

Intérêt de la protéomique pour l'identification de marqueurs diagnostiques d'accommodation en greffe rénale

Thomas Jouve

▶ **To cite this version:**

Thomas Jouve. Intérêt de la protéomique pour l'identification de marqueurs diagnostiques d'accommodation en greffe rénale. Médecine humaine et pathologie. 2014. dumas-01083385

HAL Id: dumas-01083385

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01083385

Submitted on 17 Nov 2014

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.

Université Joseph Fourier GRENOBLE MEDECINE

SICD1 Bibliothèques de l'UJF et de Grenoble INP

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Université Joseph Fourier
Faculté de médecine de Grenoble

Année 2014 No : ?

INTÉRÊT DE LA PROTÉOMIQUE POUR L'IDENTIFICATION DE MARQUEURS DIAGNOSTIQUES D'ACCOMMODATION EN GREFFE RÉNALE

Thèse présentée pour l'obtention du doctorat en médecine

Diplôme d'état

Thomas JOUVE
Né le 22 janvier 1982 à Saint Etienne (Loire)

Thèse soutenue publiquement à la faculté de médecine de Grenoble*
le 27/10/2014

devant le jury composé de :
Président du jury : Pr Philippe ZAOUI
Membres :
Pr Christophe PISON
Pr Lionel ROSTAING
Dr Rachel TETAZ
Dr Candice TROCME

Directrice de thèse : Dr Rachel TETAZ

*La Faculté de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Avant-Propos

Science et médecine : c'est un sujet qui ne cesse de m'interroger depuis mes débuts en médecine, il y a maintenant 8 ans. Huit années passées dans les livres, à l'hôpital, auprès des patients, auprès des médecins que j'ai pu cotoyer et qui m'ont formé, chacun à leur façon. Huit années qui m'ont permis de réaliser que non, les médecins ne sont pas tous des scientifiques, mais oui, certains sont de brillants scientifiques. Ce décalage entre science et médecine a été et reste la plus grande surprise pour moi au cours de ces huit dernières années, le plus grand étonnement (au sens propre du terme : l'ouverture à une nouvelle dimension de la réalité).

La médecine est avant tout humaine : elle est la réponse à des problèmes qui impliquent la vie... et la mort. Elle est le recours quand la si précieuse santé va mal. Devenir médecin, au cours des huit dernières années, a donc été une confrontation brutale, âpre, parfois difficile, toujours enrichissante, à l'humain dans tout ce qu'il a de plus grand... et de plus petit.

Où placer la science, la recherche scientifique, dans cette discipline très particulière qu'est la médecine ? Probablement avant tout dans la curiosité. La recherche est finalement de la curiosité organisée. Curiosité devant un patient qu'on ne comprend pas, devant un processus physiologique ou pathologique qu'on appréhende mal, devant un nouveau concept biologique ou plus modestement thérapeutique. Cette curiosité nous guide en médecine et nous guide en science. C'est un point commun décisif.

Ce travail de thèse est ainsi ma tentative de concilier médecin et science. La curiosité, avant tout, m'a guidé et continuera - je l'espère - de me guider. Ce fabuleux domaine de la transplantation, au carrefour de la néphrologie, de l'immunologie, de la chirurgie et de diverses biotechnologies est un excellent point de départ pour confronter les idées, imaginer demain et mieux, tout en restant proche de l'Homme, face au bonheur des nouveaux transplantés, face au malheur des donneurs d'organes...

Cette thèse voit le jour grâce à de nombreuses personnes, que je remercie ici.

A Rachel, pour son idée originale de recherche, sa curiosité et son envie communicative d'avancer en médecine, tant au quotidien qu'à plus long terme.

A Candice, pour sa grande compétence tant scientifique que technique, pour son regard sur cette étude et pour sa bonne humeur en général.

A Philippe Zaoui, pour sa bienveillance, sa disponibilité malgré toutes ses obligations et son ouverture d'esprit. C'est devant ces cours remplis de flèches en tous sens que j'ai eu envie de devenir néphrologue, parce que ces flèches ont avant tout suscité ma curiosité.

Au Professeur Pison, qui me fait l'honneur d'être membre de ce jury et de repousser les frontières de ce travail, au-delà du rein, vers l'idéal d'une médecine intégrée et... curieuse de l'autre.

Au Professeur Rostaing, qui me fait lui aussi l'honneur d'être membre de ce jury, avec un regard extérieur bienvenu qui permettra je l'espère de poser de nouvelles questions, peut-être même d'y répondre dans une future collaboration.

A l'équipe médicale, mais aussi infirmière, aide-soignante et "de service hospitalier", de néphrologie, pour m'avoir fait finalement aussi sentir chez moi dans ce couloir du 3ème L... Et pour m'avoir tous appris tellement de choses.

A ma famille, ensuite, en particulier mes soeurs (avec évidemment JB et BenJ, incontournables !), mes parents et - cette fois - mes grand-mères. Chacun sait être là quand il le faut, à sa façon. Une thèse, ça ne se vit que trois ou quatre fois, vous êtes à la deuxième de ma vie ! Et il y aura toujours d'autres meilleures raisons de se retrouver, plus encore depuis l'ère (quand quelqu'un change autant ma vie, je change d'ère !) de... Julia. Ajoutons aussi la famille Moine au complet, Michèle, Jean, Pascal, mais aussi les Parisiens et Belges, dont le soutien ou le dépaysement offerts sont précieux !

A mes amis stéphanois, les bien-nommés Bellegardiens, toujours présents depuis plus de

quinze ans. Greg, merci d'avoir été et d'être à mes côtés, pour me rappeler que la médecine, c'est avant tout une passion. Rudy, nos vies sont si différentes et c'est si agréable de se retrouver pour en parler ! Damien, la vie n'a souvent pas de sens, mais ça ne t'empêche pas de la regarder bien en face : merci de me montrer cette force. Vivent Maël et toi ! JM, la Savoie puis la Suisse ne nous empêcheront pas de continuer à refaire le monde, pour le meilleur. Gilles, nos relations sont devenues plus épisodiques, mais tu n'en restes pas moins Bellegardiens : il ne tient qu'à nous de changer la fréquence !

A mes amis de l'INSA et les associés : Sophie, L(R)aur(l)ent, Magali, Sylvain, Bruno, Emilie, Julien, Manue, Moritz... Nos chemins se croisent et se décroisent mais c'est toujours un plaisir de partager des moments avec vous tous (et avec chacun) !

A mes amis de médecine, plus récents mais pas moins importants dans ma vie, en particulier mes co-internes au cours de ces quatre années : Claire (15 patients en premier semestre ? Même pas peur !), Jean-Charles, Mylène, Audrey, Damien, Julia, Vincent, Julie, Aude, Morgane, Anaïs, Mathilde, Sandra, Caroline, Charlotte... Nous avons partagé les joies et les peines de l'hôpital, les joies et les peines de la nourriture de l'internat, les pleures et les éclats de rire : merci d'avoir été là. Tout particulièrement aux pingouins de St Jean, Julien, Anaïs et Cassie, vivent nos voyages passés et à venir !

Johanna... un paragraphe à part, ça te va ? Un stage de réa 3 en tant qu'externes nous a donné envie de passer un peu plus de temps ensemble, et une année passée comme co-internes, notamment toujours en réa 3, nous a définitivement liés. En attendant les grands projets du *Grenoble Institute of Transplantation*, merci pour ton soutien (même si tu ne le sais pas toujours), pour ta présence, pour ta bonne humeur, pour ces innombrables partages d'expériences, ces moments de stress et ces moments de détente, ces moments de joie et ces moments de peine... Tu es, à plus d'un titre, une mascotte de mon internat. Ta curiosité me donne confiance en la médecine.

Benoît, je ne te range pas parmi les internes ni parmi les médecins, pour ces remerciements : je prends le parti de te ranger à part, toi aussi, comme ami. Merci pour ton enthousiasme, ta curiosité à toi aussi, ta capacité à briller si fort et faire autant de fautes d'orthographe... J'espère que tu trouveras ce que tu cherches dans le futur et j'espère bien être là pour le voir, personnellement et professionnellement !

A mes co-internes de mon stage à l'étranger, à Chambéry, pour leur bonne humeur communicative et leur vision de la vie qui fait du bien. Elise (la plus belle des Bretonnes, dit-on), Flavie (la plus folle des grenobloises, dis-je), Murielle (la plus grande gueule des internes), Seb (l'humour le plus fin, rapport au fait que ses blagues sont fines) : ce stage n'aurait pas été le même sans vous ! A l'équipe médicale de néphrologie, Bertrand, Jacques, Claire, JB, Stéphane et maintenant même Laure, merci de m'avoir fait découvrir votre vision de la néphrologie et du travail en équipe : ça a été et ça sera un réel plaisir de travailler avec vous et de partager un moment vos vies.

Et enfin, parce qu'on garde la meilleure pour la fin, à Murielle, mon Babethon, pour avoir déjà été le ciment de ma vie pendant ces 4 ans. Sans toi, je n'imagine pas ce qu'aurait été mon internat, ces quatre ans de montagnes russes de l'émotion où tu as été mon phare... Sans toi, je n'imagine pas ce que serait ma vie future non plus ! Tu seras mon phare pour tous ces restaurants, ces paysages, toutes ces émotions, ces fragments de vie les yeux dans les yeux et les yeux dans la même direction, que nous allons construire ensemble. Vivent les framboises !

Table des matières

1 Introduction 4
- 1.1 Etat des lieux de la greffe . . . 4
- 1.2 Données épidémiologiques de la greffe . . . 5
- 1.3 Classification de Banff . . . 7
- 1.4 Evolution du concept de rejet humoral chronique . . . 9
- 1.5 Emergence du concept d'accommodation . . . 11
- 1.6 Concept de biomarqueurs . . . 12
  - 1.6.1 Nécessité . . . 12
  - 1.6.2 Perspective actuelle sur les biomarqueurs de rejet de greffe rénale . . . 13
  - 1.6.3 Perspectives méthodologiques . . . 13
- 1.7 Définition et apport de la protéomique . . . 14

2 Patients et méthodes 15
- 2.1 Population étudiée . . . 15
- 2.2 Protocole d'étude . . . 15
  - 2.2.1 Urines . . . 15
  - 2.2.2 Anticorps . . . 16
  - 2.2.3 Biopsies . . . 16
  - 2.2.4 Prétraitement du signal SELDI-TOF . . . 16
  - 2.2.5 Critères de sélection des patients d'intérêt pour l'analyse comparative . . . 17
- 2.3 Gestion des données . . . 17
- 2.4 Analyse statistique . . . 17

3 Résultats 19
- 3.1 Caractéristiques démographiques . . . 19
  - 3.1.1 Cohorte entière . . . 19
  - 3.1.2 Caractéristiques des patients accommodants et rejeteurs . . . 21
  - 3.1.3 Caractéristiques des DSA . . . 21
- 3.2 Identification d'un profil urinaire d'accommodation . . . 21
  - 3.2.1 Analyse de l'ensemble des spectres . . . 21
  - 3.2.2 Analyse du sous-ensemble accommodants VS rejeteurs . . . 23
  - 3.2.3 Inclusion des biopsies normales . . . 29

4 Discussion 30

5 Annexe 34

Références 38

1 Introduction

1.1 Etat des lieux de la greffe

L'insuffisance rénale chronique terminale est une pathologie d'incidence et de prévalence croissante, dans le monde entier. En France, l'incidence annuelle de l'insuffisance rénale chronique terminale est de 149 par million d'habitants (données ABM, registre REIN). La prise en charge de cette pathologie a largement évolué avec l'amélioration des techniques de dialyse (que ce soit en hémodialyse ou en dialyse péritonéale) et l'amélioration des techniques de greffe rénale. Elle reste néanmoins coûteuse et nécessite une prise en charge au long cours.

La greffe rénale s'est imposée comme technique de référence par la nette amélioration de la qualité et de la quantité de vie (diminution de la morbi-mortalité) par rapport aux patients en dialyse. Son coût moindre par rapport à la dialyse, au delà de la première année de greffe, en fait aussi un choix médico-économique. Le nombre de patients inscrits sur liste d'attente de greffe rénale est en augmentation constante.

Néanmoins, la durée de vie d'un greffon reste limitée par plusieurs facteurs :

— l'observance thérapeutique,

— la toxicité des médicaments immunosuppresseurs pour le greffon,

— la morbi-mortalité induite par le traitement immunosuppresseur pour le patient receveur (par exemple les complications infectieuses, les complications cardiovasculaires...),

— l'immunisation du receveur, avec des phénomènes de rejet aigus ou chroniques, cellulaires ou humoraux.

On distingue actuellement plusieurs types de rejets. Le rejet suraigu humoral (médié par des anticorps présents avant la greffe, détruisant le greffon en quelques heures à quelques jours) est virtuellement inexistant grâce aux techniques de cross-match et à la stratégie d'immunosuppression. De même, la fréquence du rejet aigu cellulaire (médié par les lymphocytes T) est largement réduite grâce à l'utilisation des anti-calcineurines comme immunosuppresseurs et plus généralement à l'optimisation de la stratégie d'immunosuppression.

Le rejet chronique a toutefois émergé, au cours de la dernière décennie, comme un acteur majeur de la dysfonction chronique de greffon. L'évolution de la classification anatomopathologique de Banff, créée en 1997 et depuis régulièrement mise à jour, a permis d'identifier de nouvelles

formes de rejet humoral, médiées par des anticorps non détectés jusqu'alors. Le développement parallèle de techniques d'identification des anticorps anti-HLA extrêmement sensibles, de type Single Antigen Beads (SAB), a permis une amélioration du dépistage des situations à risque de rejet humoral, grâce à l'identification des anticorps spécifiques du greffon (Donor Specific Antibodies, DSA).

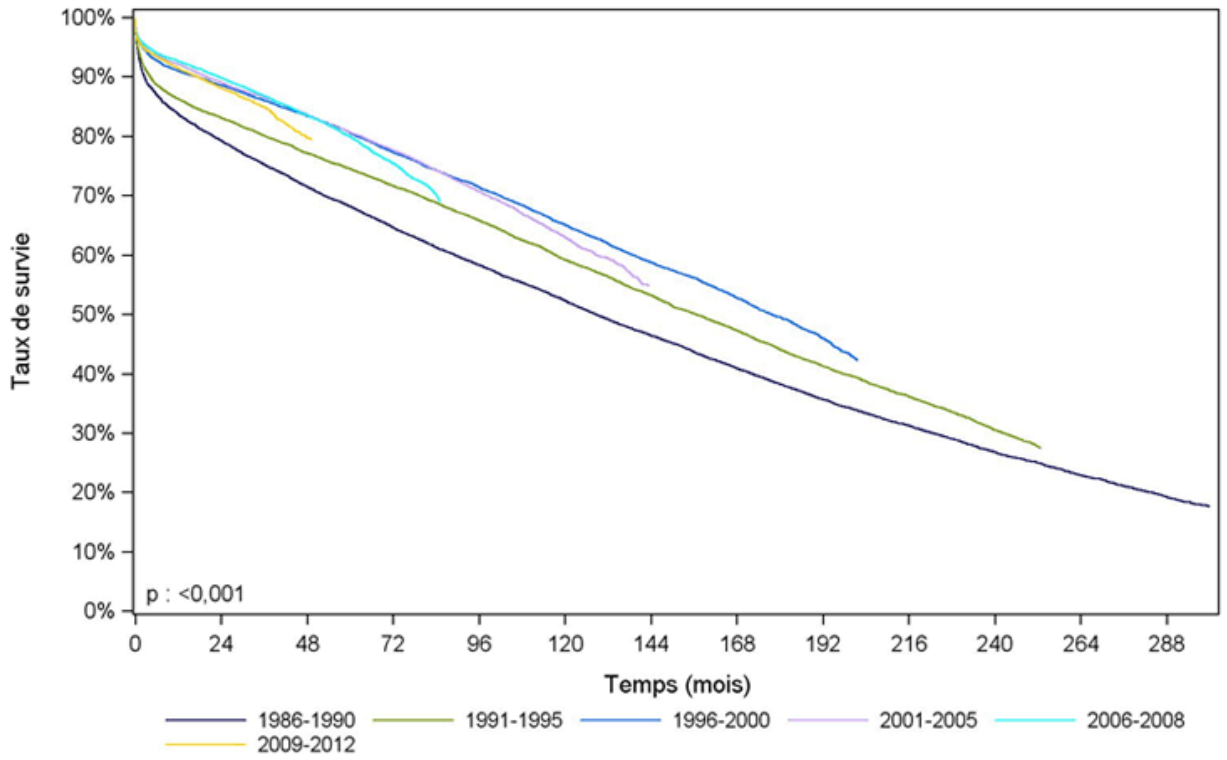
Récemment, on individualise des phénomènes dits d'*accommodation* vis-à-vis des anticorps anti-HLA. Cet état correspond à la mise en évidence de DSA, toutefois sans répercussion pathologiques en terme de lésions histologiques. L'accommodation est surtout décrite et rencontrée dans les greffes ABO incompatibles. Dans ces greffes, des anticorps anti-ABO sont bien retrouvés chez le receveur, après greffe, sans impact sur le greffon. Ces situations sous-entendent des phénomènes adaptatifs particuliers, dont l'investigation peut permettre une meilleure compréhension du fonctionnement de l'immunité dirigée contre une allogreffe. Cette meilleure compréhension peut à son tour fournir des cibles thérapeutiques potentielles, afin d'augmenter la durée de vie des greffons. Il s'agit par ailleurs d'améliorer les outils diagnostiques et pronostiques afin de détecter les situations d'accommodation et d'éviter des interventions inutiles et potentiellement délétères, qu'elles soient diagnostiques invasives ou thérapeutiques.

Il apparaît donc crucial de mettre en évidence des marqueurs précoces des situations de rejet et d'accommodation. L'objet de ce travail est la mise en évidence de marqueurs diagnostiques non invasifs d'accommodation. La cohorte mise en place doit dans un deuxième temps permettre la mise en évidence de marqueurs pronostiques d'accommodation.

1.2 Données épidémiologiques de la greffe

La greffe rénale a transformé le pronostic de l'insuffisance rénale en augmentant la qualité et la quantité de vie des sujets insuffisants rénaux. L'amélioration des techniques chirurgicales, mais aussi et surtout le développement de nouvelles stratégies immunosuppressives, dans les années 1990, ont très largement amélioré la survie médiane des greffons (figure 1). On constate toutefois deux phénomènes : d'une part l'amélioration porte aujourd'hui essentiellement sur la pente initiale de survie (dans la première année), d'autre part la pente de survie au delà de la première année semble sensiblement inchangée depuis la fin des années 1980 et l'introduction des anticalcineurines.

Figure R2. **Survie du greffon rénal selon la période de greffe**



Période de greffe	N	Survie à 1 mois	Survie à 1 an	Survie à 5 ans	Survie à 10 ans	Survie à 15 ans	Médiane de survie (mois)
1986-1990	8671	93,3% [92,7% - 93,8%]	83,7% [82,8% - 84,4%]	68,2% [67,2% - 69,2%]	52,3% [51,2% - 53,3%]	38,3% [37,2% - 39,3%]	128,6 [124,5 - 132,8]
nombre de sujets à risque*		7857	7022	5677	4278	2879	
1991-1995	8821	94,2% [93,7% - 94,7%]	86,3% [85,5% - 87,0%]	74,5% [73,6% - 75,4%]	59,2% [58,1% - 60,2%]	44,0% [42,9% - 45,1%]	156,7 [151,3 - 161,1]
nombre de sujets à risque*		8253	7537	6456	4833	3286	
1996-2000	8970	96,0% [95,5% - 96,3%]	91,0% [90,4% - 91,6%]	80,5% [79,7% - 81,3%]	65,1% [64,1% - 66,1%]	49,5% [48,4% - 50,7%]	177,5 [173,5 - 182,7]
nombre de sujets à risque*		8602	8156	7141	5504	1698	
2001-2005	11396	96,2% [95,8% - 96,5%]	92,2% [91,7% - 92,6%]	80,7% [79,9% - 81,4%]	63,0% [62,0% - 64,0%]	NO	NO
nombre de sujets à risque*		10952	10470	8972	2865	0	
2006-2008	8580	96,5% [96,0% - 96,8%]	92,6% [92,1% - 93,2%]	79,9% [79,0% - 80,7%]	NO	NO	NO
nombre de sujets à risque*		8269	7922	5304	0	0	
2009-2012	11739	95,9% [95,5% - 96,2%]	91,5% [90,9% - 92,0%]	NO	NO	NO	NO
nombre de sujets à risque*		10811	8970	0	0	0	

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

FIGURE 1 – Survie des greffons rénaux en fonction de l'époque de greffe (données ABM)

	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Malades restant en attente au 1er janvier de chaque année	6490	6880	7594	8459	9059	9869	10736
Nouveaux inscrits dans l'année	3731	3904	4159	4011	4333	4467	
Décédés en attente dans l'année	221	214	224	233	240	252	
Sortis de liste d'attente	183	150	177	202	239	274	
Greffes	2937	2826	2893	2976	3044	3074	
dont greffes avec donneur vivant	222	223	283	302	357	401	
dont greffes avec donneur décédé après arrêt circulatoire non contrôlé	52	70	79	65	81	78	
Greffes (pmh)	46,2	44,2	44,7	45,7	46,5	46,7	

TABLE 1 – Inscriptions sur liste d'attente par année.
pmh=par million d'habitants

Cette absence d'amélioration de la survie à long terme peut s'expliquer majoritairement par deux phénomènes :

— un élargissement des critères d'acceptation des donneurs comme des receveurs. Les donneurs dits *à critères étendus* des années 1990-2000 sont les donneurs les plus fréquemment rencontrés des années 2010,

— la faible capacité de réponse thérapeutique face aux atteintes chroniques, essentiellement humorales.

La survie médiane d'un greffon est actuellement de près de 15 ans (figure 1). En raison d'une part des comorbidités engendrées par un retour en dialyse, et d'autre part de la pénurie de greffon, liée au nombre croissant de patients inscrits sur liste d'attente (table 1) et à la prévention des traumatismes pourvoyeurs de mort encéphalique, il est nécessaire d'envisager d'augmenter encore cette durée de survie. L'augmentation du nombre de greffes issues de donneurs vivants (éventuellement dans des stratégies de dons croisés ou en parallèle) est un moyen pratique d'atteindre cet objectif. L'idéal serait d'induire un état de tolérance définitive (du moins durable) vis à vis du greffon.

1.3 Classification de Banff

La classification de Banff est une classification anatomopathologique. Elle s'applique notamment aux biopsies de greffon rénal et a permis non seulement une standardisation de l'évaluation de ces biopsies entre différents pathologistes et entre différents centres, mais aussi de clarifier et même développer le cadre nosologique du rejet de greffe rénal. La nosologie actuelle repose ainsi sur sept grandes classes, détaillées table 2.

I	Greffon normal	
II	Lésions médiées par anticorps	
	Rejet humoral chronique aigu/actif (*)	1/ Lésions tissulaires aiguës morphologiques : $g > 0$ ou $ptc > 0$ ou artérite intimale ou transmurale ($v > 0$) ou microangiopathie thrombotique (en l'absence d'autre cause) ou lésions tubulaires aiguës (en l'absence d'autre cause) 2/ Interaction DSA/endothélium : C4d fixation (en IF : $C4d > 1$) ou $g + ptc \geq 2$ ou surexpression de transcrits endothéliaux, in situ 3/ Présence de DSA
	Rejet humoral chronique actif (*)	Lésions tissulaires chroniques morphologiques : 1/ $cg > 0$ ou multilamination "sévère" de la basale capillaire péritubulaire (ME) 2/ Interaction DSA/endothélium (mêmes critères qu'en aigu) 3/ Présence de DSA
	Fixation C4d sans signe de rejet	Aucune lésion des autres types de lésions médiées par anticorps, sauf C4d. Pas de contrainte sur le statut DSA.
III	Lésions "borderline"	Lésions suspectes de rejet aigu cellulaire t1 à t3 avec i0 à i1 ou i2 à i3 avec t1
IV	Rejet médié par cellules T	
	Aigu	
	IA	Infiltrat interstitiel > 25% du parenchyme i2 ou i3 avec tubulite t2, v0
	IA	Idem avec tubulite t3, v0
	IIA	Artérite intimale v1
	IIB	v2
	III	v3
	Chronique	Artériopathie chronique d'allogreffe (fibrose intimale artérielle avec infiltration mononucléée)
V	Fibrose interstitielle / atrophie tubulaire	
	I	Atteinte de moins de 25% de la surface corticale
	II	Atteinte de 26 à 50% de la surface corticale
	III	Atteinte de plus de 50% de la surface corticale
VI	Autre cause ; changement non du à un rejet	

TABLE 2 – Classes anatomopathologiques de Banff - version 2007 avec mise à jour pour les lésions humorales selon Banff2013.
IF=immuno-fluorescence, DSA=Donor-Specific Antibody, ME=microscopie électronique.
(*) Les trois éléments doivent être présents pour le diagnostic. Seule la mise en évidence d'une lésion $cg > 1$ est suffisante pour le diagnostic de rejet humoral chronique, dans ce cas non actif.

Initialement décrite en 1997[1] (deux sessions précédentes en 1993 et 1995 n'avaient pas permis de proposer une classification unifiée), elle a depuis bénéficié de plusieurs mises à jour[2, 3, 4, 5, 6], à l'occasion de rencontres multidisciplinaires regroupant tous les acteurs de la greffe rénale. Ces rencontres ont d'une part abouti à une classification, d'autre part à la mise en place de nombreux groupes de travail qui permettent de statuer sur des évolutions proposées. Malgré la fréquence des mises à jour, il faut noter la grande pérennité de la classification, dont la grande structure reste la même depuis 1997.

Un des éléments de sa grande reproductibilité est la définition précise des lésions élémentaires permettant finalement la classification. Ces lésions élémentaires sont décrites dans le tableau 3. D'autres sont aujourd'hui encore validées par des groupes d'experts : la lésion *ti*, pour inflammation totale, doit permettre de refléter au mieux l'inflammation interstitielle. La lésion *aah* doit permettre une évaluation plus reproductible de la hyalinose artériolaire, par rapport à l'actuelle lésion *ah*.

g	glomérulite	cg	glomérulopathie d'allogreffe
t	tubulite	ct	atrophie tubulaire
i	infiltrat interstitiel	ci	inflammation interstitielle chronique
v	artérite intimale	cv	épaississement intimal fibreux
ptc	capillarite péri-tubulaire		
ah	hyalinose artériolaire		
mm	épaisissement de la matrice mésangial		
C4d	Fragment C4d du complément		(IF ou IHC)

TABLE 3 – Lésions élémentaires de la classification de Banff - version 2007. IF=immunofluorescence, IHC=immunohistochimie

1.4 Evolution du concept de rejet humoral chronique

L'évolution récente de la classification de Banff est centrée sur une amélioration du cadre nosologique du rejet humoral, particulièrement chronique. Ce rejet humoral chronique est une notion existant depuis Banff 2005[3]. Son identification résulte d'une réévaluation du concept de *néphropathie chronique d'allogreffe* (CAN, en anglais). Cette CAN devenait en effet, au début des années 2000, une classe non homogène et surtout trop imprécise, regroupant tant des lésions dues aux immunosuppresseurs que des lésions immunologiques de rejet ou encore des lésions d'artériosclérose non spécifique. La classe CAN ne fournissait donc que peu d'informations et ne permettait pas de sélectionner des groupes homogènes de patients, dans le but de développer

des stratégies préventives ou thérapeutiques.

Le démembrement du groupe CAN a été à la fois cause et conséquence du développement des connaissances sur le rejet humoral chronique (RHC). Une grande part des développements initiaux sur ce type de rejet est cristallisée autour de la fixation du C4d[7, 8]. Ce marqueur d'action du complément a représenté une lésion élémentaire prépondérante faisant émerger le rôle majeur de l'immunité humorale dans le vieillissement prématuré des greffons[9]. Il est ensuite apparu que tous les RHC ne donnent pas une fixation de C4d[10]. L'action du complément, initialement jugée indispensable pour une atteinte humorale, est devenue facultative, avec un rôle des lymphocytes NK en particulier. Une chronologie du RHC est en outre en cours de développement, faisant alterner des phases d'aggression médiée par le complément[11] et des phases de quiescence[12, 13]. Cette description plus précise permet peu à peu de décrire les processus pathologiques à l'oeuvre dans le RHC, afin d'adapter les stratégies thérapeutiques.

En parallèle de cette clarification nosologique, le développement de techniques de haute sensibilité (notamment sur bille avec un antigène HLA unique fixé (Single Antigen Beads, SAB)) pour le dépistage des anticorps anti-HLA, en particulier des *DSA* (Donor Specific Antibodies, anticorps spécifiques du donneur), a conduit à réévaluer à la hausse la fréquence des phénomènes immunologiques à médiation humorale. L'éventuelle présence d'anticorps anti-HLA avant greffe était bien connue. Ces techniques haute sensibilité ont permis de préciser leur cible antigénique. Il est en outre apparu, au début des années 2000, que des anticorps anti-HLA apparaissent après la greffe[14, 15, 16, 17] (en dehors de situations connues d'immunisation, comme une transfusion sanguine). L'impact de ces anticorps anti-HLA a été bien précisé en 2007 : la survie des greffons chez les porteurs de ces anticorps est moins bonne [18]. Parmi ces anticorps anti-HLA *de novo* ont été notés de nombreux DSA. Ces DSA *de novo* (dnDSA) ont progressivement été associées d'une part à une moins bonne survie du greffon, d'autre part spécifiquement au rejet humoral chronique (et aigu)[19, 20, 21]. Il est dès lors devenu possible d'utiliser les dnDSA comme biomarqueurs du rejet humoral[22, 23] : les dnDSA prédisent en effet l'apparition future d'un RHC et peuvent être recherchés dans un simple prélèvement plasmatique. Le suivi du greffé rénal intègre désormais la surveillance de l'apparition de dnDSA. En outre, la mesure quantitative des techniques SAB pourrait permettre un suivi lui-même quantitatif de l'intensité des phénomènes de rejet, même si ce point est discuté.

L'essentiel de la lutte contre le rejet avait été centrée sur le rejet cellulaire[24], ce qui a conduit à centrer les stratégies thérapeutiques sur le lymphocyte T (immunité cellulaire) et non le lymphocyte B (immunité humorale). Devant un RHC, les stratégies thérapeutiques actuellement disponibles [25, 26] sont donc peu nombreuses. Elles sont basées sur trois classes thérapeutiques :

— les immunoglobulines polyvalentes, les échanges plasmatiques et l'immuno-adsorption, dans le but de limiter l'effet de ou d'éliminer les immunoglobulines pathologiques, essentiellement de type DSA,

— le rituximab et le bortezomib, respectivement anticorps anti-CD20 (déplétant des précurseurs des plasmocytes) et inhibiteur du protéasome (nécessaire à la survie et au fonctionnement des lymphocytes B), dans le but de limiter les populations productrices d'immunoglobulines et en particulier des DSA,

— l'éculizumab, anticorps anti-C5, bloquant l'action du complément par blocage de la mise en place du complexe d'attaque membranaire.

Ces stratégies ont été développées sur de petites séries de patients après diagnostic de RHC et donnent des résultats significatifs en terme de survie du greffon[27, 28]. Elles restent toutefois partiellement efficaces et ne permettent pas de prévenir l'apparition du RHC. Le pronostic du diagnostic de RHC reste donc globalement mauvais, avec une limitation de survie du greffon à quelques années. Il faut toutefois distinguer les anticorps anti-HLA de classe 1, dont la pathogénie dans le RHC semble moins importante que les anti-HLA de classe 2 [29, 30] (ce qui est conforté par la moindre pathogénie des mismatchs HLA sérologiques de classe 1).

La chronologie du RHC rend son étude particulièrement difficile : environ 20% des patients greffés développent des DSA dans les 3 ans suivant une greffe et le délai entre apparition du DSA et RHC est non seulement mal précisé mais débattu[31, 12].

1.5 Emergence du concept d'accommodation

Le concept d'accommodation a surtout été décrit dans le contexte de la greffe ABO incompatible [32, 33, 34, 35, 36]. En effet, on utilise dans ce type de greffe des stratégies de déplétion des anticorps ABO, à la phase initiale de la greffe. Un objectif thérapeutique est la minimisation des concentrations de ces anticorps, permettant la bonne acceptation du greffon. L'accommoda-

tion survient dans un deuxième temps, où on constate que les taux d'anticorps anti-ABO sont en ré-ascension, alors que le greffon ne subit pas de phénomène de rejet. Ces anticorps ABO, clairement pathologiques au décours de la chirurgie, s'inscrivent dans un deuxième temps dans un état d'accommodation du systéme hôte-greffon. Cela pose alors la question du suivi des patients greffés en ABO-incompatible (la présence d'anticorps anti-ABO n'étant pas signe de rejet).

Cette accommodation vis-à-vis des antigènes ABO trouve un écho dans le domaine du rejet chronique humoral. Les DSA sont en effet un marqueur potentiellement précoce du rejet[23], mais on connait aussi des cas de présence de DSA sans stigmate de rejet[20, 37]. On définit ainsi l'accommodation vis-à-vis des antigènes HLA. Cette situation est difficile d'identification et pose deux questions : 1/ la question du diagnostic de rejet humoral, notamment basé sur l'identification de DSA, 2/ la question du déclenchement d'une réponse thérapeutique et de son moment dans l'histoire pathologique. En outre, la stratégie immunosuppressive, notamment d'induction, en greffe ABO incompatible, pourrait avoir un effet sur l'émergence de DSA post-greffe[38].

1.6 Concept de biomarqueurs

Le concept de biomarqueur peut être défini comme une caractéristique biologique objectivement mesurable (éventuellement quantifiable) servant d'indicateur pour un processus biologique (qui peut lui même être physiologique, pathologique, ou être un indicateur d'une réponse pharmacologique)[39].

1.6.1 Nécessité

La prise en charge médicale du rejet de transplant rénal (quel que soit son type) exige à la fois un diagnostic pertinent et un suivi thérapeutique efficace. Les biomarqueurs diagnostiques et thérapeutiques, en néphrologie et notamment en transplantation rénale, sont peu spécifiques du processus pathologique et souvent retardés. L'estimation de la fonction rénale par la créatinine plasmatique indique par exemple le rejet au stade de la dysfonction d'organe.

L'étalon-or diagnostique et thérapeutique reste, en greffe rénale, la biopsie de greffon. Cette biopsie est un acte invasif et ne peut pas relever du suivi systématique (à l'exception de biopsies

protocolaires post-greffe, dont on limite le nombre à une ou deux au maximum).

Il existe donc en greffe rénale à la fois une exigence et un manque de biomarqueurs utilisables en pratique courante et de façon répétée. De nombreuses études se sont donc attachées à identifier de nouveaux biomarqueurs de rejet, plus sensibles et / ou plus spécifiques, moins invasifs et / ou plus précoces.

1.6.2 Perspective actuelle sur les biomarqueurs de rejet de greffe rénale

Malgré de nombreuses études, les biomarqueurs utiles au suivi de greffe rénale restent peu nombreux[40, 41, 42, 43]. Seuls les anticorps anti-HLA sont maintenant de pratique courante. Le seul test validé par l'autorité américaine du médicament, Immuknow©, basé sur le dosage de l'ATP lymphocytaire suite à une stimulation aspécifique, reste peu répandu et discuté [44].

Les études transcriptomiques offrent toutefois des perspectives intéressantes. Ces études cherchent à identifier les gènes sur- ou sous-exprimés dans le rejet (quel que soit son type), afin de mettre en évidence des comportements cellulaires. Il s'agit à la fois de détecter des biomarqueurs d'intérêt mais aussi de mieux comprendre les phénomènes pathologiques à l'oeuvre.

Le concept de microscope moléculaire[45] représente une stratégie particulièrement féconde depuis quelques années[46, 47]. Il s'agit de l'étude transcriptomique de cellules rénales obtenues par biopsie. Si ces biomarqueurs restent invasifs, ils semblent permettre un affinement important du diagnostic et devraient permettre de fournir des hypothèses quant aux processus pathologiques à l'oeuvre. La classification Banff a récemment inclus[6] ces marqueurs comme un critère d'interaction anticorps / endothélium dans le rejet humoral chronique, suite aux travaux de Sis et al.[48, 49].

1.6.3 Perspectives méthodologiques

La recherche de biomarqueurs, en particulier par des méthodes haut débit, exige une approche prudente, en particulier sur le plan méthodologique. De nombreux travaux pointent du doigt le faible nombre de validation de biomarqueurs issus de la transcriptomique. Les biostatistiques associées doivent prendre en compte la multiplicité des tests réalisés afin de ne pas proposer des biomarqueurs alléchants, aux propriétés quasi-parfaites (en terme de sensibilité et spécificité, en particulier), toutefois non confirmés et non applicables[50, 51]. Parikh et al.[52]

ont proposé une perspective méthodologique exhaustive, fournissant par la même occasion un cahier des charges pour tout nouveau biomarqueur.

1.7 Définition et apport de la protéomique

La protéomique permet la recherche de biomarqueurs au niveau de l'effecteur traditionnel de la fonction biologique, à savoir la protéine. L'ensemble des modifications post-traductionnelles induit des erreurs dans la compréhension des systèmes biologiques étudiés au niveau de l'ARN. La détection et la quantification de la protéine se placent au plus près du processus biologique à l'oeuvre. La protéomique fournit donc une nouvelle perspective par rapport à la transcriptomique. Des travaux déjà anciens se sont concentrés sur les protéines urinaires pour le diagnostic précoce du rejet de greffe rénale[53].

En 2002, Petricoin[54] a largement fait connaître l'analyse du protéome par spectrométrie de masse en temps de vol. Cette technique fournit un profil protéique d'un échantillon donné. La comparaison d'échantillons de conditions pathologiques différentes permet la mise en évidence simultanée de nombreux biomarqueurs. Ce travail pionnier de Petricoin proposait un outil diagnostique du cancer de l'ovaire.

Ce travail pionnier, largement nuancé depuis, a été suivi de très nombreux travaux d'identification de profils protéiques dits *signatures*, associés à un diagnostic d'intérêt. En greffe rénale, Clarke[55] puis O'Riordan[56] ont été les premiers à proposer une analyse protéomique de l'urine des greffés, pour la mise en évidence de rejets aigus. L'émergence du concept de rejet chronique a conduit à de nombreux travaux de protéomique sur ce thème[57, 58, 59].

Dix ans plus tard, les résultats restent nuancés[60]. La protéomique, en néphrologie, suscite toujours de nombreuses questions[61]. Si l'idée de profil protéique comme biomarqueur est discutée, les hypothèses générées par ces études *sans hypothèse* fournissent des pistes pour des études mécanistiques plus spécifiques[62].

2 Patients et méthodes

2.1 Population étudiée

L'ensemble des greffés rénaux suivis au CHU de Grenoble ayant bénéficié d'une biopsie rénale soit protocolaire (dans le cadre du suivi systématique à trois mois de la greffe (M3)), soit pour dysfonction de greffon (*pour cause*) justifiant une analyse anatomopathologique, ont été inclus. Ces patients devaient être majeurs à l'inclusion et donner leur consentement pour participation à l'étude. La période d'inclusion s'est étendue d'octobre 2011 à mai 2014. L'ensemble des greffés inclus dans l'étude avaient un cross-match pré-greffe par micro-lymphotoxicité négatif. Les données médicales et de greffe ont été obtenues à partir de la base Cristal de l'ABM et des dossiers médicaux des patients.

2.2 Protocole d'étude

Les patients étaient convoqués à l'hôpital de jour de néphrologie du CHU de Grenoble, soit dans le cadre de leur suivi systématique à M3, soit lors d'une consultation pour cause. Un échantillon d'urine était prélevé pour analyse protéomique, ainsi qu'un échantillon sanguin (pour un ensemble d'analyses prescrites par le néphrologue du patient) et une biopsie rénale (une carotte pour l'analyse optique et une carotte pour l'analyse en immunofluorescence, sous réserve de faisabilité technique). Les analyses sanguines comprenaient en général une créatininémie et une recherche d'anticorps anti-HLA.

2.2.1 Urines

Un échantillon d'urine a été recueilli soit à M3, soit lors de la biopsie pour cause. Cet échantillon a été aliquoté avec un inhibiteur de protéase (Roche) puis congelé à -80°C. L'ensemble des échantillons a été décongelé simultanément pour une analyse SELDI-TOF (Surface Enhanced Laser Desorption / Ionization - Time Of Flight, BioRad) sur deux types de barettes (IMAC, Immobilized Metal Affinity Capture et CM10, échangeur cationique faible) après harmonisation de la quantité protéique totale déposée sur chaque barrette, évaluée selon la méthode dite au rouge de Pyrogallol. Le détail des procédures de dosage protéique et de dépôt sur les barrettes SELDI est disponible en annexe 1. Les spectres ont été obtenus sur deux jours de

manipulation afin de minimiser la variabilité du laser. Deux intensités lasers ont été utilisées (3200 et 4500nJ) pour explorer une gamme de masse de 0,5 à 50kDa environ.

2.2.2 Anticorps

La présence d'anticorps anti-HLA a été recherchée par technique Luminex, avec dépistage classes 1 et 2 puis identification de la spécificité antigénique si le dépistage était positif. La MFI seuil pour définir un anticorps anti-HLA a été fixée à 1500. Le statut "Donor Specific Antibody" (DSA) est établi par les spécialistes HLA (EFS Grenoble). L'ensemble des recherches d'anticorps anti-HLA par technique Luminex, de la date de la greffe à juillet 2014, a été inclu dans l'analyse. On définit comme DSA de novo (dnDSA) les DSA non présents le jour de la greffe mais présents par la suite.

2.2.3 Biopsies

Les biopsies rénales ont été lues par un unique médecin anatomopathologiste expérimenté, informé du contexte du receveur. On définit le rejet humoral aigu ou chronique, qu'il soit actif ou non, selon la classification de Banff, avec les critères anatomopathologies élémentaires suivants :

— lésions histologiques aiguës ($g > 0$ ou $ptc > 0$ ou $v > 0$) ou chroniques ($cg > 0$)

— preuves d'interaction anticorps / endothélium ($g + ptc \geq 2$ ou $C4d > 1$)

— présence de DSA

La microscopie électronique n'était pas réalisée en routine, ne permettant pas d'évaluer la multi-lamination des capillaires glomérulaires ou péri-tubulaires.

2.2.4 Prétraitement du signal SELDI-TOF

Les spectres bruts obtenus ont été prétraités de la façon suivante :

— alignement automatique selon une équation de calibration paramétrée sur un ensemble de protéines de calibration (méthode constructeur),

— recherche de maxima locaux dans le spectre moyen débruité par transformée en ondelettes, à l'aide du package MassSpecWavelet (logiciel R),

— quantification des pics identifiés sur les spectres individuels, pour construction d'une matrice $n \times m$, où n correpond au nombre de patients inclus et m correspond au nombre de pics identifiés.

2.2.5 Critères de sélection des patients d'intérêt pour l'analyse comparative

Afin d'établir un profil d'accommodation, un sous-ensemble de la population a été sélectionné. Les patients présentants un DSA avant ou au moment de la biopsie ont été identifiés et représentent la cohorte d'intérêt. Parmi ceux-ci, les patients ont été répartis en deux groupes selon la présence ou l'absence d'un rejet humoral (tel que défini dans la section 2.2.3) : les patients rejeteurs (DSA(+) rejet(+)) et les patients accommodants (DSA(+) rejet (-)).

2.3 Gestion des données

Les données collectées ont été inclues dans une base de données Postgre SQL. Ce système de gestion de base de données (SGBD), de format relationnel, présente l'avantage intrinsèque de structurer l'information sous forme de tables de données, d'une part, et d'être interrogeable *via* un langage commun *Simple Query Language* (SQL). Le SQL permet d'accéder à l'information en croisant les données des différentes tables. Cette gestion de l'information permet de dissocier le processus de saisie du processus d'interrogation des données. L'interrogation de la base de données permet de créer la table *ad hoc* pour la question d'intérêt.

L'ensemble des données de la cohorte a été intégré dans la base de données, avec un souci d'ouverture pour compléter le recueil d'information de façon prospective au-delà de ce travail de thèse.

Une interface spécifique de saisie, disponible via une interface Web facilement accessible, a été créée. Cette interface permet en outre un accès aux données individuelles par patient, par exemple pour la consultation d'historique HLA ou de biopsies.

2.4 Analyse statistique

Une analyse en composante principale (ACP) est réalisée pour chaque matrice d'intensité obtenue à l'issu du processus de prétraitement (section 2.2.4). Elle consiste à projeter dans l'espace de plus grande variance la matrice d'intensités, pour identifier des combinaisons linéaires des variables (les pics protéiques) permettant une séparation optimale (au sens des moindres carrés) des individus (les spectres, et donc les patients). La réalisation de l'ACP suppose de fixer la dimension de l'espace de projection, qui est choisi ici à 2 afin de simplifier la présentation des projections.

La sélection des pics protéiques discriminants est réalisée en univarié par test de Wilcoxon, comparant les médianes d'intensité d'un pic entre les deux groupes. Afin de prendre en compte la multiplicité des tests statistiques réalisés, un contrôle du False Discovery Rate (FDR) est réalisé, permettant un contrôle du risque α. Brièvement, le FDR contrôle la proportion $\frac{V}{R}$, où V est le nombre de faux positifs et R est le nombre total de tests positifs. Diverses stratégies ont été proposées pour contrôler le FDR, la première par Benjamini et Hochberg (1995)[63]. L'intérêt du FDR est de contrôler la vraie quantité d'intérêt, à savoir le nombre de faux positifs parmi les positifs, afin de limiter le nombre de faux biomarqueurs proposés. Parmi les différentes stratégies de contrôle du FDR, on utilise ici la stratégie originale de Benjamini et Hochberg.

Une analyse multivariée est réalisée en construisant un classifieur basé sur des arbres de décision binaires, dans un schéma de Classification and Regression Tree (CART). Les variables significatives des tests univariés précédents sont considérées pour la construction de l'arbre. Les plus pertinentes pour la partition de l'ensemble des feuilles de l'arbre (les échantillons d'urine, dans le cas discuté ici) sont conservées dans le modèle final. Ces variables conservées sont les biomarqueurs diagnostiques de l'état d'accommodation.

On propose une validation interne du classifieur, par une méthode de *leave-one out cross validation*. A partir d'un échantillon de taille n, cette méthode consiste à exclure un individu pour construire un sous-ensemble d'apprentissage de taille $n-1$, à partir duquel est construit le modèle multivarié dont la prédiction pour l'individu exclu sert de validation. En répétant la procédure d'exclusion n fois, on peut valider la sensibilité et la spécificité du classifieur proposé.

Afin d'éviter la mise en évidence de marqueurs triviaux (par exemple d'inflammation), on réalise enfin une comparaison de trois groupes simultanément : les groupes accommodants, rejeteurs et le groupe des échantillons correspondant à des biopsies normales. Ce groupe normal sert de groupe *contrôle*. La capacité à distinguer les profils urinaires accommodants des profils urinaires de rejet d'une part et des profils contrôle d'autre part, permet de valider la pertinence des biomarqueurs identifiés. La même stratégie de sélection univariée (par tests non paramétriques de Kruskal Wallis, pour trois groupes) est utilisée. La stratégie CART est utilisée pour la sélection de biomarqueurs et la construction d'un modèle diagnostique.

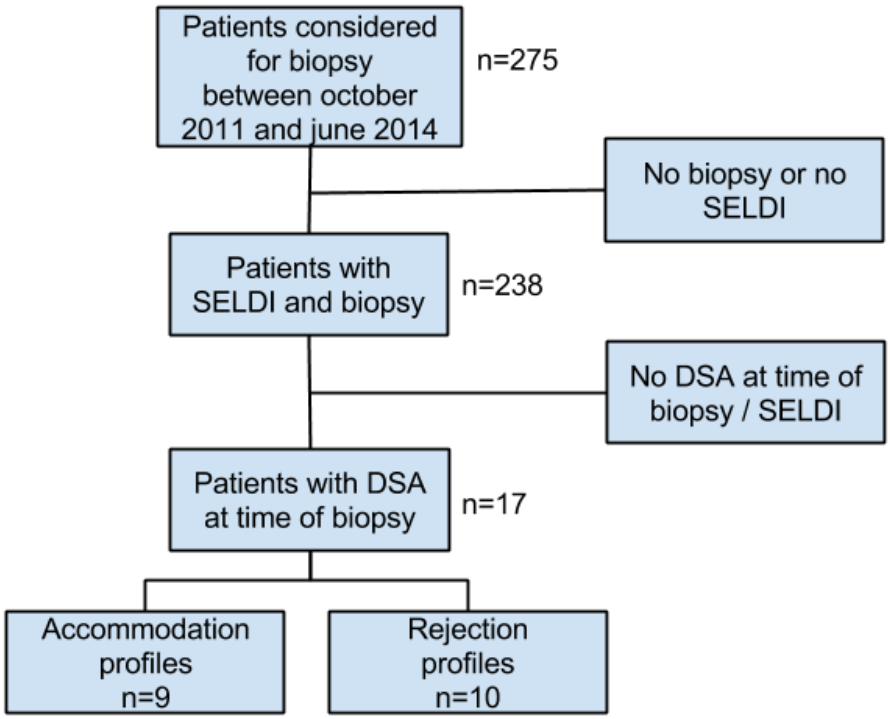


FIGURE 2 – Diagramme de flux de l'étude. 17 patients ont présenté des DSA avant ou au moment de la biopsie, donnant 19 profils en raison de 2 patients inclus dans 2 circonstances différentes.

3 Résultats

3.1 Caractéristiques démographiques

3.1.1 Cohorte entière

Entre octobre 2011 et mai 2014, 238 patients ont été inclus dans l'étude et ont fourni au moins un échantillon d'urine pour analyse, ce qui donne finalement 250 échantillons d'urine analysés. Le diagramme de flux de l'étude est présenté figure 2. Parmi ces patients, 177 ont été inclus dans le cadre de leur suivi régulier, à 3 mois de la greffe, lors de la biopsie protocolaire ; 61 ont été inclus lors d'une biopsie pour cause. Douze patients ont bénéficié à la fois d'une biopsie à M3 et d'une biopsie pour cause. La table 4 décrit l'essentiel des données démographiques de la population étudiée des receveurs. La table 5 décrit les données démographiques d'intérêt des donneurs.

Le nombre de mismatchs HLA (définis sérologiquement) était en médiane de 5 [3-6] (moyenne 4,56). Les mismatchs se répartissaient en médiane en 3 mismatchs de classe 1 (interquartile : 2-3) et 2 mismatchs de classe 2 (interquartile : 1-3).

		Médiane ou nombre (%)	Interquartile
Age (années)		51	38-61
Groupe sanguin	A	98 (41,2)	
	O	101 (42,4)	
	B	24 (10,1)	
	AB	15 (6,3)	
Sexe	Homme	149 (62,6%)	
	Femme	88 (37%)	
IMC		24,24	21,68 - 27,69
CMV	Positif	135 (56,7%)	
	Négatif	97 (40,7%)	
Néphropathie initiale	Diabète et/ou NAS	44 (18%)	
	PKR	38 (16%)	
	Néphropathies IgA	31 (13%)	
	Glomérulonéphrites	34 (14%)	
	Uropathies malformatives	19 (8%)	
	NTIC	15 (6,3%)	
	HSF	9 (3,8%)	
	Autre	10 (4,2%)	
	Inconnue	38 (15,2%)	
Rang de greffe	1	198 (83,2%)	
	2	37 (15,5%)	
	3	2 (0,8%)	
Type donneur	DCD	203 (85,3%)	
	DVA	32 (13%)	
Greffe	après dialyse	204 (85,7%)	
	préemptive	22 (9,2%)	
Ischémie froide (minutes)	Donneur DCD	886	699 - 1088
	Donneur DVA	82	74 - 103

TABLE 4 – Caractéristiques générales de la population des receveurs, à la date de la greffe. IMC=indice de masse corporelle. NAS = néphroangiosclérose. PKR = polykystose rénale. HSF = hyalinose segmentaire et focale. NTIC = néphropathie tubulo-interstitielle chronique. DVA = donneur vivant apparenté. DCD = donneur décédé (mort encéphalique ou décédé d'arrêt cardiaque)

		Médiane ou nombre (%)	Interquartile
Age		49	38-61
Sexe	Homme	138 (58%)	
	Femme	98 (41,2%)	
CMV status	positif	118 (49,5%)	
	négatif	96 (40,3%)	
Groupe sanguin	A	96 (40,3%)	
	O	112 (47%)	
	B	18 (7,5%)	
	AB	9 (3,8%)	

TABLE 5 – Caractéristiques générales de la population des donneurs

3.1.2 Caractéristiques des patients accommodants et rejeteurs

Les patients inclus ont bénéficié au moins une fois au cours de leur histoire de greffe d'une recherche d'anticorps anti-HLA. En raison du caractère dynamique de l'accommodation, avec une évolution possible vers le statut rejeteur, on raisonne en terme de profils (un patient pouvant avoir un profil d'accommodation, puis un profil de rejet). On définit ainsi un sous-ensemble de profils accommodants DSA(+) rejet humoral(-) et de profils rejeteurs DSA(+) rejet humoral(+). Les caractéristiques des deux sous-ensembles sont présentées en table 6.

3.1.3 Caractéristiques des DSA

L'ensemble des anticorps anti-HLA identifiés en pré-biopsie, chez les patients DSA+, est représenté tableau 11, en annexe.

3.2 Identification d'un profil urinaire d'accommodation

3.2.1 Analyse de l'ensemble des spectres

L'analyse des spectres SELDI urinaires donne une matrice d'intensité par type de barrette et puissance du laser. Chaque matrice a été analysée par analyse en composante principale (ACP), afin de dégager l'espace de plus grande variabilité. La projection bidimensionnelle de l'analyse en composante principale de chaque matrice est représentée figure 3.

Les spectres moyens par type de barrette et par intensité (conditions expérimentales) sont présentés figure 4. On note un décalage des pics sur l'axe $\frac{m}{z}$, reflétant la différence de calibration pour les deux intensités laser. Les pics identifiés par l'algorithme MassSpecWavelet sont

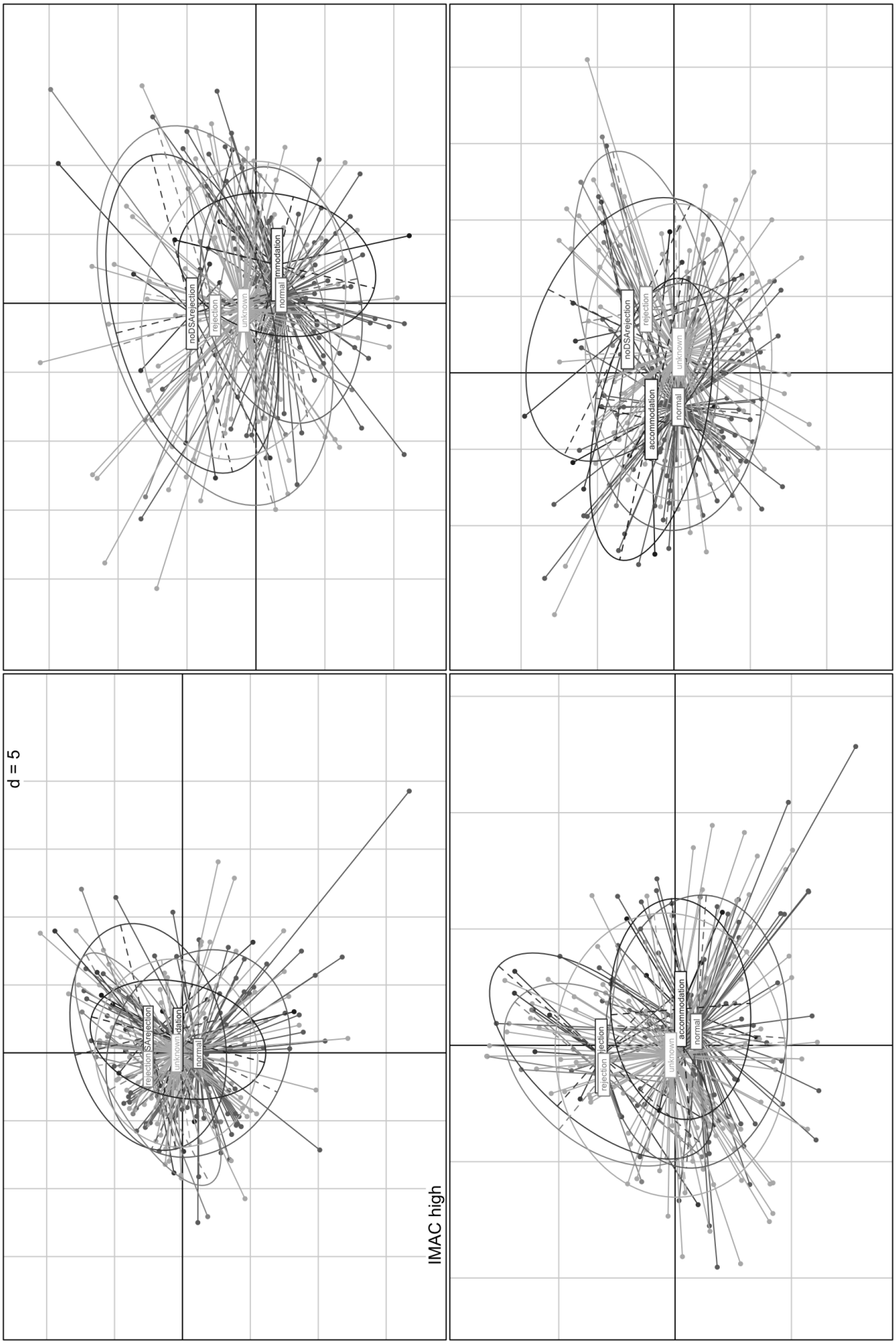


FIGURE 3 – Projection des ACP de chaque matrice d'intensité (barrettes IMAC et CM10, deux puissances du laser par type de barrette) - perspective sur l'ensemble de la cohorte. Chaque point des graphiques et un spectre, correspondant à un individu. Les ellipses d'inertie représentent la variance au sein de chaque groupe. Chaque groupe est indiqué par une étiquette en son centre d'inertie. Haut : barrette IMAC. Bas : barrette CM10. Gauche : haute intensité laser. Droite : basse intensité laser.

		Profils	
		Accomodants (n=9)	Rejeteurs (n=10)
Age à greffe		52 (44-59)	39 (32-50)
Sexe h/f		6/3	7/3
IMC		20,75	23,61
Rang de greffe	1	9	7
	2	0	3
Donneur vivant	3	1	
Greffe préemptive	2	0	
Ischémie froide (minutes)	DCD	873	996
	DVA	95	73
Délai greffe-biopsie (jours)		96 (92-97)	97 (34-1256)
Nbr mismatchs HLA			
Créatinine (μmol/l) à la date de la biopsie		124 (101 - 170)	131 (125 - 211)
Biopsie en urgence		4	9
Mismatch HLA	I	4 (3-4)	3 (2-4)
	II	2 (2-3)	2 (2-3)
Classe DSA	I	1	4
	II	9	9

TABLE 6 – Caractéristiques du sous-ensemble d'intérêt

représentés par un rond rouge.

3.2.2 Analyse du sous-ensemble accommodants VS rejeteurs

L'analyse est maintenant centrée sur les deux groupes accommodants et rejeteurs. Les spectres moyens par groupe sont représentés sur la figure 5.

L'ACP des 4 matrices d'intensité (pour les deux types de barrettes et les deux intensités laser) est présentée figure 6. Cette représentation des données SELDI fait apparaître une difficulté à séparer strictement les données dans l'espace de plus grande variance, puisqu'on ne retrouve pas d'hyperplan idéal dans cette projection permettant de classer sans erreur les patients comme accommodants ou rejeteurs.

Les analyses ultérieures sont réalisées avec l'intensité laser haute, en raison de la séparation optimale des spectres dans la projection d'ACP. Les résultats sont donnés pour la barrette IMAC et pour la barrette CM10.

L'analyse différentielle univariée accommodants VS rejeteurs fait émerger un ensemble de pics protéiques correspondant à des protéines différentiellement exprimés par les greffés. Ces pics sont présentés en tableau 7, avec la p-value du test statistique associée, corrigée pour un

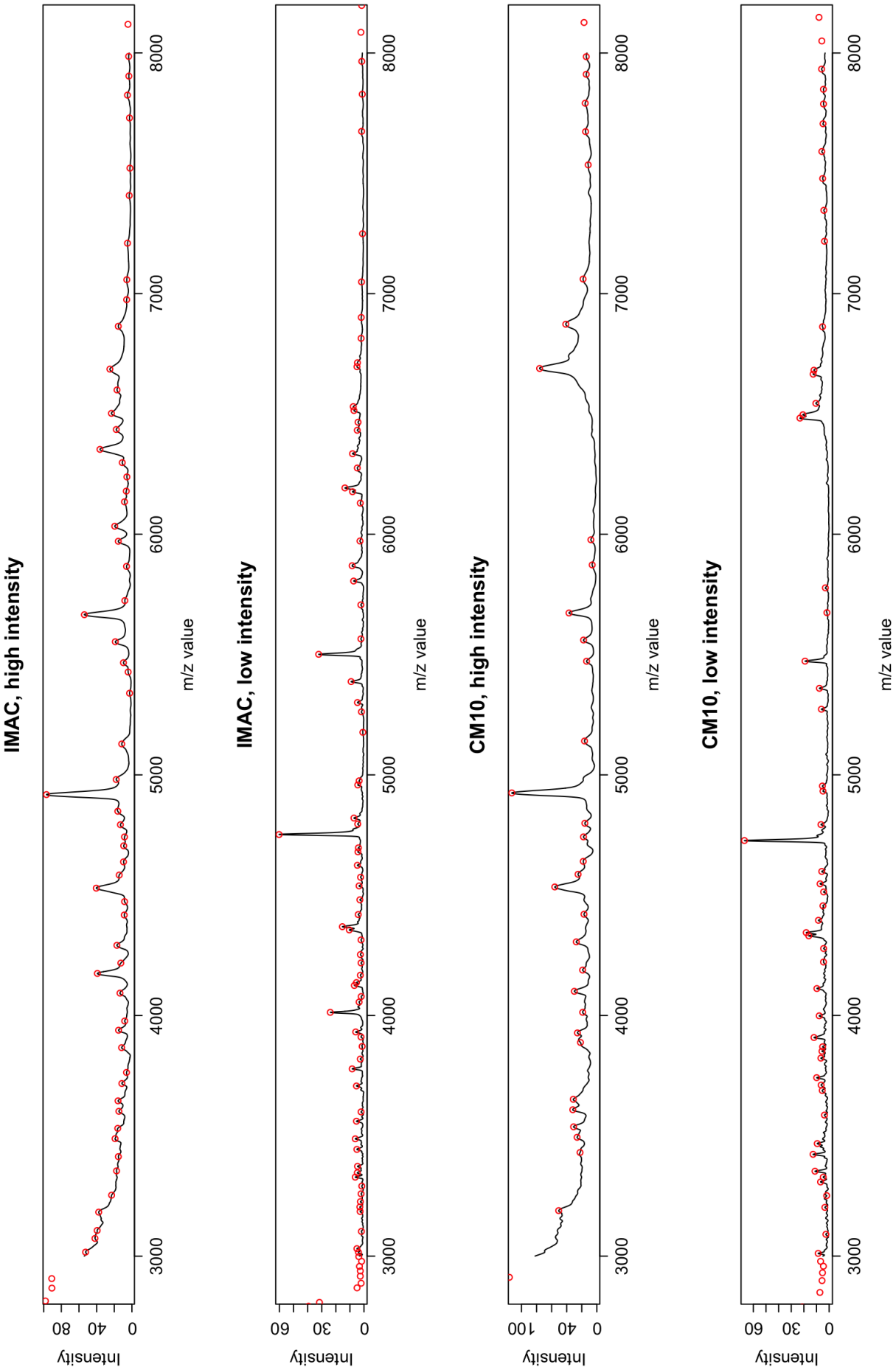


FIGURE 4 – Spectres SELDI moyens par condition expérimentale- fenêtre 3000 à 8000 Da.

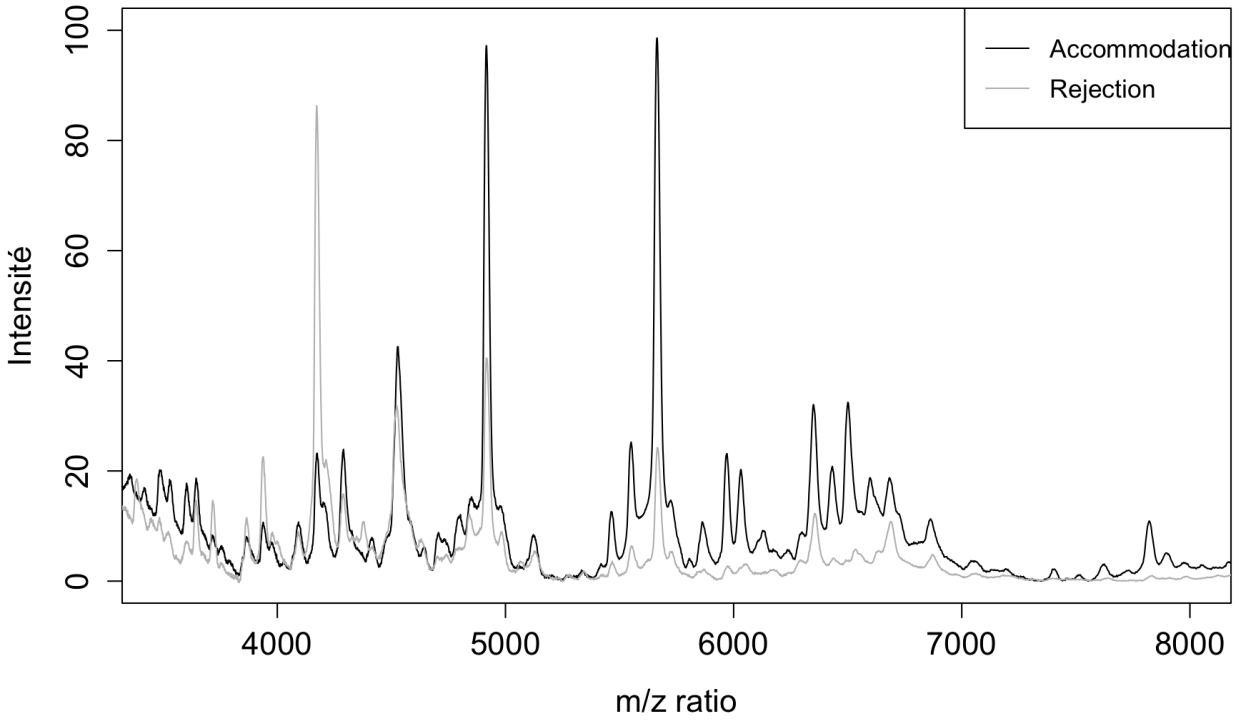


FIGURE 5 – Spectres SELDI moyens par groupe pathologique - fenêtre 3,5 à 8 kDa. Barrette IMAC, intensité laser haute.

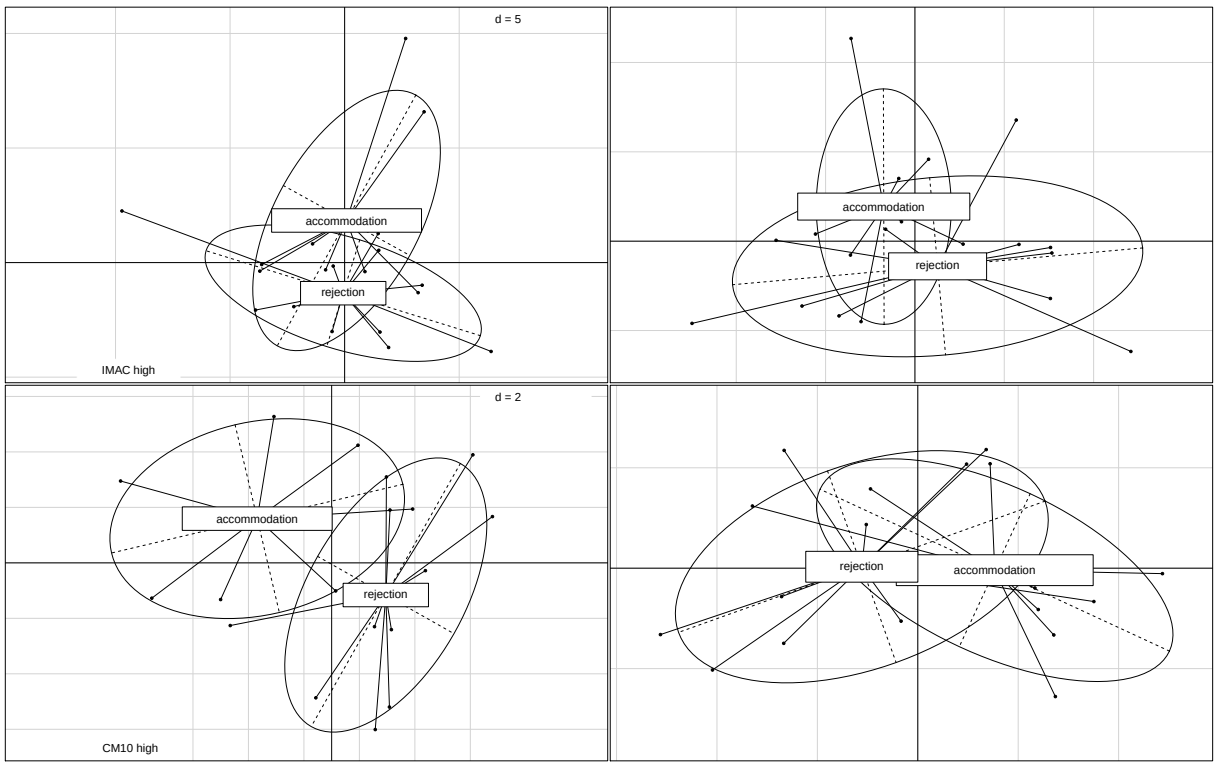


FIGURE 6 – Projection des ACP de chaque matrice d'intensité : barrettes IMAC (haut) et CM10 (bas, deux puissances du laser par type de barrette (puissance haute à gauche, basse à droite) - application aux 2 groupes accommodants / rejeteurs

FDR à 5%. Leurs formes et leurs positions dans le spectre sont représentées figure 7 pour la barrette IMAC et figure 8 pour la barrette CM10.

$\frac{m}{z}$ pic	Ratio d'intensité $\frac{accommodants}{rejeteurs}$	p-value brute	p-value corrigée
IMAC			
6238.1176	3.3495	0.0003	0.0229
7521.1184	5.2428	0.0005	0.0241
7729.8144	5.9635	0.0001	0.0076
16998.963	4.6190	0.0012	0.0429
CM10			
4742.2364	5.81	0.00	0.02
4798.873	9.65	0.00	0.02
4925.0538	12.43	0.00	0.01
5140.6831	3.02	0.00	0.02
5472.2663	7.14	0.00	0.04
5672.7821	9.12	0.01	0.04
6872.8886	5.84	0.01	0.04
7060.5122	6.90	0.00	0.04
7791.2823	7.38	0.00	0.02
8348.755	3.89	0.00	0.04
8458.9196	3.20	0.00	0.04
10912.574	4.23	0.00	0.02

TABLE 7 – Pics différentiels extraits de l'analyse des spectres, avec p-values brutes et p-values corrigées pour contrôle du FDR. Analyse univariée. Barrette IMAC et CM10, intensité haute.

A partir de l'ensemble de ces pics protéiques significativement différentiellement exprimés entre les deux états (accommodants VS rejeteurs), on construit un classifieur à l'aide d'arbres de décisions binaires. L'arbre de décision final pour l'ensemble des variables IMAC et CM10 ne comprend qu'un unique pic à 7,521 kDa, considéré comme biomarqueur diagnostique d'accomodation. Le modèle classifie de façon juste 18 spectres sur 19.

La table de contingence du test basé sur ce biomarqueur, par rapport à l'étalon-or de la biopsie, est détaillée table 8. La sensibilité, sur notre jeu de données d'apprentissage, est de 100%, pour une spécificité de 91% environ. La valeur prédictive positive est de 8/9 soit environ 89%, pour une valeur prédictive négative de 100%. Ces valeurs sont à mettre en rapport avec la faible taille de l'échantillon d'apprentissage.

L'analyse de sensibilité du classifieur, réalisée en *leave 1 out cross-validation*, donne la table de contingence détaillée table 9 et montre une sensibilité de 75% et une spécificité de 72%.

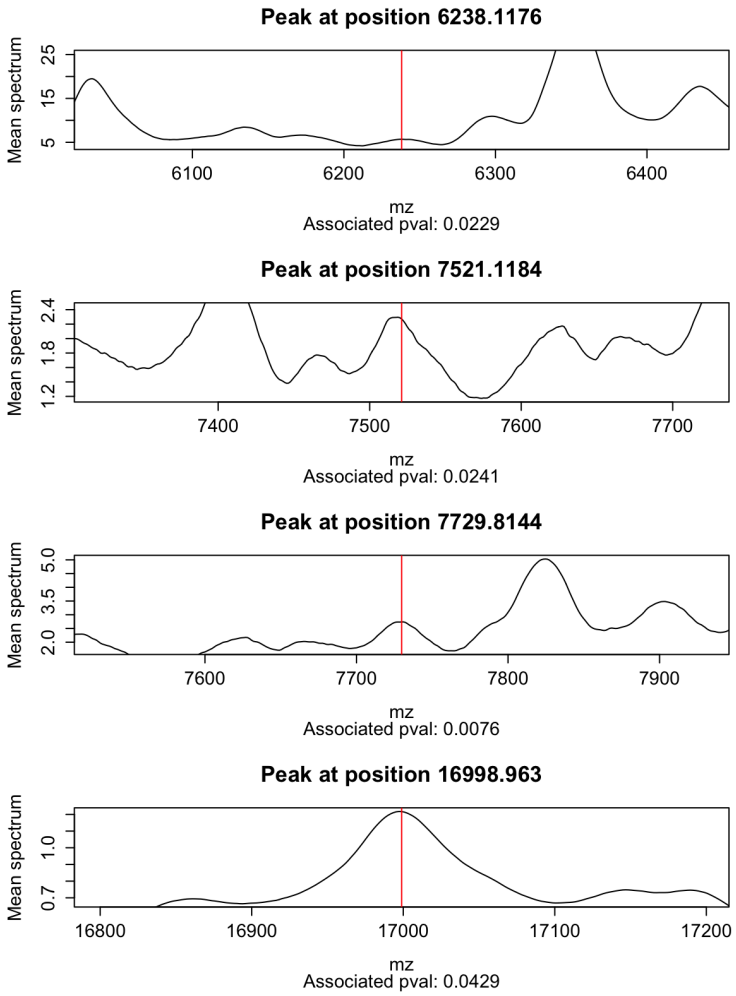


FIGURE 7 – Barrette IMAC. Représentation des pics différentiels sur le spectre moyen. La barre verticale représente la position du pic. La p-value corrigée pour le FDR, associée à ce test, est reportée en légende.

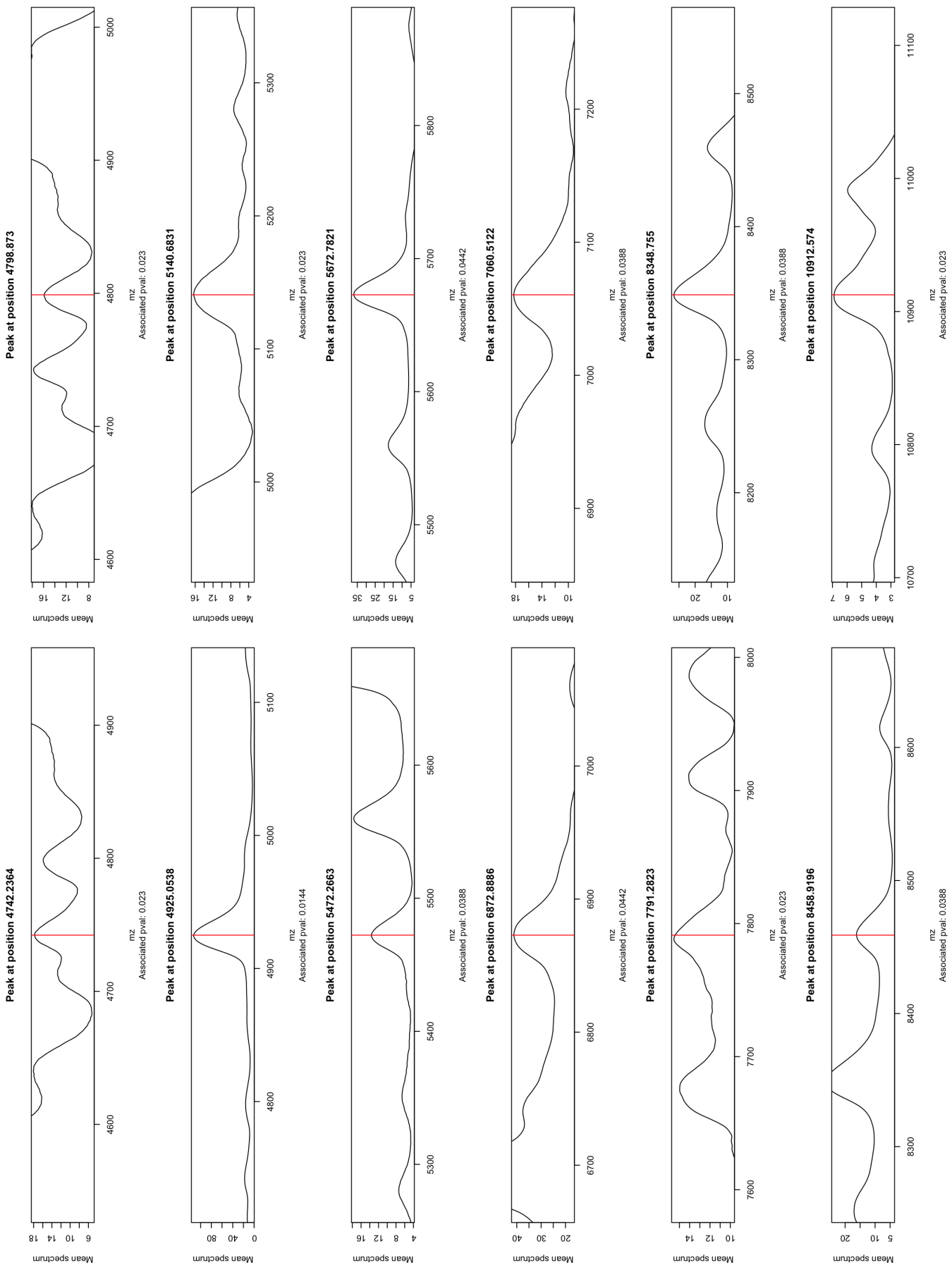


FIGURE 8 – Barrette CM10. Représentation des pics différentiels sur le spectre moyen. La barre verticale représente la position du pic. La p-value corrigée pour le FDR, associée à ce test, est reportée en légende.

	Accommodation prédite	Rejet prédit
Accommodation	8	0
Rejet	1	10

TABLE 8 – Table de contingence du modèle diagnostique par rapport à l'étalon-or biopsie

	Accommodation prédite	Rejet prédit
Accommodation	6	2
Rejet	3	8

TABLE 9 – Table de contingence du modèle diagnostique par rapport à l'étalon-or, en validation interne.

3.2.3 Inclusion des biopsies normales

Afin de réaliser une analyse de sensibilité, l'ensemble des spectres correspondant à des biopsies normales a été inclu dans l'analyse. On utilise pour cette partie les barrettes IMAC, intensité laser haute. Les variables sélectionnées en tests univariés (Kruskal Wallis à 3 groupes accommodant, rejeteur et normal) sont décrites table 10.

Pics	pvalues brutes	pvalues ajustées
7521.1184	0.0022	0.1071
6238.1176	0.0032	0.1071
6502.2199	0.0042	0.1071
15213.874	0.0044	0.1071
7824.5967	0.0048	0.1071
7903.6042	0.0050	0.1071
6599.5102	0.0061	0.1071
9232.5662	0.0066	0.1071
6134.6743	0.0067	0.1071
10014.851	0.0075	0.1083
9900.5455	0.0086	0.1132
6435.1138	0.0107	0.1160
16998.963	0.0109	0.1160
7407.4922	0.0118	0.1160
7729.8144	0.0121	0.1160

TABLE 10 – Variables significatives en test univarié de Kruskal Wallis (KW), au seuil de FDR 15%. pvalues brutes du test de KW et pvalues ajustées pour contrôle du FDR.

Le modèle multivarié par arbres de décisions, basé comme précédemment sur les variables significatives en univarié (au seuil de FDR de 0.15), est représenté figure 9. La première variable utilisée dans cet arbre de classification est la protéine de 7,5kDa identifiée dans l'analyse à 2 groupes de la section 3.2.2. On retrouve la dichotomie accommodant / rejeteur sur cette variable, mais la distinction entre biopsies normales et biopsies accommodant / rejeteur est plus difficile.

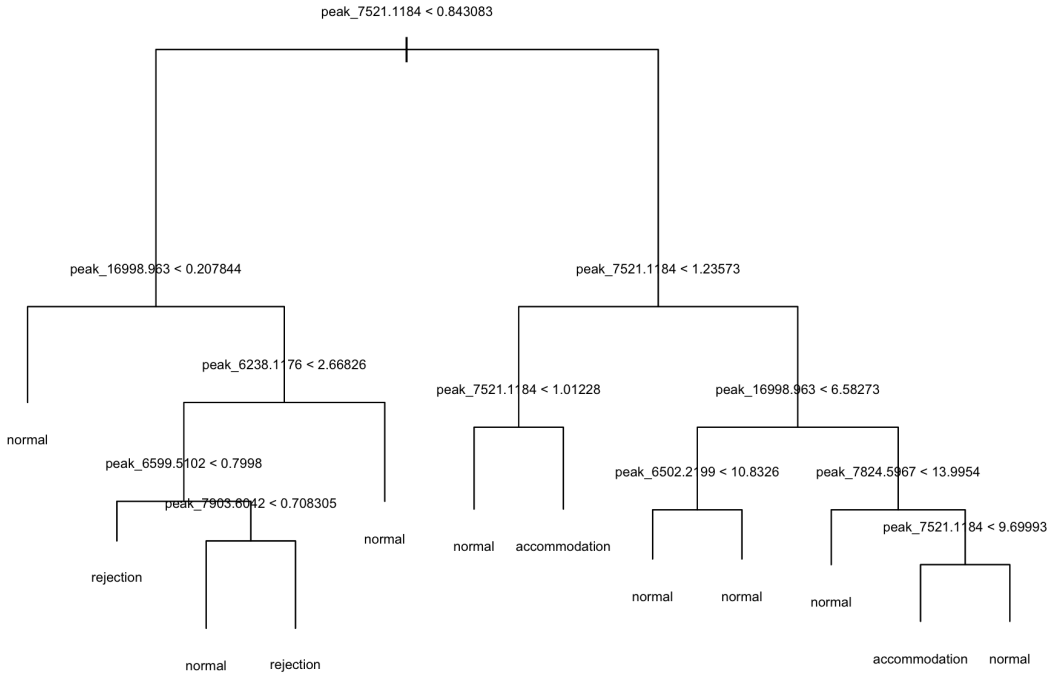


FIGURE 9 – Arbre de décision basé sur les barrettes IMAC, intensité laser haute, pour la classification entre profils accommodant, rejeteur et normal.

4 Discussion

Le rejet humoral chronique est un facteur essentiel de perte de greffon à moyen et long termes. Son identification reste basée sur une biopsie de greffon dans les cas suspectés, notamment lors de l'apparition de DSA. L'existence de patients accommodants pose toutefois question. Des biopsies sont réalisées chez des patients non rejeteurs, d'une part, et les bases moléculaires expliquant l'accommodation versus le rejet restent inconnues d'autre part.

Le travail proposé ici est basé sur une cohorte de 238 patients, dont 80% greffés entre 2011 et 2014. L'ensemble de ces patients a été clairement caractérisé avec au moins une biopsie de greffon, étalon-or de la transplantation rénale. Les données ont été intégrées dans une base de données structurée, extensible et facilement accessible, via notamment une interface Web.

La cohorte recrutée présente une grande homogénéité en terme de stratégie d'immunosuppression, à la fois initiale (induction) et au long cours. La grande majorité des patients inclus ont bénéficié d'une induction par anti-thymoglobulines (ATG) et d'une immunosuppression au long cours par l'habituelle triade tacrolimus-MMF-corticoïdes. Ceci est à prendre en compte

lors des comparaisons à de nombreuses autres études dans lesquelles l'induction par basiliximab est très fréquente. Notre centre a la particularité de proposer un sevrage des corticoïdes à M3, sous condition d'immunité, ce qui implique une double immunosuppression pour une majorité de patients dès cette date atteinte. En terme de mismatchs HLA, les couples donneur-receveur présentent 5 mismatchs en moyenne, un nombre important comme on le retrouve dans beaucoup d'études européennes ou américaines. Les cross-matches par micro-lymphotoxicité, réalisés avant greffe, étaient tous négatifs. La population étudiée ne présente pas de risque immunologique différent des populations de greffés rénaux habituellement rencontrées dans la littérature.

L'analyse inférentielle réalisée a pour objectif de fournir un outil diagnostique non invasif permettant de prédire l'accommodation. Une analyse univariée puis multivariée par Classification and Regression Trees (CART) a permis la mise en évidence d'un marqueur protéique particulier, de masse 7,5kDa, permettant de distinguer les patients accommodants des patient rejeteurs. De manière plus générale, l'analyse en composante principale des données des spectres de masse révèle une intense variabilité et une difficulté à séparer les différents types de réponses immunologiques. L'observation plus particulière des rejeteurs humoraux VS les accommodants montre une meilleure séparabilité de ces deux groupes dans l'espace des pics protéiques.

Néanmoins, il faut nuancer les capacités prédictives de ce marqueur, pour plusieurs raisons à la fois liées à l'échantillon de patients et méthodologiques.

Premièrement, l'échantillon de patients comprend l'ensemble des patients ayant développé des DSA jusqu'à la biopsie de greffon et l'analyse SELDI. Cela réduit la cohorte d'intérêt à 17 patients. Ce point est en particulier dû au temps de suivi atteint pour ce travail. La majorité des patients inclus a été greffée après juillet 2011 (inclue à partir de octobre 2011 pour la biopsie M3). Le suivi moyen est donc largement inférieur à 3 ans, alors que le délai médian de développement des DSA a été notamment évalué par Wiebe à 4,6 ans [12]. La puissance de l'étude est donc très faible et est encore réduite par la prise en compte des tests multiples, toujours rencontrés lors de l'utilisation des techniques *omiques*. Ensuite, nous avons défini comme patients porteurs de DSA les patients ayant eu au moins une identification de DSA par technique Luminex, avant le moment de la biopsie et de l'analyse SELDI. Des travaux récents pointent du doigt la sensibilité peut-être parfois exagérée et non pertinente cliniquement de

cette technique [64], ainsi que l'identification de DSA éphèmères, non durables et sans impact clinique connu [65].

La cohorte composée présente en outre une grande variabilité phénotypique, en terme de néphropathies initiales, de risque de récidive de la néphropathie initiale, de rang de greffe... L'ensemble de ces variables peut impliquer des différences en terme de profils urinaires, qui ajoute une part de variabilité biologique.

Deuxièmement, bien que l'analyse SELDI-TOF ait été le fer de lance de la protéomique au début des années 2000 et ait permis de développer en médecine le concept de profil biologique protéique et ainsi la protéomique, elle présente des limitations importantes. D'une part la précision du rapport masse sur charge est faible, d'autre part il n'est pas possible d'identifier la protéine détectée. On dispose donc d'un profil protéique de l'échantillon, mais d'un marqueur imprécis et imparfait du biomarqueur. La lecture semi-quantitative des intensités ne permet en outre pas d'envisager la technologie SELDI-TOF comme un système de mesure utilisable en pratique clinique.

Enfin, sur le plan statistique, la stratégie multivariée utilisée est basée sur des arbres de décision. Elle ne permet pas une évaluation simultanée des colinéarités, notamment. L'analyse de protéines corégulées est rendue difficile par ce type d'approche, alors même qu'on peut s'attendre à des phénomènes biologiques d'adaptation au niveau néphronique, qui induisent des variations protéomiques associées et corrélées.

En réponse à ses limitations, un suivi prospectif des patients inclus est programmé. La base de données mise en place servira de support, avec une saisie de données facilitée par l'interface Web. Ce suivi prospectif permettra d'améliorer le classifieur diagnostique, puisque des échantillons d'urine supplémentaires sont collectés à M6, M9, M12 et M24 de la greffe. L'extension de la cohorte de patients présentant des DSA permettra de valider (ou invalider) les marqueurs détectés dans ce travail. L'inclusion progressive d'autres individus développant des DSA permettra aussi l'utilisation de modèles statistiques plus performants, comme la régression logistique multivariée avec prise en compte d'effets aléatoires (les individus étudiés n'étant évidemment qu'un échantillon de la population globale d'intérêt).

Le suivi prospectif des patients recrutés ici permettra d'autre part d'établir un outil pronostique. Il s'agira alors, parmi les patients suivis de façon systématique à 3 mois de leur greffe,

d'identifier ceux développant des DSA et ceux évoluant vers le rejet humoral, pour mettre en évidence des marqueurs précoces d'immunisation et d'accommodation. Cela permettra une meilleure prise en charge des patients, par exemple par un suivi accru des anticorps ou le maintien d'une immunosuppression plus intense chez les patients repérés comme à risque.

Au-delà de l'analyse SELDI, qui ne permet pas l'identification protéique, les échantillons d'urine encore disponibles pourront être analysés par des techniques plus précises (notamment spectrométrie en tandem de type MALDI-TOF-TOF). Ces techniques permettront l'identification des marqueurs détectés. L'analyse des fonctions de ces marqueurs protéiques permettra une meilleure compréhension du phénotype des patients rejeteurs et accommodants. Cette analyse peut fournir de nouvelles cibles thérapeutiques, permettant par exemple d'induire l'accommodation. Un autre enjeu est de pouvoir traiter le rejet humoral chronique, qui reste pour le moment de très mauvais pronostic.

En raison d'une part de la taille limitée de la cohorte de patients DSA+ et du contrôle du FDR, la puissance de cette étude est très modérée. Il s'agit avant tout d'une preuve de concept, validant l'intérêt du suivi prospectif de la cohorte de greffés rénaux pour une meilleure compréhension du rejet humoral (notamment chronique).

Le travail réalisé montre que des biomarqueurs urinaires du phénomène d'accommodation existent et peuvent être utilisés pour le diagnostic non invasif du statut de la greffe. Ces biomarqueurs pourront servir, une fois validés, à l'aide à la décision clinique. L'enjeu est de taille, puisqu'il s'agit de détecter les phénomènes de rejet humoral et d'accommodation, afin d'ajuster l'immunosuppression. Ces biomarqueurs doivent permettre, *in fine*, d'améliorer la survie des greffons rénaux. Les comorbidités associées à la dysfonction de greffon et la pénurie d'organes greffables font de cette amélioration un objectif majeur de la transplantation rénale.

5 Annexe

Annexe 1

Protocole de dosage protéique au rouge de Pyrogallol

Préparation solutions réactifs :

— Pyrogallol Red Methanol 60mg de Pyrogallol Red dans 100mL de MeOH

— Disodium molybdate 0.24g dans 10mL d'eau HPLC

Réactif dosage

— 5.9 g de succinic acid

— 0.14 g sodium oxalate

— 0.500 g de sodium benzoate

— + 900mL d'eau HPLC

— + 40mL de PRM

— + 4mL de disodium molybdate

— + 250μL SDS 10%

— Ajuster le pH à 2.5 puis ajuster le volume à 1L

Gamme :

— Solution Mère (SM) : 5mg de protéines urinaires en poudre à diluer dans 500μl d'eau HPLC

— SM : 10mg/mL

— S1 : 2.5mg/mL (30μL SM + 90μL H20)

— S2 : 1.25mg/mL (80μL S1 + 80μL H20)

— S3 : 0.675mg/mL (80μL S2 + 80μL H20)

— S4 : 0.32mg/mL (80μL S3 + 80μL H20)

Dosage :

— Prise d'essai = 10μL

— Volume réactif = 200μL

— Déposer sur plaque 96 puits la gamme *2 et les échantillons *3

— Laisser reposer à température ambiante pendant 30 min

— Lire les mesures au spectrophotomètre Dynex à 600nm.

Protocole de dépôt sur les barrettes SELDI

Préparation des solutions tampons

— CM10 buffer 10X : 1M acetate de sodium (82g/mol), 100ml à pH 4

— CM10 buffer 1X : dilution 1/10

— IMAC neutralizing solution : solution commerciale

— IMAC binding buffer : solution commerciale

— IMAC-Cu charging solution : solution commerciale

— Matrice Acide Sinapinique (SA) : Diluer le contenu du tube dans un mélange ACN (200μl), H2O HPLC (198μl) et TFA 100% (2μl). Vortexer jusqu'à dissolution totale de la poudre.

Calculs des volumes à déposer sur les barrettes.

Dans une plaque 96 puits, déposer le volume d'eau, puis 6μL de tampon 10X (IMAC ou CM10), puis le volume d'échantillon. Il faut que le volume d'échantillon soit supérieur à 5μL. Si ce n'est pas le cas, faire une dilution pour en prélever plus lors du mélange avec l'eau et le tampon 10X. Lorsque cette « plaque mélange » est prête, remuer la doucement à l'aide du vortex pour plaque.

Barrette ProteinChip CM10 (échangeur cationique faible)

Placer les barrettes dans le bioprocesseur et ajouter 150μl du CM10 buffer dans chaque puits. Mettre sous agitation pendant 5 min à température ambiante. Répéter l'opération 1 fois. Vider les puits. Ajouter 50μl d'échantillon. Les échantillons doivent être dilués dans du CM10 buffer. Mettre sous agitation pendant 1h. Vider les puits et laver les avec 150μl de CM10 buffer pendant 5 min sous agitation. Répéter 3 fois l'opération. Vider les puits et ajouter 150μl d'eau milliQ. Jeter tout de suite et répéter l'opération 1 fois. Sécher au papier Whatman puis 5 min à l'air. Ajouter 1μl de matrice SA. Laisser sécher 5 min et ajouter à nouveau 1 μl de matrice. Laisser sécher à l'air. Analyser les barrettes par SELDI-TOF.

Barrette ProteinChip IMAC (Immobilized Metal Affinity Capture)

Placer les barrettes dans le bioprocesseur et ajouter 50μl de solution IMAC-Cu dans chaque puits. Mettre sous agitation pendant 10 min à température ambiante. Vider les puits et ajouter 100μl d'eau milliQ. Agiter pendant 1 min. Vider les puits et ajouter 150μl d'IMAC neutralizing solution. Agiter pendant 5 min Vider les puits et ajouter 100μl d'eau milliQ. Agiter pendant

1 min. Vider les puits et ajouter 150μl d'IMAC binding buffer dans chaque puits. Mettre sous agitation pendant 5 min à température ambiante. Répéter l'opération 1 fois. Vider les puits. Ajouter 50μl d'échantillon. Les échantillons doivent être dilués dans du IMAC buffer. Mettre sous agitation pendant 1h. Vider les puits et laver les avec 150μl d'IMAC binding buffer pendant 5 min sous agitation. Répéter 3 fois l'opération. Vider les puits et ajouter 150μl d'eau milliQ. Jeter tout de suite et répéter l'opération 1 fois. Sécher au papier Whatman puis 5 min à l'air. Ajouter 1μl de matrice SA. Laisser sécher 5 min et ajouter à nouveau 1 μl de matrice. Laisser sécher à l'air. Analyser les barrettes par SELDI-TOF

Annexe 2

short_id	Classe HLA	Date greffe	1ère id.	Nbr. id.	Spécificités
3288xx	2	2005-05-29	2013-03-01	2	DPB1*03, DPB1*14, DPB1*18, DQ7, DR14, DR15, DR16, DPB1*17
1591xx	2	2011-11-15	2012-02-16	1	DR16, DR51, DQ5, DQ6, DQA1*01, DR11, DR15, DR9, DQ4, DR4
1839xx	2	2010-03-16	2013-01-24	1	DQ2, DQA1*05, DR52, DPB1*03, DPB1*04, DPB1*13, DPB1*18, DPB1*28, DR103, DR13, DR16, DR18, DR4
2940xx	2	1998-03-15	2013-03-28	1	DQ7, DQ8, DQ9
2980xx	2	2005-03-11	2012-04-06	3	DQ2, DQ4, DQ7, DQ9, DQA1*02, DQA1*04, DQA1*05, DQA1*06, DR11, DR12, DR13, DR14, DR16, DR17, DR18, DR52, DR8, DR1, DR15, DR4, DR51, DPB1*13, DQ5, DQ6, DR103, DR7, DR9, DPA1*02, DPA1*03, DPB1*05, DPB1*14, DPB1*17, DPB1*18, DPB1*19, DPB1*28, DQA1*01, DR10
3188xx	2	2011-09-10	2013-06-11	1	DR4
3188xx	1	2011-09-10	2011-12-15	2	A32, C7
5197xx	1	1997-12-09	2014-02-06	1	A32, B27, B41, B42, B44, B45, B47, B60, B61, B7, B73, B76, B81, B82, C*01, C*07
5197xx	2	1997-12-09	2012-09-11	1	DQ5, DQ6
6322xx	2	1989-09-07	2012-12-18	2	DQ4, DQ6, DQ7, DQ8, DQA1*03, DQA1*04, DQA1*06, DPA1*02, DPA1*03, DPA1*04, DPB1*03, DPB1*05, DPB1*13, DPB1*28, DQ9, DR1, DR10, DR103, DR15, DR16, DR4, DR51, DR52, DR53, DR9
6322xx	1	1989-09-07	2013-11-04	1	B27, B61, B81, C*07
9541xx	2	2010-11-14	2010-11-14	6	DQ1, DQ4, DQ5, DQ6, DQ9, DR1, DR10, DR103, DR11, DR13, DR14, DR15, DR16, DR17, DR18, DR4, DR51, DR7, DR8, DR9, DR52, DPB0402, DR3, DPB1*04 :02, DPB1*01, DPB1*03, DPB1*04, DPB1*05, DPB1*13, DPB1*14, DPB1*17, DPB1*18, DPB1*19, DQA1*01, DQA1*04, DQA1*06, DPB1*02, DPB1*28
9541xx	1	2010-11-14	2010-11-14	2	B49, CW0401
9544xx	2	2004-08-03	2013-01-10	1	DQ7, DQ2
9709xx	2	2002-01-28	2012-09-24	1	DQA1*04, DQA1*05, DQA1*06
9940xx	2	2006-02-13	2012-06-25	2	DQ2, DQ7, DQ9, DQA1*02, DQA1*05, DQA1*06, DR53
1133xx	2	2004-01-26	2013-04-09	1	DPB1*03, DPB1*04, DPB1*28, DQ7, DR10, DR103, DR16, DR4, DR53, DQ6
1141xx	2	2007-09-05	2013-05-30	1	DPA1*01, DPA1*03, DPB1*04, DQ4, DQA1*03, DPB1*02, DPB1*03, DPB1*18, DPB1*28, DQ5, DQ6, DR103, DR17, DR18, DR4, DR52, DR53, DR8, DR9
1141xx	1	2007-09-05	2012-05-29	4	A24, B13, B27, B37, B44, B47, B49, B51, B52, B53, B57, B58, B63, B77, A23, A25, A29, A32, A66, A68, B38, B48, A11, A33, B50, B76, B61, B81, B60
1154xx	2	2006-11-13	2012-01-09	2	DQ2
1182xx	2	2005-08-17	2011-03-22	1	DQ4
1190xx	2	2005-03-19	2012-08-06	2	DQ2, DR7
1228xx	2	2007-08-29	2012-01-27	4	DQ5, DQ6, DQA1*01, DPB1*18
1328xx	2	2007-04-06	2012-06-11	2	DQ4, DQ5, DQ6, DQA1*01, DR15
1338xx	2	2011-07-08	2014-02-28	1	DQ6
1384xx	2	2012-01-20	2012-04-26	3	DQ7, DQ8, DQ9, DQA1*03, DQA1*04, DQA1*06, DQ4, DQ9(3), DQ8(3), DQA1*02
1459xx	2	2010-08-25	2011-09-29	5	DR15, DPB0201, DPB1*02, DQ2, DQA1*05
1526xx	1	2009-11-20	2012-03-28	1	C*07
1530xx	2	2011-08-24	2011-08-24	1	DR1, DR10, DR103, DR11, DR12, DR13, DR3, DR4, DR51, DR52, DR9, DPB1*02 :01, DPB1*03 :01
1530xx	1	2011-08-24	2011-08-24	1	A11, A24, A29, A3, A34, A36, B7
1591xx	2	2011-02-11	2012-12-20	1	DQ2
1708xx	2	2011-09-30	2012-04-03	2	DR11, DR12, DR13, DR14, DR17, DR18, DR52, DR8, DPB1*18, DQ6, DQ7, DQ8, DQ9, DQA1*01, DR7, DR9
1751xx	1	2011-07-17	2012-09-19	4	A23, C*05, A24, A26, C*18, A11, A43, B39, B49, B58, B60, B64, B65, B8, C*01, C*02, B44, B47, B7, C*07, C*08, C*17, B27, B35, B61, B77
1768xx	2	2012-05-21	2014-02-04	2	DQ6, DQA1*01, DQ5
1769xx	2	2012-10-02	2013-08-28	2	DQ2, DQ7(3), DQA1*03, DQA1*05
1800xx	2	2012-10-18	2013-01-22	2	DQ2, DQA1*05
1900xx	2	2013-12-18	2013-12-17	1	DR1, DR4
1925xx	2	2012-04-26	2012-07-31	2	DPB1*02, DQ6, DQA1*01, DR51, DP02, DQ5
1928xx	2	2012-07-29	2014-02-18	1	DQ5, DQ6, DQA1*01
1951xx	2	2012-06-28	2013-07-18	3	DQ7, DQ9, DQA1*04, DQA1*05, DQ2, DQ4, DQ8, DQA1*03, DQA1*06, DR53
2048xx	2	2013-01-15	2014-01-14	1	DR53
2066xx	2	2013-07-24	2014-05-19	1	DQ7, DQ8, DQ9, DQA1*03
2073xx	2	2012-05-10	2013-01-24	2	DQ6, DQA1*01, DQ4, DQ5, DR4, DR52, DPB1*03, DPB1*04, DR16, DPB1*18, DR18
2122xx	2	2012-04-05	2013-10-04	1	DQ2
2124xx	2	2012-06-25	2013-06-03	1	DR15, DR51, DR1
2151xx	2	2013-01-10	2013-09-03	2	DQ2, DR4, DR53
2240xx	1	2013-11-14	2013-11-28	1	A68, B35, B41, B44, B45, B47, B49, B50, B53, B54, B55, B56, B58, B60, B62, B63, B71, B72, B75, B76, B78, B82, B51, B57, B61

TABLE 11 – Données individuelles des anticorps anti-HLA, par patient. Date de première identification et liste des anticorps anti-HLA rencontrés

Bibliographie

Références

[1] Lorraine C. Racusen, Kim Solez, Robert B. Colvin, Stephen M. Bonsib, Maria C. Castro, Tito Cavallo, Byron P. Croker, A. Jake Demetris, Cynthia B. Drachenberg, Agnes B. Fogo, Peter Furness, Lillian W. Gaber, Ian W. Gibson, Dennis Glotz, Julio C. Goldberg, Joseph Grande, Philip F. Halloran, H. E. Hansen, Barry Hartley, Pekka J. Hayry, Claire M. Hill, Ernesto O. Hoffman, Lawrence G. Hunsicker, Anne S. Lindblad, Niels Marcussen, Michael J. Mihatsch, Tibor Nadasdy, Peter Nickerson, T. Steen Olsen, John C. Papadimitriou, Parmjeet S. Randhawa, David C. Rayner, Ian Roberts, Stephen Rose, David Rush, Luis Salinas-Madrigal, Daniel R. Salomon, Stale Sund, Eero Taskinen, Kiril Trpkov, and Yutaka Yamaguchi. The banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney International*, 55(2) :713–723, February 1999. ISSN 0085-2538. URL `http://www.nature.com/ki/journal/v55/n2/full/4490631a.html`.

[2] Lorraine C. Racusen, Robert B. Colvin, Kim Solez, Michael J. Mihatsch, Philip F. Halloran, Patricia M. Campbell, Michael J. Cecka, Jean-Pierre Cosyns, Anthony J. Demetris, Michael C. Fishbein, Agnes Fogo, Peter Furness, Ian W. Gibson, Denis Glotz, Pekka Hayry, Lawrence Hunsickern, Michael Kashgarian, Ronald Kerman, Alex J. Magil, Robert Montgomery, Kunio Morozumi, Volker Nickeleit, Parmjeet Randhawa, Heinz Regele, Daniel Seron, Surya Seshan, Stale Sund, and Kiril Trpkov. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the banff 97 classification of renal allograft rejection. *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 3(6) :708–714, June 2003. ISSN 1600-6135.

[3] K. Solez, R. B. Colvin, L. C. Racusen, B. Sis, P. F. Halloran, P. E. Birk, P. M. Campbell, M. Cascalho, A. B. Collins, A. J. Demetris, C. B. Drachenberg, I. W. Gibson, P. C. Grimm, M. Haas, E. Lerut, H. Liapis, R. B. Mannon, P. B. Marcus, M. Mengel, M. J. Mihatsch, B. J. Nankivell, V. Nickeleit, J. C. Papadimitriou, J. L. Platt, P. Randhawa, I. Roberts, L. Salinas-Madriga, D. R. Salomon, D. Seron, M. Sheaff, and J. J. Weening. Banff '05 meeting report : Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *American Journal of Transplantation*, 7(3) :518–526, March 2007. ISSN 1600-6143. URL `http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1111/j.1600-6143.2006.01688.x/abstract`.

[4] K. Solez, R. B. Colvin, L. C. Racusen, M. Haas, B. Sis, M. Mengel, P. F. Halloran, W. Baldwin, G. Banfi, A. B. Collins, F. Cosio, D. S. R. David, C. Drachenberg, G. Einecke, A. B. Fogo, I. W. Gibson, D. Glotz, S. S. Iskandar, E. Kraus, E. Lerut, R. B. Mannon, M. Mihatsch, B. J. Nankivell, V. Nickeleit, J. C. Papadimitriou, P. Randhawa, H. Regele, K. Renaudin, I. Roberts, D. Seron, R. N. Smith, and M. Valente. Banff 07 classification of renal allograft pathology : Updates and future directions. *American Journal of Transplantation*, 8(4) :753–760, April 2008. ISSN 1600-6143. URL `http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1111/j.1600-6143.2008.02159.x/abstract`.

[5] M Mengel, B Sis, M Haas, R B Colvin, P F Halloran, L C Racusen, K Solez, L Cendales, A J Demetris, C B Drachenberg, C F Farver, E R Rodriguez, W D Wallace, D Glotz, and Banff meeting report writing committee. Banff 2011 meeting report : new concepts in antibody-mediated rejection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 12(3) :563–570, March 2012. ISSN 1600-6143.

[6] M Haas, B Sis, L C Racusen, K Solez, D Glotz, R B Colvin, M C R Castro, D S R David, E David-Neto, S M Bagnasco, L C Cendales, L D Cornell, A J Demetris, C B Drachenberg, C F Farver, A B Farris, 3rd, I W Gibson, E Kraus, H Liapis, A Loupy, V Nickeleit, P Randhawa, E R Rodriguez, D Rush, R N Smith, C D Tan, W D Wallace, M Mengel, and Banff meeting report writing committee. Banff 2013 meeting report : inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 14(2) :272–283, February 2014. ISSN 1600-6143.

[7] H. E. Feucht, E. Felber, M. J. Gokel, G. Hillebrand, U. Nattermann, C. Brockmeyer, E. Held, G. Riethmüller, W. Land, and E. Albert. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clinical and Experimental Immunology*, 86(3) :464–470, December 1991. ISSN 0009-9104.

[8] H. E. Feucht, H. Schneeberger, G. Hillebrand, K. Burkhardt, M. Weiss, G. Riethmüller, W. Land, and E. Albert. Capillary deposition of c4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney International*, 43(6) :1333–1338, June 1993. ISSN 0085-2538.

[9] Kazunori Murata and William M. Baldwin. Mechanisms of complement activation, c4d deposition, and their contribution to the pathogenesis of antibody-mediated rejection. *Transplantation Reviews (Orlando, Fla.)*, 23(3) :139–150, July 2009. ISSN 1557-9816.

[10] Asami Takeda, Yasuhiro Otsuka, Keiji Horike, Daijo Inaguma, Takahisa Hiramitsu, Takayuki Yamamoto, Koji Nanmoku, Norihiko Goto, Yoshihiko Watarai, Kazuharu Uchida, Kunio Morozumi, and Takaaki Kobayashi. Significance of c4d deposition in antibody-mediated rejection. *Clinical transplantation*, 26 Suppl 24 :43–48, July 2012. ISSN 1399-0012.

[11] Mark D Stegall, Marcio F Chedid, and Lynn D Cornell. The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Nature reviews. Nephrology*, 8(11) :670–678, November 2012. ISSN 1759-507X.

[12] C. Wiebe, I. W. Gibson, T. D. Blydt-Hansen, M. Karpinski, J. Ho, L. J. Storsley, A. Goldberg, P. E. Birk, D. N. Rush, and P. W. Nickerson. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 12(5) :1157–1167, May 2012. ISSN 1600-6143.

[13] Alexandre Loupy and Stanley C. Jordan. Transplantation : Donor-specific HLA antibodies and renal allograft failure. *Nature Reviews. Nephrology*, 9(3) :130–131, March 2013. ISSN 1759-507X.

[14] Judith E. Worthington, Susan Martin, Dalia M. Al-Husseini, Philip A. Dyer, and Robert W. G. Johnson. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation*, 75(7) :1034–1040, April 2003. ISSN 0041-1337.

[15] Maryvonne Hourmant, Anne Cesbron-Gautier, Paul I. Terasaki, Kazuo Mizutani, Anne Moreau, Aurélie Meurette, Jacques Dantal, Magali Giral, Gilles Blancho, Diego Cantarovich, Georges Karam, Gilles Follea, Jean-Paul Soulillou, and Jean-Denis Bignon. Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 16(9) :2804–2812, September 2005. ISSN 1046-6673.

[16] Kazuo Mizutani, Paul Terasaki, Anne Rosen, Violet Esquenazi, Joshua Miller, Remi N. J. Shih, Rui Pei, Miyuki Ozawa, and Jarhow Lee. Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 5(9) :2265–2272, September 2005. ISSN 1600-6135.

[17] Q. Mao, P. I. Terasaki, J. Cai, K. Briley, P. Catrou, C. Haisch, and L. Rebellato. Extremely high association between appearance of HLA antibodies and failure of kidney grafts in a five-year longitudinal study. *American Journal of Transplantation*, 7(4) : 864–871, April 2007. ISSN 1600-6143. URL `http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1111/j.1600-6143.2006.01711.x/abstract`.

[18] P. I. Terasaki, M. Ozawa, and R. Castro. Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 7(2) :408–415, February 2007. ISSN 1600-6135.

[19] R. N. Smith, T. Kawai, S. Boskovic, O. Nadazdin, D. H. Sachs, A. B. Cosimi, and R. B. Colvin. Four stages and lack of stable accommodation in chronic alloantibody-mediated renal allograft rejection in cynomolgus monkeys. *American Journal of Transplantation*, 8(8) :1662–1672, August 2008. ISSN 1600-6143. URL `http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1111/j.1600-6143.2008.02303.x/abstract`.

[20] G. Bartel, H. Regele, M. Wahrmann, N. Huttary, M. Exner, W. H. Hörl, and G. A. Böhmig. Posttransplant HLA alloreactivity in stable kidney transplant recipients—incidences and impact on long-term allograft outcomes. *American Journal of Transplantation*, 8(12) :2652–2660, December 2008. ISSN 1600-6143. URL `http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1111/j.1600-6143.2008.02428.x/abstract`.

[21] Alexandre Loupy, Gary S Hill, and Stanley C Jordan. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nature reviews. Nephrology*, 8(6) :348–357, June 2012. ISSN 1759-507X.

[22] Matthew J Everly. Summarizing the use of donor specific anti-HLA antibody monitoring in transplant patients. *Clinical transplants*, pages 333–336, 2011. ISSN 0890-9016.

[23] Chris Wiebe and Peter Nickerson. Posttransplant monitoring of de novo human leukocyte antigen donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Current opinion in organ transplantation*, 18(4) :470–477, August 2013. ISSN 1531-7013.

[24] Brian J. Nankivell and Stephen I. Alexander. Rejection of the kidney allograft. *The New England Journal of Medicine*, 363 (15) :1451–1462, October 2010. ISSN 1533-4406.

[25] Lars P Kihm, Martin Zeier, and Christian Morath. Emerging drugs for the treatment of transplant rejection. *Expert opinion on emerging drugs*, 16(4) :683–695, December 2011. ISSN 1744-7623.

[26] Miae Kim, Spencer T Martin, Keri R Townsend, and Steven Gabardi. Antibody-mediated rejection in kidney transplantation : A review of pathophysiology, diagnosis, and treatment options. *Pharmacotherapy*, April 2014. ISSN 1875-9114.

[27] C. Lefaucheur, D. Nochy, J. Andrade, J. Verine, C. Gautreau, D. Charron, G. S. Hill, D. Glotz, and C. Suberbielle-Boissel. Comparison of combination plasmapheresis/IVIg/anti-CD20 versus high-dose IVIg in the treatment of antibody-mediated rejection. *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 9(5) :1099–1107, May 2009. ISSN 1600-6143.

[28] Alexandre Loupy, Caroline Suberbielle-Boissel, Julien Zuber, Dany Anglicheau, Marc-Olivier Timsit, Frank Martinez, Eric Thervet, Patrick Bruneval, Dominique Charron, Gary S. Hill, Dominique Nochy, and Christophe Legendre. Combined post-transplant prophylactic IVIg/anti-CD 20/plasmapheresis in kidney recipients with preformed donor-specific antibodies : a pilot study. *Transplantation*, 89(11) :1403–1410, June 2010. ISSN 1534-6080.

[29] J. M. DeVos, S. J. Patel, K. M. Burns, S. Dilioglou, L. W. Gaber, R. J. Knight, A. O. Gaber, and G. A. Land. De novo donor specific antibodies and patient outcomes in renal transplantation. *Clinical Transplants*, pages 351–358, 2011. ISSN 0890-9016.

[30] Toshihito Hirai, Miyuki Furusawa, Kazuya Omoto, Hideki Ishida, and Kazunari Tanabe. Analysis of predictive and preventive factors for de novo DSA in kidney transplant recipients. *Transplantation*, April 2014. ISSN 1534-6080.

[31] Matthew J. Everly, Lorita M. Rebellato, Carl E. Haisch, Miyuki Ozawa, Karen Parker, Kimberly P. Briley, Paul G. Catrou, Paul Bolin, William T. Kendrick, Scott A. Kendrick, Robert C. Harland, and Paul I. Terasaki. Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. *Transplantation*, 95(3) :410–417, February 2013. ISSN 1534-6080.

[32] Walter D. Park, Joseph P. Grande, Dora Ninova, Karl A. Nath, Jeffrey L. Platt, James M. Gloor, and Mark D. Stegall. Accommodation in ABO-incompatible kidney allografts, a novel mechanism of self-protection against antibody-mediated injury. *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 3(8) :952–960, August 2003. ISSN 1600-6135.

[33] Raymond J. Lynch and Jeffrey L. Platt. Accommodation in organ transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 13(2) :165–170, April 2008. ISSN 1531-7013.

[34] Raymond J. Lynch and Jeffrey L. Platt. Escaping from rejection. *Transplantation*, 88(11) :1233–1236, December 2009. ISSN 1534-6080.

[35] Jeffrey L Platt. Antibodies in transplantation. *Discovery medicine*, 10(51) :125–133, August 2010. ISSN 1944-7930.

[36] J. L. Platt. Accommodation : how you see it, how you don't. *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 11(10) :2007–2008, October 2011. ISSN 1600-6143.

[37] M Banasik, M Boratyńska, K Kościelska-Kasprzak, O Mazanowska, M Krajewska, M Zabińska, D Bartoszek, M Myszka, B Nowakowska, T Dawiskiba, A Lepiesza, P Chudoba, and M Klinger. The impact of de novo donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies on 5-year renal transplant outcome. *Transplantation proceedings*, 45(4) :1449–1452, May 2013. ISSN 1873-2623.

[38] Lionel Rostaing and Nassim Kamar. Can we prevent donor-specific antibodies from developing after ABO-incompatible kidney transplantation ? *Kidney International*, 85(2) :245–247, February 2014. ISSN 0085-2538. URL `http://www.nature.com.gate2.inist.fr/ki/journal/v85/n2/full/ki2013425a.html`.

[39] Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints : preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69(3) :89–95, March 2001. ISSN 0009-9236.

[40] Eberhard Wieland, Christoph J Olbricht, Caner Süsal, Purevtseren Gurragchaa, Torsten Böhler, Moshe Israeli, Claudia Sommerer, Klemens Budde, Bertram Hartmann, Maria Shipkova, and Michael Oellerich. Biomarkers as a tool for management of immunosuppression in transplant patients. *Therapeutic drug monitoring*, 32(5) :560–572, October 2010. ISSN 1536-3694.

[41] Katherine A Barraclough, Christine E Staatz, Nicole M Isbel, and Steven J Mctaggart. Review : Pharmacodynamic monitoring of immunosuppression in kidney transplantation. *Nephrology*, 15(5) :522–532, August 2010. ISSN 1440-1797. URL `http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1111/j.1440-1797.2010.01349.x/abstract`.

[42] Julie Ho, Chris Wiebe, Ian W. Gibson, David N. Rush, and Peter W. Nickerson. Immune monitoring of kidney allografts. *American Journal of Kidney Diseases : The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 60(4) :629–640, October 2012. ISSN 1523-6838.

[43] Denise J Lo, Bruce Kaplan, and Allan D Kirk. Biomarkers for kidney transplant rejection. *Nature reviews. Nephrology*, 10 (4) :215–225, April 2014. ISSN 1759-507X.

[44] Xiaoting Ling, Jun Xiong, Wenhua Liang, Paul M. Schroder, Linwei Wu, Weiqiang Ju, Yuan Kong, Yushu Shang, Zhiyong Guo, and Xiaoshun He. Can immune cell function assay identify patients at risk of infection or rejection ? a meta-analysis. *Transplantation*, 93(7) :737–743, April 2012. ISSN 1534-6080.

[45] Alexandre Loupy, Carmen Lefaucheur, Dewi Vernerey, Jessica Chang, Luis G Hidalgo, Thibaut Beuscart, Jerome Verine, Olivier Aubert, Sébastien Dubleumortier, Jean-Paul Duong van Huyen, Xavier Jouven, Denis Glotz, Christophe Legendre, and Philip F Halloran. Molecular microscope strategy to improve risk stratification in early antibody-mediated kidney allograft rejection. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, April 2014. ISSN 1533-3450.

[46] P F Halloran, A B Pereira, J Chang, A Matas, M Picton, D De Freitas, J Bromberg, D Serón, J Sellarés, G Einecke, and J Reeve. Microarray diagnosis of antibody-mediated rejection in kidney transplant biopsies : an international prospective study (INTERCOM). *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 13(11) :2865–2874, November 2013. ISSN 1600-6143.

[47] J Sellarés, J Reeve, A Loupy, M Mengel, B Sis, A Skene, D G de Freitas, C Kreepala, L G Hidalgo, K S Famulski, and P F Halloran. Molecular diagnosis of antibody-mediated rejection in human kidney transplants. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 13(4) : 971–983, April 2013. ISSN 1600-6143.

[48] Banu Sis, Gian S. Jhangri, Sakarn Bunnag, Kara Allanach, Bruce Kaplan, and Philip F. Halloran. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of c4d staining. *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 9(10) :2312–2323, October 2009. ISSN 1600-6143.

[49] Banu Sis and Philip F. Halloran. Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype : C4d-negative antibody-mediated rejection. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 15(1) :42–48, February 2010. ISSN 1531-7013.

[50] Liat Ein-Dor, Itai Kela, Gad Getz, David Givol, and Eytan Domany. Outcome signature genes in breast cancer : is there a unique set ? *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21(2) :171–178, January 2005. ISSN 1367-4803.

[51] Liat Ein-Dor, Or Zuk, and Eytan Domany. Thousands of samples are needed to generate a robust gene list for predicting outcome in cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(15) :5923–5928, April 2006. ISSN 0027-8424.

[52] Chirag R Parikh and Heather Thiessen-Philbrook. Key concepts and limitations of statistical methods for evaluating biomarkers of kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, May 2014. ISSN 1533-3450.

[53] E Sárváry, P Borka, B Sulyok, A Péter, Z Vass, G Rákóczy, L Selmeci, L Takács, J Járay, and F Perner. Diagnostic value of urinary enzyme determination in renal transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*, 9 Suppl 1 :S68–72, 1996. ISSN 0934-0874.

[54] Emanuel F. Petricoin, Ali M. Ardekani, Ben A. Hitt, Peter J. Levine, Vincent A. Fusaro, Seth M. Steinberg, Gordon B. Mills, Charles Simone, David A. Fishman, Elise C. Kohn, and Lance A. Liotta. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*, 359(9306) :572–577, February 2002. ISSN 0140-6736.

[55] William Clarke, Benjamin C Silverman, Zhen Zhang, Daniel W Chan, Andrew S Klein, and Ernesto P Molmenti. Characterization of renal allograft rejection by urinary proteomic analysis. *Annals of surgery*, 237(5) :660–664 ; discussion 664–665, May 2003. ISSN 0003-4932.

[56] Edmond O'Riordan, Tatyana N Orlova, Jianfeng Mei J, Khalid Butt, Praveen M Chander, Shafiq Rahman, Muong Mya, Rena Hu, Jahangir Momin, Elizabeth W Eng, Dierk J Hampel, Bertram Hartman, Matthias Kretzler, Veronica Delaney, and Michael S Goligorsky. Bioinformatic analysis of the urine proteome of acute allograft rejection. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 15(12) :3240–3248, December 2004. ISSN 1046-6673.

[57] Luís F. Quintana, Amanda Solé-Gonzalez, Susana G. Kalko, Elisenda Bañon-Maneus, Manel Solé, Fritz Diekmann, Alex Gutierrez-Dalmau, Joaquin Abian, and Josep M. Campistol. Urine proteomics to detect biomarkers for chronic allograft dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(2) :428–435, January 2009. ISSN 1046-6673, 1533-3450. URL `http://jasn.asnjournals.org/content/20/2/428`.

[58] Tara K. Sigdel, Sangho Lee, and Minnie M. Sarwal. Profiling the proteome in renal transplantation. *PROTEOMICS – Clinical Applications*, 5(5-6) :269–280, June 2011. ISSN 1862-8354. URL `http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1002/prca.201000117/abstract`.

[59] Rachel Tetaz, Candice Trocmé, Mathieu Roustit, Nicole Pinel, François Bayle, Bertrand Toussaint, and Philippe Zaoui. Predictive diagnostic of chronic allograft dysfunction using urinary proteomics analysis. *Annals of transplantation : quarterly of the Polish Transplantation Society*, 17(3) :52–60, September 2012. ISSN 2329-0358.

[60] Steven C Kim, Eugenia K Page, and Stuart J Knechtle. Urine proteomics in kidney transplantation. *Transplantation reviews (Orlando, Fla.)*, 28(1) :15–20, January 2014. ISSN 1557-9816.

[61] Goce Spasovski, Alberto Ortiz, Raymond Vanholder, and Meguid El Nahas. Proteomics in chronic kidney disease : The issues clinical nephrologists need an answer for. *PROTEOMICS – Clinical Applications*, 5(5-6) :233–240, June 2011. ISSN 1862-8354. URL `http://onlinelibrary.wiley.com.gate2.inist.fr/doi/10.1002/prca.201000150/abstract`.

[62] H Amer, J C Lieske, A D Rule, W K Kremers, T S Larson, C R Franco Palacios, M D Stegall, and F G Cosio. Urine high and low molecular weight proteins one-year post-kidney transplant : relationship to histology and graft survival. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 13(3) :676–684, March 2013. ISSN 1600-6143.

[63] Yoav Benjamini and Yosef Hochberg. Controlling the false discovery rate : A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57(1) :289–300, January 1995. ISSN 0035-9246. URL `http://www.jstor.org/stable/2346101`.

[64] P. Gombos, G. Opelz, S. Scherer, C. Morath, M. Zeier, P. Schemmer, and C. Süsal. Influence of test technique on sensitization status of patients on the kidney transplant waiting list. *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 13(8) :2075–2082, August 2013. ISSN 1600-6143.

[65] Raymond L. Heilman, Ala Nijim, Yvonne M. Desmarteau, Hasan Khamash, Marcelo Jorge Pando, Maxwell L. Smith, Harini A. Chakkera, Janna Huskey, Riccardo Valdez, and Kunam Sudhakar Reddy. De novo donor-specific human leukocyte antigen antibodies early after kidney transplantation. *Transplantation*, May 2014. ISSN 1534-6080.

(*) THESE SOUTENUE PAR :
Thomas JOUVE

(*) TITRE :

Intérêt de la protéomique pour l'identification de marqueurs diagnostiques d'accommodation en greffe rénale.

(*) CONCLUSION

Le rejet humoral chronique représente une cause de dysfonction du greffon médiée par la présence d'anticorps dirigés contre le greffon. Toutefois, des états d'accommodation sont décrits, correspondant à un état où les anticorps dirigés contre le greffon ne sont pas toxiques. Le travail réalisé ici consiste à mettre en évidence des marqueurs protéiques urinaires d'accommodation en transplantation rénale. L'ensemble des patients greffés rénaux suivis au CHU Grenoble et ayant bénéficié d'une biopsie entre octobre 2011 et mai 2014 ont été inclus dans l'étude (n=250). Une analyse spectrométrique SELDI-TOF a été réalisée sur l'urine afin de rechercher des marqueurs différentiels entre le groupe des patients "accommodants" et le groupe des patients "rejeteurs". Un classifieur basé sur des arbres de décision a été construit sur l'ensemble des variables différentiellement exprimées en tests univariés. La comparaison des pics protéiques entre les 2 groupes "accomodants " versus " "rejeteurs" a permis de mettre en évidence un pic protéique différentiel de masse 7,52 kDa. Le classifieur ainsi construit permet d'obtenir une sensibilité de 100% et une spécificité de 91%, soit une valeur prédictive positive de 89% et négative de 100%. L'analyse protéomique urinaire permet l'identification d'un marqueur protéique permettant le diagnostic d'accommodation, de façon non invasive. Ces résultats devront être validés sur une cohorte externe. La cohorte de patients pourra être suivie de façon prospective afin de mettre en évidence des marqueurs pronostiques d'accommodation, permettant une prise en charge précoce et optimale des patients rejeteurs.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le 06.10.14

LE DOYEN

FACULTÉ DE MÉDECINE SCOLARITÉ

J.P. ROMANET

LE PRESIDENT DE LA THESE

PROFESSEUR Zaoui

Résumé

Contexte : La transplantation rénale est le traitement de référence de suppléance rénale en cas d'insuffisance rénale chronique terminale. La durée de survie des greffons s'est améliorée jusqu'au début du XXIème siècle, mais elle est maintenant limitée par les dysfonctions tardives. Parmi ces dysfonctions, les rejets humoraux chroniques (RHC) sont une cause majeure. Les anticorps anti-donneurs (DSA) jouent un rôle prépondérant dans ces rejets. Toutefois, certains patients développent des DSA sans lésion rénale, c'est à dire un élément diagnostique de RHC sans conséquence, un phénomène appelé accommodation. Notre compréhension et nos outils diagnostiques de l'accommodation sont très limités. Dans cette étude, nous développons une stratégie d'identification de biomarqueurs de l'état d'accommodation.

Patients et méthodes : L'ensemble des patients ayant bénéficié d'une biopsie de greffon rénale entre octobre 2011 et mai 2014, au CHU de Grenoble, a été inclu dans l'étude. Un échantillon d'urine a été analysé par spectrométrie de masse SELDI-TOF. La biopsie rénale a été analysée simultanément, à la recherche notamment de signes de RHC. Un classifieur basé sur les biomarqueurs urinaires a été construit, pour diagnostiquer l'état d'accommodation VS le rejet humoral. Une stratégie de contrôle du risque de première espèce (FDR) a été utilisée pour prendre en compte la multiplicité des tests.

Résultats : 238 patients ont été inclus dans l'étude. Trente-neuf patients en tout ont développé des DSA, parmi lesquels 17 ont développé des DSA avant ou au moment de la biopsie. Ces 17 patients ont donné 19 profils urinaires, parmi lesquels 9 étaient accommodants et 10 étaient rejeteurs. La médiane de suivi était de 750 jours. L'analyse statistique a révélé un biomarqueur de masse 7,5kDa, pouvant discriminer entre accommodation et rejet. L'analyse de sensibilité menée avec les spectres correspondant à des biopsies normales en plus des deux autres groupes a montré le même pic protéique.

Conclusion : un biomarqueur urinaire d'accommodation est détecté, qui pourrait aider à discriminer les patients accommodants des patients rejeteurs, parmi les patients développant des DSA. Bien que ce biomarqueur requiert une validation externe, cette étude montre que des biomarqueurs diagnostiques peuvent être trouvés dans l'urine des patients transplantés. La cohorte étudiée pourra être suivie de façon prospective afin d'identifier des biomarqueurs pronostiques précoces d'accommodation. Ces biomarqueurs seraient les plus utiles aux cliniciens.

Abstract

Background : Kidney transplantation is the mainstay of renal replacement therapy following end stage kidney disease. While graft survival steadily improved until the beginning of the XXIst century, it is now limited by late dysfunctions, among which antibody-mediated rejection (ABMR) is a major cause. Donor-specific antibodies (DSA) were shown to play a dominant role in these rejection phenomena. However, some patients develop DSA without sustaining graft damages, that is, signs of ABMR without consequences, a phenomenon called accommodation. Our understanding and our diagnostic tools of accommodation are extremely limited. In this study, we develop a strategy to identify urinary diagnostic biomarkers for the state of accommodation.

Patients and methods : We recruited all kidney transplant recipients undergoing a graft biopsy between october 2011 and may 2014 at Grenoble University Hospital. A urinary sample was analyzed with a SELDI-TOF mass-spectrometer. The graft biopsy was simultaneously assessed for signs of ABMR. A biomarker-based classifier was built to diagnose the state of accommodation VS rejection. False Discovery Rate controlling strategies were used to handle the large number of potential biomarkers.

Results : 238 patients were enrolled in the study. 39 patients developed DSA overall. Seventeen patients developed DSA before or at the time of biopsy. These 17 patients led to 19 urinary profiles, 9 were accommodant and 10 were rejectors. Median follow-up time was 750 days. Statistical analyses revealed a biomarker of mass 7,5kDa that could discriminate between accommodation and rejection. As a sensitivity analysis, a model discriminating between the two previous states and normal biopsies showed the same protein peak.

Conclusion : A urinary biomarker of accommodation was detected that can help discriminate between accommodation and rejection in patients developing DSA. While this biomarker should be externally validated, it shows that non-invasive diagnostic biomarkers can be found in urines of transplanted patients. The cohort discussed here should be prospectively followed in order to identify early prognostic biomarkers of accommodation. These biomarkers would be most helpful to clinicians.