

Rôle du complément dans le rejet humoral chez des patients transplantés rénaux : la positivité des anticorps anti-HLA fixant le C3d est corrélée à la MFI (Mean Fluorescence Intensity) en Luminex

Morgane Villemaire

▶ **To cite this version:**

Morgane Villemaire. Rôle du complément dans le rejet humoral chez des patients transplantés rénaux : la positivité des anticorps anti-HLA fixant le C3d est corrélée à la MFI (Mean Fluorescence Intensity) en Luminex. Médecine humaine et pathologie. 2016. dumas-01331162

HAL Id: dumas-01331162

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01331162

Submitted on 13 Jun 2016

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.

UFR de Médecine
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

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 SID 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/juridique/droit-auteur
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE GRENOBLE ALPES
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

Année : 2016

Rôle du complément dans le rejet humoral chez des patients transplantés rénaux
-
La positivité des anticorps anti-HLA fixant le C3d est corrélée à la MFI (Mean Fluorescence Intensity) en Luminex

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE

DIPLÔME D'ETAT

MORGANE VILLEMAIRE

[Données à caractère personnel]

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE*

Le : 17/05/2016

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : M. le Professeur ROSTAING Lionel

Membres

Mme la Professeur GUEBRE-EGZIABHER Fitsum

M. le Professeur THAUNAT Olivier

Docteur MASSON Dominique

Directeur de thèse : Docteur MALVEZZI Paolo

**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.*

Introduction

A ce jour, le rejet humoral est la principale cause de perte des greffons rénaux [1-3]. Le diagnostic repose sur des caractéristiques histologiques (lésions évocatrices selon la classification de Banff et fixation de C4d [4] sur la biopsie) et des caractéristiques immunologiques avec la mise en évidence d'anticorps anti HLA spécifiques du donneur (Donor Specific Antibodies : DSA) [5-7].

A l'inverse du rejet aigu cellulaire médié par les lymphocytes T, le traitement du rejet humoral doit cibler la cascade immunitaire médiée par les lymphocytes B [8]. Plusieurs options thérapeutiques sont disponibles : le Rituximab (anticorps anti-CD20) [9] permettant la déplétion des lymphocytes B, le Bortézomib (inhibiteur du protéasome) [10] permettant la déplétion des plasmocytes, les techniques d'immunoabsorption [11] ou d'échanges plasmatiques [12-13] permettant l'élimination des anticorps, l'Eculizumab (anticorps monoclonal anti-C5) [14] bloquant la cascade du complément, et enfin les immunoglobulines polyvalentes qui ont un effet immunomodulateur [15]. Ces traitements permettent une amélioration de la survie du greffon en cas de rejet aigu humoral. Ils sont malheureusement peu efficaces sur le rejet humoral chronique, en raison des lésions irréversibles préalablement formées. La précocité du diagnostic est donc fondamentale et repose en premier lieu sur l'apparition des DSA. Les DSA de classe 2 de novo (de type DR, DQ), en particulier, sont associés à la présence d'un rejet humoral chronique [16-17]. Ils sont également retrouvés comme facteur de mauvais pronostique sur la survie du greffon [18-19].

La technique d'immunofluorescence par single antigen Luminex (SA Luminex) est devenue la référence pour la détection et l'identification des anticorps anti HLA. La technologie Luminex est fondée sur le principe de la cytométrie de flux. Cette technologie récente utilise des microsphères, chacune caractérisée par une fluorescence interne spécifique, où sont fixés des antigènes définis (ici des molécules HLA). Après mise en contact avec le sérum, une double lecture par deux lasers permet de quantifier la présence d'anticorps dirigés contre ces cibles antigéniques. Des forts taux de fluorescence (Mean Fluorescence Intensity = MFI) dans cette technique sont associés à une baisse

de la survie du greffon [20-22]. Cependant, le SA Luminex ne peut pas être utilisé comme test quantitatif devant la présence de facteurs confondants ; à savoir la mise en évidence d'un « effet prozone », d'une différence inter-laboratoire importante, de l'existence de deux fabricants différents, et d'une mauvaise reproductibilité intra-laboratoire. L' « effet prozone » décrit dans plusieurs études, est rapporté à la présence de complément dans les sérums [23-25]. Il correspond à une ascension transitoire des taux de MFI lors de la dilution des sérums ou de l'ajout d'EDTA. Ce phénomène est responsable de faux négatifs si les sérums ne sont pas dilués ou traités par EDTA. La technique de détection par SA Luminex a une sensibilité très élevée mais ne permet pas d'apprécier la capacité à fixer le complément des anticorps anti HLA [26]. En pratique clinique, il devient important de pouvoir différencier les anticorps réellement délétères (fixant le complément) parmi tous les anticorps révélés par cette méthode.

La cascade du complément joue un rôle important dans les rejets humoraux [27]. Les DSA conduisent à une inflammation vasculaire et à une destruction des tissus via la toxicité directe des anticorps sur la cellule endothéliale, l'activation de la cascade du complément et le recrutement des lymphocytes T de type NK (Natural Killer), macrophages et polynucléaires neutrophiles. La classification de Banff, actualisée tous les deux ans par un groupe d'experts, permet de distinguer deux types de rejet humoral selon les lésions histologiques. Des lésions de glomérulite, tubulite, capillarite péri tubulaire, artérite transmurale ou intimale, ou de microangiopathie thrombotique sont en faveur d'un rejet humoral aigu. Des lésions de doubles contours de la membrane basale glomérulaire, fibrose interstitielle, atrophie tubulaire et endartérite fibreuse sont des témoins d'évènements inflammatoires et thrombotiques à répétition en faveur du diagnostic de rejet humoral chronique. La fixation sur la biopsie de greffon du C4d (témoin de l'activation du complément) au niveau des capillaires péri tubulaires est un critère diagnostique associé, en faveur d'un rejet humoral dans cette classification [28]. Le C4d est le produit de dégradation du facteur C4. Ce dernier est activé par la voie d'activation classique et par la voie des lectines. Après clivage des différents domaines de C4, C4d reste lié de manière covalente au site d'activation de C4. C'est pourquoi le

C4d est un bon marqueur de la réponse humorale. Il est facilement détecté sur les tissus par les techniques d'immunofluorescence ou d'immunohistochimie. Par contre, la détection de C4d sur les biopsies ne permet pas de présager la survie du greffon [29].

Des études récentes mettent en avant l'intérêt clinique de détecter des DSA fixant le C1q ou le C3d [30-37] car ceux-ci sont associés à une diminution de la survie du greffon (comparé aux anticorps ne fixant pas le complément). Le C1q est un produit d'activation de la voie classique du complément, alors que le C3d est le produit de clivage du C3b par le facteur I. Le C3b est activé par les deux voies : alterne et classique, et permet la formation du complexe d'attaque membranaire. Il est retrouvé que tous les DSA fixant le C3d fixent également le C1q. La capacité du DSA à fixer le C3d semble plus prédictive du risque de perte du greffon que la fixation au C1q ; car le C3d est un produit de clivage situé en aval de C1q dans la cascade du complément [38-40]. Dans les études sur le C1q ou le C3d, il est constaté, à plusieurs reprises, une association entre les taux de MFI élevés en technique SA Luminex et la positivité des tests de détection C3d et C1q [33, 38, 39].

Le rôle du complément dans le rejet humoral, notamment associé aux DSA de classe 2 semble majeur. De nouvelles études sont nécessaires, pour explorer ces mécanismes d'action et pour valider l'apport diagnostique et pronostique des tests de détection des anticorps anti HLA fixant le complément par rapport à la technique de référence actuelle par SA Luminex. C'est pourquoi, nous avons souhaité étudier chez les patients greffés rénaux développant des DSA de classe de 2 de novo :

- leur MFI en SA Luminex
- le pourcentage de positivité du test de détection des anticorps anti HLA fixant le C3d
- la corrélation des MFI obtenues en SA Luminex et avec le test C3d
- l'intérêt pronostique de la positivité du test C3d sur la fonction du greffon, à un an de l'apparition du DSA.

Matériel et Méthodes :

Population étudiée

Nous avons sélectionné les patients greffés rénaux, qui ont développés des DSA de novo de classe 2 (avec une MFI supérieure à 1000 en SA Luminex du laboratoire Immucor ®) entre janvier 2005 et juin 2015 au CHU de Grenoble. Les patients immunisés avant la greffe, de moins de 18 ans et greffés hépatiques, cardiaques ou pulmonaires ont été exclus.

Données cliniques :

Nous avons recueilli, pour chaque patient, au moment de la détection des DSA, et un an plus tard : la clairance de la créatininémie en MDRD/CKD EPI, la protéinurie, les modalités du traitement immunosuppresseur d'induction et d'entretien à la détection du DSA.

Données histologiques :

Les résultats des ponctions biopsies de greffon chez ces patients sont recueillis. Le rejet humoral est défini histologiquement par les critères de la classification de Banff de 2011. Le diagnostic de rejet humoral aigu est posé devant la présence de lésions d'inflammation micro vasculaire (glomérulite, capillarite péri tubulaire) et/ou d'artérite transmurale ou intimale et/ou de nécrose tubulaire aigue et/ou microangiopathie thrombotique (en l'absence d'autre cause imputable pour ces deux derniers) associées à une fixation de C4d dans les capillaires péri tubulaires. Le diagnostic de rejet humoral chronique est retenu sur la présence de lésions de glomérulopathie d'allogreffe avec aspect de doubles contours de la membrane basale glomérulaire, capillarite péri tubulaire sévère, fibrose interstielle, endartérite fibreuse, associées à des dépôts linéaires de C4d dans les capillaires péritubulaires.

Technique immunologique :

Pour tous les patients (41), le premier sérum (J0), où un DSA de novo a été détecté en SA Luminex, est analysé. Un DSA de novo était retenu si, sa MFI corrigée par le bruit de fond : Background Corrected MFI (BCM) était supérieure à 1000. Le sérum à un an de la découverte des DSA (J365) est analysé en plus pour 24 des 41 patients.

Les sérums sont parallèlement testés en technique de détection standard en SA Luminex (avec des kits du laboratoire Immucor® [Belgique]) et testé avec le kit de détection d'anticorps anti HLA fixant le C3d du laboratoire Immucor®. Les MFI retenues sont les BCM obtenus et sont mesurées par LABscan. L'analyse des résultats est traitée par les logiciels Match it et Fusion. Le seuil de positivité du C3d est défini par une MFI supérieure à 750 (seuil fixé sur les recommandations du fournisseur et les publications antérieures).

Protocole pour le dépistage des anticorps anti HLA par technologie SA Luminex :

Les sérums sont tout d'abord décantés, vortexés et centrifugés. Dans chaque puit d'une plaque à filtre, 40µl de billes vortexées et 10µl de sérum sont distribués. La préparation est mise en incubation pendant 30 minutes. Un lavage avec 100µl puis 3 lavages de 250µl de tampons sont réalisés. Dans chaque puits, 50µl de conjugué dilué au 1/5ème sont ajoutés. La préparation est de nouveau mise en incubation pendant 30 minutes sous agitation puis lavée avec 150µl de tampon par puits. La plaque est ensuite lue par Luminex.

Protocole de la technique de détection du C3d d'Immucor ® :

La préparation des sérums comprend une décantation, un vortex et une centrifugation. Les billes LSA sont mélangées avec les billes contrôles positifs C3d (mix). Dans une microplaque à filtre de 96 puits, les sérums préparés sont mélangés avec le mix et mis en incubation pendant 30minutes. Nous ajoutons une source de complément C3dCS et, de nouveau, mise en incubation pendant 30 minutes. Quatre lavages sont ensuite nécessaires avant d'ajouter le conjugué spécifique dilué. La

préparation est remise en incubation pendant 30 minutes. Ensuite, nous réalisons deux lavages et ajoutons le tampon.

Statistique

La corrélation entre les MFI obtenues en technique standard et avec le kit C3d est étudiée pour les DSA, puis avec tous les anticorps anti HLA détectés (DSA et non DSA) par test de Spearman (non paramétrique). Le test du Chi2 est utilisé pour les comparaisons pronostiques.

Résultats :

Parmi les 924 patients greffés rénaux au CHU de Grenoble entre janvier 2005 et juin 2015, 41 patients (4,4%) ont développés des DSA de classe 2 de novo. Pour les 41 patients, tous les sérums révélant la première détection de DSA sont utilisés. Sur 24 de ces 41 patients, les sérums à 1 an de l'apparition des DSA sont analysés en plus des sérums de J0. Au total, 65 sérums sont testés en technique standard SA Luminex et en test de détection C3d.

Les caractéristiques des patients sont regroupées dans le Tableau 1. Les patients sont majoritairement des hommes (à 85%) de 49,3 (+/- 14,3) ans en moyenne. Le débit de filtration glomérulaire estimé en MDRD est en moyenne à 40,9 (+/- 20,35) ml/min à l'apparition des DSA versus 34,7 (+/- 23) ml/min à un an de l'apparition des DSA (J365). Quatorze patients (34%) ont une clairance de la créatininémie en MDRD inférieure à 30ml/min à J0 contre 64% à J365.

La grande majorité des patients (75,5%) ont reçu un traitement d'induction par anti thymoglobulines au moment de la greffe. A l'apparition des DSA, 71% des patients ont un protocole d'immunosuppression par Tacrolimus et Mycophénolate mofétil.

Caractéristiques	Résultats
Sexe : nombre/nombre total (%) - Homme - Femme	 35/41 (85%) 6/41 (15%)
Moyenne d'âge à l'apparition des DSA (années)	49,3 (+/- 14,3)
Type de néphropathie : nombre/nombre total (%) - Néphropathie à IgA - Vasculaire - Diabétique - Uropathie - Polykystose hépatorénale - Hyalinose segmentaire et focale - Lupique - Glomérulonéphrite extra membraneuse - Post infectieuse - Sclérose tubéreuse de Bourneville - Non connue	 12/41 (29%) 7/41 (17%) 5/41 (12%) 5/41 (12%) 4/41 (10%) 2/41 (5%) 2/41 (5%) 1/41 (2,5%) 1/41 (2,5%) 1/41 (2,5%) 1/41 (2,5%)
Traitement immunosuppresseur à l'apparition des DSA : nombre/nombre total (%) – Tacrolimus + Mycophénolate mofétil – Ciclosporine + Mycophénolate mofétil – Inhibiteur de mTor (Sirolimus ou Evérolimus) + Mycophénolate mofétil **Type d'induction reçue lors de la greffe** – Antithymoglobulines – Basiliximab – Daclizumab – Pas d'induction	 29/41 (71%) 6/41 (14,5%) 6/41 (14,5%) 31/41 (75,5%) 8/41 (19,5%) 1/41 (2,5%) 1/41 (2,5%)
Clairance de la créatinine en MDRD à J0 (moyenne en ml/min) **Clairance MDRD à J0: nombre /nombre total (%)** < 30ml /min > 30ml/min **Clairance de la créatinine en MDRD à J365 (moyenne en ml/min)** **Clairance MDRD à J365 : nombre/ nombre total (%)** < 30ml/min > 30 ml/min	40,9 (+/- 20,35) 14/41 (34%) 27/41 (66%) 34,7 (+/- 23) 23/36 (64%) 13/36 (36%)

Tableau 1 : Caractéristiques de la population

Type de DSA de novo

Les DSA sont détectés à 39,8 (+ /- 22,9) mois en moyenne de greffe rénal chez ces patients. Dix

patients ont plus d'un DSA (24%). Les DSA de classe 2 de type DQ sont majoritairement retrouvés (65,5%). (Tableau 2)

Caractéristiques	Nombre (%)
Délai d'apparition des DSA par rapport au jour de la greffe en moyenne (mois)	39,8 (+/- 22,9)
Nombre de DSA de classe 2 **Type de DSA de classe 2 : nombre/nombre total de DSA (%)** - DQ - DR - DP	55 36/55 (65.5%) 15/55 (27.3%) 4/55 (7.2%)
Nombre moyen de DSA par patients	1,3 (1-3)
Patients ayant développé plus d'un DSA	10/41 (24%)

Tableau 2 : Caractéristiques des DSA

Retour en dialyse

Dix patients sur 41 (24,4%) sont retournés en dialyse dont 6 (14,6%) dans la première année suivant l'apparition des DSA. Le retour en dialyse survient en moyenne 47,75 (+/- 58,3) mois après la première détection des DSA. (Tableau 3)

Caractéristiques	Nombre (%)
Retour en dialyse : nombre/nombre total (%)	10/41 (24.4%)
Retour en dialyse dans la première année suivant l'apparition de DSA	6/41 (14,6%)
Moyenne du délai du retour en dialyse par rapport à la découverte des DSA	47,75 (+/- 58,3) mois

Tableau 3 : Retour en dialyse

Etude de corrélation

Il existe une forte corrélation (r = 0,9) entre les MFI en technique SA Luminex et les MFI en technique C3d ($p < 10^{-16}$). Sur les 65 sérums étudiés, 22 sérums sont C3d positifs (34%) et ont tous des MFI en technique SA Luminex élevées à plus de 9000.

Que l'on étudie toutes les anticorps anti HLA détectés ou uniquement les DSA, il n'existe aucun sérum pour lequel la MFI en technique standard est inférieure à 9000 avec un test C3d positif.

Inversement, 43 sérums sont C3d négatifs (66%). Toutes les MFI en technique SA Luminex chez ces patients sont inférieures à 11000. Il n'existe que trois sérums qui ont un test C3d négatif et une MFI supérieure à 9000. (Figure 1 et 2)

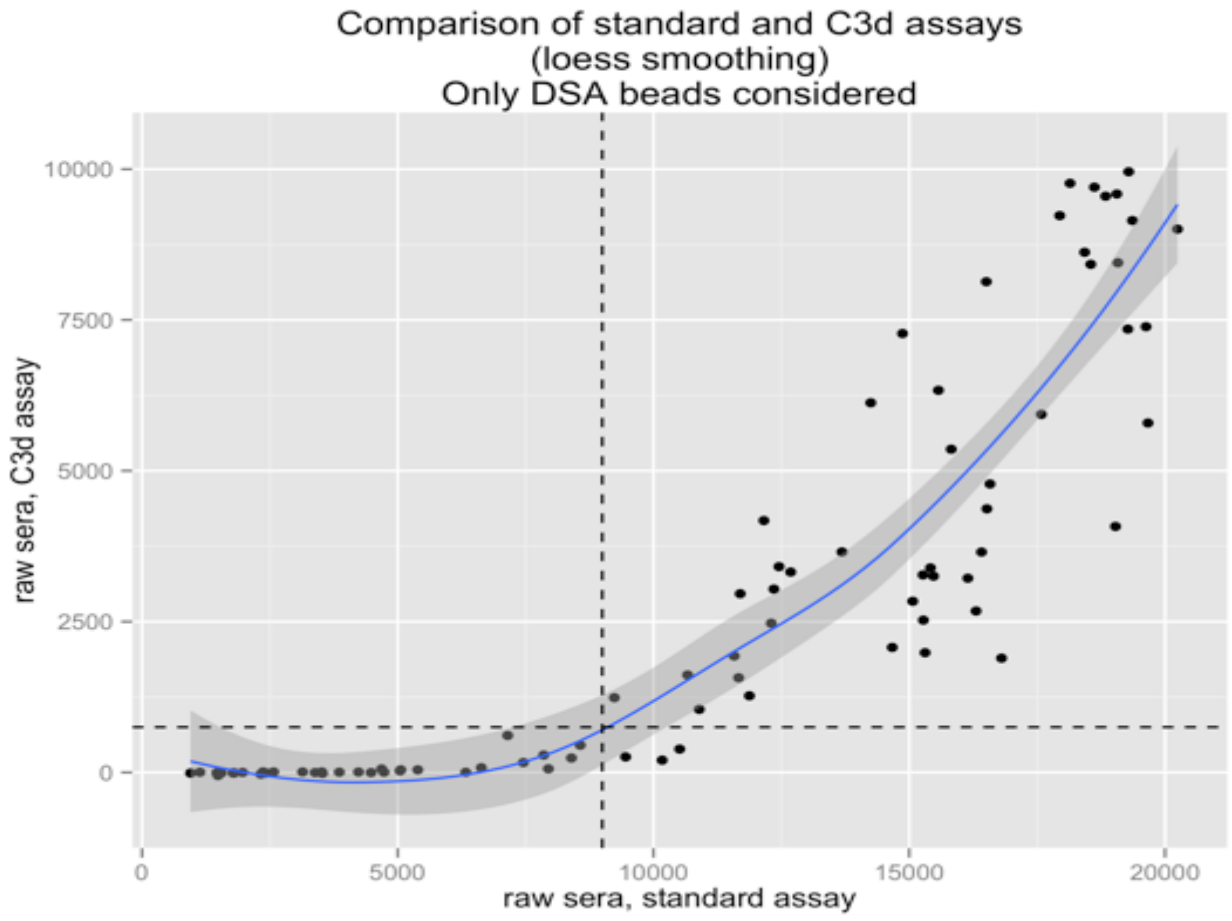


Figure 1 : Corrélation entre MFI en technique SA Luminex et MFI en technique C3d des DSA

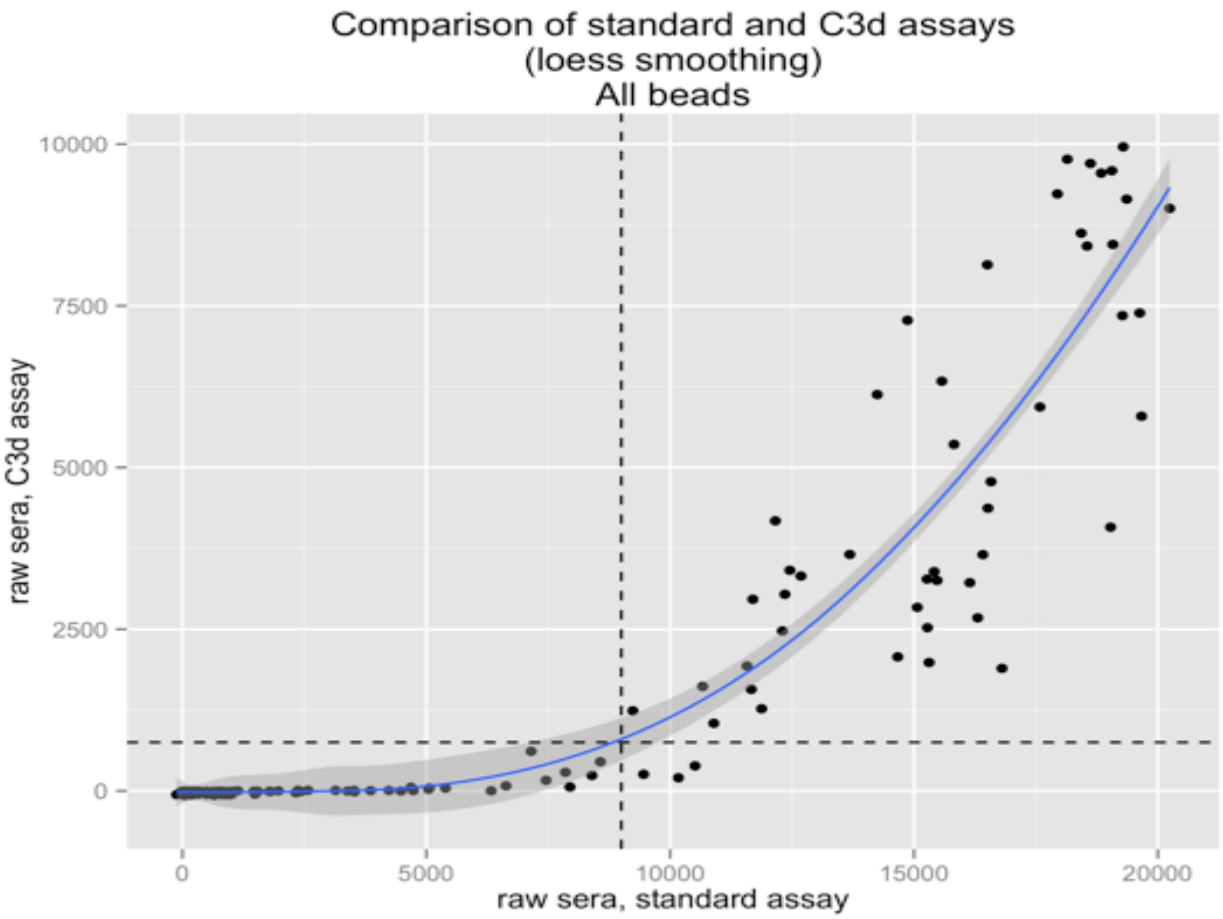


Figure 2 : Corrélation entre MFI en technique SA Luminex et MFI en technique C3d sur tous les anticorps anti HLA détectés (DSA et non DSA)

Rejet humoral

Sur les 41 patients sélectionnés, 27 ont eu une ponction biopsie de greffon (66%). Selon les critères de la classification de Banff de 2011, un rejet humoral aigu est retrouvé pour 9 patients (33%). Chez seulement 5 d'entre eux (55%) la détection de DSA fixant le C3d est positive. Sept autres (26%) ont un rejet humoral chronique et, pour tous, leurs DSA fixent le C3d (100%).

Parmi les 11 patients ne présentant pas de rejet humoral, selon la classification de Banff, 3 (27%) ont un test C3d positif.

On retrouve une association significative entre la positivité du test C3d et la présence d'un rejet humoral chronique (p=0,004) versus absence de rejet humoral. Cette association n'est pas significative pour le diagnostic de rejet humoral aigu versus absence de rejet humoral (p= 0,199).

(Tableau 4)

Lésions histologiques/ Test C3d	C3d +	C3d -	Nombre de biopsie
Rejet humoral aigu	5 (55%)	4 (45%)	9 **(33%)**
Rejet humoral chronique	7 (100%)	0	7 **(26%)**
Pas de rejet humoral	3 (27%)	8 (73%)	11 **(41%)**
Total	15	12	**27 (100%)**

Tableau 4 : Statut de positivité du C3d selon le type de lésions histologiques retrouvées sur la biopsie du greffon

Evaluation pronostique

L'étude pronostique a concerné 36 sur 41 patients : 5 n'ont pas encore atteint leur année de suivi après l'apparition du DSA. Nous avons choisi comme critère composite de mauvais pronostic sur la survie du greffon : le retour en dialyse et/ou la perte d'au moins 50% de clairance de la créatinine en MDRD dans l'année suivant l'apparition des DSA.

Au total, 8 patients (22%) ont eu une évolution péjorative selon notre critère composite.

Le test C3d est positif chez 16 patients (44%). Six d'entre eux soit 37,5% ont une évolution péjorative selon notre critère composite. Sur les 20 patients (66%) ayant un test C3d négatif, seulement 2 patients (10%) ont eu une évolution péjorative. Ces deux patients ont également une MFI en SA Luminex plus faible autour de 1500. Il s'agit en réalité de patients ayant perdu leurs greffons pour des causes infectieuses (BK virus, infection invasive à CMV) sans élément en faveur d'un rejet humoral à la biopsie.

Le résultat du test C3d est significativement associé à la survie du greffon selon notre critère composite (p=0,04 en test du Chi2). Le test de détection des anticorps anti HLA fixant le C3d a une

bonne valeur prédictive négative de 90% mais une valeur prédictive positive faible de 37,5%. La sensibilité de ce test est de 75% et la spécificité est de 64%. Le taux de faux positif est important à 62,5% pour un taux de faux négatifs à 10%. (Tableau 5, Figure 3)

Evolution selon critère composite / Test C3d	**C3d +**	**C3d -**	Total
Evolution péjorative	6	**2**	8 (22%)
Bonne évolution	10	**18**	28 (78%)
Total	**16 (44%)**	**20 (66%)**	**36**

Tableau 5 : Survie du greffon à un an de l'apparition du DSA selon le taux de positivité du C3d

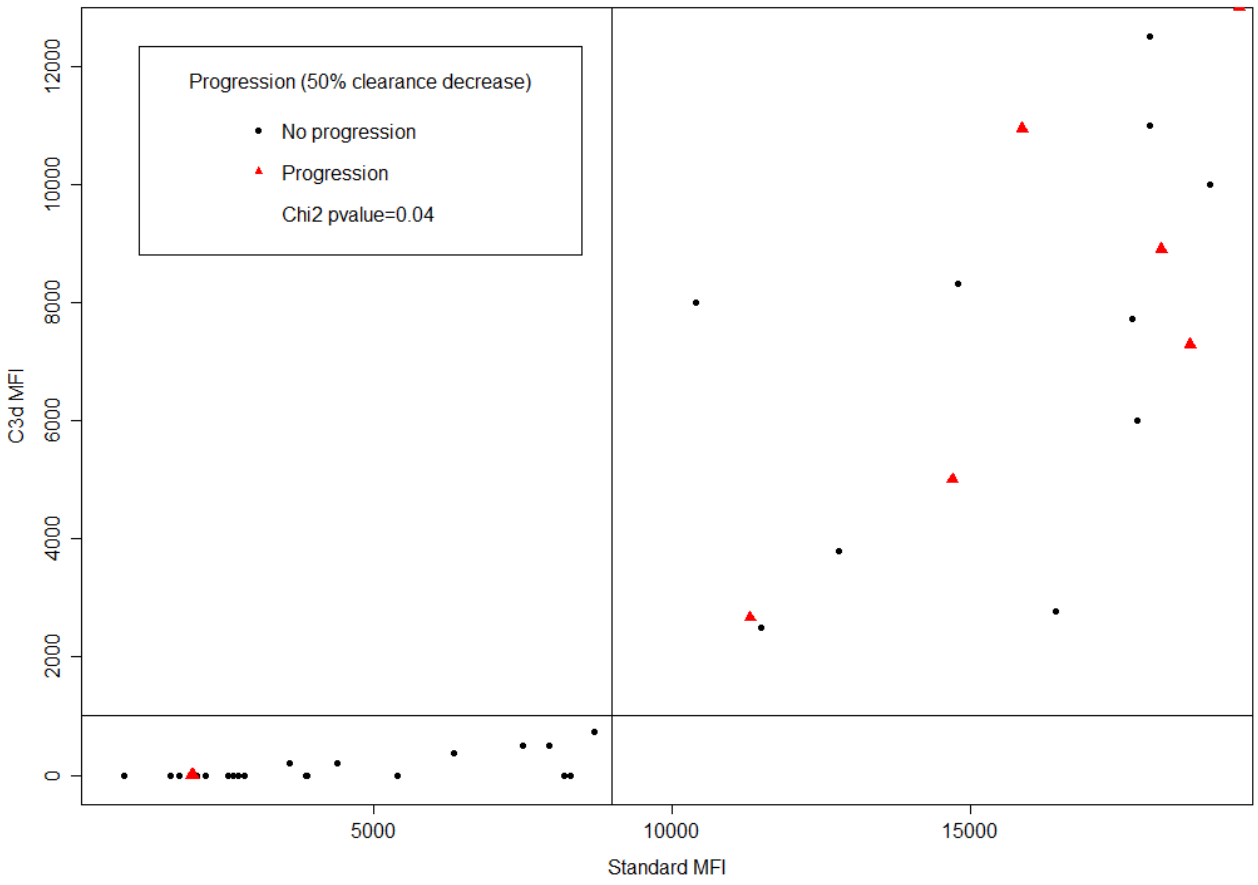


Figure 3 : Survie du greffon un an après l'apparition des DSA en fonction de la MFI en test C3d et en SA Luminex (critère composite : retour en dialyse ou perte de 50% de fonction du greffon à un an de

l'apparition du DSA)

La différence statistique ne se retrouve plus si le critère composite de mauvais pronostic est modifié pour un retour en dialyse et/ou une perte de 20% de clairance de la créatinine en MDRD dans l'année suivant l'apparition des DSA. (Figure 4)

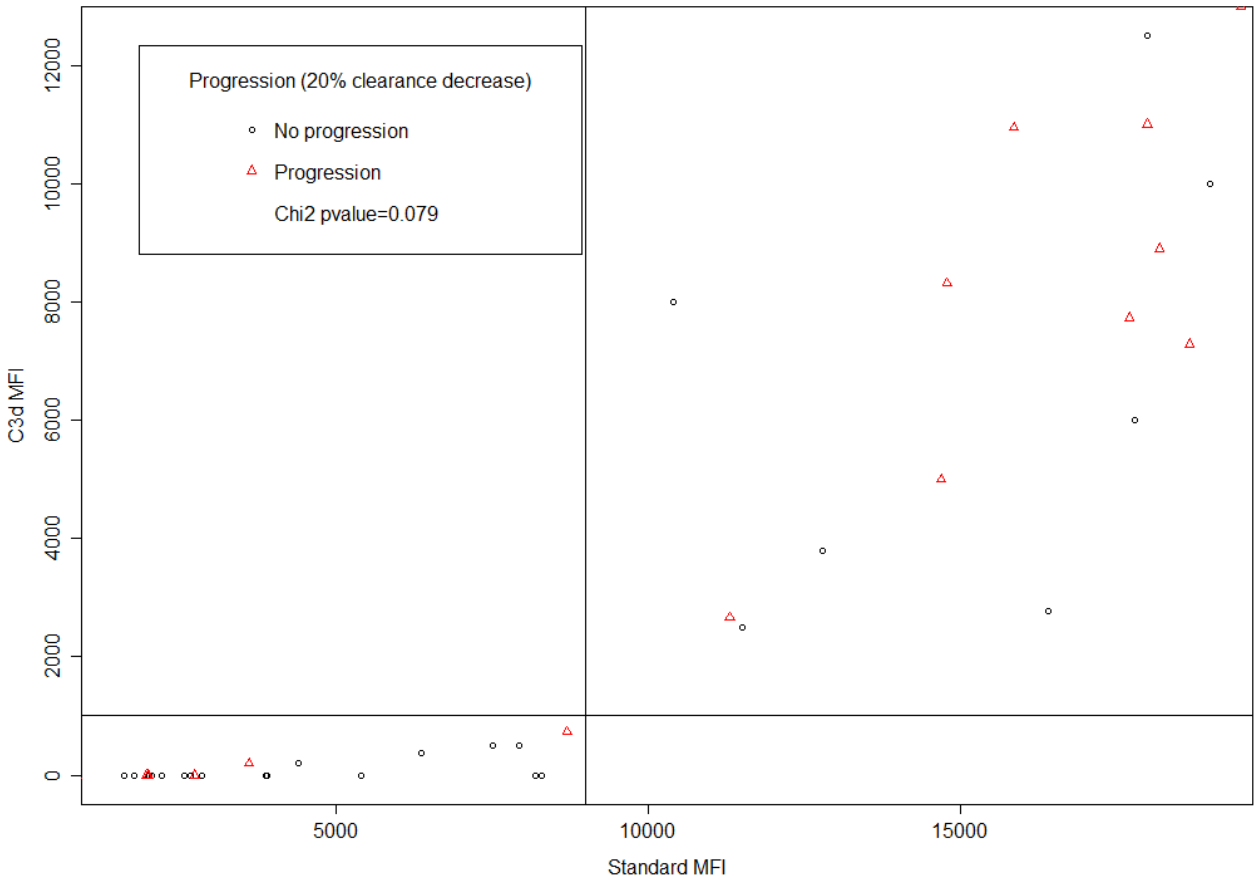


Figure 4 : Survie du greffon un an après l'apparition des DSA en fonction de la MFI en test C3d et en SA Luminex (critère composite : retour en dialyse ou perte de 20% de fonction du greffon à un an de l'apparition du DSA)

Discussion :

La positivité du test de détection d'anticorps anti HLA fixant le C3d est fortement corrélée à des taux élevés de MFI en technique standard par SA Luminex avec un seuil autour de 9000 de MFI. Cette corrélation avait été observée également dans l'étude de Sicard de manière moins franche : en effet, il retrouvait 5 billes sur 40 (12,5%) avec un test C3d positif et une MFI inférieure à 5000 [38]. Cette différence de résultats pourrait être expliqué par le fait que nous avons testé uniquement les sérums de patients ayant développé des DSA de classe 2 de novo, contrairement à leur étude où des DSA de classe 1 et de classe 2 ont été étudiés qu'ils soient de novo ou non. Le seuil de positivité du test de détection C3d a été fixé à plus de 500 de MFI dans l'étude de Sicard. La modification du seuil de positivité de 750 à 500 de MFI dans notre étude ne change pas nos résultats.

L'étude plus récente de Comoli [39] sur une cohorte pédiatrique de 39 patients, ayant développés des DSA de novo (dont 70% de classe 2), conforte nos résultats. Dix patients avaient des DSA fixant le C3d : tous de classe 2 et tous fixant le C1q. Les DSA fixant le C3d avaient des taux de MFI significativement plus élevées que les DSA fixant le C1q et ceux ne fixant pas le complément. Au cours du suivi, 8 patients ayant des DSA ne fixant pas le complément initialement, ont développé des DSA fixant le C3d. La capacité de fixation au C3d et au C1q était associée à l'élévation des taux de MFI en SA Luminex. Tous les DSA fixant le C3d avaient une MFI supérieure à 8000 en SA Luminex avec pour 80% d'entre eux des MFI dépassant 14 000 de MFI.

De la même manière, d'autres études ont montré une corrélation semblable entre la positivité du test C1q et l'importance des MFI en SA Luminex avec un seuil de positivité vers 10 000 de MFI [33]. Ceci nous amène à nous demander si la quantité d’anticorps pourrait être responsable de l’activation du complément plutôt que leur spécificité intrinsèque.

Cette technique de détection des DSA fixant le complément semble intéressante à visée pronostique. Malgré notre faible effectif, le résultat du test de détection de DSA fixant le C3d est

significativement (p=0,04) associée à la survie du greffon (selon le critère composite : retour en dialyse et/ou perte de 50% de clairance MDRD dans l'année suivant l'apparition des DSA). On retrouve une bonne valeur prédictive négative du test C3d à 90%. Parmi les patients ayant eu un test C3d positif, 37,5% ont eu une évolution péjorative selon notre critère composite. Cette proportion paraît déjà importante à seulement un an suivant l'apparition du DSA. Plus intéressant encore, seulement 2 patients sur 20 soit 10% ont eu une évolution péjorative malgré un test C3d négatif, sachant que ces patients ont perdu leurs greffons pour des causes infectieuses (BK virus et infection invasive à CMV) et que leurs taux de MFI en SA Luminex sont plutôt faibles autour de 1500 de MFI. Des résultats similaires ont été obtenus par Sicard en 2014 [(38)]. En effet, les 40 patients avec un test C3d positif avaient une diminution de survie de leur greffon statistiquement significative (50,7 versus 68,6% à un an) sur leur cohorte de 69 patients greffés souffrant d'un rejet humoral retrouvé à la biopsie. De même, Comoli [(39)] retrouve comme facteurs de risque de perte de greffon : la présence de DSA de novo, leur taux de MFI, leur capacité de fixation au complément et l'âge du donneur. La fixation au C3d semble plus prédictive que la fixation au C1q (Hazard Ratio : 27,80, IC = 5,61- 137,72) versus 11,09, IC =2,25 – 54,64). La fixation au C3d était également retrouvée comme facteur de risque d'apparition d'un rejet humoral, bien qu'ils aient observé des rejets humoraux chez des patients avec DSA de novo ne fixant pas le complément. Dans notre étude, la positivité du test C3d est significativement associée à la présence d'un rejet humoral chronique (p=0,04). Curieusement, cette corrélation n'est pas retrouvée avec la présence d'un rejet humoral aigu probablement à cause d'un effectif trop faible (seulement 27 sur 41 patients ont eu une biopsie de greffon soit 66%). De plus, la biopsie du greffon n'était pas systématiquement réalisée au moment de la détection des anticorps.

Les limites de notre étude reposent sur le caractère rétrospectif et monocentrique, et sur le faible effectif de patients. Mais cette étude mérite attention, du fait d'une population très homogène : exclusion des patients immunisés avant la transplantation et inclusion seulement de patients ayant

développés des DSA de classe 2 de novo. De plus, nos patients ont reçu un traitement très homogène : induction par sérum anti-lymphocytaire, entretien par Tacrolimus et Mycophénolate mofétil avec sevrage des stéroïdes dans la première année post greffe pour la grande majorité.

Nos analyses Luminex ont été réalisées uniquement avec des kits du laboratoire Immucor ®. Nous avons effectué des tests de dilution et des prétraitements par EDTA sur quelques sérums, car ces techniques permettraient de contrer un éventuel « effet prozone » [25,40]. Ces tests n'ont montré aucune différence significative entre les taux de MFI obtenus avec ou sans traitement des sérums, permettant d'exclure ce biais (données non présentées). Jusqu'à présent, « l'effet prozone » n'a été décrit qu'avec les kits de l'autre fabricant de la technologie Luminex.

Des travaux de recherche sont encore nécessaires pour mettre en évidence un test de dépistage des anticorps anti HLA plus spécifique que la technique SA Luminex. Une piste déjà étudiée a été de rechercher la présence ou non de DSA sur les biopsies de greffon. Dans l'étude de Bachelet [41], les DSA ont pu facilement être détectés et identifiés dans les éluats obtenus à partir des biopsies de greffon (après lavage). Mais aucun DSA sur la biopsie n'a été détecté en l'absence de DSA dans le sérum. La présence de DSA au niveau du greffon est associée à des taux de MFI importants des DSA sériques. L'identification de DSA sur la biopsie de greffon est retrouvée comme facteur de mauvais pronostic sur la survie du greffon.

L'étude du type d'immunoglobulines et de la sialylation des anticorps anti HLA pourrait être une autre piste à suivre. Malard-Castagnet et al, retrouvent chez les patients développant un rejet humoral des IgG plus sialylés [42]. Sur 189 sérums analysés, Everly et al, notent une réponse immunitaire de type IgM à IgG des DSA. Les DSA de type IgM ne sont pas associés à une diminution de la survie du greffe à l'inverse des DSA de type IgG. La persistance du type IgM, associée au développement de DSA de type IgG d'isotype 3, identifie la sous-population la plus à risque de perte du greffon rénal [43-44].

Conclusion

La détection de DSA de novo est actuellement l'une des découvertes les plus frustrantes pour les cliniciens de transplantation : la présence de ces anticorps est certes un facteur de mauvais pronostic, mais à l'heure actuelle aucun outil ne permet de distinguer les anticorps les plus délétères des plus bénins. Des nouveaux marqueurs diagnostiques, tels que les kits de détection d'anticorps fixant le complément (C1q et C3d), ont été développés pour répondre à ce besoin. Malheureusement, la positivité du test C3d fournit peu d'informations supplémentaires par rapport à la technique SA Luminex standard, probablement car la détection d'anticorps fixant le complément peut dépendre de la quantité de DSA présent dans le sérum.

Il est maintenant clair qu'il existe un effet délétère sur la survie du greffon des anticorps anti HLA fixant le complément C3d et C1q. Cependant, les tests de détection des DSA fixant le complément sont des techniques coûteuses et semblent corrélés presque parfaitement à de forts taux de MFI en technique SA Luminex. Dans ces conditions, nous mettons en doute le bénéfice médico-économique de ces techniques par rapport à une technique SA Luminex bien faite dont on sait que les MFI élevées sont plus à risque de perte de greffon.

Bibliographie :

1) Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. N Engl J Med. 2010; 363(15):1451-62.

2) Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. Am J Transplant. 2012; 12(2):388-99.

3) Pouliquen E, Koenig A, Chen CC, et al. Recent advances in renal transplantation: antibody-mediated rejection takes center stage. F1000Prime Rep. 2015; 12; 7:51.

4) Mengel M, Sis B, Haas M, et al. Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. Am J Transplant. 2012; 12(3):563-70.

5) Loupy A, Hill GS, Jordan SC. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. Nat Rev Nephrol. 2012; 8(6):348-57.

6) Djamali A, Kaufman DB, Ellis TM, et al. Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: current status and novel approaches. Am J Transplant. 2014 ;14(2):255-71

7) Konvalinka A, Tinckam K. Utility of HLA Antibody Testing in Kidney Transplantation. J Am Soc Nephrol. 2015; Jul; 26(7):1489-502.

8) Fehr T, Gaspert A. Antibody-mediated kidney allograft rejection: therapeutic options and their experimental rationale. Transpl Int. 2012; 25(6):623-32.

9) Kaposztas Z, Podder H, Mauiyyedi S,et al.Impact of Rituximab Therapy for Treatment of Acute Humoral Rejection. Clin Transplant 2009; 23: 63.

10) Everly MJ, Everly JJ, Susskind B,et al. Bortezomib provides effective therapy for antibody- and cell-mediated acute rejection.Transplantation2008;86: 1754.

11) Bohmig GA, Wahrmann M, Regele H,et al. Immunoad-sorption in severe C4d-positive acute kidney allograft rejection: a randomized controlled trial.Am J Transplant 2007;7: 117.

12) Montgomery RA, Zachary AA, Racusen LC,et al. Plasmapheresis and intravenous immune globulin provides effective rescue therapy for refractory humoral rejection and allows kidneys to be successfully transplanted into cross-match-positive recipients.Transplantation 2000;70:887.

13) Lefaucheur C, Nochy D, Andrade J,et al.Comparison of combination plasmapheresis/IVIg/anti-CD20 versus high-dose IVIg in the treatment of antibody-mediated rejection.Am J Transplant 2009;9: 1099.

14) Stegall MD, Diwan T, Raghavaiah S, et al.Terminal complement inhibition decreases antibody-mediated rejectionin sensitized renal transplant recipients.Am J Transplant 2011;11: 2405.

15) Shehata N, Palda VA, Meyer RM,et al.The use of immunoglobulin therapy for patients undergoing solid organ transplantation: an evidence-based practice guideline. Transfus Med Rev2010;24 (Suppl. 1): S7

16) Kobayashi T, Maruya E, Niwa M, et al. Significant association between chronic antibody-mediated rejection and donor-specific antibodies against HLA-DRB rather than DQB in renal transplantation. Hum Immunol. 2011; 72(1):11-7.

17) Croze LE, Tetaz R, Roustit M, et al. Conversion to mammalian target of rapamycin inhibitors increases risk of de novo donor-specific antibodies. Transpl Int. 2014; 27(8):775-83.

18) GloorJM, Sethi S, Stegall MD, et al. Transplant glomerulopathy: subclinical incidence and association with alloantibody. Am J Transplant 2207; 7: 2124.

19) Yamamoto T1, Watarai Y, Takeda A, et al.De Novo Anti-HLA DSA Characteristics and Subclinical Antibody-MediatedKidney Allograft Injury. Transplantation. 2015.

20) Heilman RL, Nijim A, Desmarteau YM, et al. De novo donor-specific human leukocyte antigen antibodies early after kidney transplantation. Transplantation. 2014; 98(12):1310-5.

21) Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. J Am Soc Nephrol. 2010; 21(8):1398-406.

22) Kannabhiran D, Lee J, Schwartz JE,et al. Characteristics of Circulating Donor Human Leukocyte Antigen-specific Immunoglobulin G Antibodies Predictive of Acute Antibody-mediated Rejection and Kidney Allograft Failure. Transplantation. 2015; 99(6):1156-64.

23) Guidicelli G, Anies G, Bachelet T, et al. The complement interference phenomenon as a cause for sharp fluctuations of serum anti-HLA antibody strength in kidney transplant patients. Transpl Immunol. 2013; 29(1-4):17-21.

24) Schwaiger E, Wahrmann M, Bond G, et al. Complement component C3 activation: the leading cause of the prozone phenomenon affecting HLA antibody detection on single-antigen beads. Transplantation. 2014 ; 97(12):1279-85.

25) Martina Schnaidt, Christof Weinstock, Marija Jurisic, et al. HLA Antibody Specification Using Single-Antigen Beads—A Technical Solution for the Prozone Effect Transplantation 2011;92: 510–515.

26) Stegall MD, Chedid MF, Cornell LD. The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation. Nat Rev Nephrol. 2012; 8(11):670-8.

27) Lefaucheur C, Nochy D, Hill GS, et al. Determinants of poor graft outcome in patients with antibody-mediated acute rejection. Am J Transplant. 2007; 7(4):832-41.

28) Loupy A, Hill GS, Suberbielle C, et al. Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA). Am J Transplant. 2011; 11(1):56-65.

29) Sapir-Pichhadze R, Curran SP, John R, et al. A systematic review of the role of C4d in the diagnosis of acute antibody-mediated rejection. Kidney Int. 2015; 87(1):182-94.

30) Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. N Engl J Med. 2013; 369(13):1215-26.

31) Llorente S, Boix F, Eguia J, et al. C1q-fixing human leukocyte antigen assay in immunized renal patients: correlation between Luminex SAB-C1q and SAB-IgG. Transplant Proc. 2012; 44(9):2535-7.

32) Chen G, Sequeira F, Tyan DB. Novel C1q assay reveals a clinically relevant subset of human leukocyte antigen antibodies independent of immunoglobulin G strength on single antigen beads. Hum Immunol. 2011; 72(10):849-58.

33) Messina M, Ariaudo C, Praticò Barbato L, et al. Relationship among C1q-fixing de novo donor specific antibodies, C4d deposition and renal outcome in transplant glomerulopathy. Transpl Immunol. 2015; 33(1):7-12.

34) Yell M, Muth BL, Kaufman DB, et al. C1q Binding Activity of De Novo Donor-specific HLA Antibodies in Renal Transplant Recipients With and Without Antibody-mediated Rejection. Transplantation. 2015 ; 99(6):1151-5.

35) Ata P, Canbakan M, Kara M, et al. Serum flow cytometric C1q binding antibody analysis of renal recipients with low levels of sensitization. Transplant Proc. 2012; 44(6):1652-5.

36) Calp-Inal S, Ajaimy M, Melamed ML, et al. The prevalence and clinical significance of C1q-binding donor-specific anti-HLA antibodies early and late after kidney transplantation. Kidney Int. 2015; 89(1) :209-216.

37) Guidicelli G, Guerville F, Lepreux S, et al. Non-Complement-Binding De Novo Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Kidney Allograft Survival. J Am Soc Nephrol. 2016; 27(2):615-25.

38) Sicard A, Ducreux S, Rabeyrin M, et al. Detection of C3d-binding donor-specific anti-HLA antibodies at diagnosis of humoral rejection predicts renal graft loss. J Am Soc Nephrol. 2015; 26(2):457-67.

39) Comoli P, Cioni M, Tagliamacco A et al. Acquisition of C3d-Binding Activity by De Novo Donor-Specific HLA Antibodies Correlates With Graft Loss in Nonsensitized Pediatric Kidney Recipients. Am J Transplant. 2016;XX: 1-11.

40) Tambur AR, Herrera ND, Haarberg KM et al. Assessing Antibody Strength: Comparison of MFI, C1q, and Titer Information. Am J Transplant. 2015; 2421-30

41) Bachelet T, Couzi L, Lepreux S, et al. Kidney intragraft donor-specific antibodies as determinant of antibody-mediated lesions and poor graft outcome. Am J Transplant. 2013; 13(11):2855-64.

42) Malard-Castagnet S, Dugast E, Degauque N, et al. Sialylation of antibodies in kidney recipients with de novo donor specific antibody, with or without antibody mediated rejection. Transpl Int. 2014; 27(8):775-83.

43) Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, et al. Impact of IgM and IgG3 anti-HLA alloantibodies in primary renal allograft recipients. Transplantation. 2014 ; 97(5):494-501.

44) Lefaucheur C, Viglietti D, Bentlejewski C, et al. IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury. J Am Soc Nephrol. 2016; 27(1):293-304.

Role of complement in chronic antibody-mediated rejection in renal-transplant patients - *de novo* C3d-fixing of donor-specific antibodies are correlated with Luminex mean fluorescence intensity

M. Villemaire[1], T. Jouve[1,5], A. Bourdin[2], B. Janbon[1], N. Pinel[3], R. Tetaz[1], N. Terrier[4], L. Rostaing[1,6], D. Masson[2], P. Malvezzi[1]

[1] Clinique de Néphrologie, Unité de Transplantation Rénale, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Grenoble-Alpes, Grenoble, France

[2]Laboratoire d'Histocompatibilité, EFS Rhône Alpes, Grenoble, France

[3] Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Grenoble-Alpes, Grenoble, France

[4] Clinique d'Urologie et Transplantation Rénale, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Grenoble-Alpes, Grenoble, France

[5] Université Joseph Fourier, Grenoble, France

[6] Université Paul Sabatier, Toulouse, France

Key words: donor-specific HLA antibodies, kidney transplantation, complement, antibody-mediated rejection

Abstract

Chronic antibody–mediated rejection is the main cause of late kidney-graft loss. The presence of donor-specific antibodies (DSA) in the serum is the main criterium for this diagnosis. Single-antigen Luminex assays identify DSAs and semi-quantitative estimates of antibodies are assessed using mean fluorescence intensity (MFI). Recent data show that patients whose DSAs fix C3d have a worse clinical outcome, implying that C3d-specific Luminex assays may provide useful prognostic data. We compared C3dDSA with standard MFIs in a cohort of patients with *de novo* class-2 DSAs, and analyzed graft survival at 1 year. The included kidney-graft recipients received a transplant between 2005 and 2015 and had developed *de novo* class-2 DSAs. Serum was tested using standard single-antigen Luminex technique and C3d-fixing antibody-detection system (Immucor®). 41/924 patients (4.4%) developed class-2 DSAs: 65 serum samples were analyzed (baseline and follow-up). Among them, 43 serum samples were negative for C3d DSAs (66%). An MFI threshold of 9000 in the single-antigen Luminex assay discerned all negative from positive C3d DSAs, even when all single-bead results were taken into account. 22% of patients had doubled creatinine level or had lost their graft at 1 year. C3d results were significantly associated with graft survival (p=0.04). We found a strong correlation between C3d-fixing antibody positivity and MFI strength in the setting of *de novo* class-2 DSAs. These results infer that when MFI is high, complement activation occurs leading to chronic antibody-mediated rejection in the graft and progressive loss of function.

Introduction

Chronic antibody-mediated rejection (cAMR) is the leading cause of kidney graft loss [1-3]. Currently available treatments are not effective at countering or slowing this immunological process. Corticosteroids, plasma exchange, rituximab, bortezomib, and eculizumab have been tried alone or in combination without significant results [4].

A diagnosis of cAMR is based on precise histological features from a graft biopsy (defined by the 2013 Banff classification [5]) and the demonstration of specific anti-HLA antibodies directed against the donor (donor-specific antibodies: DSAs) [6-8].

The Banff classification distinguishes two types of humoral rejection according to the type of histological lesion: acute antibody-mediated rejection (glomerulitis, peri-tubular capillaritis, transmural, or intimal arteritis) and chronic active antibody-mediated rejection (double contours of the glomerular basement membrane, interstitial fibrosis, fibrous endarteritis). Underlying complement activation may also be found by biopsy staining of C4d and is an associated diagnostic criterion [9].

cAMR is associated with the presence of class-2 DSAs (DQ, DR, DP), which have prognostic factors for graft survival [10-11].

Single-antigen Luminex (SA Luminex) is now considered the reference method to detect and identify allo-reactive antibodies. This technology uses microbeads that attach to defined HLA antigens and detect specific antibodies in the patient’s serum using flow-cytometry. Mean fluorescence intensity (MFI) is thus measured and can be correlated with the presence or absence of an antibody.

Although strong fluorescence intensity has been associated with decreased graft survival [12-14], SA Luminex cannot be used as a quantitative test for the presence of antibodies. Many confounding factors have been identified: the demonstration of a "prozone effect", and poor intra- and inter-laboratory reproducibility. The "prozone effect", described in several studies, corresponds to a transitory rise in MFI rates concomitantly with serum dilution [15-17]. This phenomenon has been

related to the presence of complement in the sera and may be responsible for false negatives.

Furthermore, although SA Luminex is highly sensitive it cannot distinguish the more harmful complement-fixing antibodies[18].

The complement cascade plays an important role in humoral rejection [19]. DSAs may activate the complement cascade leading to inflammation and progressive tissue destruction. Complement activation in humoral rejection was initially demonstrated by finding a complement fraction (C4d) on graft biopsies, but the detection of C4d on AMR biopsies is not systematic and does not necessarily predict graft survival [20].

Recent studies support the clinical importance of detecting donor-specific anti-HLA antibodies that fix C1q or C3d [21-28] because of their association with decreased graft survival. C1q is a product of activation of the classical complement pathway whereas C3d is the C3b cleavage product from factor I. C3b is activated by two pathways: alternate and classical, and allows the formation of the complex membrane attack. In one report, DSA's ability to fix C3d seemed more able to predict the risk of graft loss compared to C1q; this is probably because C3d appears later in the complement cascade than C1q [29]. In these studies, an association between high Luminex MFI and C1q and C3d positivity has also been found.

Complement has a major role in the development and pathogenesis of cAMR. Thus, in this study, we analyzed a population of kidney-transplant patients that had developed *de novo* class-2 DSAs and found a correlation between Luminex MFI and the presence of C3d-fixing antibodies. We also studied the prognostic value of C3d positivity with respect to kidney function and graft survival.

Results

Of the 924 renal-transplant patients that received a graft at Grenoble University Hospital between January 2005 and June 2015, 41 patients (4.4%) that had developed *de novo* class-2 DSAs met the inclusion criteria. The sera from all these patients was studied on D0 and for 24 of these 41 patients at 1 year later. A total of 65 sera were tested using standard Luminex SA and the C3d detection test.

The patients' characteristics are summarized in Table 1. The patients were predominantly male (85%) and had a mean age of 49.3 years (+/- 14.3). Mean glomerular-filtration rate (eGFR), estimated by MDRD, was 40.9 mL/min (+/- 20.35) when DSAs were detected (day 0: D0) and 34.7mL/min (+/- 23) on D365. Fourteen patients (34%) had an eGFR of <30 mL/ min on D0.

Most patients (75.5 %) received an induction therapy of anti-lymphocyte globulins at the time of transplantation. When *de novo* DSAs were first detected, 71% of patients had an immunosuppression protocol that included tacrolimus and mycophenolate mofetil.

Types of de novo *DSAs*

De novo DSAs were detected, on average, at 39.8 (+/- 22.9) months after renal transplantation in these patients. Ten patients had more than one DSA. Most had a class-2 DSA that was DQ (65.5%) (Table 2).

Return to dialysis

Of the ten patients (24.4%) that returned to dialysis, six (14.6%) needed dialysis within the first year following onset of the DSAs. Dialysis was commenced at an average of 47.75 (+/- 58.3) months after a DSA was detected (Table 3).

Correlation study

There was a strong correlation (r = 0.9) between the MFI SA Luminex technique and MFI C3d (p <0,001). Of the 65 examined sera, 22 were C3d positive (34%) and all had SA Luminex MFI scores of >9000.

If we consider the manufacturer-defined threshold for C3d-fixing positivity (MFI=750), all HLA antibodies (DSAs and non-DSAs) positive for C3d fixing had a Luminex SA MFI that was lower than 9000.

Conversely, the 43 C3d-negative sera had a SA Luminex MFI of <11000. Only three sera had a

negative C3d test and a MFI of >9000 (Figures 1 and 2).

Humoral rejection

Of the 41 selected patients, 27 had a graft biopsy (66%). According to the 2013 Banff criteria, acute humoral rejection was found in nine patients (33%). C3d-fixed DSA was positive in only five of these (55%). Seven others (26%) had active cAMR and all of their DSA fixed C3d (100%).

Of the 11 patients without a humoral rejection, three (27%) had a positive C3d test.

We found a significant correlation between the positivity of the C3d test and the presence of active chronic humoral rejection (p = 0.004). This correlation did not significantly diagnose an acute humoral rejection (p = 0.2) (Table 4).

Prognostic assessment

The prognostic study included 36 of the 41 patients: i.e., five had not yet reached their first?? year of follow-up after *de novo* DSAs were detected. We chose a poor prognosis for graft survival as the composite endpoint: i.e., a return to dialysis and/or loss of at least 50% of eGFR in the year following onset of a DSA.

Eight patients (22 %) had a poor outcome according to our composite endpoint. Sixteen of the 36 patients (44%) had a positive C3d test, and six of these (37.5%) had a poor outcome in our composite endpoint. Of the 20 patients (66%) with a C3d-negative test, only two patients (10%) had a poor outcome but lost their grafts through infectious causes (BK virus, invasive CMV) and not because of immunological issues.

The result of the C3d test was significantly associated with graft survival according to our composite endpoint (p = 0.04, chi-squared test). The C3d test had a good negative predictive value of 90% but a low positive predictive value of 37.5%. The sensitivity of this test was 75% and specificity was 64%. The rate of false positives was high at 62.5% and was 15% for false negatives (Table 5, Figure 3).

Discussion

The most interesting findings from this study were the very strong correlation between C3d-antibody positivity and both MFI strength and histologically-proven chronic antibody-mediated rejection in the setting of *de novo* class-2 DSAs.

Our data corroborate the results from a recently published study by Sicard et al. [29], which also compared the prognostic value of the C3d-fixing antibody test with the C1q-fixing test. A correlation between MFI strength and C3d positivity was also found but was less pronounced in their study: 5 (12.5%) of 40 beads with a positive C3d test had an MFI of <5000. This difference may be because we only tested the sera from patients who developed *de novo* class-2 DSAs. In the study by Sicard et al., class 1 and 2 DSAs were investigated whether they were *de novo* or not. The positivity threshold of the C3d detection test was set at >500 MFI whereas we fixed it at 750. Modifying the positivity threshold from 750 to 500 MFI in our study did not change our results.

Several studies have shown a similar correlation between the positivity of the C1q test and the importance of SA Luminex MFI with a positivity threshold of 10,000 MFI [24]. This led us to wonder whether the amount of antibodies may be responsible for complement activation rather than their intrinsic specificity.

In accordance to previous studies, our cohort confirmed that this complement-fixing DSA-detection technique was a useful prognostic tool. Despite our small number of patients, the results from the DSA-detection test for fixing C3d were significantly (p = 0.04) and were associated with graft survival (defined by the number of patients that needed to return to dialysis and/or loss of 50% of MDRD clearance in the year following onset of a DSA). Among patients who had a positive C3d test, 37.5% had a poor outcome in our overall end-point. This proportion seemed to be significant at just 1 year after the onset of a DSA. More interestingly, only 2 of the 20 patients (10%) had a poor outcome despite a negative C3d test, and these patients lost their grafts from infectious (BK virus and invasive CMV) rather than immunological causes.

In our study, the positivity of the C3d test was also significantly associated with the presence of active chronic humoral rejection (p = 0.04) according to the Banff classification. Curiously, this correlation was not found with the occurrence of an acute humoral rejection, possibly because of a lack of patients (i.e., only 27 of the 41 patients underwent a graft biopsy). This could be partially explained by the timing of the biopsy, which did not necessarily correspond with detection of antibodies.

The retrospective and monocentric nature of this study and the small number of included patients are certainly limitations to our results, but we believe that this study merits attention because of its particularities. Firstly, we included a very homogeneous population, which excluded all patients immunized before transplantation and only included *de novo* class-2 immunized patients. Furthermore, patients received a very homogeneous immunosuppressive induction regimen, which included, for the most part, tacrolimus and mycophenolate as maintenance therapies, plus steroids, which were withdrawn within the first year post-transplantation.

Our Luminex studies were performed solely with the Immucor® kits: we performed dilution tests and EDTA pretreatments to counter the eventual "prozone effect" in a limited number of sera that presented with high MFIs. These tests did not show any significant difference in MFI readings, thus excluding this bias (data not shown). To our knowledge, the "prozone effect" has been only associated with other manufacturers other than Luminex [(30)].

The *de novo* detection of DSAs is, at present, one of the most frustrating findings for transplant clinicians: the presence of these antibodies is certainly a bad prognostic factor; however, there is no tool, as yet, that can distinguish the most deleterious antibodies from those that are more benign. Novel diagnostic markers, such as complement-fixing antibody detection kits (C1q and C3d), have been developed to respond to this need. Unfortunately, we found that C3d–fixing for antibody positivity provided little additional information compared to the standard SA Luminex technique, as detection of complement-fixing antibodies may depend on the quantity of DSAs present in the serum.

In conclusion, it is now clear that there is a deleterious effect on the survival of graft-reactive antibodies that fix the complements C1q and C3d. Nevertheless, the complement-fixing DSA-detection tests are expensive and seem almost perfectly correlated with high SA Luminex MFI scores. Under these conditions, we question the medical and economic benefits of these techniques when compared to a well-performed SA Luminex technique, in which we know that a high MFI means a greater risk of graft loss.

Materials and methods

Population

We selected all consecutive renal-transplant patients who received a graft between January 2005 and June 2015 at Grenoble University Hospital. HLA-sensitized patients before transplantation, those aged <18 years, and liver-, heart-, or lung-transplant patients were excluded.

We then selected patients that developed a *de novo* class-2 DSA (with an MFI of >1000 assessed by SA Immucor Luminex ® laboratory). The day when *de novo* DSAs were detected was considered as day 0 (D0). A biopsy was performed if kidney function was altered or proteinuria appeared.

Clinical data

We collected data when a *de novo* DSA was discovered (D0) and at 1 year later (D365): i.e., eGFR (MDRD), proteinuria, immunosuppressive regimen, HLA antibody specificities, and MFI.

Histological data

The results from graft biopsies were collected. AMR was defined histologically according to the Banff 2013 classification.

Immunological technique

The first positive serum for a *de novo* class-2 DSA (D0) was analyzed together with a serum sample taken 1 year later (D365), when available.

Sera were tested in parallel with the SA Luminex standard detection technique (Immucor® [Belgium]) and with the C3d-fixing HLA antibody detection kit (Immucor®). The retained MFI

values corresponded to the manufacturer's Background Corrected MFI (BCM) value. Results were processed using Match It® and Fusion® software. Positivity for the SA Luminex analysis was defined as an MFI >1000 in D0 serum. The C3d positivity threshold was defined by an MFI of >750 (the threshold was defined following the manufacturer's recommendations and previous publications).

Detection of allo-reactive antibodies using SA Luminex technology

Sera were decanted, vortexed, and centrifuged. In each well of a filter plate, 40 µL of beads and 10 µL of vortexed serum were distributed. The preparation was incubated for 30 min. A 100-µL wash and then three 250-µL washes of the buffer were performed. In each well, 50 µL of conjugate, diluted to $1/5^{th}$, was added. The preparation was incubated again for 30 min with shaking, and then washed with 150 µL of buffer per well. The plate was then read using Luminex.

Detection of C3d-fixing HLA antibodies

The preparation of sera included decanting, centrifuging, and a vortex. LSA beads were mixed with the positive controls beads C3d (mix). In a 96-well filter microplate, prepared sera were added to the mix and incubated for 30 min. We added an additional source of C3dCS and the mix was incubated for a further 30 min. Four washes were then necessary before adding the diluted specific conjugate. The preparation was then re-incubated for 30 min, was washed twice, and then added to the buffer.

Statistics

The correlation between the MFI obtained using the standard technique and with the C3d kit was studied for the DSAs and then with all the anti-HLA antibodies detected (DSA and no DSAs) using Spearman's correlation formula. The chi-squared test was used to study the prognostics. P value <0,05 was considered as statistically significant

References

1) Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. N Engl J Med. 2010; 363(15):1451-1462.

2) Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. Am J Transplant. 2012; 12(2):388-399.

3) Pouliquen E, Koenig A, Chen CC, et al. Recent advances in renal transplantation: antibody-mediated rejection takes center stage. F1000Prime Rep. 2015; 12(7):51.

4) Fehr T, Gaspert A. Antibody-mediated kidney allograft rejection: therapeutic options and their experimental rationale. Transpl Int. 2012; 25(6):623-32.

5) Sapir-Pichhadze R, Curran SP, John R, et al. A systematic review of the role of C4d in the diagnosis of acute antibody-mediated rejection. Kidney Int. 2015; 87(1):182-194.

6) Loupy A, Hill GS, Jordan SC. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. Nat Rev Nephrol. 2012; 8(6):348-357.

7) Djamali A, Kaufman DB, Ellis TM, et al. Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: current status and novel approaches. Am J Transplant. 2014 ; 14(2):255-271.

8) Konvalinka A, Tinckam K. Utility of HLA Antibody Testing in Kidney Transplantation. J Am Soc Nephrol. 2015; Jul; 26(7):1489-1502.

9) Haas M, Sis B, Racusen LC, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. Am J Transplant. 2014; 14(2):272-283.

10) Kobayashi T, Maruya E, Niwa M, et al. Significant association between chronic antibody-mediated rejection and donor-specific antibodies against HLA-DRB rather than DQB in renal transplantation. Hum Immunol. 2011; 72(1):11-17.

11) Croze LE, Tetaz R, Roustit M, et al. Conversion to mammalian target of rapamycin inhibitors increases risk of de novo donor-specific antibodies. Transpl Int. 2014; 27(8):775-783.

12) Heilman RL, Nijim A, Desmarteau YM, et al. De novo donor-specific human leukocyte antigen antibodies early after kidney transplantation. Transplantation. 2014; 98(12):1310-1315.

13) Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. J Am Soc Nephrol. 2010; 21(8):1398-1406.

14) Kannabhiran D, Lee J, Schwartz JE, et al. Characteristics of Circulating Donor Human Leukocyte Antigen-specific Immunoglobulin G Antibodies Predictive of Acute Antibody-mediated Rejection and Kidney Allograft Failure. Transplantation. 2015; 99(6):1156-1164.

15) Guidicelli G, Anies G, Bachelet T, et al. The complement interference phenomenon as a cause for sharp fluctuations of serum anti-HLA antibody strength in kidney transplant patients. Transpl Immunol. 2013; 29(1-4):17-21.

16) Schwaiger E, Wahrmann M, Bond G, et al. Complement component C3 activation: the leading cause of the prozone phenomenon affecting HLA antibody detection on single-antigen beads. Transplantation. 2014; 97(12):1279-1285.

17) Martina Schnaidt, Christof Weinstock, Marija Jurisic, et al. HLA Antibody Specification Using Single-Antigen Beads—A Technical Solution for the Prozone Effect Transplantation 2011;92: 510–515.

18) Stegall MD, Chedid MF, Cornell LD. The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation. Nat Rev Nephrol. 2012; 8(11):670-678.

19) Lefaucheur C, Nochy D, Hill GS, et al. Determinants of poor graft outcome in patients with antibody-mediated acute rejection. Am J Transplant. 2007; 7(4):832-841.

20) Loupy A, Hill GS, Suberbielle C, et al. Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA). Am J Transplant. 2011; 11(1):56-65.

21) Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. N Engl J Med. 2013; 369(13):1215-1226.

22) Llorente S, Boix F, Eguia J, et al. C1q-fixing human leukocyte antigen assay in immunized renal patients: correlation between Luminex SAB-C1q and SAB-IgG. Transplant Proc. 2012; 44(9):2535-2537.

23) Chen G, Sequeira F, Tyan DB. Novel C1q assay reveals a clinically relevant subset of human leukocyte antigen antibodies independent of immunoglobulin G strength on single antigen beads. Hum Immunol. 2011; 72(10):849-858.

24) Messina M, Ariaudo C, Praticò Barbato L, et al. Relationship among C1q-fixing de novo donor specific antibodies, C4d deposition and renal outcome in transplant glomerulopathy. Transpl Immunol. 2015; 33(1):7-12.

25) Yell M, Muth BL, Kaufman DB, et al. C1q Binding Activity of De Novo Donor-specific HLA Antibodies in Renal Transplant Recipients With and Without Antibody-mediated Rejection. Transplantation. 2015; 99(6):1151-1155.

26) Ata P, Canbakan M, Kara M, et al. Serum flow cytometric C1q binding antibody analysis of renal recipients with low levels of sensitization. Transplant Proc. 2012; 44(6):1652-1655.

27) Calp-Inal S, Ajaimy M, Melamed ML, et al. The prevalence and clinical significance of C1q-binding donor-specific anti-HLA antibodies early and late after kidney transplantation. Kidney Int. 2015; 89(1):209-216.

28) Guidicelli G, Guerville F, Lepreux S, et al. Non-Complement-Binding De Novo Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Kidney Allograft Survival. J Am Soc Nephrol. 2016; 27(2):615-625.

29) Sicard A, Ducreux S, Rabeyrin M, et al. Detection of C3d-binding donor-specific anti-HLA antibodies at diagnosis of humoral rejection predicts renal graft loss. J Am Soc Nephrol. 2015; 26(2):457-467.

30) Tambur AR, Herrera ND, Haarberg KM et al. Assessing Antibody Strength: Comparison of MFI, C1q, and Titer Information. Am J Transplant. 2015; 2421-2430.

Table 1: Population characteristics

Characteristics	**Results**
Sex: number/number total (%) - Males - Females	 35/41 (85%) 6/41 (15%)
Average age at the onset of DSA (years)	49.3 (+/- 14.3)
Type of nephropathy: number/ total (%) - IgA nephropathy - Vascular nephropathy - Diabetic nephropathy - Uropathy - Polycystic Kidney disease - Focal and segmental glomerulosclerosis - Systemic Lupus - Membranous glomerulonephritis - Post infection glomerulonephritis - Bourneville tuberous sclerosis - Unknown	12/41 (29%) 7/41 (17%) 5/41 (12%) 5/41 (12%) 4/41 (9.8%) 2/41 (4.9%) 2/41 (4.9%) 1/41 (2.4%) 1/41 (2.4%) 1/41 (2.4%) 1/41 (2.4%)
Immunosuppressive treatment at the onset of DSA: number / total (%) - Tacrolimus + Mycophenolate mofetil - Ciclosporine + Mycophenolate mofetil - mTor Inhibitors (Sirolimus ou Everolimus) + Mycophenolate mofetil **Type of induction** - Antithymocyte globulins - Basiliximab - Daclizumab - No induction	 29/41 (71%) 6/41 (14.5%) 6/41 (14.5%) 31/41 (75.5%) 8/41 (19.5%) 1/41 (2.5%) 1/41 (2.5%) 0
Estimated glomerular filtration rate (eGFR) on D0 (average mL / min) eGFR: number / total (%) < 30 mL/min > 30 mL/min **Estimated glomerular filtration rate (eGFR) on D365 (average mL / min)eGFR: number / total (%)** < 30ml/min >30ml/min	40.9 (+/- 20.35) 14/41 (34%) 27/41 (66%) 34.7 (+/- 23) 23/36 (64%) 13/36 (36%)

Abbreviations: IgA, immunoglobulin A; DSA, donor-specific antibodies; MDRD, Modification of Diet in Renal Disease

Table 2: de novo DSA characteristics

Characteristics	**Number (%)**
Time to onset of *de novo* DSA after transplantation (months)	39.8 (+/- 22.9)
Number of class 2 DSA **Type of class 2 DSA: number/total (%)** - DQ - DR - DP	55 36/55 (65.5%) 15/55 (27.3%) 4/55 (7.2%)
Average number of DSA per patient **Patients who have developed more than one *de novo* DSA**	1,3 (1-3) 10/41 (24%)

Abbreviation: DSA, donor-specific antibodies.

Table 3: Primary-endpoint and kidney allograft failure

Characteristics	**Number (%)**
Return to dialysis: number/ total (%)	10/41 (24.4%)
Return to dialysis in the first year after the onset of *de novo* DSA	6/41 (14.6%)
Average delay for return to dialysis following discovering a *de novo* DSA (months)	47.75 (+/- 58.3)

Abbreviation: DSA, donor-specific antibodies.

Table 4: C3d test depending on the histological lesions found on graft biopsy

Histological lesions/ C3d Test	**C3d +**	**C3d -**	**Total of biopsies**
Acute humoral rejection	5 (55%)	4 (45%)	9 **(33%)**
Active chronic humoral rejection	7 (100%)	0	7 **(26%)**
No humoral rejection	3 (27%)	8 (73%)	11 **(41%)**
Total			**27**

Table 5: Evolution of the graft to a year of the onset of a *de novo* DSA related to C3d positivity rate

Evolution as composite endpoint / Test C3d	**C3d +**	**C3d -**	**Total**
Progression	6	2	8
No progression	10	18	28
Total	**16 (44%)**	**20 (66%)**	**36**

Figure 1: Comparison of standard and C3d assays (only DSA beads considered)

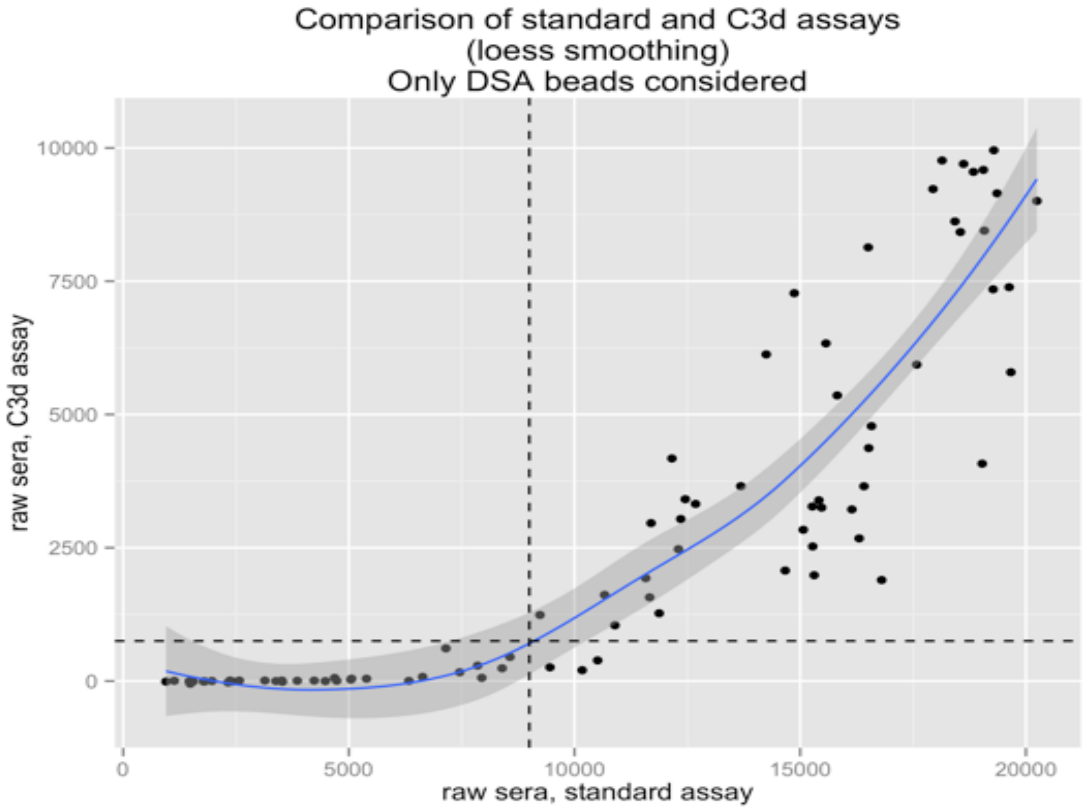
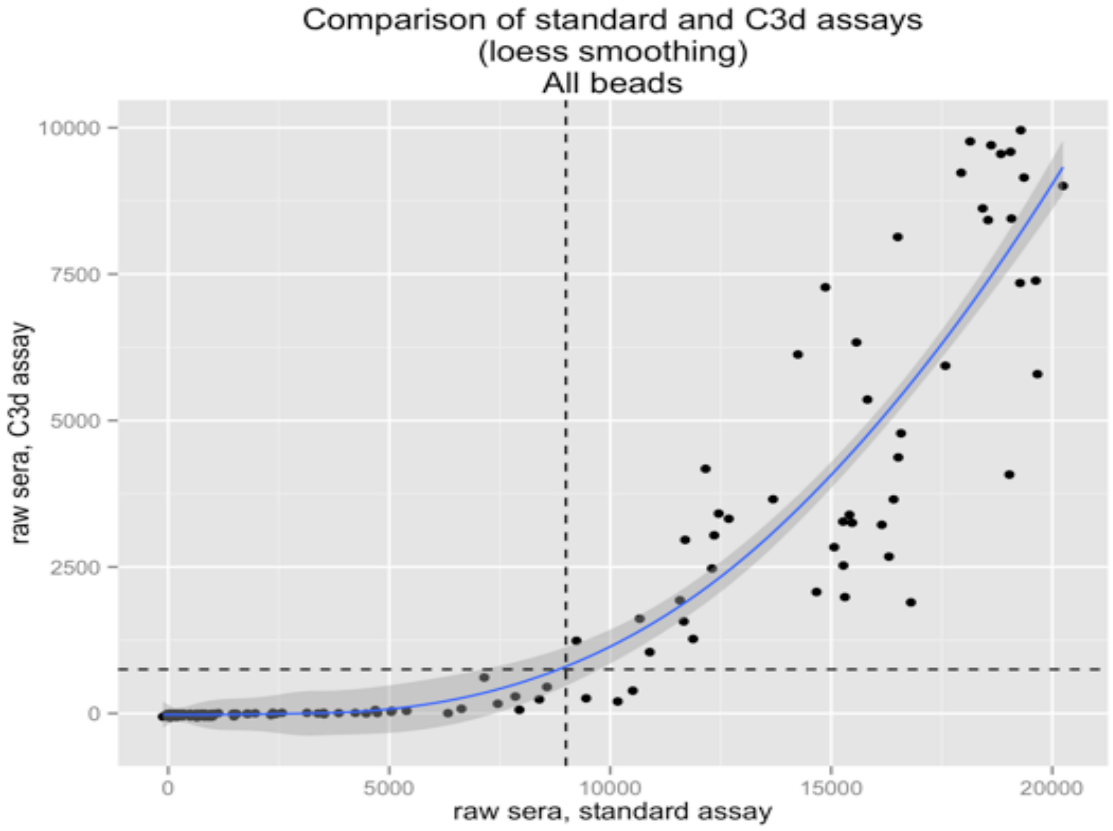


Figure 2: Comparison of standard and C3d assays (all beads)



THESE SOUTENUE PAR : VILLEMAIRE MORGANE

TITRE : **Rôle du complément dans le rejet humoral chez des patients transplantés rénaux - La positivité des anticorps anti-HLA fixant le C3d est corrélée à la MFI (Mean Fluorescence Intensity) en Luminex**

CONCLUSION

Introduction: Le rejet humoral chronique est la principale cause de perte des greffons rénaux. Le diagnostic repose sur la détection d'anticorps anti HLA spécifiques contre le donneur (DSA). La technique la plus utilisée pour la détection des DSA est le Single Antigen (SA) Luminex. La méthode permet d'identifier les anticorps anti HLA mais ne discerne pas les anticorps plus délétères. Des études mettent en avant l'intérêt de détecter des DSA fixant le complément (C1q ou C3d). La présence de DSA fixant le C3d (C3dDSA) serait un facteur de mauvais pronostic de la survie du greffon. L'objectif de l'étude est d'évaluer la proportion de patients ayant développé des C3dDSA, de comparer cette positivité aux MFI en SA Luminex et d'analyser la survie du greffon à un an de suivi.

Méthodes: Nous avons inclus les patients greffés rénaux au CHU de Grenoble entre 2005 et 2015 ayant présenté des DSA de novo de classe 2 en SA Luminex. Les sérums ont été analysés en SA Luminex et par le kit de détection C3d (Immucor®). Seuls les patients présentant au moins un DSA avec MFI >1500 ont été inclus dans l'étude. Les données cliniques à l'apparition des DSA et à un an de suivi ont été recueillies.

Résultats: Sur 924 patients, 41 (4,4%) ont développé des DSA de classe 2 de novo. Sur 65 sérums analysés : 43 sérums étaient C3dDSA négatifs (66%). La positivité du test C3d est fortement corrélée aux taux de MFI en SA Luminex (r=0.9). Tous les anticorps anti HLA fixant le C3d ont une MFI >9000 en SA Luminex.

Un an après l'apparition des DSA, 22% des patients ont perdu leur greffon ou plus de 50% de débit de filtration glomérulaire. Sur ce critère composite, le résultat du test C3d est significativement associé à la survie du greffon (p=0.04).

Conclusion: La positivité du test de détection d'anticorps anti HLA fixant le C3d est fortement corrélée à des taux élevés de MFI en SA Luminex avec un seuil autour de 9000 de MFI. Ce test paraît intéressant à titre pronostique : les anticorps anti HLA fixant le C3d auraient un effet délétère sur la survie du greffon. Cependant, les tests de détection des DSA fixant le complément sont des techniques coûteuses et semblent corrélés presque parfaitement à de forts taux de MFI en technique SA Luminex. Dans ces conditions, nous mettons en doute le bénéfice médico-économique de ces techniques par rapport à une technique SA Luminex bien faite dont on sait que les MFI élevées sont plus à risque de perte de greffon.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le 18 Avril 2016.

LE DOYEN

Pour la Présidente
et par délégation

Le Doyen de Médecine
Pr. Jean-Paul ROMANET

UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

LE PRESIDENT DE LA THESE

Figure 3: Evolution of graft function at 1 year after the onset of a *de novo* DSA based on the C3d test and the SA Luminex test MFI (overall data for return to dialysis or 50% loss of graft function at 1 year after the appearance of *de novo* DSA)

