 (32%)	5 (22.7%)	7 (43.8%)	4 (33.3%)	NS
<b>Donneurs vivants apparentés</b>	6 (12%)	3 (13.6%)	3 (18.8%)	0 (0%)	NS
<b>Donneurs limites</b>	13 (26%)	7 (31.8%)	3 (18.8%)	3 (25%)	NS
<b>Incompatibilités HLA, moyenne (±DS)</b>					
Classe 1	2.4 (±0.9)	2.3 (±1.1)	2.6 (±0.9)	2.5 (±0.9)	NS
DQ	0.8 (±0.6)	0.4 (±0.5)*	1 (±0.5)*	1.1 (±0.5)*	0,005*
DR	1.1 (±0.6)	1.1 (±0.7)	1.1 (±0.3)	1 (±0.7)	NS
<b>Durée d'ischémie froide (heures), moyenne (±DS)</b>	16.1 (±8.7)	15.5 (±8)	16.5 (±9.3)	16.4 (±8.8)	NS
<b>Reprise retardée de fonction</b>	10 (20%)	6 (27.3%)	2 (12.5%)	2 (16.7%)	NS
<b>Infections CMV/BKV/PNA post-greffe</b>	11 (22%)	4 (18.2%)	5 (31.3%)	2 (16.7%)	NS
<b>Traitement d'induction</b>					NS
rATG	30 (60%)	11 (50%)	11 (68.7%)	8 (66.7%)	
IL2-RA	18 (36%)	11 (50%)	4 (25%)	3 (25%)	
Aucun	2 (4%)	0 (0%)	1 (6.3%)	1 (8.3%)	
<b>Arrêt des corticoïdes avant J10</b>	10 (20%)	8 (36.4%)*	2 (12.5%)*	0 (0%)*	0,037*
<b>Traitement d'entretien</b>					NS
CNI / MMF / Prednisone	8 (16%)	3 (13.7%)	4 (25%)	1 (8.3%)	
CNI / MMF	26 (52%)	14 (63.6%)	7 (43.8%)	5 (41.8%)	
Inhibiteur de mTOR / MMF / Prednisone	5 (10%)	0 (0%)	1 (6.2%)	4 (33.3%)	
Inhibiteur de mTOR / MMF	8 (16%)	3 (13.7%)	4 (25%)	1 (8.3%)	
Tacrolimus	2 (4%)	1 (4.5%)	0 (0%)	1 (8.3%)	
Tacrolimus / Imurel	1 (2%)	1 (4.5%)	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Créatininémie à M3 (µmol/L) moyenne (± DS)</b>	143 (±43)	141 (±38)	148 (±49)	142 (±48)	NS
<b>Protéinurie à M3 (g/L) moyenne (± DS)</b>	0.15 (±0.13)	0.16 (±0.16)	0.14 (±0.10)	0.13 (±0.11)	NS
<b>Catégorie Banff 2007 (biopsie de greffon à M3)</b>					NS
Nombre de biopsies	31	22	5	4	
Catégorie 1 (rein normal)	25 (81%)	18 (81.8%)	4 (80%)	3 (75%)	
Catégorie 3 (lésions borderline)	2 (6%)	1 (4.6%)	0 (0%)	1 (25%)	
Catégorie 5 (FIAT)	4 (13%)	3 (13,6%)	1 (20%)	0(0%)	

Tableau 2. Caractéristiques des patients inclus

#### 4.1.4. Caractéristiques immunologiques des patients immunisés en post-greffe (tableau 3)

Les 28 receveurs ayant développé des anticorps anti-HLA dirigés contre leur donneur en post-greffe se sont immunisés contre les **antigènes DQ** de leur greffon. Parmi le groupe « DSA + rejet », des anticorps dirigés contre un antigène DR du donneur étaient associés aux anti-DQ chez 4 patients et un anticorps anti-classe I (A) était également présent chez un autre greffé.

Les valeurs de **MFI** des anticorps sont élevées, comprises entre 1328 et 17601 avec une médiane à 3435 (2153-5373) et 5251 (3034-7558) pour les groupes « DSA + rejet » et « DSA + accommodation » respectivement, sans différence significative entre les groupes (p=NS).

Le taux de **PRA** en technique Luminex® est similaire dans les groupes « DSA + rejet » et « DSA + accommodation » avec des médianes à 20% (7-36) et 14% (6-20) respectivement (p=NS).

Un **crossmatch** par technique de cytométrie en flux ou FACS (« flow cytometric crossmatch assay ») a pu être réalisé chez 61% des patients dans les suites de l'émergence des anticorps. Celui-ci est revenu positif avec les lymphocytes B mais négatif avec les lymphocytes T chez 43.7% des patients du groupe « DSA + rejet » versus 16.8% du groupe « DSA + accommodation » (p=NS).

Le **délai d'apparition** des anticorps par-rapport à la greffe varie de 2 à 64.4 mois et est similaire entre les groupes « DSA + rejet » et « DSA + accommodation » avec des médianes à 20.5 (10.6-41.7) et 19.9 (8.2-30.9) mois respectivement.

L'**évolution** des DSA a été contrôlée chez l'ensemble des patients et ceux-ci sont restés détectables en technique Luminex® chez 83.3% du groupe « DSA + accommodation » tandis qu'ils sont devenus négatifs chez 37.5% du groupe « DSA + rejet » après traitement du rejet.

	<b>DSA + rejet</b>	<b>DSA + accommodation</b>	<b>p</b>
<b>Nombre de patients</b>	<b>16</b>	<b>12</b>	
<b>Classe d'anticorps anti-HLA</b>			<b>NS</b>
Classe I, n	1*	0	
DQ, n	16	12	
DR, n	4**	0	
<b>MFI des DSA (médiane)</b>			
Classe I	4856 (4856-4856)	-	
DQ	3436 (2479-9655)	5251 (3034-7558)	<b>NS</b>
DR	3028 (1644-4393)	-	
<b>PRA Luminex (médiane)</b>	<b>20% (7-36)</b>	<b>14% (6-20)</b>	<b>NS</b>
<b>Crossmatch FACS</b>			<b>NS</b>
Positif LyB, négatif LyT	7 (43.7%)	2 (16.8%)	
Positif LyB et LyT	0 (0%)	0 (0%)	
Négatif LyB et LyT	3 (18.8%)	5 (41.6%)	
Non effectué	6 (37.5%)	5 (41.6%)	
<b>Evolution DSA</b>			<b>NS</b>
Reste positif	10 (62.5%)	10 (83.3%)	
Deviend négatif	6 (37.5%)	2 (16.7%)	
<b>Délai d'apparition DSA par rapport à la greffe (médiane)</b>	<b>20.5 mois (10.6-41.7)</b>	<b>19.9 mois (8.2-30.9)</b>	<b>NS</b>

**Tableau 3. Caractéristiques immunologiques des patients des groupes « DSA + rejet » et « DSA + accommodation »**

\* 1 patient a un DSA anti-DQ associé avec un anticorps anti-classe I (A)

\*\* 4 patients ont à la fois des DSA anti-DQ et anti-DR

LyB = Lymphocyte B ; LyT = Lymphocyte T

#### 4.1.5. Description des épisodes de rejet

Les 16 patients du groupe « **DSA + rejet** » ont été biopsiés entre 0 et 3.2 ans après l'émergence des DSA avec un délai médian à 17 jours (0-213).

Cette biopsie a permis de porter le diagnostic de rejet humoral chez 13 greffés (associé à un rejet aigu cellulaire dans 2 cas) et de rejet aigu cellulaire isolé chez les 3 autres patients.

Il s'agissait d'un rejet humoral aigu chez 7 receveurs et chronique chez les 6 autres.

Parmi ces 16 patients, 10 ont eu une biopsie de greffon de contrôle après traitement du rejet, à un délai médian de 55 jours (31-91) après la 1<sup>ère</sup> biopsie.

Celle-ci retrouvait une régression des lésions chez 2 greffés avec un rejet humoral aigu et une persistance des signes histologiques de rejet chez les 8 autres patients.

Au cours de l'ensemble du suivi il n'a pas été constaté d'épisodes de rejet, cellulaire ou humoral, dans les groupes « **non immunisés** » et « **DSA + accommodation** ».

## 4.2. HLA-G

### 4.2.1. HLA-G soluble

Les niveaux de HLA-G soluble ont été mesurés dans le plasma des patients aux différents temps post-greffe décrits précédemment.

Les résultats sont reportés dans le **tableau 4**, exprimés selon la médiane (premier quartile-troisième quartile) de l'ensemble des dosages des patients de chaque groupe aux différents temps.

La comparaison entre les taux de HLA-G soluble des groupes « **immunisés** » et « **non immunisés** » a été réalisée à partir des dosages du jour d'apparition des DSA (« immunisés ») versus ceux effectués au 18<sup>ème</sup> mois post-greffe (« non immunisés »). Celle-ci retrouve des taux similaires entre ces 2 groupes (p=NS).

De même, les médianes de HLA-G soluble des 34 patients de la cohorte n'ayant pas présenté d'épisodes de **rejet** (au 18<sup>ème</sup> mois post-greffe pour le groupe « non immunisé » et à J0 DSA pour le groupe « DSA + accommodation ») sont comparables à celles des 16 patients du groupe « DSA + rejet » : 13.2 ng/mL (2.6-29.2) versus 18.2 ng/mL (7.2-44.5) (p=NS).

Concernant le groupe des patients « immunisés », il n'a pas été retrouvé de différence significative entre les taux de HLA-G soluble des patients des groupes « **DSA + rejet** » et « **DSA + accommodation** » quelque soit le temps post-greffe.

## Taux de HLA-G soluble (ng/mL) : médiane à différents temps

	Non immunisés	Immunisés	p	DSA + rejet	DSA + accommodation	p
	n = 22	n = 28		n = 16	n = 12	
<b>M3 post-greffe</b>	6.2 (1.0-21.2)	-		-	-	
<b>M18 post-greffe ou J0 DSA</b>	15.3 (2.1-42.1)	12.3 (4.8-36.4)	<b>NS</b>	18.2 (7.2-44.5)	11.9 (3.3-23.9)	<b>NS</b>
<b>J PBG</b>	-	-		17.2 (14.8-50.7)	7.8 (4.2-8.9)	<b>NS</b>
<b>M3 post-DSA</b>	-	-		18.2 (5.6-36.1)	13.2 (4.9-31.4)	<b>NS</b>
<b>M12-M18 post-DSA</b>	-	-		27 (10.5-53,8)	7.6 (0.5-17.9)	<b>NS</b>

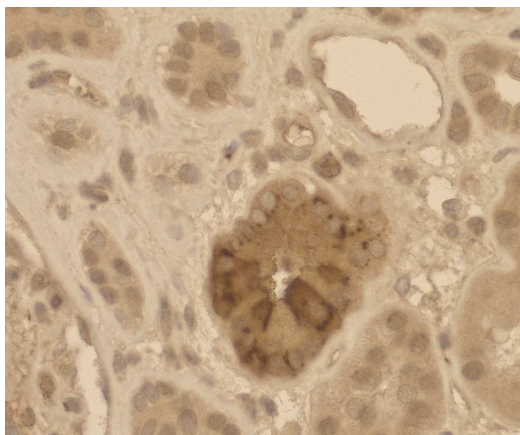
*Tableau 4. Expression de HLA-G soluble*

## 4.2.2. HLA-G membranaire

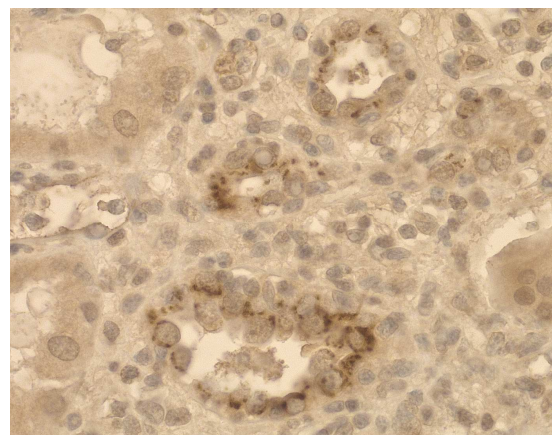
Nous avons observé plusieurs types de marquage de HLA-G membranaire sur les biopsies examinées :

- un marquage **cytoplasmique diffus** des cellules épithéliales tubulaires des tubes contournés proximaux et distaux (n=3, 6%) variant entre 5 et 30 tubes marqués par prélèvement (*figure 9*)
- un marquage **para-nucléaire en mottes** au niveau de l'appareil de Golgi des cellules épithéliales tubulaires des tubes contournés proximaux et distaux (n=6, 12%), variant entre 5 et 40% de l'ensemble des tubes positifs (*figure 10*)
- une **association** de ces 2 types de marquage (n=8, 17%).

Il n'a pas été retrouvé d'expression glomérulaire de HLA-G.



*Figure 9. Marquage cytoplasmique*



*Figure 10. Marquage péri-nucléaire*

Concernant les greffés ayant eu des **biopsies itératives** à différents délais post-transplantation, l'expression de HLA-G membranaire est restée constante dans le temps pour l'ensemble des patients des groupes « non immunisés » et « DSA + accommodation ».

Concernant le groupe « DSA + rejet », seuls 2 patients ont vu évoluer leur expression de HLA-G au fil du temps :

- Un patient est passé d'une expression positive sur la PBG J0 DSA à négative sur la PBG post-traitement du rejet.
- Un autre greffé a évolué d'une expression négative au moment de l'émergence des DSA à une expression positive sur une PBG réalisée tardivement 317 jours après la 1<sup>ère</sup>.

L'ensemble des résultats de HLA-G membranaire sur les biopsies réalisées soit au 3<sup>ème</sup> mois post-greffe soit au moment de l'émergence des DSA pour les groupes « non immunisé » et « immunisé » respectivement est présenté dans le **tableau 5**.

	Non immunisés	Immunisés	p	DSA + Rejet	DSA + accommodation	p
<b>Nombre de patients</b>	22	26		16	10	
<b>Expression positive de HLA-G membranaire</b>	8 (36.4%)	9 (34.6%)	<b>NS</b>	3 (18.6%)*	6 (60%)*	<b>0.042*</b>
Expression cytoplasmique et para-nucléaire	4 (18.2%)	4 (15.4%)		1 (6.2%)	3 (30%)	
Expression cytoplasmique isolée	0 (0%)	3 (11.5%)		1 (6.2%)	2 (20%)	
Expression para-nucléaire isolée	4 (18.2%)	2 (7.7%)		1 (6.2%)	1 (10%)	

**Tableau 5. Expression de HLA-G membranaire.**

Considérant la cohorte de 48 patients dans son ensemble (2 patients n'ont pas été biopsiés), une expression positive de HLA-G membranaire est présente chez 35% d'entre eux. Celle-ci est retrouvée chez 36.3 % des patients du groupe « **non immunisé** » et 34.6 % du groupe « **immunisé** », sans différence significative entre les groupes.



Par ailleurs, au sein du groupe « immunisé », 6 patients ont été greffés en 2009 et ont donc également bénéficié d'une PBG au 3<sup>ème</sup> mois de greffe retrouvant 33.3 % de positivité pour HLA-G membranaire, là encore sans différence avec le groupe « non immunisé ».

L'analyse en sous-groupes des 26 patients immunisés montre que l'expression de HLA-G membranaire est significativement plus importante dans le groupe « **DSA + accommodation** » comparativement au groupe « **DSA + rejet** » (60% versus 18.6%,  $p=0.042$ ).

L'étude comparative des patients avec une expression positive ou négative de HLA-G membranaire détaillée dans le **tableau 6** n'a pas permis de retrouver d'association entre la présence de HLA-G et les différentes variables cliniques que sont l'âge ou le sexe du receveur, le nombre d'incompatibilités HLA, la durée d'ischémie froide, les MFI des DSA ou le délai entre la greffe et la réalisation de la biopsie.

Concernant le traitement immunosuppresseur, ces 2 populations sont comparables en termes de traitement d'induction et de proportion de patients sevrés précocement des corticoïdes.

En revanche, on remarque une tendance à avoir une expression positive de HLA-G membranaire plus importante chez les greffés traités par **inhibiteurs de mTOR** au moment de la biopsie. En effet, parmi les 11 patients sous inhibiteurs de mTOR, 54.5% ont un marquage positif contre 30% des 37 receveurs traités par anti-calcineurines. Cependant cette différence reste non significative ( $p=0.163$ ).

Concernant le risque de **rejet**, nous retrouvons une tendance à une moindre incidence de rejet chez les receveurs exprimant HLA-G membranaire comparativement à ceux sans expression de la molécule (17.6% versus 41.9%). Cependant, cette différence n'atteint pas la significativité ( $p=0.33$ ).

	Expression de HLA-G membranaire		p
	Positive	Négative	
<b>Nombre de patients</b>	<b>17</b>	<b>31</b>	
<b>Age du receveur (années) moyenne (±DS)</b>	51.2 (±16)	47.9 (±14)	<b>NS</b>
<b>Sexe : masculin</b>	13 (76.5%)	25 (80.6%)	<b>NS</b>
<b>Incompatibilités HLA moyenne (±DS)</b>			<b>NS</b>
Classe I	2.1 (±1.1)	2.6 (±0.9)	
DQ	0.8 (±0.5)	0.7 (±0.6)	
DR	1.2 (±0.6)	1.1 (±0.6)	
<b>Durée d'ischémie froide (heures) moyenne (±DS)</b>	17 (±7.5)	14.8 (±9)	<b>NS</b>
<b>Traitement d'induction</b>			<b>NS</b>
rATG	10 (58.8%)	18 (58.1%)	
IL2-RA	6 (35.3%)	12 (38.7%)	
Aucun	1 (5.9%)	1 (3.2%)	
<b>Sevrage des corticoïdes avant J10</b>	5 (29.4%)	5 (16.1%)	<b>NS</b>
<b>Traitement d'entretien au moment de la PBG</b>			<b>NS</b>
Anti-calcineurines	11 (64.7%)	26 (83.9%)	
Inhibiteurs de mTOR	6 (35.3%)	5 (16.1%)	
Corticoïdes	9 (53%)	17 (54.8%)	
<b>Délai jour de greffe-jour de biopsie (mois) moyenne (±DS)</b>	19.4 (±21.4)	17.1 (±19.1)	<b>NS</b>
<b>Développement de DSA post-greffe</b>	9 (52.9%)	17 (54.8%)	<b>NS</b>
<b>MFI des DSA, moyenne (±DS)</b>	6138 (±4198)	6317 (±5426)	<b>NS</b>
<b>Episode de rejet</b>	3 (17.6%)	13 (41.9%)	<b>NS</b>

*Tableau 6. Caractéristiques des patients selon l'expression de HLA-G membranaire*

### 4.3. Fonction rénale

L'évolution de la fonction rénale estimée par la valeur de la créatininémie ( $\mu\text{mol/L}$ ) entre les patients des groupes "**DSA + rejet**" et "**DSA + accommodation**" a pu être comparée grâce à un modèle d'analyse de variance à un facteur ("one-way anova").

Celle-ci a permis de comparer pour chaque patient l'évolution de son taux de créatinine mesuré à différents moments par rapport à l'émergence des anticorps : 6 mois avant (M-6), 3 mois avant (M-3), le jour de l'apparition des DSA (J0), 3 mois (M3) et 6 mois (M6) après.

Les moyennes de créatininémie pour chaque groupe aux différents temps sont reportées dans le **tableau 7**.

L'analyse statistique n'a pas mis en évidence d'évolution significativement différente de la créatininémie entre les 2 groupes au cours du temps de suivi compris entre **M-6** et **M+6** ( $p=0.07$ ).

En revanche, 23 patients ayant été suivis bien au delà du sixième mois après l'apparition des DSA, une comparaison des 2 groupes a été menée par une analyse de variance entre la créatininémie **6 mois avant l'apparition des DSA** et celle du **dernier temps de suivi** pour chaque patient.

Les valeurs moyennes de créatininémie sont de  $288 \pm 226 \mu\text{mol/L}$  (dernier suivi) versus  $143 \pm 35 \mu\text{mol/L}$  (M-6) pour le groupe « DSA + rejet » et de  $168 \pm 59 \mu\text{mol/L}$  (dernier suivi) versus  $131 \pm 25 \mu\text{mol/L}$  (M-6) pour le groupe « DSA + accommodation ».

Une évolution significativement plus péjorative de la fonction du greffon dans le groupe « DSA + rejet » a ainsi été mise en évidence comparativement aux patients du groupe « DSA + accommodation » ( $p=0.01$ ).

## Créatininémie ( $\mu\text{mol/L}$ ), moyenne ( $\pm\text{DS}$ ) à différents temps par rapport à l'émergence des DSA

	DSA + rejet	DSA + accommodation	p
M - 6	143 $\pm$ 35	131 $\pm$ 25	
M - 3	147 $\pm$ 47	146 $\pm$ 42	
J 0	195 $\pm$ 109	155 $\pm$ 40	
M + 3	181 $\pm$ 50	157 $\pm$ 46	
M + 6	226 $\pm$ 168	169 $\pm$ 39	NS *
Au dernier temps de suivi	288 $\pm$ 226*	168 $\pm$ 59*	0,01**

*Tableau 7. Evolution de la fonction rénale des groupes "DSA + rejet" et "DSA + accommodation"*

\* p non significatif comparant l'évolution entre les 2 groupes de la créatininémie depuis M-6 jusqu'à M+6

\*\* p significatif comparant l'évolution entre les 2 groupes de la créatininémie entre M-6 et le dernier temps de suivi

# 5. Discussion

---

## 5.1. Etat d'accommodation versus rejet

Notre étude confirme l'état de « pseudo-tolérance » ou « accommodation » décrit auparavant par Colvin et al. <sup>[4]</sup> puisque seuls 57.1% des 28 patients ayant développé des DSA en post-greffe ont présenté un épisode de rejet.

La dissociation de notre groupe de patients immunisés en deux entités bien distinctes, à savoir ceux avec des signes de toxicité des DSA et ceux avec un état d'accommodation, reflète bien un problème actuel en transplantation qui est de parvenir à différencier ces 2 types de patients, dont l'évolution et le pronostic se révèlent totalement différents.

Comme de nombreuses études le rapportent <sup>[5, 6]</sup>, la survenue d'un rejet humoral est un facteur de mauvais pronostic pour la fonction du greffon. Dans notre cohorte, 10 patients parmi les 13 ayant présenté un rejet humoral ont bénéficié d'une biopsie de greffon de contrôle après traitement du rejet : les résultats étaient péjoratifs avec persistance de signes de rejet sur 80% des prélèvements.

Par ailleurs, l'évolution défavorable de la fonction rénale au terme du suivi des patients du groupe « DSA + rejet » en comparaison avec celle du groupe « DSA + accommodation » témoigne bien des conséquences délétères de ces épisodes de rejet.

L'analyse comparative de ces deux populations n'a pas révélé de différences notables pouvant expliquer la présence ou non d'une toxicité des DSA, en particulier concernant les caractéristiques immunologiques (classe d'anticorps, valeurs de MFI, PRA Luminex®) ou le traitement immunosuppresseur.

## 5.2. HLA-G soluble

### 5.2.1. Principaux résultats

Contrairement aux études précédentes en transplantation rénale <sup>[43, 44]</sup>, nos résultats ne montrent pas d'effet protecteur de HLA-G soluble vis à vis de l'émergence d'anticorps anti-HLA ou de la survenue d'un épisode de rejet.

Nous ne retrouvons pas non plus d'implication de cet isoforme soluble de la molécule dans la survenue d'un état d'accommodation.

En effet, aucune différence significative n'a été retrouvée entre les taux de HLA-G soluble des différents groupes, quelque soit le temps de mesure post-greffe concerné. Ces dosages itératifs révèlent d'ailleurs des valeurs relativement similaires pour chaque patient, témoignant d'une certaine stabilité des taux de HLA-G soluble au fil du temps pour un patient donné.

### 5.2.2. Comparaison aux précédentes études

Plusieurs explications à cette divergence entre nos résultats et ceux des précédentes études peuvent être envisagées.

Tout d'abord, le kit ELISA utilisé n'a permis de détecter que l'isoforme HLA-G 5 sans dosage de HLA-G 6 et 7. Cependant, il s'agit de l'isoforme principal et décrit comme le plus fonctionnel.

De plus, seules 2 études <sup>[43, 44]</sup> ont concerné l'expression de HLA-G soluble en transplantation rénale avec des résultats discutables pour l'une d'entre elles <sup>[44]</sup>.

Cette dernière a été la seule à s'intéresser à la relation entre HLA-G soluble et émergence d'anticorps anti-HLA, sans qu'il soit précisé si ceux-ci étaient dirigés contre des spécificités antigéniques du donneur. Elle a été menée en 2006 par Qiu et al. <sup>[44]</sup> sur une cohorte de 65 greffés rénaux (39 rejets chroniques et 26 patients avec une bonne fonction du greffon) et a étudié les taux de HLA-G soluble au cours d'un suivi prolongé (entre 3 et 12 ans) de ces 2 populations à 5-6 temps post-greffe, variables selon les

patients. Les résultats retrouvaient une association négative entre l'expression de HLA-G soluble et la survenue de rejet (expression positive chez 20.5% des 39 rejets chroniques versus 50% pour les 26 autres patients) ainsi qu'avec le développement d'anticorps anti-HLA (80% des receveurs ayant développé des anticorps n'exprimaient pas HLA-G tandis que 81.4% des patients avec une expression positive n'ont pas présenté d'anticorps).

Cependant, cette étude a classé de manière surprenante les résultats de HLA-G en « positif » ou « négatif » sans préciser les valeurs obtenues ni le seuil de positivité retenu. Or, nos résultats comme ceux des autres études en transplantation rénale mais également hépatique ou cardiaque <sup>[48, 49]</sup> montrent bien l'extrême variabilité des valeurs de HLA-G soluble entre patients ainsi que la rareté des patients ayant des résultats strictement nuls.

Par ailleurs, dans cette étude, l'expression de HLA-G a été considérée comme positive lorsque l'ensemble des sérums testés étaient positifs ou devenaient positifs au fil du temps, et inversement pour une expression négative. Ceci est tout à fait discutable, puisque plusieurs patients ayant développé des anticorps anti-HLA avaient 3 sérums sur 4 avec une expression positive de HLA-G mais ont été finalement considérés comme HLA-G négatif car leur dernier sérum ne présentait pas de HLA-G.

La deuxième étude ayant porté sur la relation entre HLA-G soluble et rejet en transplantation rénale a été menée en 2009 par l'équipe de Rebmann et al. <sup>[43]</sup> chez 32 greffés rénaux et 29 greffés rein-pancréas. Les taux de HLA-G ont été mesurés en pré-transplantation et en post-transplantation précoce (à 0, 1, 3, 7, 14 et 21 jours post-greffe). Les patients ayant présenté un ou plusieurs épisodes de rejet aigu (sans distinction cellulaire ou humoral) avaient un taux de HLA-G soluble plus bas en pré- et post-greffe que ceux sans épisode de rejet ( $12.9 \pm 1.8$  ng/mL versus  $20.1 \pm 1.9$  ng/mL,  $p=0.013$ ). HLA-G soluble apparaissait alors comme un facteur protecteur indépendant avec un cut-off déterminé à 11.5 ng/mL. A noter que, comme décrit précédemment, cette étude ne retrouvait aucune valeur nulle de HLA-G chez ces patients greffés.

La comparaison de ces résultats avec ceux de notre cohorte reste limitée puisqu'il s'agit ici d'une étude portant sur des rejets aigus, survenant en post-greffe précoce, alors que notre travail concerne le post-greffe beaucoup plus tardif avec des lésions de rejet essentiellement humorales et avec une proportion marquée de rejets chroniques. Ces différences peuvent au moins en partie expliquer les résultats divergents avec ceux de notre étude.



## 5.3. HLA-G membranaire

### 5.3.1. Principaux résultats et comparaison aux précédentes études

L'analyse de notre cohorte retrouve une tendance à une moindre incidence de rejet aigu et/ou chronique chez les patients exprimant HLA-G membranaire comparativement à ceux sans expression de la molécule. Bien que cette différence n'atteigne pas la significativité, probablement par manque de puissance de notre étude, nos résultats sont concordants avec ceux des 2 précédentes publications portant sur ce sujet <sup>[41, 45]</sup>.

La première menée par Créput et al. en 2003 <sup>[41]</sup> portant sur 40 greffes combinées foie-rein montrait une association entre l'expression de HLA-G sur les biopsies hépatiques et l'absence de rejet du greffon hépatique et rénal. Dans cette étude, seules 9 biopsies de greffon rénal avaient pu être réalisées et il n'avait donc pas pu être retrouvé de corrélation entre le marquage HLA-G de celles-ci et la survenue d'épisodes de rejet.

En revanche, la seconde étude publiée en 2008 par Crispim et al. <sup>[45]</sup> portant sur 73 biopsies de transplantés rénaux, réalisées à un temps variable post-greffe, a montré un marquage positif de HLA-G membranaire sur 54.8% des prélèvements dont 90% ne présentaient aucun signe de rejet (versus 35% et 82.4% respectivement dans notre cohorte).

Par ailleurs, nos résultats ont permis de mettre en évidence une association positive entre l'expression de HLA-G membranaire et la survenue d'un état d'accommodation en présence d'anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur.

En effet, la molécule a été retrouvée chez seulement 18.7% des patients ayant développé un rejet dans les suites de l'apparition des DSA versus 60% chez ceux ayant développé un état d'accommodation ( $p=0.042$ ).

Ainsi, les propriétés tolérogènes de cette molécule, découvertes initialement pour son rôle protecteur du fœtus semi-allogénique vis-à-vis de la réaction immunitaire de la mère, sembleraient également être impliquées dans les mécanismes immunologiques qui interviennent pour contrer la toxicité des anticorps anti-HLA.

### 5.3.2. Site d'expression de HLA-G membranaire

Le marquage retrouvé dans notre cohorte au niveau des cellules épithéliales tubulaires est concordant avec les résultats de l'étude de Creput et al <sup>[41]</sup>.

Nous n'avons pas retrouvé d'expression glomérulaire de HLA-G chez nos patients, à la différence de l'étude de Crispim et al <sup>[45]</sup> dans laquelle le marquage épithélial tubulaire était associé dans 2 cas à une expression glomérulaire.

Les critères de positivité (nombre ou pourcentage de tubes marqués, intensité du marquage) de ces 2 autres études n'étant pas connus, nous n'avons pas pu effectuer de comparaison avec nos propres critères.

### 5.3.3. Facteurs inducteurs d'expression de HLA-G membranaire

Le mécanisme précis par lequel l'expression de HLA-G est activée en transplantation, pendant ou après le processus de greffe reste méconnu.

Il n'a pas été retrouvé dans notre cohorte d'éventuels facteurs inducteurs ou de différences en termes de caractéristiques démographiques (âge, sexe du receveur), de délai par rapport à la date de greffe, ou encore d'immunosuppression entre les patients présentant ou non une expression de HLA-G membranaire.

Une proportion plus importante de greffés traités par inhibiteurs de mTOR exprimait HLA-G en comparaison avec les receveurs traités par anti-calcineurines (54.5% versus 30%) mais ceci reste une tendance sans différence significative ( $p=0.163$ ).

Un certain nombre d'études semble indiquer que l'expression de HLA-G suivant la transplantation pourrait être secondaire au traitement immunosuppresseur administré pour la prévention du rejet d'allogreffe.

Ainsi, il a été démontré que les corticostéroïdes augmentent in vitro le nombre de transcrits de HLA-G dans les cultures de cellules trophoblastiques, qui ont été une des premières cellules rapportées comme productrices de HLA-G <sup>[50]</sup>.

Par ailleurs, les cellules mononuclées du sang périphérique de greffés hépatiques mises en présence de ciclosporine, associée ou non à la prednisolone, produisent une quantité plus importante de HLA-G soluble et membranaire <sup>[40]</sup>.

En transplantation cardiaque, une augmentation significative des taux de HLA-G soluble est observée 2 heures après l'administration d'un traitement immunosuppresseur comprenant anti-calcineurines, MMF et corticostéroïdes <sup>[51]</sup>.

Enfin, en transplantation rénale, l'expression de HLA-G soluble est plus importante chez les greffés traités par Belatacept comparativement à ceux sous inhibiteurs de la calcineurine ( $72 \pm 14$  ng/mL versus  $5 \pm 1$  ng/mL,  $p < 0.01$ ). De plus, sous l'influence de ce premier traitement, la capacité des cellules dendritiques à sécréter du HLA-G soluble in vitro et in vivo a été mise en évidence <sup>[52]</sup>.

## 5.4. Allo-immunisation post-greffe : importance des antigènes HLA classe II

Nos résultats soulignent la prédominance des anticorps dirigés contre les antigènes HLA classe II du donneur, en particulier les antigènes DQ. En effet, ceux-ci sont impliqués pour l'ensemble de nos patients immunisés, reflétant donc leur rôle dans le processus d'allo-immunisation post-greffe et de rejet humoral.

Le fait que DQ soit une cible antigénique majeure est en accord avec les observations d'autres investigateurs <sup>[53-55]</sup>.

De nombreuses études ont également rapporté une relation plus étroite entre les DSA classe II et la dysfonction du greffon secondaire à un rejet humoral chronique <sup>[56-58]</sup>. Ces résultats ne semblent d'ailleurs pas limités à la transplantation rénale puisqu'une prédominance similaire de DSA classe II associés à une diminution de la survie du greffon a été mise en évidence en transplantation cardiaque <sup>[59]</sup>.

Cependant, dans une étude rétrospective, Kobayashi et al. <sup>[55]</sup> a retrouvé que la survenue de rejet humoral chronique était étroitement liée à la présence de DSA anti-DRB et non anti-DQB (45.5% versus 17.1%,  $p < 0.01$ ). Ces constatations faisaient évoquer l'hypothèse que les anticorps anti-DRB puissent être plus délétères pour le greffon.

Dans notre cohorte, la majorité des DSA étant dirigés contre les antigènes DQ avec seulement une faible proportion d'anti-DR, il n'est pas possible de préciser si ces derniers ont été plus délétères pour le greffon. A noter cependant que les 4 patients ayant développé des anticorps anti-DR ont tous présenté un épisode de rejet.

Les raisons de cette disparité entre DSA classe I et II apparaissant en post-transplantation ainsi que leur association avec la réponse humorale restent complexes et méconnues.

## 5.5. Limites de l'étude

Notre étude comporte un certain nombre de limites.

Tout d'abord, concernant les **patients non immunisés** en post-greffe, l'expression de HLA-G membranaire n'a pu être étudiée que sur les biopsies systématiques du troisième mois, limitant la comparaison avec celles des patients ayant développé des DSA qui ont été réalisées plus tardivement.

Par ailleurs, la nécessité d'avoir du matériel disponible pour l'analyse du HLA-G membranaire (biopsies de greffon) et soluble (sérums stockés à l'EFS) a limité la constitution de notre groupe de patients non immunisés. Ceci a eu pour conséquences un effectif réduit et composé de patients transplantés récemment, avec un recul moyen de 18 mois, limitant les comparaisons avec l'autre groupe.

Concernant les **patients immunisés**, 2 d'entre eux ont été classés dans le groupe « DSA + accommodation » devant l'absence de signes cliniques et biologiques de rejet mais cet état de tolérance n'a pas été prouvé histologiquement par une biopsie du greffon.

Par ailleurs, le fait que tous les patients immunisés n'aient pas bénéficié de biopsies systématiques à 3 mois de greffe représente également un facteur limitant.

En effet, bien que la fonction du greffon à ce délai de greffe estimée par la créatininémie et la protéinurie semble comparable entre les différents groupes, ceci ne peut être affirmé sur des critères histologiques pour tous les patients.

De plus, l'expression de HLA-G membranaire semblant relativement constante au cours du temps chez les patients ayant eu des biopsies itératives, une des questions soulevées est de savoir si le marquage HLA-G membranaire à 3 mois de greffe est prédictif ou non de la survenue d'un rejet à long terme. L'absence de biopsie systématique pour l'ensemble de notre cohorte ne nous permet malheureusement pas de répondre à cette question.

Enfin, pour 3 patients parmi les 16 du groupe « DSA + rejet » la biopsie de greffon a montré uniquement des lésions de rejet cellulaire sans signes histologiques en faveur d'une participation humorale. Leur inclusion dans le groupe des patients ayant présenté des signes de toxicité des DSA est donc discutable. Cependant, l'analyse statistique contrôlée en excluant ces 3 patients confirme une expression de HLA-G membranaire significativement plus importante dans le groupe « DSA + accommodation » comparativement au groupe « DSA + rejet » (60% versus 15.4%,  $p=0.039$ ). Les résultats statistiques de HLA-G soluble ne sont également pas modifiés.

Concernant le dosage du **HLA-G soluble**, le kit utilisé présente pour limite de ne rechercher que l'isoforme HLA-G 5. Cependant, celui-ci est décrit comme étant l'isoforme principal et le plus fonctionnel.

Enfin, l'évaluation de la **fonction rénale** par la créatininémie reste bien sûr toujours discutable. Cependant, la méthode statistique utilisée par analyse de variance contrecarre en partie ce problème puisqu'elle permet de comparer chaque patient à lui-même et ainsi de prendre en compte l'évolution de la fonction rénale dans le temps pour chacun, ce qui constitue le paramètre le plus intéressant.

## 5.6. Perspective

Au terme de cette étude, il apparaît que la recherche d'une expression de HLA-G membranaire dans les organes transplantés puisse constituer une nouvelle approche afin de mieux comprendre les facteurs favorisant le développement d'un état de tolérance.

A la différence de l'isoforme soluble de la molécule dont le rôle semble moindre, l'isoforme membranaire apparaît bien comme étant impliqué dans le développement de cet état d'accommodation.

Afin d'approfondir les mécanismes physiopathologiques de ce phénomène de tolérance, il reste encore à définir précisément les facteurs inducteurs d'expression de HLA-G et l'intrication très certainement complexe de la molécule avec l'ensemble des effecteurs de la réponse immunitaire.

Une étude prospective, analysant l'expression de la molécule de manière systématique sur l'ensemble des biopsies réalisées à 3 mois de greffe dans notre centre, pourrait être envisagée. Celle-ci permettrait très certainement d'apporter des éléments de réponse aux questions soulevées, notamment concernant le potentiel caractère prédictif de HLA-G vis-à-vis du développement d'un état de tolérance chez nos patients transplantés.

Nous espérons que cela permettrait de mieux appréhender le risque immunologique de chaque patient et ainsi d'adapter le traitement immunosuppresseur pour chacun.

## **6. Conclusion**

---



Thèse soutenue par : Laure-Emmanuelle CROZE

**Titre : Recherche d'un effet protecteur de HLA-G membranaire et soluble vis-à-vis de la toxicité des anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur en transplantation rénale**

## CONCLUSION

L'allo-immunisation post-greffe représente un facteur important et probablement sous-estimé de la dysfonction chronique d'allogreffe, obstacle majeur à la survie prolongée des greffons rénaux. Actuellement, le développement de nouvelles technologies particulièrement sensibles pour la détection des anticorps anti-HLA, telles que le Luminex®, soulève la question de la toxicité de ces anticorps. En effet, ceux-ci ne s'accompagnent pas toujours d'épisodes de rejet, traduisant alors un état de « pseudo-tolérance » ou accommodation dont la physiopathologie reste incomprise et de grand intérêt.

Connaissant les propriétés immuno-modulatrices de HLA-G découvertes lors de la grossesse, l'objectif principal de notre étude est de rechercher un effet protecteur de la forme soluble et/ou membranaire de cette molécule vis à vis de la toxicité sur le greffon de ces allo-anticorps.

Notre étude rétrospective a été menée sur l'ensemble des patients non immunisés en pré-greffe receveurs d'une allogreffe rénale au CHU de Grenoble entre le 01/01/2005 et le 31/12/2009 (n=283). Parmi ces patients, plusieurs groupes ont été identifiés selon leur immunisation post-greffe :

- un groupe « **immunisé** » (n=28) regroupant l'ensemble des patients ayant développé des anticorps anti-HLA dirigés contre leur donneur (« donor specific antibodies », DSA) en post-greffe. Ces derniers ont ensuite été divisés en 2 sous-groupes : le groupe « **DSA + rejet** » (n=16) caractérisé par une toxicité des anticorps se traduisant par la survenue d'un rejet et le groupe « **DSA + accommodation** » (n=12) comprenant les patients sans signes de toxicité des DSA vis à vis du greffon.
- un groupe « **non immunisé** » (n=22) comprenant seulement les patients pour lesquels nous disposions du matériel nécessaire à l'analyse du HLA-G membranaire et soluble et n'ayant pas développé de DSA en post-greffe.

Une comparaison de l'expression de HLA-G membranaire (étudiée par immunohistochimie sur les biopsies de greffon) et soluble (par technique ELISA) chez ces 50 patients a été effectuée à différents temps post-greffe.

Notre étude confirme une association positive entre l'expression de HLA-G membranaire sur les biopsies de greffon et la survenue d'un état d'accommodation en présence de DSA ( $p=0.042$ ). De plus, nous retrouvons une tendance à une moindre incidence de rejet chez les receveurs exprimant HLA-G membranaire (17.6% versus 41.9%,  $p=NS$ ) comme précédemment décrit dans d'autres études. En revanche, aucun effet protecteur de l'isoforme soluble de la molécule vis à vis de la toxicité des anticorps et de la survenue d'un épisode de rejet n'a été mis en évidence.

Notre étude n'a pas permis d'identifier d'éventuels facteurs inducteurs d'expression de HLA-G, bien que l'on note que les patients traités par inhibiteurs de mTOR ont une tendance à exprimer plus fréquemment le HLA-G membranaire en comparaison avec ceux traités par anti-calcineurines (54.5% versus 30%,  $p=NS$ ).

Ainsi, l'expression de HLA-G membranaire chez les greffés rénaux est associée à une meilleure tolérance du greffon en présence d'anticorps anti-HLA dirigés contre celui-ci. Contrairement à l'isoforme soluble de la molécule, l'isoforme membranaire semble donc bien impliquée dans le mécanisme physiopathologique complexe du phénomène d'accommodation.

Ce nouveau marqueur disponible pourrait donc être un outil histologique intéressant pour déterminer et suivre le statut de tolérance des receveurs d'allogreffe rénale et ainsi aider à l'adaptation des thérapeutiques immunosuppressives. L'objectif final étant de mieux appréhender le risque immunologique de chaque patient afin d'adapter le traitement immunosuppresseur et d'améliorer encore la survie des greffons.

Vu et permis d'imprimer

Grenoble, le 21 septembre 2011

LE DOYEN

Professeur Jean-Paul ROMANET



LE PRESIDENT DE THESE

Professeur Philippe ZAOUÏ

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Philippe Zaoui', written over a horizontal line.

# Bibliographie

---

1. Pascual, M., et al., *Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation*. N Engl J Med, 2002. **346**(8): p. 580-90.
2. Siddiqi, N., M.A. McBride, and S. Hariharan, *Similar risk profiles for post-transplant renal dysfunction and long-term graft failure: UNOS/OPTN database analysis*. Kidney Int, 2004. **65**(5): p. 1906-13.
3. Solez, K., et al., *Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN')*. Am J Transplant, 2007. **7**(3): p. 518-26.
4. Colvin, R.B., et al., *Emerging role of B cells in chronic allograft dysfunction*. Kidney Int Suppl, 2010(119): p. S13-7.
5. Colvin, R.B., *Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(4): p. 1046-56.
6. Crespo, M., et al., *Acute humoral rejection in renal allograft recipients: I. Incidence, serology and clinical characteristics*. Transplantation, 2001. **71**(5): p. 652-8.
7. Mauiyyedi, S., et al., *Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(3): p. 779-87.
8. Everly, M.J., et al., *Reducing de novo donor-specific antibody levels during acute rejection diminishes renal allograft loss*. Am J Transplant, 2009. **9**(5): p. 1063-71.
9. Lachmann, N., et al., *Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts*. Transplantation, 2009. **87**(10): p. 1505-13.
10. Lee, P.C., et al., *HLA-specific antibodies developed in the first year posttransplant are predictive of chronic rejection and renal graft loss*. Transplantation, 2009. **88**(4): p. 568-74.
11. Worthington, J.E., et al., *Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome*. Transplantation, 2003. **75**(7): p. 1034-40.
12. Mao, Q., et al., *Extremely high association between appearance of HLA antibodies and failure of kidney grafts in a five-year longitudinal study*. Am J Transplant, 2007. **7**(4): p. 864-71.
13. Terasaki, P.I. and M. Ozawa, *Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial*. Am J Transplant, 2004. **4**(3): p. 438-43.
14. Mizutani, K., et al., *Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure*. Am J Transplant, 2005. **5**(9): p. 2265-72.

15. Terasaki, P.I., M. Ozawa, and R. Castro, *Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival*. Am J Transplant, 2007. **7**(2): p. 408-15.
16. Leffell, M.S. and A.A. Zachary, *Anti-allograft antibodies: some are harmful, some can be overcome, and some may be beneficial*. Discov Med, 2010. **9**(48): p. 478-84.
17. Bartel, G., et al., *Posttransplant HLA alloreactivity in stable kidney transplant recipients-incidences and impact on long-term allograft outcomes*. Am J Transplant, 2008. **8**(12): p. 2652-60.
18. Leffell, M.S. and A.A. Zachary, *Antiallograft antibodies: relevance, detection, and monitoring*. Curr Opin Organ Transplant, 2010. **15**(1): p. 2-7.
19. Heinrichs, H. and H.T. Orr, *HLA non-A,B,C class I genes: their structure and expression*. Immunol Res, 1990. **9**(4): p. 265-74.
20. Paul, P., et al., *Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells*. Hum Immunol, 2000. **61**(11): p. 1138-49.
21. Favier, B., et al., *Research on HLA-G: an update*. Tissue Antigens, 2007. **69**(3): p. 207-11.
22. Colonna, M., et al., *A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells*. J Exp Med, 1997. **186**(11): p. 1809-18.
23. Colonna, M., et al., *Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules*. J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3096-100.
24. Goodridge, J.P., et al., *KIR2DL4 (CD158d) genotype influences expression and function in NK cells*. J Immunol, 2003. **171**(4): p. 1768-74.
25. Kikuchi-Maki, A., et al., *KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN-gamma production*. J Immunol, 2003. **171**(7): p. 3415-25.
26. Carosella, E.D., *The tolerogenic molecule HLA-G*. Immunol Lett, 2011. **138**(1): p. 22-4.
27. Riteau, B., et al., *HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response*. J Reprod Immunol, 1999. **43**(2): p. 203-11.
28. Riteau, B., et al., *HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity*. J Immunol, 2001. **166**(8): p. 5018-26.

29. Ristich, V., et al., *Tolerization of dendritic cells by HLA-G*. Eur J Immunol, 2005. **35**(4): p. 1133-42.
30. Fournel, S., et al., *Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6100-4.
31. LeMaoult, J., et al., *HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immunosuppressive CD4+ T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(18): p. 7064-9.
32. Le Rond, S., et al., *Alloreactive CD4+ and CD8+ T cells express the immunotolerant HLA-G molecule in mixed lymphocyte reactions: in vivo implications in transplanted patients*. Eur J Immunol, 2004. **34**(3): p. 649-60.
33. Najji, A., et al., *Soluble HLA-G and HLA-G1 expressing antigen-presenting cells inhibit T-cell alloproliferation through ILT-2/ILT-4/FasL-mediated pathways*. Hum Immunol, 2007. **68**(4): p. 233-9.
34. Bahri, R., et al., *Soluble HLA-G inhibits cell cycle progression in human alloreactive T lymphocytes*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1331-9.
35. Rouas-Freiss, N., et al., *Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(21): p. 11520-5.
36. Fainardi, E., et al., *Emerging topics and new perspectives on HLA-G*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(3): p. 433-51.
37. Liang, S., B. Baibakov, and A. Horuzsko, *HLA-G inhibits the functions of murine dendritic cells via the PIR-B immune inhibitory receptor*. Eur J Immunol, 2002. **32**(9): p. 2418-26.
38. Sheshgiri, R., et al., *Myocardial HLA-G reliably indicates a low risk of acute cellular rejection in heart transplant recipients*. J Heart Lung Transplant, 2008. **27**(5): p. 522-7.
39. Brugiere, O., et al., *Immunohistochemical study of HLA-G expression in lung transplant recipients*. Am J Transplant, 2009. **9**(6): p. 1427-38.
40. Basturk, B., et al., *Human leukocyte antigen-G, a new parameter in the follow-up of liver transplantation*. Transplant Proc, 2006. **38**(2): p. 571-4.
41. Creput, C., et al., *Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation*. J Hepatol, 2003. **39**(4): p. 587-94.

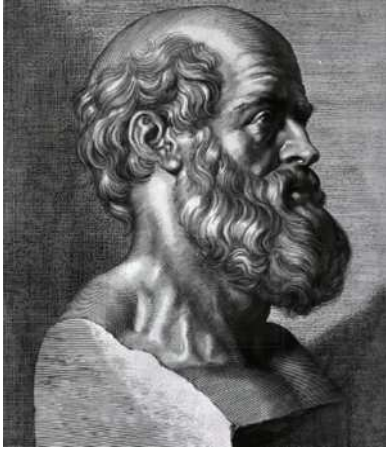
42. Creput, C., et al., *Detection of HLA-G in serum and graft biopsy associated with fewer acute rejections following combined liver-kidney transplantation: possible implications for monitoring patients*. Hum Immunol, 2003. **64**(11): p. 1033-8.
43. Rebmann, V., et al., *Soluble total human leukocyte antigen class I and human leukocyte antigen-G molecules in kidney and kidney/pancreas transplantation*. Hum Immunol, 2009. **70**(12): p. 995-9.
44. Qiu, J., et al., *Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance*. Am J Transplant, 2006. **6**(9): p. 2152-6.
45. Crispin, J.C., et al., *Human leukocyte antigen-G expression after kidney transplantation is associated with a reduced incidence of rejection*. Transpl Immunol, 2008. **18**(4): p. 361-7.
46. Solez, K., et al., *Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions*. Am J Transplant, 2008. **8**(4): p. 753-60.
47. Sis, B. and P.F. Halloran, *Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection*. Curr Opin Organ Transplant, 2010. **15**(1): p. 42-8.
48. Zarkhin, V., et al., *Expression of soluble HLA-G identifies favorable outcomes in liver transplant recipients*. Transplantation, 2010. **90**(9): p. 1000-5.
49. Sheshgiri, R., et al., *Association between HLA-G expression and C4d staining in cardiac transplantation*. Transplantation, 2010. **89**(4): p. 480-1.
50. Moreau, P., et al., *Glucocorticoid hormones upregulate levels of HLA-G transcripts in trophoblasts*. Transplant Proc, 2001. **33**(3): p. 2277-80.
51. Luque, J., et al., *Soluble HLA-G in heart transplantation: their relationship to rejection episodes and immunosuppressive therapy*. Hum Immunol, 2006. **67**(4-5): p. 257-63.
52. Bahri, R., et al., *Dendritic cells secrete the immunosuppressive HLA-G molecule upon CTLA4-Ig treatment: implication in human renal transplant acceptance*. J Immunol, 2009. **183**(11): p. 7054-62.
53. Ozawa, M., et al., *Longitudinal testing of 266 renal allograft patients for HLA and MICA antibodies: Greenville experience*. Clin Transpl, 2006: p. 265-90.
54. Duquesnoy, R.J., et al., *Retransplant candidates have donor-specific antibodies that react with structurally defined HLA-DR,DQ,DP epitopes*. Transpl Immunol, 2008. **18**(4): p. 352-60.
55. Kobayashi, T., et al., *Significant association between chronic antibody-mediated rejection and donor-specific antibodies against HLA-DRB rather than DQB in renal transplantation*. Hum Immunol, 2011. **72**(1): p. 11-7.

56. Campos, E.F., et al., *Post-transplant anti-HLA class II antibodies as risk factor for late kidney allograft failure*. Am J Transplant, 2006. **6**(10): p. 2316-20.
57. Langan, L.L., et al., *Post-transplant HLA class II antibodies and high soluble CD30 levels are independently associated with poor kidney graft survival*. Am J Transplant, 2007. **7**(4): p. 847-56.
58. Issa, N., et al., *Transplant glomerulopathy: risk and prognosis related to anti-human leukocyte antigen class II antibody levels*. Transplantation, 2008. **86**(5): p. 681-5.
59. Kaczmarek, I., et al., *Donor-specific HLA alloantibodies: long-term impact on cardiac allograft vasculopathy and mortality after heart transplant*. Exp Clin Transplant, 2008. **6**(3): p. 229-35.



# **Serment d'Hippocrate**

---



## *Serment d'Hippocrate*

*En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate,*

*Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.*

*Je donnerai mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires. Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.*

*Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.*

*Je garderai le respect absolu de la vie humaine.*

*Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.*

*Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.*

*Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.*