



HAL
open science

Anticorps spécifiques du greffon fixant le C3d et rejet humoral infra-clinique en transplantation rénale

Rangolie Kaveri

► **To cite this version:**

Rangolie Kaveri. Anticorps spécifiques du greffon fixant le C3d et rejet humoral infra-clinique en transplantation rénale. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02458299

HAL Id: dumas-02458299

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02458299>

Submitted on 28 Jan 2020

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.

UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE
UFR SANTE – Département PHARMACIE

Année 2018-2019

N°

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 28 juin 2019

par

Rangolie KAVERI

Née le 23/09/1991 à Paris

**Anticorps spécifiques du greffon fixant le C3d et rejet
humoral infra-clinique en transplantation rénale**

Président du jury : Professeur Loïc FAVENNEC

Directeurs de thèse : Docteur Dominique BERTRAND

Docteur Fabienne FARCE

Professeur Loïc FAVENNEC

Membres du jury : Professeur Sophie CANDON

Docteur Françoise HAU

ANNEE UNIVERSITAIRE 2018 - 2019

U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Benoit VEBER
Professeur Guillaume SAVOYE

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle APTER	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Jean-Marc BASTE	HCN	Chirurgie Thoracique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal BENHAMOU	HCN	Médecine interne
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mme Sophie CANDON	HCN	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas CORNU	HCN	Urologie
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mr Stéphane DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric DI FIORE	CB	Cancérologie
Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie

Mr Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mr Olivier GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
Mr Claude HOUDAYER	HCN	Génétique
Mr Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra LAMIA	Havre	Pneumologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépatogastro-entérologie

M. Benoit MISSET (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation Médicale Mr Jean-François
MUIR (<i>urnombre</i>)	HB	Pneumologie
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace ROMAN (<i>disponibilité</i>)	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Christian THUILLEZ (<i>urnombre</i>)	HB	Pharmacologie
Mr Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
M. Gilles TOURNEL	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre VANNIER (<i>urnombre</i>)	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	HB	Service Santé Réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
Mme Marie-Laure WELTER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Neurophysiologie
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOCHE	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas MOUREZ (<i>détachement</i>)	HCN	Virologie
Mr Gaël NICOLAS	HCN	Génétique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia ROLLIN	HCN	Médecine du Travail
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr David WALLON	HCN	Neurologie
Mr Julien WILS	HCN	Pharmacologie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mr Thierry WABLE	UFR	Communication
Mme Mélanie AUVRAY-HAMEL	UFR	Anglais

II - PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Isabelle LEROUX - NICOLLET	Physiologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mr Jérémy BELLIEN (MCU-PH)	Pharmacologie
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Camille CHARBONNIER (LE CLEZIO)	Statistiques
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Dominique DUTERTE- BOUCHER	Pharmacologie
Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Nejla EL GHARBI-HAMZA	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique

Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques
Mme Hong LU	Biologie
M. Jérémie MARTINET (MCU-PH)	Immunologie
Mme Marine MALLETER	Toxicologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT	Chimie analytique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES UNIVERSITAIRES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mme Caroline BERTOUX	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
----------------------------	---------

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mme Alice MOISAN	Virologie
Mme Anaïs SOARES	Bactériologie
M. Henri GONDE	Pharmacie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mme Sophie MOHAMED	Chimie Organique
---------------------------	------------------

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET	Physiologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Rémi VARIN	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR MEDECINE GENERALE

Mr Jean-Loup **HERMIL** (PU-MG) UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCE MEDECINE GENERALE

Mr Matthieu **SCHUERS** (MCU-MG) UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mme Laëtitia **BOURDON** UFR Médecine Générale

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mr Emmanuel **HAZARD** UFR Médecine Générale

Mme Marianne **LAINÉ** UFR Médecine Générale

Mme Lucile **PELLERIN** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Paul MULDER (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su RUAN (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain FRAINEAU (med)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline GAILDRAT (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas GUEROUT (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel LETELLIER (med)	Physiologie
Mme Christine RONDANINO (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric PASQUET	Sciences du langage, orthophonie
Mr Youssan Var TAN	Immunologie
Mme Isabelle TOURNIER (med)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

SJ – Saint Julien Rouen

L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs.

1	CHAPITRE I – INTRODUCTION	10
1.1	Contexte	10
1.2	Définitions des différents types de greffes	11
1.3	Le système HLA, ou Human Leukocyte Antigen	11
1.3.1	Base génétique	11
1.3.2	Structure des molécules de classe I	12
1.3.3	Structure des molécules de classe II	13
1.3.4	Nomenclature HLA	15
1.3.5	Causes de sensibilisation anti-HLA	18
1.3.5.1	La transfusion	18
1.3.5.2	La grossesse	18
1.3.5.3	Transplantations antérieures	19
1.3.5.4	Immunisation dite « naturelle »	19
1.4	HLA et transplantation rénale	20
1.5	Mécanismes immunologiques du rejet	22
1.5.1	Le système du complément	22
1.5.1.1	La voie classique	23
1.5.1.2	La voie alterne	23
1.5.1.3	La voie des lectines	24
1.5.2	Cytotoxicité dépendante des anticorps, ou ADCC (Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity)	24
1.5.3	La réponse cellulaire	25
1.5.4	La réponse humorale	26
1.5.5	Physiopathologie du rejet humoral	27
1.5.5.1	Rejet médié par les anticorps	27
1.5.5.2	Rejet aigu médié par les anticorps	30
1.5.5.3	Rejet indolent médié par les anticorps	30
1.5.5.4	Rejet chronique médié par les anticorps	31
1.5.5.5	C4d et rejet chronique	31
1.5.5.6	Rejet médié par les anticorps avec Cd4 négatif	33
1.6	Classification de Banff	34
1.7	Rejet non-HLA et autres facteurs de risques	35
1.7.1	Anticorps non HLA	35
1.7.2	Greffes ABO-incompatibles	36
1.8	Recommandations de l'Agence de la biomédecine	37
1.8.1	Suivi du patient en vue de l'inscription sur liste d'attente	37
1.8.2	Suivi du patient inscrit sur liste d'attente	38
1.8.3	Suivi du patient après la greffe	38
1.9	Les différentes techniques existantes pour mettre en évidence une immunisation anti-HLA	39
1.9.1	Les tests cellulaires	39
1.9.1.1	Le PRA (Panel Reactive Antibody)	39
1.9.1.2	Le cross-match par lymphocytotoxicité	39
1.9.1.3	Le cross-match par cytométrie en flux	43

1.9.2	Les tests en phase solide	44
1.9.2.1.1	ELISA	44
1.9.2.1.2	Luminex	44
1.9.3	Cross match virtuel	48
1.10	Techniques pour la mise en évidence du complément	48
1.10.1	Origines du concept	48
1.10.2	Le test c4d	49
1.10.3	Le test C1q	49
1.10.4	Le test C3d	50
1.11	Limites techniques communes aux tests d'identification SAB des anticorps	50
1.11.1	Effet prozone	50
1.11.2	Antigènes dénaturés	51
1.11.3	Densité antigénique	52
1.11.4	Représentativité des panels	52
1.12	Objectifs de l'étude	52
2	CHAPITRE II - PATIENTS ET METHODES	54
2.1	Patients	54
2.2	Aspects techniques	55
2.2.1	Identification des anticorps anti-HLA par One Lambda	56
2.2.2	Test C3d Immucor	57
2.3	Analyses statistiques	60
3	CHAPITRE III – RESULTATS	61
3.1	Analyses descriptives	61
3.2	Résultats du test C3d	66
3.3	Rejet médié par les anticorps et histologie	71
3.4	Test C3d et détection des DSA	73
3.5	Fonction rénale et C3d	77
3.6	Fonctions de survie	83
4	CHAPITRE IV – DISCUSSION	85
4.1	Synthèse des résultats	85
4.1.1	Facteurs prédictifs du rejet infra-clinique	85
4.1.2	Test C3d	85
4.1.3	Histologie	86
4.1.4	Évolution de la fonction rénale	87

4.1.5	MFI et C3d	88
4.2	Limites de l'étude	89
4.2.1	Limites techniques de notre étude	89
4.2.2	Données HLA manquantes	90
4.2.3	Durée de suivi	90
4.2.4	Biais du traitement immunosuppresseur	91
4.3	Comparaison avec la littérature	91
4.3.1	C1q et rejet	91
4.3.2	C3d et rejet	92
4.4	Conclusion	96
4.5	Perspectives	96
5	BIBLIOGRAPHIE	99

LISTE DES ABBREVIATIONS

ABMR : Antibody-Mediated Rejection en anglais, Rejet médié par les anticorps en français

ADCC : Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity

ADN : Acide Désoxyribonucléique

BCR : Récepteur B pour l'antigène

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CAM : Complexe d'attaque membranaire

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes

DFG : Débit de Filtration Glomérulaire

DSA : Donor Specific Antibody en anglais, Anticorps dirigé contre le greffon en français

DTT : Dithiothréitol

EDTA : Éthylène-diamine-tétra-acétique

EFS : Établissement Français du Sang

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

Fc : Fragment cristallisable des immunoglobulines

HLA : Human Leukocyte Antigen

IgG : Immunoglobuline de classe G

IgM : Immunoglobuline de classe M

IVIg : Immunoglobulines polyvalentes par voie intraveineuse

LCT : Lymphocytotoxicité

LSA : Luminex Single Antigen

MDRD : Modification of diet in renal disease, équation permettant l'estimation de la fonction rénale

MFI : Mean Fluorescent Intensity ou intensité moyenne de fluorescence

MICA : Protein MHC class I related chain A

NGS : Next Generation Sequencing

PBR : Peptide Binding Region, ou site de liaison au peptide

PRA : Panel Reactive Antibody

SAB : Single Antigen Bead

TCR : Récepteur T pour l'antigène

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Structure schématique des molécules HLA de classe I.....	12
Figure 2 : Structure schématique des molécules HLA de classe II.....	13
Figure 3 : Représentation schématique de l'expression protéique à la surface cellulaire des molécules HLA à partir des gènes	14
Figure 4 : Présentation antigénique aux lymphocytes T	15
Figure 5 : Représentation graphique de l'augmentation du nombre d'allèles HLA découverts avec le temps	16
Figure 6 : Explications sur la nomenclature HLA de 2010, inspirée et traduite depuis hla.alleles.org.	17
Figure 7 : Les trois voies du complément.....	22
Figure 8 : Schéma de l'ADCC.....	25
Figure 9 : Signaux de co-stimulation et interaction entre Lymphocyte T et CPA	27
Figure 10 : Schéma du mécanisme de pathogénicité des DSA.....	29
Figure 11 : Evolution infra-clinique et clinique du rejet humoral, d'après Loupy et al, The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure, 2012.....	32
Figure 12 : Principe du cross-match par lymphocytotoxicité.....	40
Figure 13 : Schéma visuel de la technique du cross-match, adapté de BasicMedicalKey.com.....	41
Figure 14: Lecture d'une plaque de Terasaki au microscope à fluorescence.....	42
Figure 15 : Principe du cross-match par cytométrie en flux.....	44
Figure 16: Principe de détection des micro-billes par le Luminex.....	45
Figure 17: Différences entre les différents panels Luminex : Dépistage, Billes phénotypées, et SAB..	47
Figure 18: Schéma de la voie classique du complément et des tests en phase solide	50
Figure 19 : Protocole technique SAB One Lambda	57
Figure 20 : Protocole technique du test C3d, Immucor LIFECODES C3d Detection.....	59
Figure 21: Répartition de la cohorte de patients selon leur statut C3d.....	66
Figure 22: Distribution du C3d selon les groupes « rejet humoral infra-clinique » et « absence de rejet »	67
Figure 23: Répartition du C3d selon les groupes « rejet actif », « rejet chronique actif » et « absence de rejet »	68
Figure 24: Répartition des types de rejet « actif infra-clinique », « chronique infra-clinique» et « absence de rejet » selon les groupes « C3d+» et « C3d-».....	69
Figure 25: Répartition du C3d selon les groupes « rejet actif » ou « rejet chronique actif »	70

Figure 26: Distribution du C3d dans le groupe présentant un rejet humoral infra-clinique à la biopsie et ayant un marquage C4d des capillaires périrubulaires positif	71
Figure 27: Distribution du C3d dans le groupe ne présentant pas de rejet humoral infra-clinique à la biopsie mais ayant un marquage C4d des capillaires périrubulaires positifs.....	72
Figure 28: Comparaison des moyennes des MFI du DSA immunodominant selon les groupes C3d- et C3d+	73
Figure 29: Comparaison des moyennes des MFI de la somme des DSA selon les groupes C3d- et C3d+	74
Figure 30: Corrélation entre la MFI du DSA immunodominant (iMFI) et iBG-Adj (MFI ajustée au bruit de fond du DSA immunodominant)	75
Figure 31: Corrélation entre la MFI du DSA immunodominant (iMFI) et iBCR-Neg	75
Figure 32: Évolution du MDRD selon les groupes « rejet actif infra-clinique », « rejet chronique actif infra-clinique », « absence de rejet » au moment de la découverte des DSA, à un an, à 3 ans puis à 5 ans.....	78
Figure 33: Évolution du MDRD pour toute la cohorte selon les groupes « C3d+ » et « C3d- », au moment de la découverte des DSA, à un an, à 3 ans puis à 5 ans.....	78
Figure 34: Évolution du MDRD dans le groupe « rejet humoral infra-clinique » selon le statut C3d au moment de la découverte des DSA, à un an, à 3 ans puis à 5 ans.....	79
Figure 35: Évolution du MDRD dans le groupe « absence de rejet » selon le statut C3d au moment de la découverte des DSA, à un an, à 3 ans puis à 5 ans.....	80
Figure 36: Comparaison à différents temps (1 an, 3 ans puis 5 ans après la biopsie) du nombre de patients avec une baisse de la fonction rénale supérieure à 30% par rapport au moment de la biopsie, selon les groupes « C3d+ » et « C3d- »	81
Figure 37: Probabilité cumulée de dialyse en fonction du temps et du statut C3d pour toute la cohorte	83
Figure 38 : Probabilité cumulée de dialyse en fonction du temps et du statut C3d pour le groupe rejet humoral infra-clinique (actif et chronique actif), suivi 5 ans post-biopsie.....	84

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Organigramme de décision de greffe au laboratoire HLA de Bois-Guillaume.....	43
Tableau 2 : Caractéristiques générales de la cohorte	55
Tableau 3 : Caractéristiques des patients selon les groupes « rejet actif infra-clinique », « chronique actif infra-clinique » ou « absence de rejet »	61
Tableau 4 : Facteurs prédictifs associés au rejet humoral infra-clinique ; Analyse univariée de l'impact des variables sur le rejet actif infra-clinique	63
Tableau 5 : Facteurs prédictifs associés au rejet humoral infra-clinique ; Modèle 1 - Analyse multivariée de l'impact des variables sur le rejet actif infra-clinique avec MFI iDSA.....	64
Tableau 6 : Facteurs prédictifs associés au rejet humoral ; Modèle 2- Analyse multivariée de l'impact des variables sur le rejet actif avec MFI sDSA	65

1 CHAPITRE I – Introduction

1.1 Contexte

En France en 2017, 3782 greffes de rein ont eu lieu, dont 611 à partir de donneurs vivants. Ce chiffre est en constante augmentation : +5% par rapport à 2016, et +24% en 5 ans [1]. En effet, la transplantation rénale à partir d'un donneur décédé ou vivant représente la thérapeutique de choix, ou « gold standard », dans la prise en charge des patients insuffisants rénaux chroniques. L'allogreffe de rein permet une meilleure espérance de vie par rapport aux patients dialysés, avec une mortalité inférieure de 68%, [2] et une meilleure qualité de vie par rapport aux patients dialysés, et ce même chez les patients très immunisés. Le nombre de nouveaux inscrits est également en constante augmentation, mais on distingue cependant des différences notables dans l'accès à la greffe selon les patients : chez les patients hyper-immunisés (Taux de greffon incompatible ou TGI >85%), la probabilité d'être greffé à 24 mois est de 27% contre 50% chez les non-immunisés [1]. Ces chiffres démontrent bien la problématique de l'immunisation en greffe, et plus largement celle du rejet de greffon, qui reste le principal enjeu aujourd'hui. Durant les vingt dernières années, les connaissances sur les mécanismes du rejet ont évolué et ont mené à des problématiques nouvelles. Le rejet médié par les lymphocytes T conduisant au rejet aigu constituait la problématique majeure au début des greffes ; il est aujourd'hui bien pris en charge. On sait maintenant que le contrôle de la réponse humorale est la clé pour parvenir à de meilleurs résultats sur la survie du greffon et le rejet chronique. La meilleure compréhension du rejet de greffe médié par les anticorps (ABMR), l'arrivée de nouvelles techniques de plus en plus sensibles pour dépister les anticorps anti-HLA, et l'approche moléculaire ont permis l'avènement de nouvelles approches thérapeutiques et l'amélioration du suivi des patients greffés. Dans ce travail, nous allons nous intéresser à une cohorte multicentrique de patients transplantés rénaux, tous cliniquement stable à l'inclusion mais ayant développé de novo un ou plusieurs anticorps dirigés contre leur greffon. Afin de bien comprendre les objectifs de l'étude, plusieurs rappels physiopathologiques et techniques vont être développés en introduction. Nous reviendrons plus précisément sur les objectifs de l'étude ensuite.

1.2 Définitions des différents types de greffes

L'autogreffe est la greffe de tissu ou organe à partir d'un individu et pour ce même individu. Le donneur étant aussi le receveur, il n'existe pas de phénomène de rejet immunologique. L'allogreffe est la transplantation d'un tissu ou organe d'un autre individu de la même espèce, le donneur, en vue de restaurer les fonctions de cet organe qui sont amoindries ou inexistantes chez le receveur. Le donneur et le receveur sont donc génétiquement différents, sauf dans le cas d'une greffe entre jumeaux monozygotes. Dans le cas de l'allogreffe, il peut donc y avoir un phénomène de rejet, que nous allons détailler plus loin. En néphrologie, on ne pratique que l'allogreffe.

1.3 Le système HLA, ou Human Leukocyte Antigen

1.3.1 Base génétique

Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH ou MHC en anglais) est une région génétique codant pour un système de protéines cellulaires qui jouent un rôle majeur dans le système immunitaire, notamment pour la défense contre les agents pathogènes. Le premier antigène du système HLA chez l'humain a été découvert en 1952 par Jean Dausset. Le système HLA, ou Human Leukocyte Antigen représente l'ensemble des protéines cellulaires codées dans la région du CMH. Cette région codante se trouve sur le bras court du chromosome 6 en position 6p21 et occupe 4 méga-paires de bases. Il s'agit d'un système extrêmement polymorphe et qui participe à rendre chaque individu unique. Bien que ne représentant en taille qu'environ 0.1% du génome humain (environ 3.6 millions de paires de bases), il contribue à plus de 10% à la diversité génétique humaine [3]. Le polymorphisme signifie qu'il existe, dans une population donnée, un grand nombre d'allèles pour le même locus. Dans le cas des molécules HLA, les différences entre les allèles sont dues à plusieurs « single-nucleotide polymorphisms » (SNPs), c'est-à-dire à une variation d'un seul nucléotide sur une position spécifique du génome. Chaque individu possède deux allèles pour chaque gène HLA, un allèle étant hérité de chacun des parents : on parle d'haplotype. Le nombre total d'allèles dans la population n'est pas connu puisque de nouveaux allèles continuent à être décrits de jour en jour. Le système immunitaire se base sur le HLA pour distinguer le soi du non soi, et ainsi déclencher une réponse adaptée. Le HLA se distingue généralement en HLA de classe I et HLA de classe II. Le système HLA est impliqué dans la reconnaissance et la présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes T.

1.3.2 Structure des molécules de classe I

Les molécules HLA de classe I sont présentes à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme et présentent des peptides endogènes, provenant du cytoplasme et après dégradation par le protéasome en peptide de 8 à 10 acides aminés, aux lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. Les molécules HLA de classe I sont composées de deux chaînes polypeptidiques associées de manière non covalente. La chaîne alpha est codée par les gènes HLA-A, HLA-B, HLA-C. Elle est polymorphique et présente 3 domaines « immunoglobulin-like » alpha1, alpha2 et alpha3. Les domaines alpha1 et alpha2 forment une cavité dans laquelle les peptides antigéniques viennent se loger (Peptide Binding Region, PBR). Dans le système HLA, le polymorphisme est particulièrement important dans les régions de liaison au peptide (PBR) ; il s'agit des exons 2 et 3 principalement pour les molécules de classe I. Ce phénomène a une importance fonctionnelle car il peut mener à des différences dans les capacités de liaison au peptide ainsi que dans les spécificités de reconnaissance des peptides. La chaîne bêta, ou bêta2microglobuline est invariante et codée par un gène hors CMH. Elle sert à assurer la conformation de la molécule. Du fait de l'invariabilité de la bêta2microglobuline, les molécules HLA de classe I sont moins polymorphiques que celles de classe II [4].

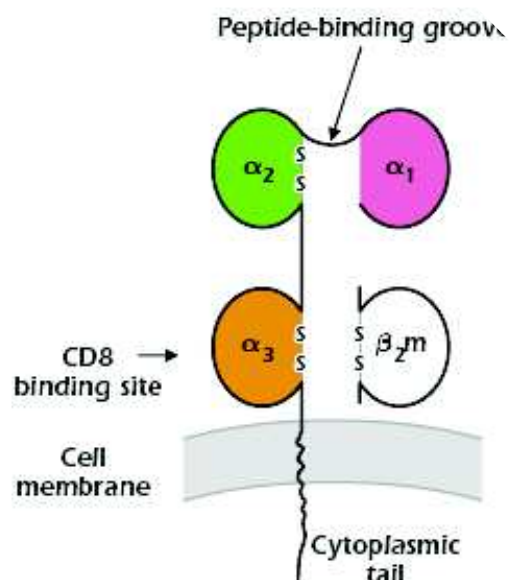


Figure 1 : Structure schématique des molécules HLA de classe I. Les molécules HLA de classe I, avec la chaîne alpha et ses trois domaines, dont la région de liaison au peptide entre les domaines alpha 1 et alpha 2, et la chaîne invariante bêta-2-microglobuline.

1.3.3 Structure des molécules de classe II

Les molécules HLA de classe II ne sont présentes qu'à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) : lymphocytes B, monocytes, macrophages, cellules de Langerhans, cellules dendritiques et cellules endothéliales capillaires. Elles présentent des peptides antigéniques exogènes, qui proviennent de l'extérieur de la cellule et après dégradation en peptides d'environ 15 à 25 acides aminés par le système endo-lysosomal, aux lymphocytes T CD4+ helper. Ces molécules sont composées de deux chaînes polypeptidiques : une chaîne alpha et une chaîne bêta codées par deux gènes distincts (A et B), liées de manière covalente.

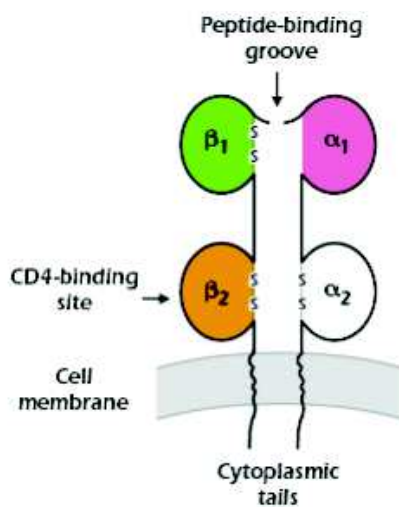


Figure 2 : Structure schématique des molécules HLA de classe II. Les molécules HLA de classe II, avec leur chaîne alpha et la chaîne bêta. Le site de liaison au peptide est situé entre les domaines alpha 1 et bêta 1.

La majorité des variations alléliques pour les molécules de classe II sont situées sur l'exon 2, qui code pour les régions de liaison aux peptides (PBR). Les molécules HLA possèdent plusieurs régions hypervariables au niveau de leurs domaines distaux membranaires. La spécificité d'un épitope est définie par les structures primaire, secondaire, tertiaire puis quaternaire des chaînes polypeptidiques et les propriétés électrostatiques des résidus. Les résidus qui ne font pas partie du site de liaison à l'anticorps mais qui jouent sur sa conformation vont donc impacter sur la spécificité de l'épitope. Les molécules HLA-DQ et HLA-DP ont deux chaînes polymorphiques et des épitopes qui peuvent être présents sur les deux chaînes, ou qui comprennent des portions des deux chaînes. Une molécule HLA peut avoir un épitope unique à l'allèle spécifique qui le code ainsi que des épitopes qui sont aussi présents sur d'autres

molécules HLA. Ceci explique le fait qu'un mismatch unique (c'est-à-dire l'attribution d'un greffon ne différant que d'un antigène entre le donneur et le receveur) peut provoquer la production d'anticorps qui réagissent avec plusieurs molécules HLA qui partagent des épitopes avec l'antigène mismatch. Une des particularités des gènes HLA de classe II est que le nombre de locus HLA-DRB est différent selon les individus. Par exemple, le gène DRB3* qui code pour la molécule HLA-DR52, est présent seulement sur certains haplotypes du gène DRB1*. Cela est également valable pour le gène DRB4* qui code pour la molécule DR53, et le gène DRB5* qui code pour la molécule DR51. Ces molécules, qu'on ne retrouve donc pas chez tous les individus, sont appelées les molécules associées [5].

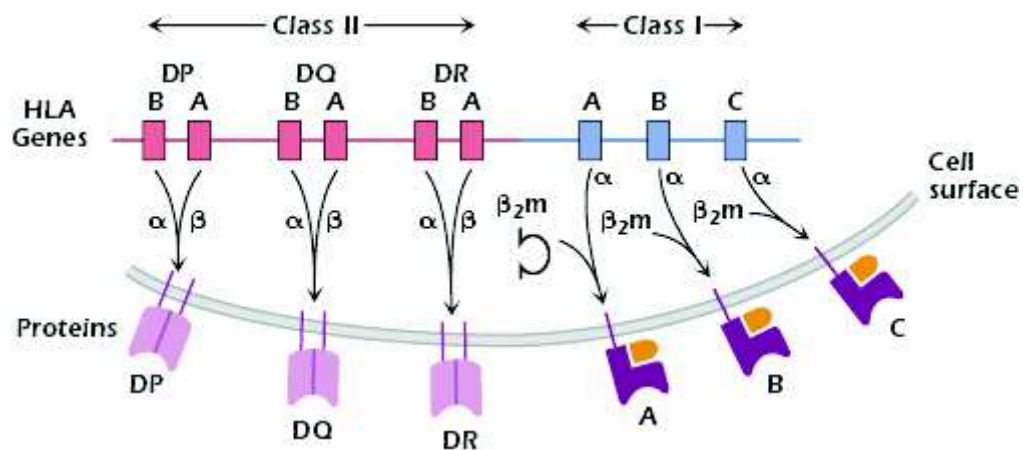


Figure 3 : Représentation schématique de l'expression protéique à la surface cellulaire des molécules HLA à partir des gènes

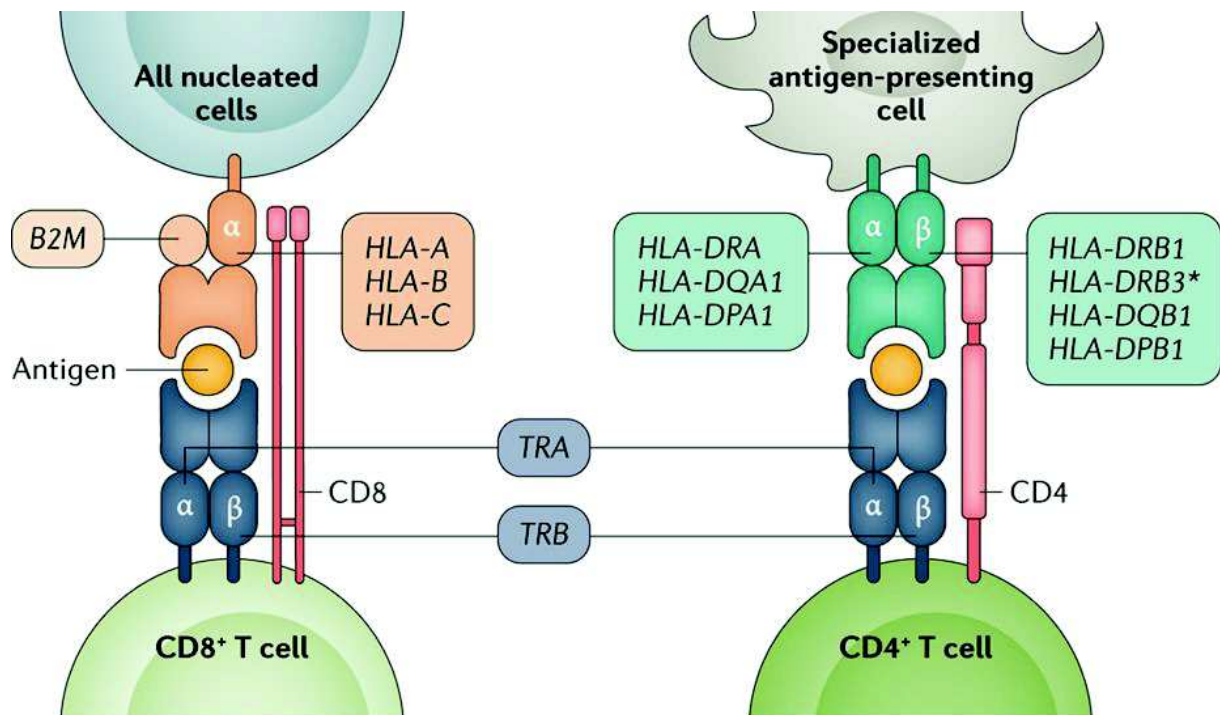


Figure 4 : Présentation antigénique aux lymphocytes T

Les molécules HLA de classe I sont retrouvées à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme et peuvent présenter les antigènes aux lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. L'épitope est lié à la molécule HLA de classe I, qui est reconnu par le récepteur du lymphocyte T. Les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, lymphocytes B, macrophages) peuvent présenter des antigènes aux lymphocytes T helper CD4+ grâce aux molécules HLA de classe II à leur surface. Les gènes codant pour les différentes chaînes sont encadrés et en italique sur la figure ci-dessus [6].

1.3.4 Nomenclature HLA

Les avancées techniques notamment en biologie moléculaire ont permis de mieux caractériser ces molécules HLA à la surface de nos cellules. On peut donc aujourd'hui connaître, au moins en partie, « la carte HLA » d'un individu donné. La nomenclature du système HLA dépend de la méthode utilisée. Au départ, les premiers allèles découverts ont été définis par des méthodes sérologiques, c'est-à-dire par la mise en évidence d'anticorps dirigés contre des antigènes HLA, puis les techniques ont évolué et ont permis la détection d'allèles au niveau moléculaire. La nomenclature utilisée aujourd'hui a été introduite en 2010 ; la découverte croissante de nouveaux allèles par les techniques moléculaires a rendu nécessaire cette

nouvelle nomenclature. On est donc passé d'une nomenclature sérologique à une nomenclature basée sur l'ADN.

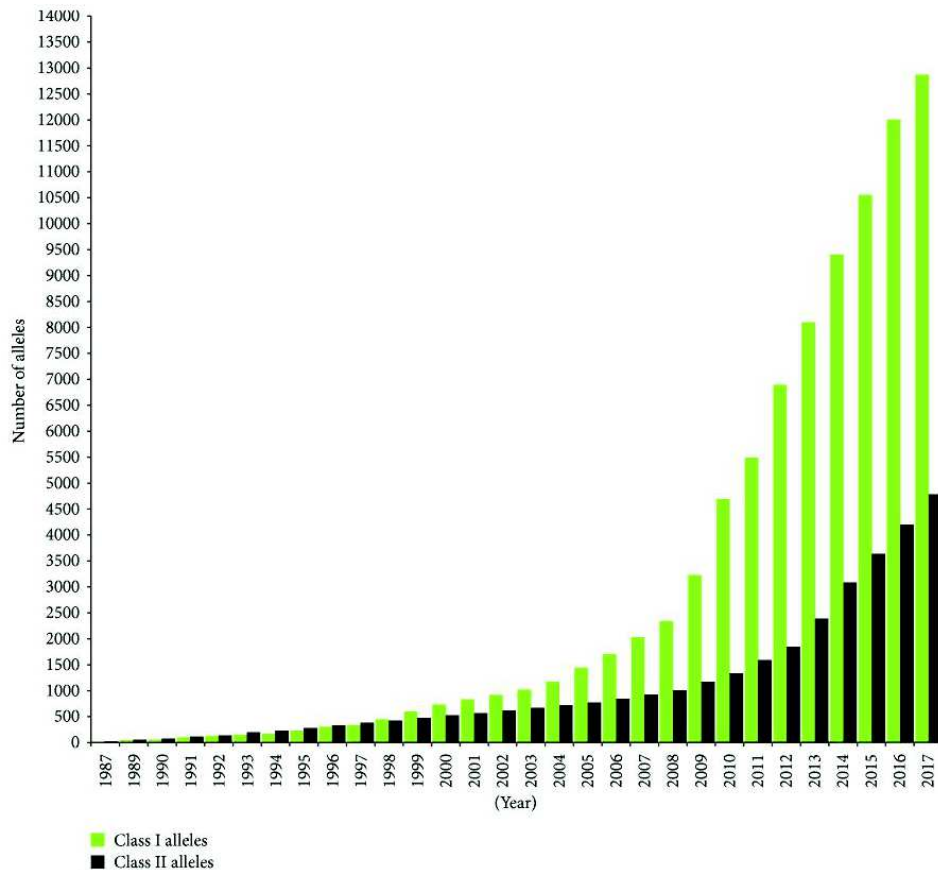


Figure 5 : Représentation graphique de l'augmentation du nombre d'allèles HLA découverts avec le temps

Représentation entre 1987 qui marque le début de la caractérisation des molécules HLA et 2017, où l'on a dépassé les 13000 allèles découverts [4]

La nomenclature est internationale, elle est définie et remise un jour par un comité dédié : « The WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System » [7]. Chaque allèle possède un numéro unique constitué d'au moins 4 digits. Les deux premiers digits correspondent à un groupe d'allèles qui codent pour un antigène. Souvent, ces deux premiers numéros correspondent à l'antigène sérologique, appelé par le même numéro, mais pas toujours. Par exemple, les allèles HLA-A*02 :01 et HLA-A*02 :02 correspondent tous deux à l'antigène A2, défini ainsi en premier lieu par les techniques sérologiques. Attention, les

techniques moléculaires étant apparues plus tardivement, la correspondance avec l'antigène sérologique n'est pas toujours évidente et doit être vérifiée dans les tableaux de nomenclature actualisés. C'est ce qu'on appelle « l'équivalent sérologique ». Par exemple, l'allèle HLA-B*14 :01 a pour équivalent sérologique l'antigène B64 alors que l'allèle HLA-B*14 :02 a pour équivalent sérologique l'antigène B65. Les allèles dont les numéros diffèrent dans ces deux premiers champs de digits doivent être différents par au moins une substitution nucléotidique modifiant la séquence d'acides aminés de la protéine codée. Dans le troisième champ, on retrouve des modifications non-codantes ou silencieuses, situées dans la région codante. Les allèles qui diffèrent seulement par du polymorphisme intronique ou dans les régions 5' et 3' se distinguent par le 4^{ème} champ.

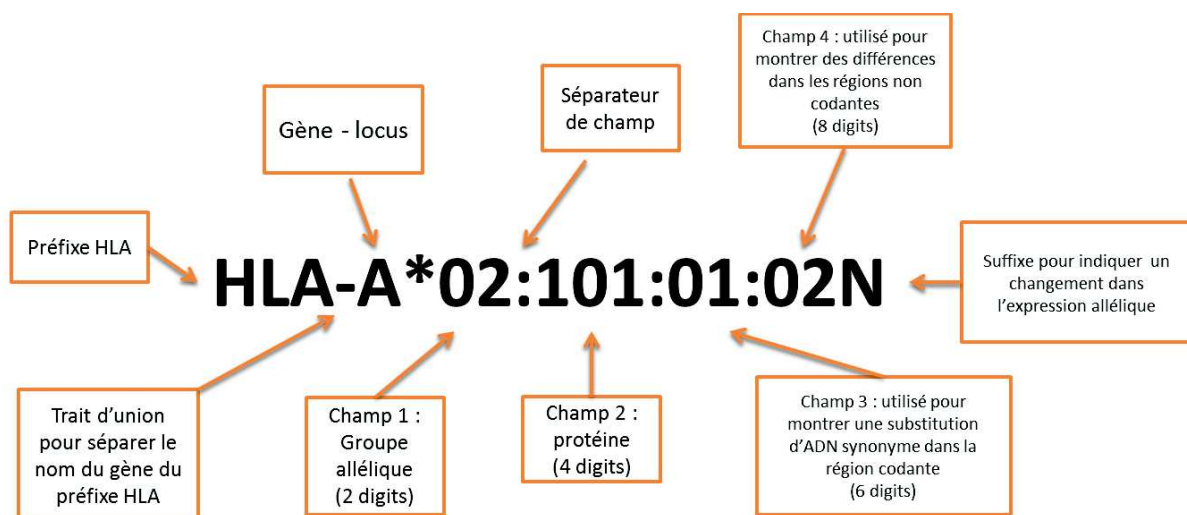


Figure 6 : Explications sur la nomenclature HLA de 2010, inspirée et traduite depuis hla.alleles.org

La résolution du typage HLA d'un individu dépend donc de la technique utilisée et correspond aux nombres de digits renseignés. Le développement des techniques de biologie moléculaire, en particulier de la NGS (Next Generation Sequencing) appliqué au HLA permet d'avoir accès à ces informations. En pratique, une résolution trop fine (au-delà de 4 digits) n'a pas encore d'application clinique. Les 4 digits permettant d'obtenir l'équivalent sérologique et donc la protéine exprimée, sont suffisants pour le typage des patients et des donneurs en néphrologie.

1.3.5 Causes de sensibilisation anti-HLA

La sensibilisation HLA, ou immunisation anti-HLA, est définie par la présence d'anticorps anti-HLA circulants dans le sérum d'un individu. En néphrologie, il est intéressant de connaître l'immunisation anti-HLA des patients, qu'ils soient déjà greffés ou futurs receveurs d'un greffon. En effet, nous avons vu dans le chapitre précédent que le système HLA intervient dans la reconnaissance du soi et du non soi. En cas de transplantation, l'arrivée d'un tissu provenant d'un autre individu provoque une réponse immunitaire, exprimée entre autres par le système HLA. Il est possible aujourd'hui de dépister si d'éventuels anticorps anti-HLA sont déjà présents dans le sérum d'un patient. Si ces anticorps anti-HLA sont spécifiquement dirigés contre des antigènes HLA que le donneur potentiel possède, on parle alors de DSA (Donor Specific Antibody). Il existe trois causes principales d'immunisation anti-HLA, c'est-à-dire de développer des anticorps anti-HLA [4] :

1.3.5.1 La transfusion

L'immunisation anti-HLA par transfusion a principalement lieu lors de transfusions de plaquettes, car les plaquettes expriment les molécules HLA, à la différence des globules rouges. Cependant, la transfusion de concentrés de globules rouges est également susceptible de causer une immunisation anti-HLA chez les patients transfusés. En général, de multiples transfusions sont nécessaires pour induire une immunisation anti-HLA ; on considère que la transfusion est peu immunogène.

1.3.5.2 La grossesse

Il s'agit de la première source d'immunisation anti-HLA en termes de fréquence (puisque la grossesse est un événement plus fréquent que la transfusion ou la transplantation). L'immunisation anti-HLA induite par la grossesse est inévitable et crée des anticorps anti-HLA plus « puissants » et persistants que ceux induits par transfusion. La prévalence des anticorps anti-HLA chez les femmes augmente significativement avec le nombre de grossesses. D'après une étude menée sur une large cohorte, 1.7% des femmes nulligestes ont des anticorps anti-HLA, 11.2% des femmes avec une grossesse, 22.3% des femmes avec deux grossesses, 27.5% des femmes avec trois grossesses et 32.2% avec quatre grossesses ou plus ont des anticorps anti-HLA [8]. Comme le fœtus hérite d'un allèle HLA paternel et d'un allèle maternel, la mère est exposée aux antigènes HLA du père, exprimés sur les cellules du bébé en formation, qui sont inconnus de son système immunitaire. Celui-ci va donc réagir en développant des

anticorps anti-HLA. Ces anticorps ne traversent pas le placenta et ne sont pas dangereux pour le fœtus. Le degré d'immunisation augmente avec le nombre de grossesses. Ainsi, il est fréquent qu'une femme soit immunisée contre les antigènes HLA du père de ses enfants et de ses enfants.

1.3.5.3 Transplantations antérieures

Après une transplantation, 24% des receveurs développent des anticorps anti-HLA de novo dans la décennie qui suit. Ces anticorps, comme tous les anticorps ne disparaissent jamais vraiment ; ils peuvent être variables dans le temps et en intensité mais seront toujours à prendre en compte en cas de nécessité de deuxième greffe. Leur intensité peut être amplifiée au moment d'un traumatisme ou d'un état inflammatoire.

1.3.5.4 Immunisation dite « naturelle »

Nous avons vu les trois facteurs largement dominants pouvant entraîner une immunisation anti-HLA. Donc, a priori, un homme jamais transfusé n'aura pas d'anticorps anti-HLA. Cependant, il a déjà été mis en évidence à plusieurs reprises des anticorps anti-HLA dans le sérum de donneurs de sexe masculin sans historique de transfusion ni de transplantation. Ces anticorps seraient produits suite à une réactivité croisée vis-à-vis de certains épitopes retrouvés chez certains micro-organismes ou allergènes ; il s'agirait donc d'anticorps anti-HLA « naturels », formés au simple contact de l'environnement [9]. Ce type d'immunisation reste largement minoritaire, avec des anticorps anti-HLA avec des titres faibles et des spécificités peu courantes. Attention à ne pas confondre cette immunisation avec les "fausses réactivités" que l'on peut observer à cause des limites techniques, qui sont dues à une surexposition des antigènes normalement cryptiques, donc non exposés à la surface des cellules, ou à une altération de la structure tertiaire des molécules HLA. Ceci entraîne des réactions inhabituelles, et on appelle les anticorps ainsi dépistés des anticorps « dénaturés ». Cette notion est détaillée dans la partie « techniques de mise en évidence d'une immunisation anti-HLA ».

De manière générale, il faut retenir la grossesse, la transplantation et la transfusion comme facteurs de risque d'immunisation anti-HLA. Une étude a montré que parmi 722 candidats à la greffe de rein, 75% de ceux qui avaient déjà reçu une première transplantation possédaient des anticorps anti-HLA de classe I, contre 38.8% des patientes ayant été enceinte et 18.9% des

patients ayant été transfusés [10]. La relation entre transplantation et HLA est détaillée dans les paragraphes qui suivent.

1.4 HLA et transplantation rénale

La transplantation rénale est la stratégie thérapeutique de choix pour les patients en insuffisance rénale et qui offre la meilleure survie et qualité de vie à long terme. La première greffe rénale a eu lieu en 1952 à l'hôpital Necker à Paris par l'équipe du Professeur Hamburger : la donneuse, vivante, a donné un rein pour son fils. Malheureusement, 21 jours plus tard, le jeune homme est décédé. Le premier succès pour une transplantation rénale a eu lieu en 1954 à Boston. Le donneur et le receveur étaient deux vrais jumeaux, donc génétiquement identiques. La transplantation de cellules, tissu ou organes d'un donneur génétiquement différent du receveur induira une réponse immunitaire chez ce receveur, réponse qui sera dirigée contre les allo-antigènes du greffon provenant du donneur. Si cette réponse n'est pas contrôlée, elle peut aboutir à la destruction de l'organe greffé : le rejet de greffon se définit par le processus immunitaire qui aboutit à la destruction et à la perte de fonctionnalité de l'organe qui a été transplanté. C'est un processus complexe qui implique plusieurs mécanismes. Le fait d'implanter un organe « étranger » provenant d'un donneur chez un receveur induit une réponse immunitaire chez ce receveur, car le greffon va être reconnu comme étranger notamment par le biais du système HLA. Les systèmes immunitaires innés et acquis jouent tous les deux un rôle dans le rejet d'allogreffe, parfois de manière entremêlée. En effet, on disait classiquement que le rejet aigu était le résultat de l'activation du système immunitaire inné, tandis que le rejet chronique était causé par le système immunitaire acquis. On sait aujourd'hui que ces deux processus peuvent intervenir parfois simultanément. Il existe plusieurs manières de classer les rejets. Il faut d'abord bien différencier le rejet clinique du rejet histologique. Le rejet clinique se base sur des critères biologiques comme la protéinurie, la créatininémie, le dépistage et l'identification des DSA et sur des critères cliniques comme la pression artérielle, la température et le ressenti du patient. Si un rejet est suspecté, on procède à la biopsie afin de caractériser ce rejet avec des critères histologiques. Nous reviendrons plus tard sur la classification de Banff, qui est la classification histologique la plus utilisée en pratique. On peut aussi retrouver une classification des

différents rejets en fonction du délai d'apparition du rejet par rapport à la greffe. Il faut savoir que c'est une classification un peu obsolète du fait de la grande rareté des rejets dits « hyper-aigus » selon cette classification, en tout cas en France. Cependant il est intéressant de connaître ces notions parce qu'elles sont encore parfois utilisées dans la littérature.

- Le rejet hyper-aigu

Le rejet hyper-aigu a lieu en quelques minutes. Il est en fait dû à une pré-sensibilisation, qui a eu lieu avant la greffe. Les anticorps préformés agissent en quelques minutes : visible dès la fin de l'opération, le rein ne se re-perfuse pas correctement car un dépôt d'anticorps dirigés contre les molécules HLA présents sur l'endothélium des glomérules et sur les micro-vaisseaux va se former, causer une nécrose, un dépôt plaquettaire, une coagulation locale. Tout ce processus entraîne une thrombose locale, des lésions vasculaires sur l'organe et il faut procéder à une transplantectomie. Les cross-match systématiques et dépistage des DSA pré-greffe ont permis une large diminution de ce problème, qui est rare de nos jours. D'ailleurs, ce type de rejet ne fait plus partie de la classification de Banff.

- Le rejet aigu

Le rejet aigu a lieu dans les jours ou semaines (jusqu'à trois mois) après la transplantation. L'inflammation cause une dysfonction rénale rapide. On retrouve des infiltrats cellulaires de lymphocytes T CD4+ et T CD8+ à la biopsie, mais ces rejets peuvent être d'origine cellulaire et/ou humorale. Certains auteurs parlent de rejet aigu tardif qui arrive après trois mois. Dans les années 1960, le rejet aigu était fréquent. Aujourd'hui, la fréquence du rejet dans l'année qui suit la transplantation est inférieure à 15%. Cette baisse de fréquence s'explique par l'apparition d'un arsenal thérapeutique immunosuppresseur bien plus puissant, notamment grâce aux inhibiteurs de calcineurine. D'autre part, depuis les années 1980, la compatibilité donneur/receveur est mieux étudiée, comprise, et prise en compte dans les décisions de greffe. Cependant, les rejets aigus sont encore sévères.

- Le rejet chronique

Le rejet chronique, qui survient des mois ou des années après la transplantation. La dégradation de la fonction rénale est lente, progressive, irréversible et pas toujours facile à

observer cliniquement. Les lésions tissulaires sont le résultat d'une réaction immunitaire principalement humorale, et active à bas bruit.

1.5 Mécanismes immunologiques du rejet

1.5.1 Le système du complément

Le complément est un système composé d'une trentaine de protéines sériques, solubles et membranaires, impliquées dans la réponse innée aux infections, dans la régulation de la réponse immunitaire spécifique et dans l'élimination des complexes immuns [11]. Il s'agit d'une cascade d'activations enzymatiques, qui peut être stimulée selon trois voies : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines. Ces trois voies aboutissent à la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM) [12].

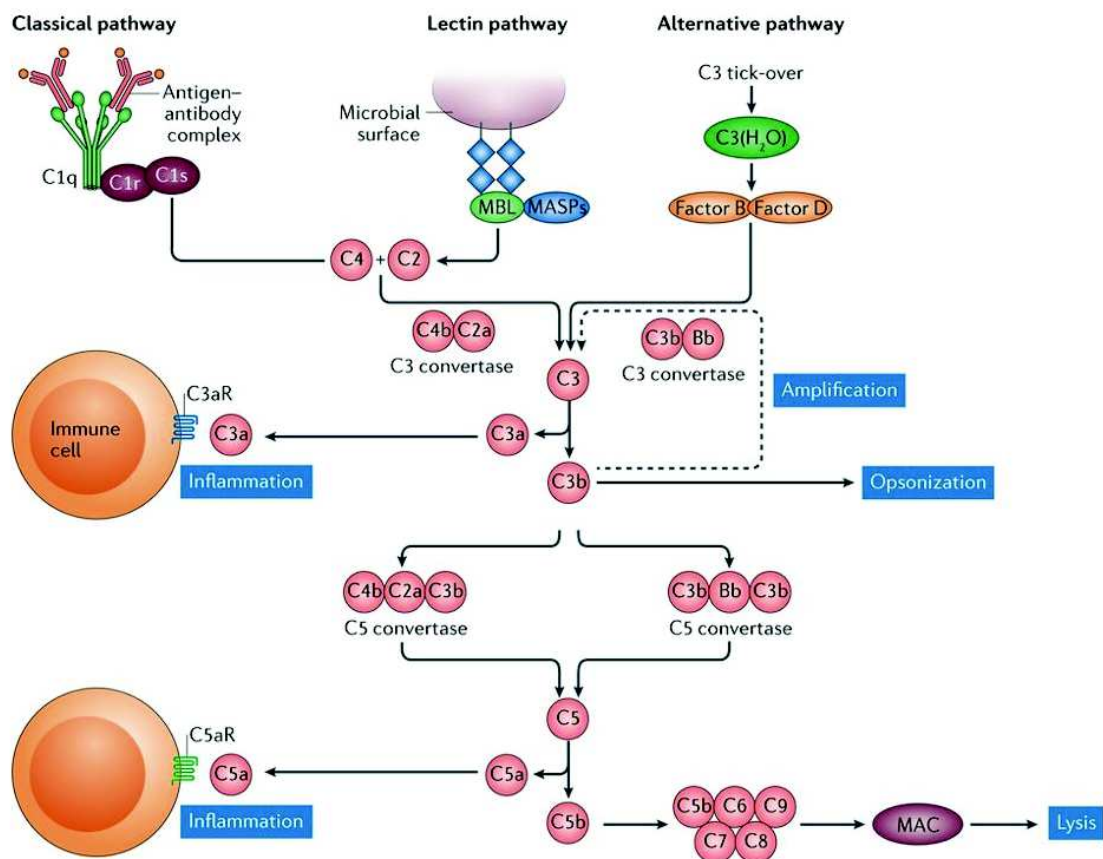


Figure 7 : Les trois voies du complément

Les trois voies du complément, de [13]

1.5.1.1 La voie classique

La voie classique est la plus fréquemment impliquée, elle est activée par les complexes immuns, n'est active qu'en présence de Mg^{2+} et Ca^{2+} et implique les composants C1 à C9. Lors de la première étape, la molécule C1q reconnaît le complexe immun. Toutes les immunoglobulines (Ig) n'ont pas le même pouvoir activateur du complément ; les IgM sont fortement activatrices, une seule molécule est suffisante pour activer le complément alors que les IgG1, 2 et 3 nécessitent au moins deux molécules et les IgG4, et IgA et IgE ne sont pas activatrices. Parmi les sous-classes d'IgG, les IgG3 ont la plus forte capacité de liaison au C1q, puis les IgG1, 2 et enfin 4. Le C1q peut fixer plusieurs immunoglobulines en même temps. Dans le cas d'une greffe, l'activation de C1 peut être initiée par l'interaction entre les domaines globulaires de C1q et les IgM ou IgG liés à des antigènes présents sur l'endothélium du greffon. La fixation du C1q sur le complexe immun entraîne l'activation de C1r et C1s, qui vont cliver C4 et C2 en C4a, C4b et C2a, C2b. C4b et C2a se fixent sur une surface activatrice et forment le complexe C4b2a, ou C3 convertase classique. Le C4d est un fragment du C4b, produit d'activation de la voie classique. C'est pour cela qu'on utilise le marquage au C4d sur les biopsies rénales ; c'est un marqueur d'anticorps circulants activant le complément. Dans la suite de la cascade de la voie classique, la C3 convertase classique peut cliver le C3 et C3a qui est relarguée dans le plasma et en C3b qui va se fixer sur la surface activatrice avec la C3 convertase classique pour former la C5 convertase classique. Après cette phase activatrice vient la phase effectrice, qui est commune à toutes les voies du complément : La C5 convertase forme le C5b qui se fixe sur un deuxième site membranaire, et recrute les molécules C6, C7, C8 et plusieurs molécules C9 pour former le CAM. Ce CAM crée des pores dans la membrane cellulaire, aboutissant à sa lyse.

1.5.1.2 La voie alterne

La voie alterne est un système de défense anti-microbien, elle nécessite une surface activatrice et dépend du magnésium. Le C3 se clive spontanément lors de la première étape. Le fragment C3b qui résulte de ce clivage se lie au facteur B. Ce complexe se fixe sur la membrane activatrice où le facteur D vient cliver le facteur B en Ba et Bb. Ba est relargué dans la circulation et le complexe C3bBb ou C3 convertase alterne. S'ensuit la phase d'amplification, où la C3 convertase alterne clive de nombreuses molécules C3, qui se lient au facteur B, ce qui

aboutit à de nouvelles C3 convertases alternes. Plusieurs molécules de C3b vont se fixer à côté de la C3 convertase alterne, ce qui aboutit à la C5 convertase alterne. Puis on retrouve la voie effectrice commune à la voie classique.

1.5.1.3 La voie des lectines

La voie des lectines est activée par une protéine : la MBL (Mannose Binding Lectin), donc sur les surfaces contenant du mannose (pas les cellules humaines). La MBL se fixe spécifiquement sur le mannose et active les MASP 1 et 2 (mannose associated serin protease). Les MASP clivent C2 et C4, et la voie des lectines rejoint ainsi la voie classique.

Dans le cas de la greffe, une activation complète du complément aboutit donc au CAM, qui provoque la mort cellulaire, et donc in fine la perte du greffon : c'est un rejet aigu. Si toutefois l'activation du complément n'est pas totale, il peut quand même y avoir une nécrose locale et un détachement des cellules endothéliales de la membrane basale ; c'est un rejet chronique. Si l'activation du complément est totalement inhibée, la greffe est « résistante » ou « acceptée », on parle d'accommodation.

1.5.2 Cytotoxicité dépendante des anticorps, ou ADCC (Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity)

Il s'agit d'un mécanisme de défense immunologique impliquant en premier lieu la reconnaissance d'anticorps. Le fragment Fc (constant) des anticorps recrute des cellules portant un récepteur pour le Fc des immunoglobulines, qui sont les cellules effectrices : macrophages ou cellules NK (Natural Killer). Les macrophages recrutés vont phagocyter la cellule cible, et les cellules NK vont induire son apoptose par l'intermédiaire de perforines et granzymes. C'est un mécanisme indépendant de celui du complément.

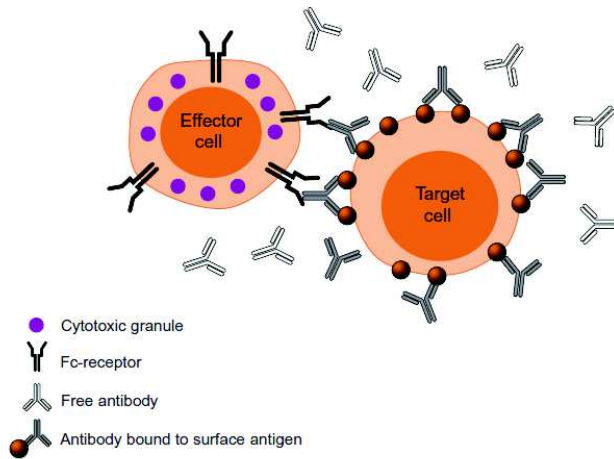


Figure 8 : Schéma de l'ADCC

L'ADCC implique l'interaction entre les cellules cibles, qui expriment des antigènes à leur surface, et les cellules effectrices. Les cellules effectrices doivent exprimer des récepteurs Fc à leur surface pour que l'ADCC puisse avoir lieu [14]

1.5.3 La réponse cellulaire

Dans le rejet cellulaire, les lymphocytes T sont capables de reconnaître directement des molécules HLA différentes du soi : les lymphocytes T sont capables de reconnaître le complexe CMH-peptide allogénique via leur TCR (Récepteur T pour l'antigène). Le CD3, complexe moléculaire présent sur les lymphocytes T, va s'activer à la suite de cette reconnaissance et provoquer le début de la transduction intra cellulaire de ce signal spécifique de l'antigène reconnu. Ainsi, plusieurs signaux de co-stimulation vont se mettre en place : Les molécules CD80 et CD86, présentes sur les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), se lient au CD28 sur les lymphocytes T. Ensuite la liaison entre le CD40 sur les CPA et le CD40L (ou CD154) sur le lymphocyte T amplifie la réponse et active la production de facteurs de transcription ce qui aboutit à la sécrétion de cytokines dont l'interleukine 2 et l'interleukine 15. Ces cytokines délivrent des signaux de prolifération et d'expansion clonale des lymphocytes T ainsi que leur différenciation en cellules effectrices : Les lymphocytes T helper CD4+ et les lymphocytes T cytotoxiques CD8+. Les lymphocytes T CD4+ peuvent être Th1, qui sécrètent de l'interféron gamma, de l'IL2 et le Tumor Necrosis Factor (TNF bêta). Ils peuvent aussi être Th2, qui sécrètent les interleukines IL4, IL5, IL6, IL10 et IL13. Les cellules Th1 entraînent plutôt une réponse cellulaire alors que les cellules Th2 orientent plutôt vers une réponse humorale. Du fait de leur capacité à sécréter ces cytokines, les lymphocytes T CD4+ entraînent des lésions

tissulaires. Les lymphocytes T CD8+ quant à eux détruisent directement les cellules allogéniques. Les lymphocytes T et les cellules de l'immunité innée fonctionnent donc en synergie pour rejeter l'allogreffe. La déplétion en lymphocytes T à travers l'utilisation d'anti-thymocyte globulin, anticorps anti-CD3 ou dirigés contre le récepteur alpha à l'IL2 sont utilisés dans le traitement du rejet actif. On utilise aussi maintenant le blocage des différentes voies de co-stimulation afin de prévenir le rejet actif et chronique actif.

En transplantation rénale, le rejet médié par les cellules T est bien plus rare que le rejet médié par les anticorps mais reste l'évènement dominant dans les rejets précoces. L'élément majoritaire est l'inflammation, avec la création d'un infiltrat interstitiel et des lésions tissulaires typiques du rejet cellulaire. Ces lésions étant typiques, quand elles sont présentes on parle de rejet cellulaire que ce soit juste après la greffe ou des années après. Ces lésions ne semblent pas différer selon la nature des antigènes mismatches [15].

1.5.4 La réponse humorale

Elle est plutôt impliquée dans le rejet chronique. On parle de réponse humorale quand un antigène se lie au récepteur des lymphocytes B sur les lymphocytes B immatures du receveur ; ces récepteurs sont des immunoglobulines de surface sur les lymphocytes B. Dans le cas de la greffe, l'antigène qui se lie au lymphocyte B correspond le plus souvent à une molécule HLA du donneur. En se liant, l'antigène entraîne l'activation du lymphocyte B, ce qui va entraîner l'activation de plusieurs voies de signalisation comme celle du CD80 comme vu précédemment, et l'augmentation de l'expression de molécules HLA de classe II à la surface du lymphocyte B. Ceci aboutit à l'internalisation de l'antigène. L'antigène, une fois internalisé, est « processé » et présenté en tant que peptide par le CMH de classe II aux lymphocytes T helper. Nous retrouvons le processus vu pour la réponse cellulaire : la synapse immunologique créée par cette interaction renforce l'expression membranaire du CD40L à la surface du lymphocyte T, qui va se lier au CD40 sur le lymphocyte B. Puis, le lymphocyte B renforce son expression membranaire de CD80 et CD86, qui vont se lier au CD28 présent sur les lymphocytes T CD4+.

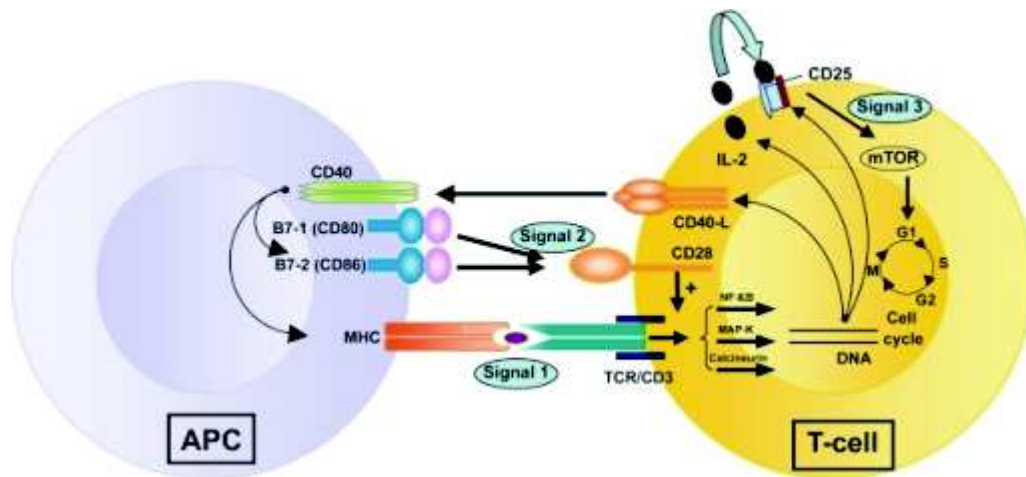


Figure 9 : Signaux de co-stimulation et interaction entre Lymphocyte T et CPA

La figure 9 représente les signaux de co-stimulation et interaction entre Lymphocyte T et CPA [16]. Les lymphocytes B sont prêts pour proliférer dans le centre germinatif du ganglion. Ils subissent le phénomène d'hyper-mutation somatique des régions variables des gènes d'immunoglobulines. Seuls les lymphocytes B ayant une très forte affinité pour l'antigène vont pouvoir survivre, se différencier en plasmocytes pour produire des anticorps ou en lymphocytes B mémoires. Les plasmocytes continuent à interagir avec les lymphocytes T ; le phénomène de commutation de classe peut avoir lieu et entraîner la production d'IgG. Ces anticorps ainsi spécifiquement sécrétés, en réponse à la stimulation immunologique que sont les antigènes du donneur, s'appellent les DSA : Donor Specific Antibody. Les DSA sont connus pour être délétères pour le greffon [17], [18], [19].

1.5.5 Physiopathologie du rejet humoral

1.5.5.1 Rejet médié par les anticorps

Le rejet médié par les anticorps est aussi appelé ABMR en anglais pour « Antibody Mediated Rejection ». La majorité des facteurs de risque identifiés concernant le rejet de greffe sont en lien avec l'activation du système immunitaire, et donc la reconnaissance d'antigènes étrangers sur le greffon par le receveur. L'ampleur de la réponse est un équilibre entre l'immunogénicité du greffon, la susceptibilité du receveur et le niveau d'immunosuppression [20]. Le degré d'histo-incompatibilité entre le donneur et le receveur (soit le nombre de mismatches HLA) est ce qui va déterminer le potentiel immunogène de la greffe. En effet, il est maintenant bien connu que les greffes HLA incompatibles aboutissent à un plus grand nombre de rejets que les greffes HLA compatibles [21]. Les lymphocytes T reconnaissent les antigènes HLA étrangers

soit par la voie directe, soit par la voie indirecte. Dans la présentation directe, les antigènes dérivés du donneur sont présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), elle mêmes dérivées du donneur, aux lymphocytes T du receveur. Cela aboutit principalement à l'activation des lymphocytes T CD8+ et ainsi aux cellules T effectrices. Dans la présentation indirecte, les antigènes du donneur sont présentés par les CPA du receveur ; ce qui peut aboutir à l'activation des lymphocytes B et donc à la production d'allo-anticorps. C'est cette voie indirecte qui serait dominante dans le rejet chronique. Les DSA ou anticorps anti-HLA dirigés spécifiquement contre le donneur, peuvent exister avant la greffe : on parle de DSA préformés, qui sont dus à une sensibilisation HLA préalable à la greffe, comme vu plus haut. Les DSA peuvent aussi se former après la transplantation, on parle de DSA *de novo*. Ils apparaissent chez 20 à 30% des receveurs [22]. Les DSA peuvent être dirigés contre des molécules HLA de classe I, ou bien dirigés contre des molécules HLA de classe II. Les DSA *de novo* sont principalement de classe II, et les études montrent que les DSA de classe II sont de moins bon pronostic que les DSA de classe I [23]. De fait, les DSA ne sont pas tous « égaux », c'est-à-dire qu'ils n'ont pas tous le même pouvoir pathogène vis-à-vis du greffon. C'est une notion importante à retenir pour ce travail, dont l'un des objectifs sera entre autres d'essayer de définir un nouveau critère de pathogénicité parmi les DSA. Les DSA sont responsables de différents types de rejets humoraux, dont une forme pernicieuse de rejet chronique qu'on appelle glomérulopathie du greffon. La présence de DSA pré-formés ainsi que les cross match positifs ont longtemps été une contre-indication à la greffe, sachant que le rejet médié par les anticorps a plus de risque de survenir dans ces situations. La physiopathologie du rejet médié par les anticorps n'est pas encore totalement comprise. Les DSA se lient aux antigènes HLA ou à d'autres cibles sur l'endothélium de l'allogreffe, ce qui initie le processus. Le type de chaîne lourde semble influencer sur la pathogénicité du processus ; si les DSA activent le complément (IgG1 ou IgG3), la voie du complément se déclenche rapidement par l'activation du C1q. Cette voie aboutit généralement à une perte rapide de l'allogreffe. Sinon, les DSA peuvent se lier à des cibles cellulaires sur l'endothélium et ainsi stimuler la prolifération cellulaire ou induire l'ADCC avec sécrétion d'interféron gamma. Cette voie serait plus impliquée dans le développement d'un type de lésions chroniques médiées par les anticorps, qui serait plus dépendant des cellules NK (Natural Killer) que du complément. Les DSA peuvent aussi se lier aux molécules HLA et d'autres cibles et activer le système du complément, mais de manière incomplète, c'est-à-dire n'aboutissant pas à la formation du complexe d'attaque membranaire

(C5b-C9), et sans cause de lésions apparentes. On appelle ce processus l'accommodation. De plus, l'absence d'ADCC sur le long terme peut être liée à un polymorphisme Fc des IgG, ce qui amène à l'absence d'activation des cellules NK par des voies dépendantes du CD16 (Fc gamma R). Tout ceci rend la classification de la pathogénicité des DSA complexe [24].

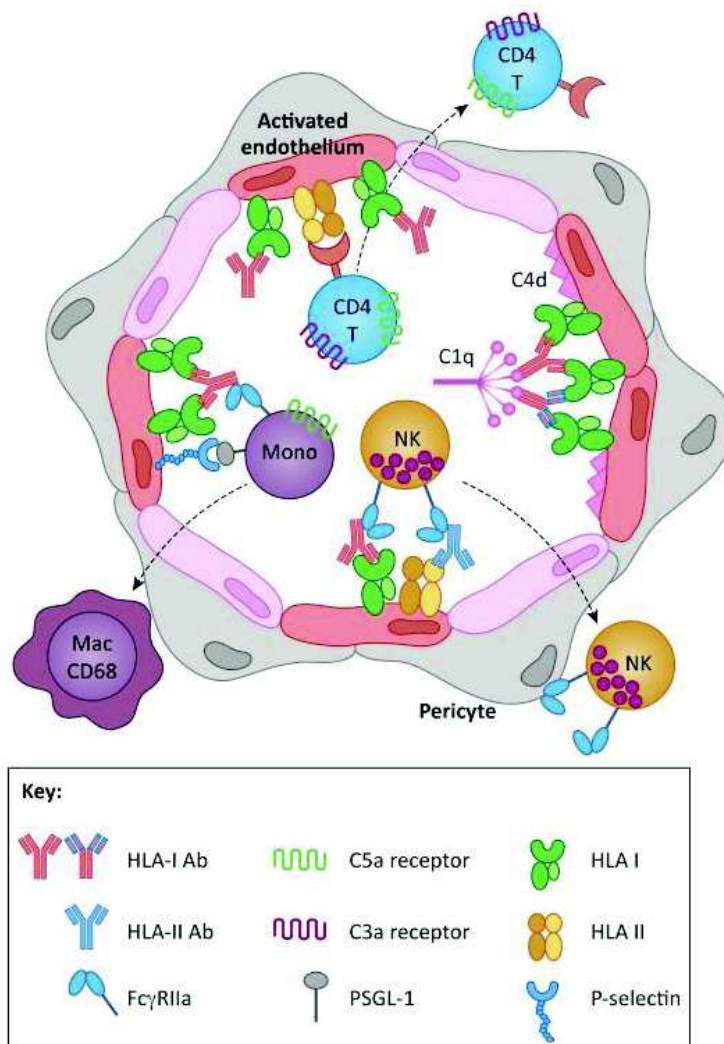


Figure 10 : Schéma du mécanisme de pathogénicité des DSA

Le schéma du mécanisme de pathogénicité des DSA selon Thomas et al [24] : la fixation des anticorps anti-HLA entraîne des signaux intracellulaires qui activent les cellules endothéliales. Celle-ci expriment alors la P-sélectine, ce qui active le recrutement de leucocytes par interaction avec PSGL-A. Les monocytes recrutés se différencient en macrophages CD68+ qui peuvent être détectés par l'histologie dans les capillaires et l'espace sous-endothélial. La fixation des anticorps anti-HLA augmente également l'immunogénicité des lymphocytes T CD4+ du receveur, ce qui entraîne une réponse aux allo-antigènes HLA de classe II. Les

anticorps activant le complément déclenchent la voie classique du complément par la liaison du C1q, ce qui résulte en la production d'anaphylatoxines C3a et C5a. Ces anaphylatoxines ont la capacité d'augmenter directement le recrutement des leucocytes et la réponse cellulaire des lymphocytes T. Les monocytes, neutrophiles et cellules NK peuvent aussi exprimer les récepteurs FcγRs qui peuvent interagir avec la chaîne lourde des anticorps anti-HLA liés aux cellules endothéliales du donneur. Les FcγRs augmentent aussi le recrutement des leucocytes et jouent un rôle dans la phagocytose et l'ADCC. Tous ces phénomènes expliquent que les anticorps anti-HLA du receveur fixés sur les cellules endothéliales du donneur entraînent une inflammation micro vasculaire, qui est typique du rejet médié par les anticorps.

En résumé, les DSA se lient aux antigènes exprimés par l'allogreffe, ce qui entraîne une activation de la voie classique du complément, initie l'ADCC, et module l'activité biologique des cellules vasculaires. Les lésions créées par ces processus deviennent progressivement irréversibles et compromettent les fonctions du greffon. Le rejet médié par les anticorps est aujourd'hui considéré comme le résultat d'un processus dynamique de lésions tissulaires, causés par les DSA, qui contribuent à l'inefficacité du greffon. Les différentes formes de rejet médié par les anticorps peuvent être classées selon différentes caractéristiques ; voici une des classifications possibles, d'après Loupy et al [25]. Cette classification se base sur les formes cliniques du rejet. Il faut garder à l'esprit que la classification de Banff (détaillée au paragraphe 1.6 et en annexe) est la référence pour l'histologie, et c'est donc sur la classification de Banff que l'on s'est basé pour définir nos groupes de patients pour ce travail.

1.5.5.2 Rejet aigu médié par les anticorps

Ce phénomène peut survenir quand les DSA sont préformés et qu'ils attaquent le greffon dès la fin de l'opération, mais également à l'apparition d'un DSA de novo.

1.5.5.3 Rejet indolent médié par les anticorps

Les DSA sont toujours détectables dans la circulation et sont responsables d'une forme indolente et lentement progressive de lésions tissulaires. Celle-ci est caractérisée par la persistance d'une glomérulite, inflammation des capillaires péri-tubulaires et un dépôt de C4d dans les capillaires péri-tubulaires. On remarque que les patients qui développent des DSA de novo ont plutôt des signes indolents et lentement évolutifs d'anomalies micro vasculaires, sans altération de la fonction rénale ni protéinurie notable. Cette forme est donc également

appelée infra-clinique. L'analyse de biopsies effectuées dans le cadre de patients présentant des DSA a montré des variations importantes du statut humoral des patients durant la première année post greffe, caractérisée par des fluctuations de l'inflammation glomérulaire ou capillaire, et dans les dépôts de C4d. Cela démontrerait la notion d'un continuum dans l'histoire naturelle du rejet humoral. L'apparition de DSA de novo serait le résultat d'une immunosuppression insuffisante ou inadéquate, ainsi qu'un processus dynamique qui commencerait très tôt après la transplantation et qui continuerait à des niveaux variables durant toute la vie du greffon.

1.5.5.4 Rejet chronique médié par les anticorps

Avec l'évolution des pratiques et des stratégies d'immunosuppression, on s'est intéressé de plus près aux effets retardés du rejet médié par les anticorps. Les lésions vasculaires chroniques sont une des caractéristiques principales du rejet chronique médié par les anticorps pour toutes les greffes solides, même si les manifestations histologiques varient selon l'organe. En greffe rénale, les lésions vasculaires chroniques apparaissent sous forme de glomérulopathie, artériopathie, « multilamination » des capillaires péri-tubulaires de la membrane basale [26]. Les études de biopsies ont montré des variations importantes dans le statut humoral du patient durant la première année de la transplantation. On retrouve des fluctuations dans le taux de DSA, du dépôt de C4d [27]. Il est donc peu probable que les lésions du greffon soient dues à un seul épisode de rejet médié par les anticorps, mais plutôt que ce rejet est un processus dynamique qui commence dès la transplantation et se poursuit à différents niveaux de nombreuses années après. Les rejets médiés par les anticorps qui se déclenchent tôt (durant la première année suivant la transplantation) se retrouvent en grande majorité chez les patients qui ont des DSA préformés [28]. Les rejets médiés par les anticorps retardés sont plutôt observés chez les patients non immunisés et associés à l'apparition de DSA *de novo*. Toutefois, la présence de DSA circulants et les lésions micro-vasculaires, présentes dans les deux cas, montrent qu'il s'agit d'une seule et même pathologie, malgré des lésions tissulaires qui peuvent être différentes.

1.5.5.5 C4d et rejet chronique

Le C4d est l'un des produits de dégradation inactif du C4, un composant de la voie classique du complément. Le C4d reste lié de manière covalente aux tissus après activation du C4. Dans les biopsies de greffe rénale, on observe des dépôts de C4d dans les capillaires péri-tubulaires

de 64% des patients présentant un rejet chronique, et chez 53% des patients présentant une glomérulopathie. Le dépôt de C4d dans les capillaires péri-tubulaires retrouvé dans les biopsies effectuées dans les 6 premiers mois de greffe est associé à une moins bonne survie du greffon à 1 an [21]. Le C4d est un marqueur fluctuant, il peut être présent ou absent aussi bien dans le rejet actif que dans le rejet chronique actif [29]. La classification de Banff sera présentée au paragraphe 1.6 ainsi qu'en annexe.

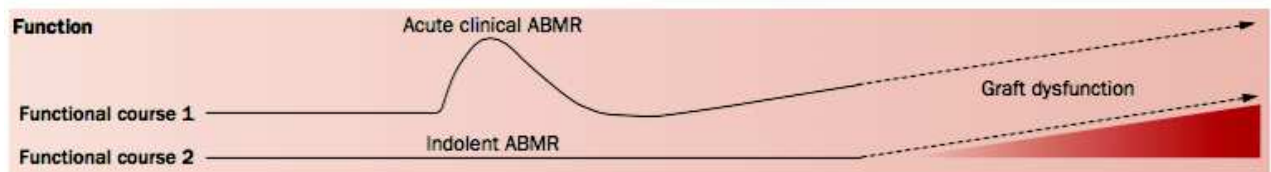


Figure 11 : Evolution infra-clinique et clinique du rejet humoral, *d'après Loupy et al, The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure, 2012*

Ce schéma permet de bien comprendre que le rejet humoral est un processus continu, et qu'il peut se passer beaucoup de temps avant qu'une dysfonction du greffon ne se manifeste (« graft dysfunction », à droite du schéma), alors que pourtant le processus immunitaire est bien enclenché. Dans le premier cas « functional course 1 », on trouve le cas où il y a un pic d'expression clinique au moment d'un rejet actif clinique (acute clinical ABMR). Dans le deuxième cas « functional course 2 », aucune manifestation clinique ne se déclare, le rejet est chronique actif mais infra-clinique (ou anciennement indolent, c'est-à-dire actif à bas bruit). Pourtant, dans les deux cas, la dysfonction du greffon n'arrive que plus tard, et au même moment. On comprend donc que l'absence d'expression clinique du rejet ne signifie pas que le processus immunitaire n'est pas en marche.

1.5.5.6 Rejet médié par les anticorps avec Cd4 négatif

Le marquage C4d est très utilisé dans la classification Banff et est donc un critère qui rentre en compte dans les décisions de prise en charge thérapeutique. Le dépôt de C4d dans les capillaires est un marqueur de rejet humoral pas seulement pour les greffes rénales, mais aussi pour le cœur, les poumons et le foie. Cependant, on sait maintenant que la positivité du C4d n'est ni totalement spécifique ni assez sensible pour le diagnostic de rejet humoral. On retrouve jusqu'à 50% de patients présentant un rejet humoral et qui ont un marquage C4d négatif [25]. La positivité du C4d pourrait n'être que la partie émergée de l'iceberg du processus de rejet humoral. La classification Banff requiert une positivité du marquage C4d au niveau des capillaires péri-tubulaires pour affirmer le diagnostic de rejet humoral, ce qui pourrait exclure certains patients et les priver d'un traitement plus approprié. La première preuve d'une réelle entité clinique de rejet humoral avec négativité du marquage C4d remonte au début des années 2000 dans différentes études [30],[31] chez plusieurs patients présentant une inflammation microvasculaire, avec un ou plusieurs DSA, mais sans dépôt de C4d. Cette inflammation micro-vasculaire s'est progressivement transformée en glomérulopathie du transplant. Cette étude a montré que les changements dans la microcirculation et la présence de DSA de classe II étaient de bons marqueurs prédictifs de l'évolution vers le rejet médié par les anticorps, et ce indépendamment de la positivité du C4d. D'après les études, la plupart des cas de rejet médié par les anticorps à C4d négatif apparaissent plus d'un an après la greffe, et sont des rejets médiés par les anticorps chroniques ou des épisodes aigus sur un rejet médié par les anticorps chronique. On a retrouvé quelques cas de rejets actifs chez ces patients, en grande majorité chez des patients hyper immunisés, chez qui on a effectué une désimmunisation avant la transplantation, mais chez qui les DSA persistaient à des taux très bas. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer l'absence de dépôt de complément malgré la preuve d'une inflammation micro-vasculaire sur les biopsies et la persistance des DSA dans la circulation. La faible sensibilité du Cd4 peut être due à des problèmes techniques, comme les différentes méthodes de détection et leurs sensibilités respectives. D'autre part, certains DSA ont une capacité de fixation du complément moindre. Certains auteurs parlent d'une voie indépendante du complément [32]. On pense aussi que les nouvelles thérapeutiques utilisées dans le rejet médié par les anticorps

peuvent amoindrir la « force » de l'activation du complément, vu que ces thérapeutiques sont très efficaces sur le traitement du rejet humoral et la diminution de l'inflammation micro-vasculaire chez les patients traités, à un an de la transplantation : immunoglobulines par voie intraveineuse (IVIg), échanges plasmatiques, anti-CD20 (Rituximab) par exemple.

1.6 Classification de Banff

Afin de faciliter le diagnostic et la prise en charge des patients greffés rénaux, la classification de Banff a été mise en place depuis 1993, a beaucoup évolué et continue à être mise à jour. L'idée est de disposer d'un outil pour les cliniciens et biologistes, permettant de bien identifier les patients en situation de rejet, et ainsi de mieux les suivre et adapter leur prise en charge. Au départ, cette classification s'intéressait surtout au rejet médié par les lymphocytes T. Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ayant montré l'importance du rejet médié par les anticorps et des DSA, la classification de Banff a aussi évolué en intégrant ces nouvelles données.

La découverte du marquage C4d comme marqueur spécifique de l'interaction entre DSA et les micro-vaisseaux des greffes ABO compatibles a beaucoup aidé à la compréhension du rejet de greffe. Le marquage pour le C4d en routine a permis de nouvelles observations. La positivité de ce marquage dans certaines lésions a permis de montrer que celles-ci étaient souvent liées à des allo anticorps, par exemple la glomérulopathie du greffon, alors qu'elles étaient avant considérées comme du rejet chronique sans mécanisme spécifique. C'est dans ce contexte que la première classification de Banff pour le rejet actif et chronique actif a été publiée en 2003 [33], et continue à être mise à jour régulièrement. Cette classification repose sur trois éléments de preuve pour le diagnostic de rejet médié par les anticorps :

- Preuve histologique : souvent exprimée par une micro inflammation vasculaire et glomérulite et / ou inflammation des capillaires péri tubulaires pour le rejet actif et glomérulopathie du transplant pour le rejet chronique actif. Le rejet médié par les anticorps s'observe surtout dans la micro-circulation de l'organe transplanté, par une dilatation des capillaires, la présence de cellules activées dans les capillaires, comme des monocytes, macrophages, lymphocytes T et NK, des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles.

- Preuve immuno-histologique : principalement un dépôt de C4d dans les capillaires péri-tubulaires
- Preuve sérologique : présence de DSA dans le sérum

La dernière version de la classification de Banff date de 2017 [34]. Elle définit deux catégories de rejet humoral, selon les lésions histologiques retrouvées à la biopsie. Le premier est le rejet actif, qui remplace le terme de rejet aigu. Le rejet actif répond bien aux traitements immunosuppresseurs. Le deuxième est le rejet chronique actif, qui remplace le terme de rejet chronique. On y retrouve les lésions du rejet actif, avec en plus des lésions caractéristiques du rejet chronique ; on l'appelle donc « rejet chronique actif ». Ce type de rejet ne répond pas bien aux traitements immunosuppresseurs. Le rejet humoral se distingue aussi en deux phénotypes : le phénotype I, lorsque les DSA du patient sont préformés et le phénotype II, lorsque les DSA sont *de novo*. Dans cette étude, nous avons utilisé cette dernière version de la classification de Banff pour constituer les groupes « absence de rejet », « rejet actif », et « rejet chronique actif » au moment de la biopsie.

Durant les dernières années, plusieurs études menées par différentes équipes (notamment des protocoles d'études de biopsie à l'apparition de DSA) ont montré que les DSA peuvent provoquer des lésions histologiques significatives sans dépôt de C4d ; cette notion a été incluse dans les versions révisées de la classification de Banff « rejet médié par les anticorps à marquage C4d négatif » [34]. A l'inverse, le concept de rejet médié par les anticorps sans DSA n'est pas reconnu, on considère plutôt que les techniques disponibles actuellement ne permettent pas le dépistage de tous les anticorps, y compris les anticorps non-HLA qui pourraient provoquer le rejet médié par les anticorps [35]. Le dépistage des DSA reste très fortement recommandé dans tous les cas où la biopsie montrerait des caractéristiques morphologiques de rejet médié par les anticorps actif ou chronique actif, pas seulement pour le diagnostic mais aussi pour l'évaluation du risque et le monitoring thérapeutique du patient. La classification révisée de Banff de 2017 se trouve en annexe à la fin de ce document.

1.7 Rejet non-HLA et autres facteurs de risques

1.7.1 Anticorps non HLA

Certaines études ont montré la possibilité de rejet sans DSA, ce qui suggère l'implication d'autres facteurs, notamment l'expression d'antigènes autres que HLA sur le tissu rénal allo-

greffé. Parmi ces autres molécules, les plus étudiées sont les anticorps dirigés contre le récepteur de type 1 à l'angiotensine II (anti-AT1Rs), et les anti-MICAs (MHC classe I-related chain A antibody) [35]. L'AT1R est un récepteur couplé à la protéine G qui intervient dans l'action de l'angiotensine II, dont la régulation de la pression artérielle et l'équilibre hydrosodé. Les anticorps anti-AT1R peuvent se former dans des situations d'inflammation, sensibilisation, ou la non-adhérence aux traitements médicamenteux. Les molécules MICA sont exprimées constitutivement sur les cellules vasculaires endothéliales et leur expression peut être amplifiée en cas de stress, par exemple lors de la transplantation. Toutefois, les conséquences cliniques de la présence de ces anticorps chez les patients transplantés restent controversées et les résultats diffèrent selon les études. Pour le moment, il n'existe pas de stratégie thérapeutique basée sur la présence ou l'absence de ces anticorps et leur dépistage ne s'effectue pas en routine en France. Nous détaillerons au paragraphe 1.8 les recommandations de l'Agence de la Biomédecine concernant le suivi immunologique des patients greffés.

1.7.2 Greffes ABO-incompatibles

Il ne faut pas oublier de considérer les autres aspects et facteurs de risque qui interviennent, à la fois dans le choix du greffon et dans l'évolution des patients greffés. Les antigènes ABO sont exprimés non seulement sur les érythrocytes mais aussi sur tous les tissus de l'organisme ; la greffe ABO-incompatible est relativement récente et nécessite un protocole de désimmunisation particulier. Les résultats à long terme sont bons mais restent légèrement inférieurs aux greffes ABO compatibles. Par exemple, les receveurs qui sont de groupe sanguin O possèdent des anticorps naturels réguliers dans leur sérum. Ces anticorps sont de nature IgM, mais les personnes de groupe sanguin O peuvent également avoir des hémolysines anti-A et/ou anti-B, c'est-à-dire des anticorps de nature IgG, et parfois IgA. Ces anticorps peuvent être de titre plus ou moins élevé, et délétères si le donneur est de groupe sanguin A ou B et exprime donc ces antigènes sur le greffon. Les hémolysines anti-A et/ou anti-B sont des anticorps qui vont entraîner des dommages sur le greffon incompatible, comme le rejet aigu. C'est pour cette raison que les greffes ABO incompatibles étaient historiquement non réalisées. Depuis les années 1980, plusieurs études sur des cohortes de greffes ABO incompatibles ont montré de bons résultats [36]. Grâce aux protocoles de désimmunisation, qui consiste à faire baisser les titres en anticorps chez le futur receveur, on peut procéder à

des greffes ABO incompatibles. Les protocoles de désimmunisation consistent en la plasmaphérèse, l'administration d'immunoglobulines par voie intra-veineuse (IVIg) ou de Rituximab, parfois la splénectomie. Tout ceci permet d'augmenter les chances de greffe des patients pour lesquels les greffons compatibles sont rares : en théorie, cela permettrait d'avoir 30% de donneurs vivants en plus. Il n'y aurait pas de différence significative pour la survie générale et la survie du greffon entre les greffes ABO compatibles et ABO incompatibles une fois les cinq premières années post-greffe passées [37]. Cependant il faut garder en tête que les patients greffés en ABO incompatible sont plus à risque pour le rejet aigu, les infections et la mortalité liée aux infections, donc surtout dans les trois premières années post-greffe. Quand cela est possible on préférera toujours une greffe ABO compatible.

Également, l'adhésion des patients au projet et au suivi de greffe, souvent reflétée par leur observance thérapeutique aux médicaments immunosuppresseurs, est un facteur évident mais clé pour le non rejet de leur greffon.

1.8 Recommandations de l'Agence de la biomédecine

Les points suivants reprennent les recommandations en vigueur en France concernant le suivi immunologique des patients en attente de greffe d'organes, ou greffés, d'après l'Agence de la biomédecine [38].

1.8.1 Suivi du patient en vue de l'inscription sur liste d'attente

- Réalisation du typage HLA A B DR DQ patient, à reconfirmer sur un second prélèvement si nécessaire → à noter donc que le typage C*, ou DP* n'est donc pas toujours effectué, ce qui expliquera que dans nos résultats que les typages des patients ne soient pas tous réalisés sur tous les loci, et que donc on peut méconnaître des DSA : positivité d'un anticorps dans le sérum d'un patient sans connaître le typage du donneur correspondant à ce locus.
- Une recherche d'anticorps anti-HLA de classe I et II doit être faite sur au moins deux sérums à trois mois d'intervalle par une technique sensible → nous détaillerons au prochain paragraphe les différentes techniques à disposition. A noter que la « technique sensible » est un terme peu précis et aucun fournisseur particulier ni seuil de positivité n'est recommandé.

- Une recherche par lymphocytotoxicité sur lymphocytes T ou totaux avec et sans DTT sur un panel représentatif, afin de détecter d'éventuelles IgM.
- En cas de positivité de la recherche, l'identification des spécificités d'anticorps doit être réalisée par une technique sensible.
- Tout évènement immunisant pour le patient doit être signalé (grossesse, transfusion, greffe) et impose une nouvelle recherche d'anticorps anti-HLA sur deux sérums, l'un entre J15 et J21 et l'autre à J30 de l'évènement immunisant.

1.8.2 Suivi du patient inscrit sur liste d'attente

- Si le patient n'est pas immunisé, un dépistage d'anticorps anti-HLA par une technique sensible est recommandé tous les 3 mois (maximum 6 mois d'écart entre deux prélèvements) ainsi qu'une recherche d'anticorps IgM en LCT sur lymphocytes T ou totaux une fois par an.
- Si le patient est immunisé, une recherche d'anticorps anti-HLA est recommandée tous les trois mois. Tout évènement immunisant entraîne une nouvelle recherche d'anticorps, au même titre que les patients non immunisés, ainsi qu'une recherche d'anticorps anti-HLA par LCT une fois par an. En cas de suspicion d'auto-réactivité, il est recommandé d'effectuer un auto cross- match.

1.8.3 Suivi du patient après la greffe

- Recherche d'anticorps anti-HLA à 3 mois de la greffe puis un an puis une fois par an par une technique sensible.
- En cas de greffe d'îlots pancréatiques ou de transfusion, une recherche (et si besoin identification) d'anticorps anti-HLA doit être effectuée entre J15 et J21 puis à J30 de l'évènement immunisant.
- En cas de rejet aigu, transplantectomie, retour en dialyse, arrêt de l'immunosuppression, 6 recherches d'anticorps anti-HLA sont à répartir au cours des 6 mois suivants.
- En cas de suspicion de rejet humoral et en l'absence d'anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur détectable, une recherche complémentaire d'allo-anticorps non HLA peut être effectuée.

- Le cas de la grossesse implique un suivi accru avec recherche d'anticorps anti-HLA tous les mois à partir du 3^{ème} mois de grossesse. Un typage du procréateur peut être effectué afin de mettre en évidence d'éventuels antigènes HLA communs avec le greffon.

1.9 Les différentes techniques existantes pour mettre en évidence une immunisation anti-HLA

1.9.1 Les tests cellulaires

1.9.1.1 Le PRA (Panel Reactive Antibody)

Le PRA est un anticorps réagissant avec un ou plusieurs antigènes spécifiques présent sur un panel test. Le test « percent PRA » est une technique historique qui permet d'évaluer le niveau de sensibilisation anti-HLA d'un patient [3]. Le « percent PRA » est défini comme le pourcentage d'antigènes HLA, présents sur un panel test, qui réagissent avec le sérum d'un patient. Les antigènes HLA proviennent d'un pool de plusieurs donneurs, donc les antigènes recouvrent a priori la population générale. Ainsi si le patient possède des anticorps anti-HLA dans son sérum, ceux-ci vont se fixer aux antigènes correspondants sur la plaque, et provoquer une lyse cellulaire qui sera visible et donc quantifiable. On pourra en déduire un pourcentage d'immunisation face à un panel de donneurs. Il s'agit d'un test qui n'est plus utilisé en routine de nos jours.

1.9.1.2 Le cross-match par lymphocytotoxicité

Le cross match par lymphocytotoxicité dépendant du complément ou CDC (Complement-Dependant Cytotoxicity) a été le premier test mis en place en routine afin de dépister les incompatibilités HLA majeures [39]. Les lymphocytes du donneur et le sérum du receveur sont mis en présence de complément dans des plaques de Terasaki, du nom de l'un des premiers chercheurs à avoir mis au point cette technique. Si le sérum du receveur contient des allo-anticorps dirigés contre les lymphocytes du donneur, et que ces allo-anticorps se fixent à leur cible, il y aura alors formation du complexe d'attaque membranaire et destruction de la paroi cellulaire. Grâce à l'addition d'un colorant rouge qui n'entre que dans les cellules lysées, on peut en déduire un pourcentage de cellules lysées et donc une positivité éventuelle du cross match, ce qui signifie une incompatibilité majeure donneur-receveur.

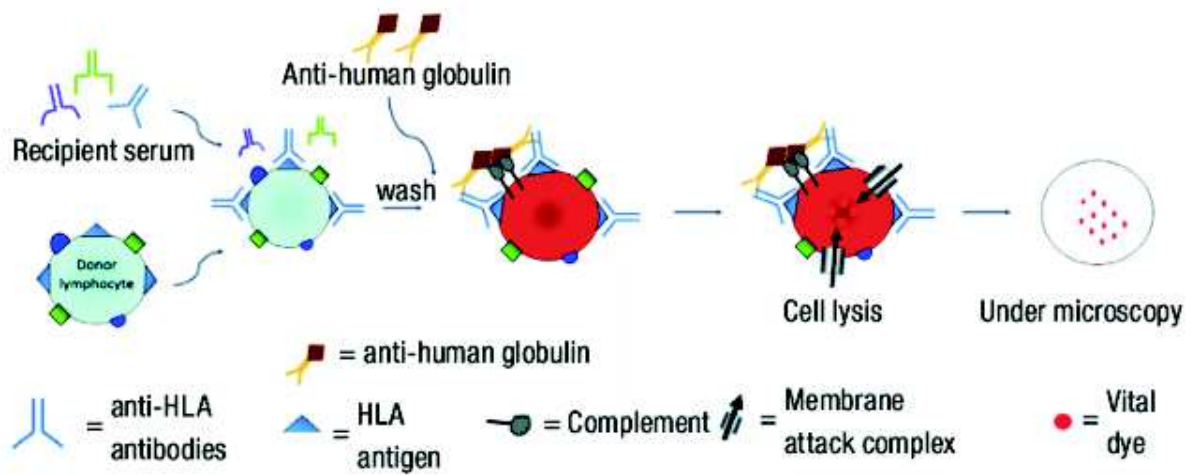


Figure 12 : Principe du cross-match par lymphocytotoxicité

Les lymphocytes du donneur sont mis en présence du sérum du receveur, qui contient éventuellement des DSA pré-formés. L'addition de l'anti-globuline humaine permet d'augmenter la sensibilité du test. Après lavage, on ajoute du colorant qui va entrer dans les cellules seulement si elles ont été lysées par le complexe d'attaque membranaire. La coloration se lit au microscope [39].

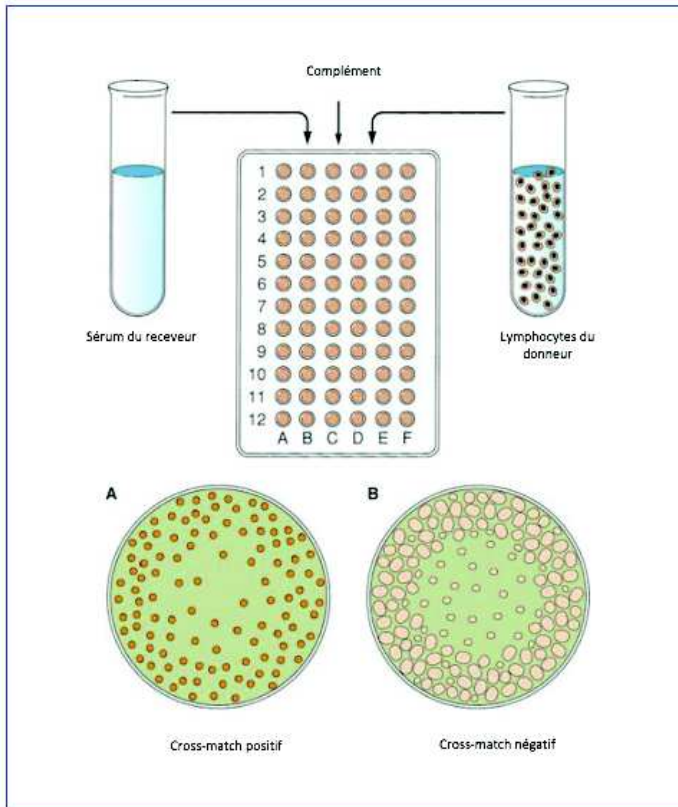


Figure 13 : Schéma visuel de la technique du cross-match, adapté de BasicMedicalKey.com

On utilise un microscope à fluorescence pour la lecture, qui est visuelle. On comprend bien que ce test est peu sensible, qu'il ne met en évidence que les anticorps présents en quantité suffisante pour déclencher la lyse cellulaire, et seulement à travers la voie du complément. On peut utiliser de l'AGH (IgG anti-humaine) afin d'augmenter la sensibilité de ce test. On peut différencier les anticorps anti-HLA de classe I en utilisant des lymphocytes T et ceux de classe II, en utilisant les lymphocytes B qui portent à la fois des antigènes HLA de classe I et II. Ce test a l'avantage d'être le seul à pouvoir mettre en évidence une réactivité due aux IgM ; réactivité dont on peut s'affranchir en utilisant le DTT. Le DTT est un réactif permettant de détruire les IgM. Après incubation du sérum du receveur avec du DTT, on procède de nouveau au cross-match ; s'il s'avère être négatif, on sait que la positivité du cross-match avant DTT était due à des IgM. On peut aussi faire un auto-cross-match en parallèle pour vérifier que les IgM sont des auto-anticorps : on met en présence le sérum du receveur avec ses propres cellules afin d'observer une réaction positive. Si c'est bien le cas, une telle positivité n'est pas une contre-indication à la greffe puisque les auto-anticorps ne sont pas considérés comme dangereux. En revanche, un cross-match toujours positif après DTT est donc dû à des IgG, et peut donc

contre-indiquer la greffe. Comme nous allons le voir, de nouvelles techniques plus sensibles existent aujourd'hui. Cependant, le cross-match par cytotoxicité dépendante du complément reste l'étape ultime avant de procéder à la greffe en néphrologie. Sa négativité est l'assurance d'absence de rejet aigu, mais ne prédit en rien l'avenir du greffon sur le long terme.

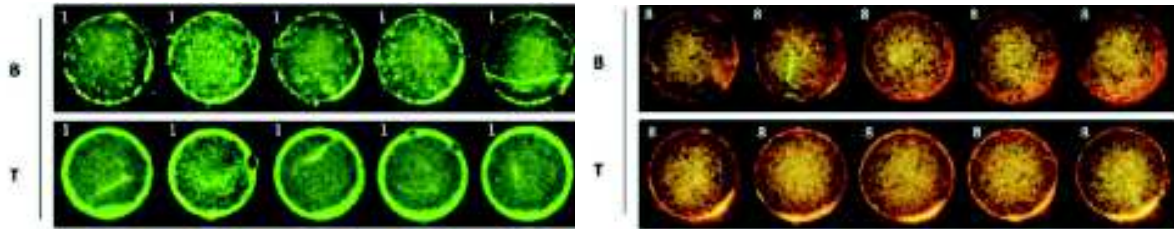


Figure 14: Lecture d'une plaque de Terasaki au microscope à fluorescence

Figure adaptée de [40] : à gauche, on observe un cross-match négatif : les cellules du donneur, qui sont les petits points verts, n'ont pas été lysées par le CAM, le colorant rouge n'a pas pu entrer dans les cellules, toutes les cellules sont vertes. A droite, on observe un cross-match positif : les cellules du donneur ont été lysées par le CAM (et donc par les anticorps présents dans le sérum du receveur), le colorant rouge a pu entrer dans les cellules. On quantifie le pourcentage de cellules rouges (donc lysées). Ici sur la figure de droite, la lyse est de 100%.

1- CAS FREQUENTS

Traitement par DTT	Lymphocytes T	Lymphocytes B	Conclusion
Sans DTT Avec DTT	- -	- -	Greffe possible
Sans DTT Avec DTT	+ +	+ +	Greffe impossible
Sans DTT Avec DTT	- -	+ -	Greffe possible sauf si présence de spécificités anti-HLA connues du donneur mises en évidence
Sans DTT Avec DTT	- -	+ +	CAEN : Greffe impossible ROUEN : Greffe possible sauf si présence de spécificités anti-HLA connues du donneur mises en évidence
Sans DTT Avec DTT	- -	+ +/-	Greffe à discuter. Tenir compte de l'ensemble de l'historique du patient

2- CAS RARES

Sans DTT Avec DTT	+ -	+ -	Greffe possible sauf si présence de spécificités anti-HLA connues du donneur mises en évidence
Sans DTT Avec DTT	+ -	+ +	CAEN : Greffe impossible ROUEN : Greffe à discuter avec le clinicien. Tenir compte de l'ensemble de l'historique patient.
Sans DTT Avec DTT	+ +/-	+ +/-	Greffe impossible

Tableau 1 : Organigramme de décision de greffe au laboratoire HLA de Bois-Guillaume

Cet organigramme de décision de greffe est utilisé au laboratoire HLA de Bois-Guillaume, d'après la procédure « réalisation du cross-match virtuel et du cross-match par LCT avant greffe de rein » de l'EFS Hauts-de-France Normandie.

1.9.1.3 Le cross-match par cytométrie en flux

Ce test a amélioré la sensibilité de la détection des anticorps anti-HLA, à la fois pour ceux dépendant du complément et non, en classe I et en classe II. Elle a aussi permis de réduire la subjectivité liée à la lecture pour le cross-match par lymphocytotoxicité. La technique consiste à mettre en présence les lymphocytes du donneur, et le sérum du receveur. Si un ou plusieurs DSA sont présents dans le sérum du receveur, ils vont se lier aux molécules HLA à la surfaces des lymphocytes T ou B du donneur. Après incubation avec une immunoglobuline G anti-humaine couplée à un fluorochrome, un cytomètre de flux est utilisé pour la lecture. Le niveau de fluorescence est proportionnel à la quantité d'anticorps lié aux cellules. On peut utiliser des marqueurs différents sur les fluorochromes pour différencier la réactivité B et T, et donc

les anticorps de classe I et II. La figure suivante schématise le concept de cross-match par cytométrie en flux, d'après [39].

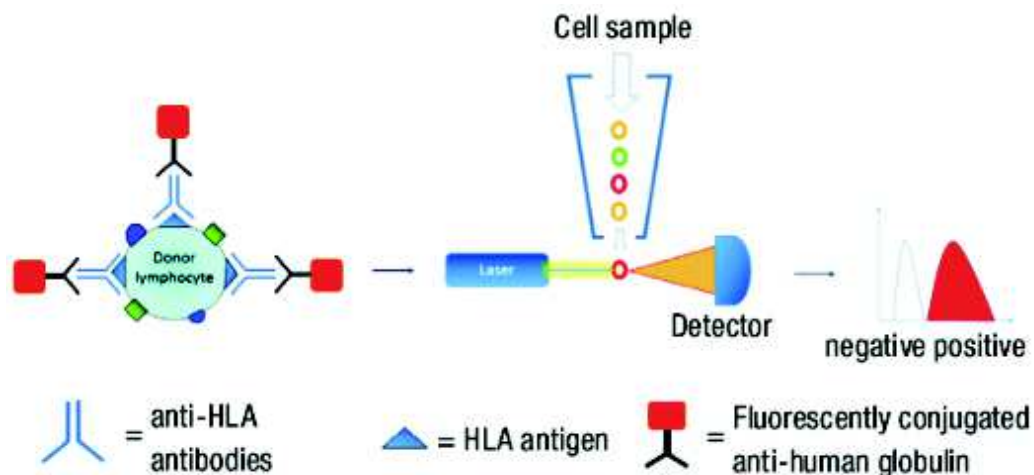


Figure 15 : Principe du cross-match par cytométrie en flux

1.9.2 Les tests en phase solide

1.9.2.1.1 ELISA

Les tests en phase solide de type ELISA utilisaient des molécules HLA solubles immobilisées sur une matrice solide comme une plaque de micro-titration. La technique ELISA est historique, elle a été largement remplacée par le Luminex®. Le principe reste le même, seul le support et la technologie ont évolué.

1.9.2.1.2 Luminex

La technique Luminex est largement utilisée en routine en laboratoire. Le principe du Luminex repose sur la cytométrie en flux, avec deux lasers de détection. La technique Luminex utilise des molécules HLA solubles immobilisées sur une matrice solide : les micro-billes. Les molécules HLA peuvent être purifiées à partir de plaquettes ou être des molécules recombinantes. Les microbilles de polystyrène sont imprégnées de colorants fluorescents qui sont excités de manière simultanée par un laser rouge à 635 nm. La lumière émise peut être détectée à 660 nm et 730 nm en utilisant un cytomètre de flux adapté. En mesurant la composition de la lumière émise dans chaque canal, il est possible d'identifier une centaine de billes avec une seule molécule HLA de manière concomitante. Le sérum du patient est incubé sur une plaque à filtre avec les billes. Les anticorps, s'ils sont présents dans le sérum

du patient, se lie à l'antigène correspondant qui est immobilisé sur les billes. Après incubation et lavages, le conjugué est ajouté : une IgG anti-humaine couplé à un fluorochrome, la phycoérythrine (PE). Le conjugué va se lier à l'allo-anticorps qui s'est fixé sur sa cible antigénique. La détection des anticorps anti-HLA se fait donc en utilisant cet anticorps secondaire couplé à la R-phycoérythrine (PE), excité par un laser vert et détecté à 576 nm [41]. Les billes de polystyrène sont lues sur le Luminex. Il possède un double laser de détection. Le premier laser, rouge, classe les billes et donc permet de connaître l'antigène qui sera détecté sur chaque bille. Le second laser, vert, mesure l'amplitude du signal produit par la PE, qui est directement proportionnelle à la quantité d'anticorps fixée.

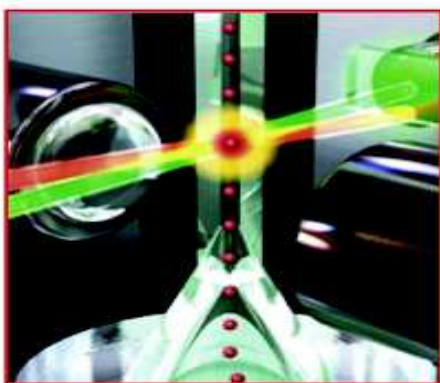
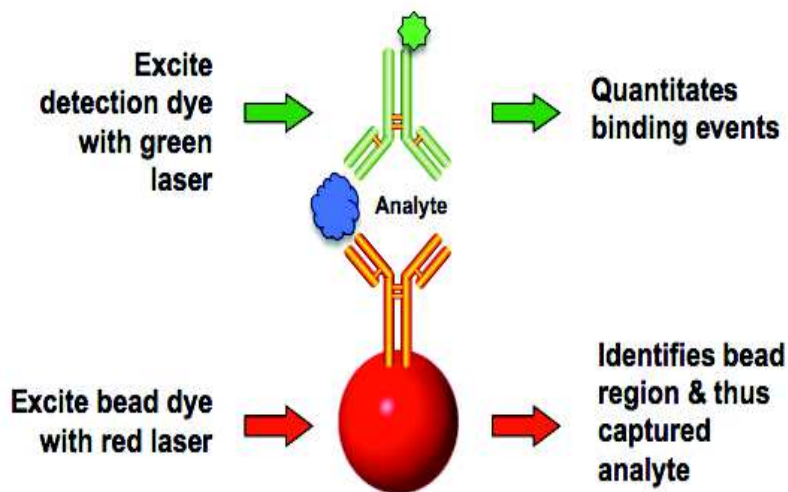


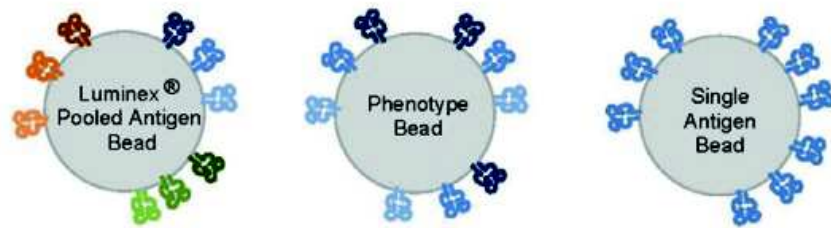
Figure 16: Principe de détection des micro-billes par le Luminex

Les résultats sont semi-quantitatifs ; présence ou absence d'une certaine quantité d'anticorps (IgG, toutes sous-classes confondues), selon un seuil défini. Les résultats sont exprimés de manière différente selon le fournisseur ; One Lambda utilise la MFI (Mean Fluorescence

Intensity ou intensité moyenne de fluorescence). La MFI n'est pas un titre ni une concentration d'anticorps et ne doit pas être interprétée comme telle. Cependant, elle donne quand même une indication sur la « quantité » d'anticorps présents et est donc souvent utilisée comme indicateur. Le seuil à partir duquel une MFI est considérée comme importante dépend de chaque centre. Toutefois, il est fréquent de retenir un seuil supérieur à 1000 pour être considéré comme un anticorps d'intérêt, à prendre en compte.

Il existe trois types de panels Luminex [41] :

- Le dépistage : Plusieurs antigènes HLA sont représentés à la surface d'une même bille ; généralement que des molécules HLA de classe I (HLA-A, -B, -C) sur une même bille d'une part, et HLA de classe II (HLA-DR, -DQ, -DP) sur une autre bille. De nombreuses billes avec une représentation différente d'antigènes, qui couvre la grande majorité des molécules HLA, sont poolées et utilisées en même temps pour le dépistage. Les antigènes proviennent de pools de nombreux individus et sont utilisés pour le dépistage d'une immunisation. En effet, si le sérum d'un patient est détecté positif sur ce type de test, on pourra seulement savoir qu'il possède des anticorps anti-HLA dans son sérum, mais on ne pourra pas dire spécifiquement de quel anticorps il s'agit.
- Les billes phénotypées, qui sont coatées avec le phénotype de classe I ou de classe II d'un seul individu. Les antigènes de classe I ou II ainsi représentés proviennent d'une seule lignée cellulaire. Ce panel est peu utilisé en pratique.
- Les panels « Single Antigen » ou SAB (Single Antigen Beads). Un seul antigène d'origine recombinante recouvre une bille. Il s'agit de la technique d'identification par excellence : en effet, elle permet de connaître spécifiquement le ou les anticorps présents dans le sérum du patient, au niveau allélique, et ce avec une très bonne sensibilité.



Application	Dépistage	Identification	Identification
Densité antigénique relative	Basse	Intermédiaire	Elevée
Source antigénique	Plaquette ou lignée cellulaire transformée (EBV)	Lignée cellulaire transformée (EBV)	Lignée cellulaire recombinante
Composition antigénique, par bille	Phénotype complet de classe I ou II, de 3 à 5 individus	Phénotype complet de classe I ou II, d'un seul individu	Antigène seul

Figure 17: Différences entre les différents panels Luminex : Dépistage, Billes phénotypées, et SAB

En pratique au laboratoire, on utilise en première intention le panel de dépistage, moins onéreux, afin de savoir si le patient est immunisé et si oui, en quelle classe. Si le dépistage est positif, on identifie spécifiquement le ou les anticorps responsables de cette immunisation en utilisant le test SAB, qui est plus cher. Nous allons maintenant nous intéresser uniquement à la technique SAB, qui est celle utilisée dans notre étude. Deux fournisseurs principaux ont développé les réactifs nécessaires à l'utilisation de la technique Luminex : Immucor et One Lambda [42]. Dans notre étude, nous avons utilisé One Lambda pour l'identification des DSA, et Immucor pour la détection du C3d. Les protocoles sont différents, ainsi que les logiciels d'exploitation et le format de rendu des résultats. Les protocoles seront détaillés dans la partie Matériel et méthodes.

1.9.3 Cross match virtuel

Dans certains cas et lorsque le temps est un facteur limitant à la greffe à cause principalement du temps d'ischémie froide de l'organe ou des distance géographiques, on peut effectuer un cross-match virtuel. Il s'agit de confronter les données théoriques dont on dispose ; les résultats de l'identification des anticorps anti-HLA de classe I et II d'un receveur sont confrontés au typage HLA du donneur potentiel. Ainsi, on peut savoir si le receveur présente, ou pas, un DSA préformé qui contre-indiquerait la greffe. Il faut savoir que pour le moment, le cross match virtuel ne se substitue pas au cross match par lymphocytotoxicité sauf dans le cas où le receveur n'est pas immunisé et ceci implique que les dossiers des patients soient tenus à jour de manière très rigoureuse.

1.10 Techniques pour la mise en évidence du complément

1.10.1 Origines du concept

Les nouvelles techniques de dépistage des anticorps anti-HLA ont énormément gagné en sensibilité, permettant de dépister des anticorps circulants même à des taux très bas. Paradoxalement, ce gain en sensibilité peut rendre les conditions d'accès à la greffe plus délicate ; comme on dépiste un plus grand nombre d'anticorps anti-HLA, la possibilité de dépister un éventuel DSA est donc élevée, et les équipes peuvent décider de refuser un greffon par crainte du rejet. Or on sait maintenant que tous les éventuels DSA dépistés n'ont pas la même pathogénicité, et ne vont pas forcément entraîner d'effets néfastes contre le greffon. Il est donc important de pouvoir disposer de tests biologiques simples, peu invasifs pour le patient, qui permettraient de « classer » ces différents anticorps, et de leur attribuer une valeur prédictive de pathogénicité. On utilise déjà certains paramètres afin d'estimer leur pathogénicité [43] : La « force », interprétée à partir de la MFI (intensité moyenne de fluorescence), le titre, le nombre de DSA, la somme de leur MFI, leur persistance dans le temps, le fait qu'ils soient de novo ou préformés, la spécificité de classe (classe I ou classe II), l'épitope reconnu. Depuis les années 70, la voie classique du complément est considérée comme l'un des mécanismes principaux de pathogénicité des DSA, surtout depuis la mise en évidence de dépôts de fractions du complément (C4d, C3d) dans les capillaires péri-tubulaires des patients présentant un rejet cellulaire [44]. Le rôle du complément dans le rejet médié par les anticorps [45] est donc une question qui se pose depuis une dizaine d'années, et plusieurs études ont suggéré son implication à la fois dans le rejet actif et chronique actif. Dans le rejet

actif, il a été montré que l'utilisation de l'éculizumab (blocage du C5) chez les patients immunisés réduisait l'incidence de rejet actif [46]. Dans le rejet chronique, les résultats sont moins tranchés ; une activation précoce du complément pourrait favoriser l'entrée du greffon dans un processus inflammatoire comprenant l'infiltration de cellules inflammatoires ou en l'endommageant directement, en modulant l'activité des cellules T et la réponse adaptative impliquée dans le rejet. Par la suite, cette inflammation deviendrait indépendante du taux de DSA présent, et du complément. Différentes techniques ont donc été mises en place afin de mettre en évidence les anticorps anti-HLA ayant la capacité d'activer le complément. Les différences résident principalement dans le composant de la cascade que l'on veut mettre en évidence, et donc dans le stade d'activation du complément.

1.10.2 Le test c4d

Il s'agit du premier test en phase solide concernant l'étude du complément pour les anticorps anti-HLA, il a été développé par Wahrmann et al. en 2005 [47]. Le principe repose sur de la cytométrie en flux et la liaison d'anticorps IgG aux antigènes anti-HLA purifiés et immobilisés sur des billes inertes (FlowPRA Screening, One Lambda, Inc., Canoga Park, CA). Après incubation du sérum du patient avec ces billes recouvertes par les antigènes HLA purifiés, on ajoute une source de complément pour permettre l'éventuelle activation de la cascade. La source de complément est le sérum provenant de donneurs masculins, volontaires sains, n'ayant jamais été transfusés. Si le C4d est détecté, un signal positif sera émis. Comme nous l'avons vu précédemment, le C4d est un produit de clivage généré par l'activation de la voie classique du complément, activation médiée par les allo-anticorps présents. Les études utilisant ce test ont corrélé la positivité du C4d en cytométrie en flux avec le dépôt de C4d sur les biopsies de greffon, et une moins bonne survie du greffon à trois ans de la transplantation. Cependant lorsque ce test a été adapté à la technique SAB, qui est plus sensible, la capacité des DSA C4d+ à prédire la survie du greffon a été démontrée dans certaines études, mais pas toutes. L'absence de commercialisation de ce test a limité son étude et son intérêt par la suite.

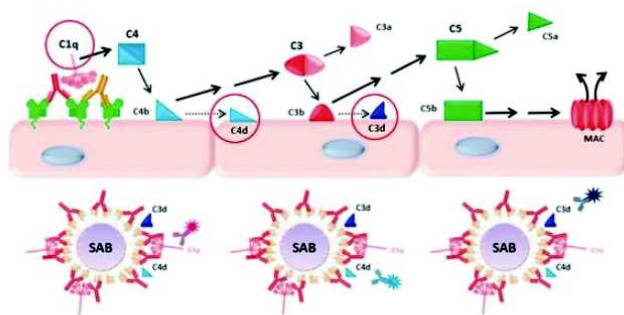
1.10.3 Le test C1q

Dans ce test développé en 2011 par Chen et al. [48], l'IgG du test standard est remplacé par un réactif anti-C1q, qui va donc lier seulement aux anticorps anti-HLA qui ont la capacité de fixer le C1q, le premier composant de la voie classique du complément. La standardisation

pour la concentration en complément a été obtenue en éliminant le complément endogène par chauffage, puis en ajustant avec une concentration définie par du C1q humain purifié.

1.10.4 Le test C3d

Comme nous l’avons vu précédemment, le C3d est un produit de clivage positionné en aval de la cascade de la voie classique du complément. A l’inverse du C1q, qui mesure seulement le potentiel des anticorps à initier la cascade du complément, le C3d est déjà un des produits secondaires de cette activation. Il pourrait donc un être un meilleur reflet de cette activation, et par extension un meilleur reflet d’une éventuelle lésion tissulaire du greffon. De plus, la voie du complément étant une cascade d’amplification, on devrait retrouver le C3d en plus grande quantité, et il peut être un marqueur plus sensible que le C1q. Dans notre étude, c’est à ce marqueur d’activation du complément que l’on va s’intéresser.



	Test C1q	Test c4d	Test C3d
Source de complément	C1q exogène purifié	Sérum humain « normal »	Sérum humain « normal »
Réactif de détection	Anticorps anti-C1q	Anticorps anti-C4d	Anticorps anti-C3d

Figure 18: Schéma de la voie classique du complément et des tests en phase solide

Parallèle avec les différents tests en phase solide (C1q, C4d, C3d) mis en place pour évaluer le potentiel d’activation du complément des anticorps anti-HLA, adapté de [43]

1.11 Limites techniques communes aux tests d’identification SAB des anticorps

1.11.1 Effet pro-zone

Le principal problème technique est la sous-estimation et même l’absence de détection de certains anticorps, pourtant présents à très forts titres. Ce phénomène s’appelle « l’effet pro-

zone » ou « effet Hook ». En diluant le sérum, on retrouve la réelle positivité des anticorps qui ont subi cet effet. Les différentes hypothèses pour expliquer cet effet pro-zone sont soit la compétition d'IgM avec les IgG pour la fixation sur les sites antigéniques disponibles, soit la compétition du complément C1 du complément dans le sérum, ce qui entraîne également une compétition et empêche les anticorps de se fixer sur les billes [49]. On peut s'affranchir de cet effet en diluant les sérums, ou en traitant les sérums préalablement par la chaleur ou l'EDTA (un agent chélateur de calcium souvent utilisé comme anticoagulant). Ce phénomène est surtout observé chez les patients hyperimmunisés [50]. Le prétraitement des sérums par l'EDTA est maintenant fortement recommandé par les fournisseurs.

1.11.2 Antigènes dénaturés

Le fait de purifier et d'immobiliser les molécules HLA sur les billes peut altérer leur structure tertiaire, dénaturer l'antigène et exposer des antigènes normalement pas exposés in vivo, qu'on appelle « néo-épitopes ». On a retrouvé quelques exemples d'hommes non transfusés dépistés positifs, ou de patients atteints de pathologies auto-immunes mais ne présentant pas de facteurs de risque d'immunisation anti-HLA. Certaines particules virales peuvent aussi « mimer » des molécules HLA et entraîner une immunisation dite « naturelle ». On appelle ces anticorps des anticorps anti-HLA « dénaturés » [41]. L'exposition de ces néo-épitopes peut entraîner la détection d'anticorps sans pertinence clinique et qui sont des réactions faussement positives. Cela est gênant car le patient en attente de greffe sera alors considéré comme immunisé et cela va retarder ses chances d'obtenir une greffe. L'un des moyens pour mettre en évidence une immunisation contre un antigène dénaturé est de traiter les billes par l'acide ; cela a pour effet de dénaturer tous les antigènes présents sur la bille. En effectuant le test SAB une nouvelle fois, si on retrouve encore la positivité de l'anticorps alors celui-ci se lie effectivement à un antigène dénaturé et n'est pas à prendre en compte [51]. Il semblerait que 21 à 39% des patients présenteraient un anticorps dirigé contre un antigène dénaturé [52]. A l'inverse, certaines épitopes habituellement exposés en surface et qui ont une importance clinique peuvent se retrouver cachés, on les appelle des « anticorps cryptiques » ; ceci va empêcher la détection des anticorps correspondant et donc entraîner une réaction faussement négative [53]. Cela est également gênant car on peut passer à côté de l'immunisation d'un patient et lui attribuer un greffon incompatible.

1.11.3 Densité antigénique

La MFI n'est pas un titre et le test SAB n'est pas un test quantitatif mais seulement semi-quantitatif. L'une des explications est que la densité antigénique des différentes molécules HLA sur les billes varie selon les lots et les méthodes de production. Par ailleurs, les épitopes cibles peuvent être répartis sur plusieurs billes ; cela peut entraîner une « dilution » de l'anticorps présent dans le sérum, qui ira se fixer sur plusieurs cibles, donc on retrouvera une MFI plus faible par bille et l'on ne la prendra peut-être pas en considération de ce fait [53].

1.11.4 Représentativité des panels

Si le receveur présente un anticorps dirigé contre un antigène HLA rare, il se peut que cet antigène ne soit pas présent sur les billes des panels utilisés. Dans ce cas, on peut passer à côté de l'anticorps. Il faudrait s'assurer que les antigènes du donneur sont bien présents sur les billes que l'on utilise [51].

1.12 Objectifs de l'étude

Dans cette étude, nous avons étudié une population homogène de 112 patients suivis dans plusieurs centres : Amiens, Angers, Brest, Caen, Clermont Ferrand, Strasbourg, Rouen, Tours. Les patients inclus ont tous bénéficié d'une greffe rénale, n'avaient pas de DSA pré-formés avant leur greffe, étaient tous infra-cliniques, ont eu l'apparition d'un DSA de novo, et ont subi une biopsie de greffon pour cette apparition de DSA. Les critères pour être considéré comme « infra-clinique » dans cette étude sont d'avoir une créatininémie stable sur les trois derniers mois (moins de 20% de variation) et une protéinurie inférieure à 0.5g/g. Après la greffe, ces patients ont développé un ou plusieurs DSA entre 2008 et 2016 et ont bénéficié d'une biopsie de ce fait. Ces DSA ont été identifiés par la technique One Lambda et une MFI supérieure à 1000 était nécessaire pour être inclus dans l'étude. Aucun changement thérapeutique n'a eu lieu entre l'apparition du DSA et la biopsie. Ce sont les sérums du jour de biopsie qui ont été étudiés ici. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'un des critères de pathogénicité des DSA, à savoir leur capacité à activer le complément et plus spécifiquement la positivité des DSA au test C3d. Le premier objectif est de savoir si ce test a un intérêt dans

l'aide au diagnostic de rejet infra-clinique et en particulier si une positivité au test C3d chez un patient doit inciter à lui faire une biopsie.

Le deuxième objectif de l'étude concerne l'impact à long terme du test C3d sur la survie du greffon : La positivité précoce (infra-clinique) du test C3d est-elle un marqueur prédictif d'une moins bonne survie du greffon ?

2 CHAPITRE II - Patients et méthodes

2.1 Patients

Notre étude se base sur les sérums du jour de biopsie des patients inclus dans l'étude. Les critères d'inclusion sont des patients greffés, n'ayant pas de DSA pré formés mais ayant développé des DSA de novo. Ces patients sont suivis dans différents centres en France. On retrouve dans le tableau suivant les caractéristiques principales des patients inclus.

Caractéristiques	Nombre total de patients inclus	112
Centre de greffe	Amiens	28
	Angers	10
	Brest	2
	Caen	7
	Clermont Ferrand	7
	Rouen	20
	Strasbourg	8
	Tours	30
Néphropathie	Diabète	5 (4,5%)
	Glomérulonéphrite	28 (25%)
	NTIC et uropathie malformative	17 (15,2%)
	NAS	4 (3,6%)
	Polykystose et autres maladies génétiques	35 (31,3%)
	Indéterminé	18 (16%)
	Autres	5 (4,5%)
Type de donneur	Donneur vivant	8 (7,1%)
	Mort encéphalique	104 (92,9%)
Délais	Sex Ratio (H/F)	78/34 soit 2,29
	Age moyen au moment de la biopsie (ans)	50,05 +/- 13,17
	Délai entre la biopsie et greffe (mois)	82,84 +/-68,1

	Délai entre apparition DSA et biopsie (mois)	13,04+/-21,95
	MDRD moyen au moment de la biopsie	55,038 +/-18,37
Traitement immunosupresseur	Ciclosporine + Imurel	5 (4,5%)
	Ciclosporine + MMF	52 (46,4%)
	Ciclosporine	2 (1,8%)
	MMF	1 (0,9%)
	mTOR + MMF	19 (17%)
	mTOR seul	3 (2,7%)
	aucun traitement	2 (1,8%)
	tacrolimus + imurel	1 (0,9%)
	tacrolimus + MMF	25 (22,3%)
	tacrolimus	2 (1,8%)

Tableau 2 : Caractéristiques générales de la cohorte

Les patients inclus ont été greffés et suivis à Amiens, Angers, Brest, Caen, Clermont-Ferrand, Rouen, Strasbourg et Tours. Dans notre cohorte, on retrouve en majorité des hommes (sex ratio de 2,29) avec un âge moyen de 50 ans au moment de la biopsie. Le délai moyen entre la greffe et la biopsie est de 82 mois et celui entre l'apparition du DSA et la biopsie a été de 13 mois. Entre temps, ces patients ont été en majorité traités par l'association de ciclosporine et mycophénolate mofétil, sans changement thérapeutique entre la greffe et la biopsie. Le MDRD moyen au moment de la biopsie est de 55,0 ml/min/1,73m². Leur greffon provenait en large majorité de donneurs par mort encéphalique, et les néphropathies ayant mené à la greffe étaient en majorité des polykystoses ou autres maladies génétiques, suivies des glomérulonéphrites.

2.2 Aspects techniques

Les sérums ont été conservés congelés à -80°C entre le jour de biopsie de chaque patient et le début de l'étude, donc entre 2006 et 2018. Tous les sérums ont été rapatriés des différents centres jusqu'au laboratoire HLA de l'EFS de Bois-Guillaume. Pour les laboratoires utilisant One Lambda en première intention, les identifications ont été réalisées le jour de la biopsie. Pour l'étude, les résultats ont été recherchés rétrospectivement dans les logiciels médico-

techniques propres à chaque centre puis ont été communiqués au laboratoire EFS HLA de Bois-Guillaume. La majorité des laboratoires HLA en France travaillent avec One Lambda en première intention ; cette étude se base sur des patients dont les anticorps ont été identifiés en One Lambda. Pour les centres ne travaillant pas en première intention avec One Lambda, comme Rouen, les sérums du jour de la biopsie ont été congelés puis testés à posteriori en One Lambda. Au total, 112 patients ayant développé un DSA de novo avec une MFI supérieure à 1000 en One Lambda ont été inclus.

2.2.1 Identification des anticorps anti-HLA par One Lambda

On utilise des billes auxquelles sont fixées des molécules HLA recombinantes et purifiées. Ces billes sont conçues pour détecter les anticorps de type IgG. Les résultats bruts sont analysés sur le logiciel Fusion. Les sérums sont traités selon les recommandations du fournisseur détaillées en annexe. L'identification pour la classe 1 et pour la classe 2 sont réalisées séparément, les billes étant conservées dans des kits et lots distincts pour chaque classe. Les sérums n'ont pas été identifiés avec le même lot, ni par la même personne et ni au même moment puisque les identifications ont été effectuées dans les laboratoires HLA associés à chaque centre de greffe. La première étape consiste à décongeler (si besoin), vortexer puis centrifuger les sérums des patients. On répartit 5 µL de billes LSA (classe 1 ou classe 2) dans chaque puits, et on ajoute ensuite 20µL de sérum des patients (1 patient par puits). Après une incubation de 30 minutes par agitation et à l'abri de la lumière, on effectue trois lavages afin d'éliminer les anticorps non spécifiques qui ne se sont pas fixés aux billes. Puis on ajoute un anticorps anti-IgG humain conjugué à la phycoérythrine, qui va se fixer sur les anticorps déjà fixés aux billes. Après une nouvelle incubation de 30 minutes par agitation à l'abri de la lumière et de nouveaux lavages, on peut passer la plaque pour lecture sur le Luminex.

Il faut distinguer le seuil technique du seuil clinico-biologique : chaque centre définit son propre seuil à partir duquel les MFI sont considérées comme positives, en fonction de la situation clinique. Pour notre étude, nous n'avons inclus que les patients dont la MFI était supérieure à 1000.



Ce document ne se substitue en aucun cas à la notice et au mode d'emploi. Il ne doit être utilisé qu'après lecture et compréhension de ces derniers.

Préparation	Allumer le Luminex
	Centrifuger les échantillons et le LSNC de 8000 à 10000g pendant 10min
	Préparer une solution de lavage 1x en diluant le wash buffer 10x avec de l'eau distillée (2,5ml/puits)
	- Recouvrir les puits non utilisés - Humidifier les filtres des puits avec 300µl de solution de lavage 1x.
	Incuber 10 min à 20-25°C sur plateforme rotative à basse vitesse
	Aspirer la solution de lavage
Binding	Agiter les tubes de billes sur un vortex (15 sec max)
	Incliner la plaque à 45°C
	Déposer 5µl de billes par puits
	Ajouter 20µl de sérum par puits, sur la goutte de billes, et agiter à la pipette
	Incuber 30 min à 20-25°C à l'abri de la lumière, sur plateforme rotative à basse vitesse
Lavages	Ajouter 175µl de solution de lavage 1x dans chaque puits - aspirer
	Après chaque lavage, tapoter la plaque pour désamorcer les capillaires
	Répéter ce lavage 4 fois
Révélation	Diluer 1µl d'IgG-PE dans 99µl de solution de lavage 1x (par test)
	Ajouter 100µl d'IgG-PE dilué dans chaque puits
	Incuber 30 min à 20-25°C à l'abri de la lumière, sur plateforme rotative à basse vitesse
Lavages	Ajouter 175µl de solution de lavage 1x dans chaque puits - aspirer
	Après chaque lavage, tapoter la plaque pour désamorcer les capillaires
	Répéter ce lavage 4 fois
	Ajouter 80µl de PBS 1x

Faire l'acquisition

Figure 19 : Protocole technique SAB One Lambda

2.2.2 Test C3d Immucor

Il s'agit d'un test qualitatif détectant la fraction C3d du complément qui s'est lié à un complexe antigène/anticorps dans les sérums testés. On utilise les mêmes billes que pour l'identification des DSA donc pour rappel chaque bille ne porte qu'un seul antigène HLA et on teste la classe I et la classe II séparément. A ces billes, on ajoute 1µL de billes « contrôle positif C3d » : c'est ce qui correspond au « mix » dans le protocole qui suit. Il y a une étape supplémentaire par

rapport au test SAB, c'est l'ajout de sérum négatif provenant de donneurs masculins jamais transfusés. Ce sérum correspond à une source de complément, et pendant une incubation de 30 minutes, la cascade du complément va pouvoir se déclencher à la condition impérative que l'anticorps fixé sur la bille soit capable d'initier cette cascade. Dans ce cas, la fraction C3d va se fixer sur la bille correspondante. Après trois lavages pour éliminer les anticorps non fixés, on ajoute le conjugué, qui est ici une solution contenant un anticorps anti-C3d humain couplé à la phycoérythrine. Ce conjugué ne se fixera que sur les anticorps capables d'activer le complément, qui se sont déjà fixés aux billes à l'étape précédente. Une nouvelle incubation de trente minutes puis 3 lavages successifs sont de nouveau nécessaires, puis chaque échantillon dans chaque puits est remis en suspension pour analyse dans le Luminex LABScan 200 flow analyzer. Il s'agit d'un cymomètre de flux à double détection qui trie et analyse chaque population de bille correspondant à un antigène HLA donné et détermine la quantité de C3d fixée sur chaque bille en mesurant l'intensité de la phycoérythrine. Pour qu'un échantillon soit interprétable, il faut que le cymomètre détecte au moins 40 événements pour chaque type de bille et que les témoins positifs et négatifs soient conformes aux profils attendus par le fournisseur.

Pour le test C3d, les 112 patients ont été passés sur deux séries différentes pour la classe 1 et deux autres séries pour la classe 2, par la même personne et sur trois jours consécutifs et sur le même lot. Pour des raisons techniques comme le temps de dépôt de chaque échantillon, la photosensibilité des billes et du conjugué, ainsi que la relative longueur de lecture sur le Luminex, il n'est pas possible de passer les 112 patients sur la même série.

C3d

Décongeler à T°C Ambiante et à l'abri de la lumière les billes LSA#B, les billes de témoin positif C3dPCB, le sérum complétement C3dCS, et le conjugué C3dCJ puis conserver dans la glace

Mettre tampon de lavage LSAWD entre 20-24°C

Pré-humidifier les puits avec 100 à 300 µl H2O_d / puits Aspirer après 2-5 min *

Ajouter 40µL du **Mix** billes C3dPCB + billes LSA#B / puits

Ajouter 10 µL de **sérum** patients ou contrôles et mélanger

Incubation 30 min à 20-24°C
À l'abri de la lumière sur plateforme rotative

Ajouter 30 µL de **C3dCS** / puits

Incubation 30 min à 20-24°C
À l'abri de la lumière sur plateforme rotative

Laver 1x avec 100µL et 3x avec 250 µL de Tampon *

Ajouter 50µL de conjugué **par** Puits

↳ prêt à l'emploi

Incubation 30 min à 20-24°C
À l'abri de la lumière sur plateforme rotative

Laver 1x avec 100µL et 1x avec 250 µL de Tampon *

Ajouter 200µL de Tampon / Puits

Lecture sur Luminex

Mettre un film sur les puits non utilisés

Mix :

Centrifuger puis Vortexer les billes LSA#B ~ 1min
Nouveau tube: 1µL de C3dPCB + 40µL LSA#B / puits.
Remettre les billes non utilisées à ≤ -65°C

Vortexer puis Centrifuger les sérums, contrôles LSAPC et LSANC avant utilisation 30s à 10 000 g
Remettre les sérums contrôles non utilisés entre 2-8°C

Recouvrir la plaque de papier aluminium

Remettre le C3dCS non utilisés à -65°C
(4 décongélations max)

Centrifuger le conjugué C3dCJ ~ 30s à 600-800g
Remettre le C3dCJ non utilisés à -65°C
(6 décongélations max)

Utiliser de nouveaux embouts et bien remettre en suspension les billes
Remettre le tampon non utilisé entre 2-8°C

référence de la notice technique:
LC1495CEFR REV B (23/03217)
MAJ pl 05/03/18

* Surveiller la pression et essuyer le dessous de la plaque

Figure 20 : Protocole technique du test C3d, Immucor LIFECODES C3d Detection

Les résultats sont rendus selon trois critères :

- La Background Adjusted MFI ou MFI ajustée au bruit de fond = MFI brute de l'échantillon – MFI du sérum du témoin négatif de la même bille.
- BCR-Neg : MFI ajustée au bruit de fond de l'antigène / valeur brute de la MFI de la bille la plus faible du même locus

- La force relative R-Strength = MFI ajustée au bruit de fond de l'antigène / valeur brute de la MFI de l'antigène pour le sérum témoin négatif

Il faut que l'échantillon présente au moins deux critères positifs sur les trois suivants pour que le test C3d soit considéré comme positif, d'après les recommandations du fournisseur.

- Background Adjusted MFI (Bg Adj) > 1500
- R-Strength > 4
- BCR-Neg > 4

Dans les résultats nous utilisons la notion de DSA "immunodominant"; cela signifie que si un patient dans la cohorte a plusieurs DSA, on prend en compte le DSA dont la MFI est la plus élevée. Dans ce cas, le paramètre étudié est précédé d'un « i » dans les tableaux. Nous utilisons aussi la notion de somme ; dans ce cas on additionne les valeurs du paramètre étudié pour tous les DSA d'un même patient. Le paramètre est alors précédé d'un « s » dans les tableaux.

Concernant les résultats de la biopsie, nous avons utilisé cette dernière version de la classification de Banff pour constituer les groupes « absence de rejet », « rejet actif infra-clinique », et « rejet chronique actif infra-clinique » au moment de la biopsie.

2.3 Analyses statistiques

Les résultats obtenus ont été analysés statistiquement avec le logiciel R. Les résultats sont donnés sous la forme « moyenne +/- écart-type ». On a utilisé des modèles de régression linéaire pour les analyses uni et multi-variées, des tests de comparaison de moyenne (test de Student), des tests de comparaison de proportions (test exact de Fisher). Sont considérés comme significatifs les résultats donnant une p-value < 0.05 %. Seuls les résultats significatifs en analyse univariée seront repris pour les analyses multi-variées. Les courbes de survie ont été obtenues par la fonction de survie de Kaplan Meier, et un test de Log Rank a été effectué pour comparer les courbes.

3 CHAPITRE III – Résultats

3.1 Analyses descriptives

Critères	Rejet actif infra-clinique	Rejet chronique actif infra-clinique	Absence de rejet
Age à la biopsie (années)	45,1 +/-5,3	53,2 +/- 6,9	51,5+/- 3
Délai greffe-biopsie (mois)	69,4 +/- 24,1	99,8 +/-33,4	84,3+/-17,4
Délai DSA+ et biopsie (mois)	9,6 +/-5,8	14,5+/-7,1	14,3+/-6,6
MDRD à la biopsie	60,8 +/- 7,2	48,3+/- 7,2	54,3 +/- 4,6
MDRD M12	49,4 +/- 5,5	44,5 +/- 5,6	53,9 +/- 4,6
MDRD FIN	36,4 +/- 8,4	33,9 +/- 9,8	50,5 +/-5,7
MFI iDSA	8296,9 +/- 1471,8	5643,9 +/-1583,7	5640,1+/-1044,8
MFI sDSA	10951,9 +/- 2150,9	7320,9 +/- 2604,7	6535,8 +/- 1267,8
iBG Adj	3167,7+/-2459,1	2771,6+/-2705,2	3168,5+/-1596,4
iBCR neg	93,8+/- 71,4	142,5+/-155,9	77,0+/-41,8
iR-strength	92,6+/- 74	92,1+/- 98,3	72,2+/- 39,5
sBG AdjDSA C3d+	3186,8+/- 2465,8	2701,4+/- 2721,7	3455,8+/- 1737,4
sBCR Neg DSA C3d+	96,1+/- 71,7	141+/- 156,3	81,8+/- 43,8
sR-strength DSA C3d+	92,9+/- 74	91,2+/- 98,6	79,4+/- 42,6
Nombre de patients	31	19	62

Tableau 3 : Caractéristiques des patients selon les groupes « rejet actif infra-clinique », « chronique actif infra-clinique » ou « absence de rejet »

Au moment de la biopsie les patients du groupe « rejet actif infra-clinique » sont plus jeunes que ceux des groupes « rejet chronique actif infra-clinique » et « absence de rejet ». Le délai entre la greffe et la biopsie et donc l'apparition du DSA est plus court que dans les autres groupes. Le MDRD au moment de la biopsie est le plus élevé des trois groupes, mais il est aussi le plus faible à la fin de l'étude ; la baisse de la fonction rénale dans ce groupe est donc la plus rapide, du moins sur la durée de cette étude ; le suivi le plus long est de 5 ans après la première biopsie pour la majorité des patients. Concernant les anticorps, la MFI du DSA immunodominant, ainsi que la somme des MFI des DSA des patients est plus élevée dans le

groupe « rejet actif infra-clinique » que dans le groupe « rejet chronique actif infra-clinique » ou « absence de rejet », de même que la somme des MFI des DSA propre à chaque patient. En revanche, concernant les données liées au test C3d (BG Adj, BCR Neg, R-Strength), on ne met pas en évidence de différence notable entre les trois groupes, que ce soit pour le DSA immunodominant ou pour la somme des DSA : la force relative (R-Strength) semble légèrement supérieure dans les groupes « rejet actif infra-clinique » et « rejet chronique infra-clinique » que dans le groupe « absence de rejet » pour le DSA immunodominant. Mais cette différence ne se retrouve pas sur les autres paramètres du test C3d : le BG Adj est équivalent dans le groupe « absence de rejet » et « rejet actif », et les deux sont supérieurs au groupe « rejet chronique actif ». Pour le critère du BCR Neg, c'est cette fois dans le groupe « rejet chronique actif » qu'il semble le plus élevé.

Variables	Hazard Ratio	95% IC	p-value
Sexe du receveur (masculin)	0,485	0,40-0,57	0,102
Âge du receveur	0,96	0,95-0,96	0,0161
MDRD au moment de la biopsie (ml/min per 1.73m2)	1,023	1,021-1,025	0,044
MFI iDSA > 3000	13	13,2-13,6	0,013
MFI sDSA > 6000	6,83	6,73-6,93	0,0003
iBGAdj	1	0,99-1	0,94
iBCRNeg	1	1,0-1,0	0,974
iRstrength	1	0,99-1	0,673
sBGAdj DSA C3d+	0,99	0,99-1	0,947
sBCRNeg DSA C3d+	1	1,0-1,0	0,994
sRstrength DSA C3d+	1	1,0-1,0	0,78
C3d+ oui	1,37	1,29-1,45	0,45
Ciclosporine	0,46	0,38-0,54	0,07
Tacrolimus	0,83	0,74-0,92	0,71
Corticoïdes	0,54	0,46-0,62	0,15
Everolimus	9,49	9,3-9,6	0,008

Tableau 4 : Facteurs prédictifs associés au rejet humoral infra-clinique ; Analyse univariée de l'impact des variables sur le rejet actif infra-clinique

Les résultats de l'analyse univariée de l'impact des variables sur le rejet actif retrouvent d'une part l'âge du receveur, le MDRD au moment de la biospie, la MFI du DSA immunodominant au

moment de la biopsie, la MFI de la somme des DSA au moment de la biopsie comme des facteurs prédictifs associés au rejet actif infra-clinique. D'autre part, les traitements immunosuppresseurs sont des facteurs prédictifs indépendant de rejet actif infra-clinique, notamment le traitement par éverolimus, ciclosporine et corticoïdes. Dans cette première analyse, nous mettons en évidence l'absence de significativité des paramètres liés au test C3d. En prenant en compte les critères de positivité du test C3d, on trouve un hazard ratio à 1,37 mais une p-value non significative à 0,45.

Variables	HR_multivarie	pvalue_multivarie	IC 95%
Age à la biopsie	0,95	0,013	0,949-0,956
MDRD à la biopsie	1,014	0,326	1,017-1,011
MFI iDSA>3000	12,69	0,018	12,49-12,89
Ciclosporine	0,952	0,925	0,856-1,049
Everolimus	20,1	0,010	19,88-20,31
Corticoïdes	0,562	0,25	0,469-0,655

Tableau 5 : Facteurs prédictifs associés au rejet humoral infra-clinique ; Modèle 1 - Analyse multivariée de l'impact des variables sur le rejet actif infra-clinique avec MFI iDSA

Dans le premier modèle d'analyse multivariée, qui intègre la MFI du DSA immunodominant, l'âge au moment de la biopsie, la MFI du DSA immunodominant et le traitement par éverolimus sont des facteurs prédictifs indépendant de rejet actif infra-clinique. La variable « MFI iDSA supérieure à 3000 » donne un hazard ratio proche de 12,7 avec une p-value égale à 0,018. Le fait d'avoir un DSA immunodominant avec une MFI supérieure à 3000 multiplie par 12,7 le risque de rejet actif. Le seuil de 3000 a été choisi grâce à une courbe ROC qui a permis d'établir le meilleur seuil de sensibilité et spécificité.

Variables	HR_multivarie	pvalue_multivarie	IC 95%
Age à la biopsie	0,958	0,041	0,954- 0,961
MDRD à la biopsie	1,022	0,179	1,024-1,019
MFI sDSA>6000	9,407	0,0004	9,289-9,524
Ciclosporine	1,127	0,828	1,025-1,229
Everolimus	33,4	0,01	33,145-33,649
Corticoïdes	0,363	0,056	0,265-0,462

Tableau 6 : Facteurs prédictifs associés au rejet humoral ; Modèle 2- Analyse multivariée de l'impact des variables sur le rejet actif avec MFI sDSA

Dans le deuxième modèle d'analyse multivariée, qui intègre cette fois la somme des MFI des DSA, l'âge au moment de la biopsie, la somme de la MFI des DSA et le traitement par everolimus sont des facteurs prédictifs indépendant de rejet actif infra-clinique. La somme des MFI des DSA supérieure à 6000 donne un hazard ratio égal à 9,4 avec une p-value égale à 0,0004. Le fait d'avoir une somme de MFI des DSA supérieure à 6000 multiplie par 9,4 le risque de rejet actif. Le seuil de 6000 a été choisi grâce à une courbe ROC qui a permis d'établir le meilleur seuil de sensibilité et spécificité.

3.2 Résultats du test C3d

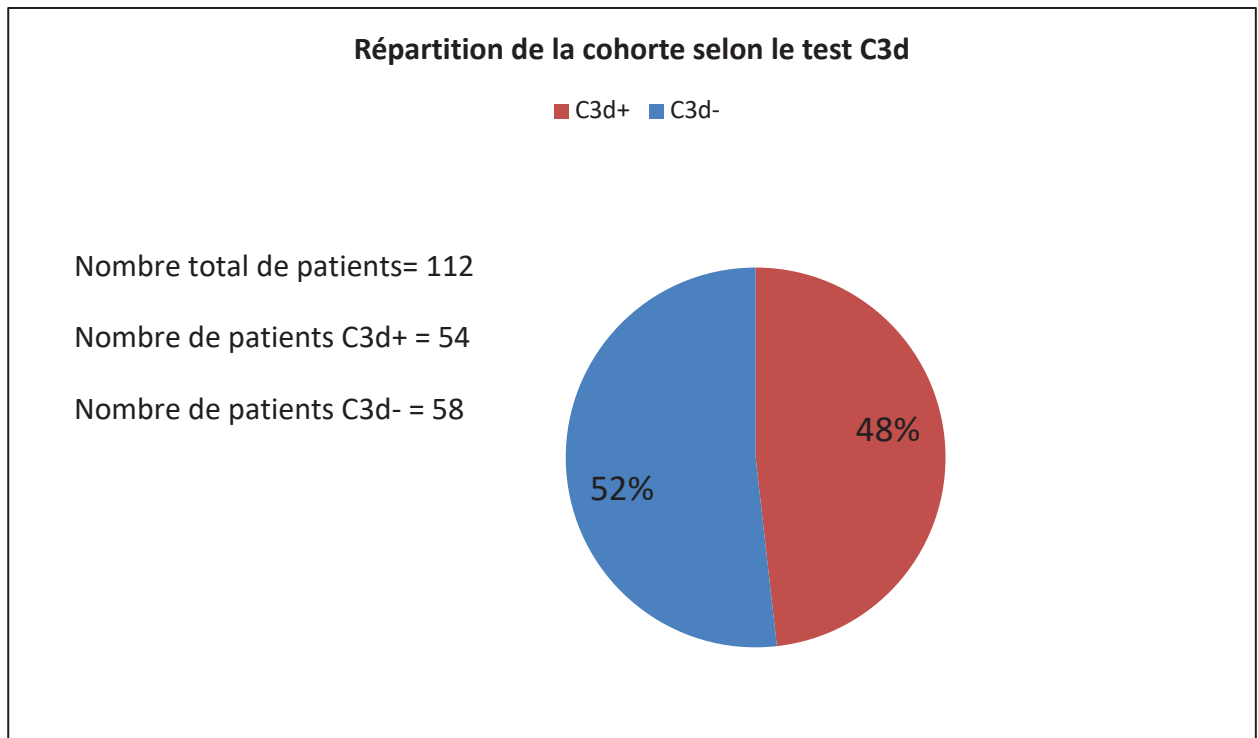
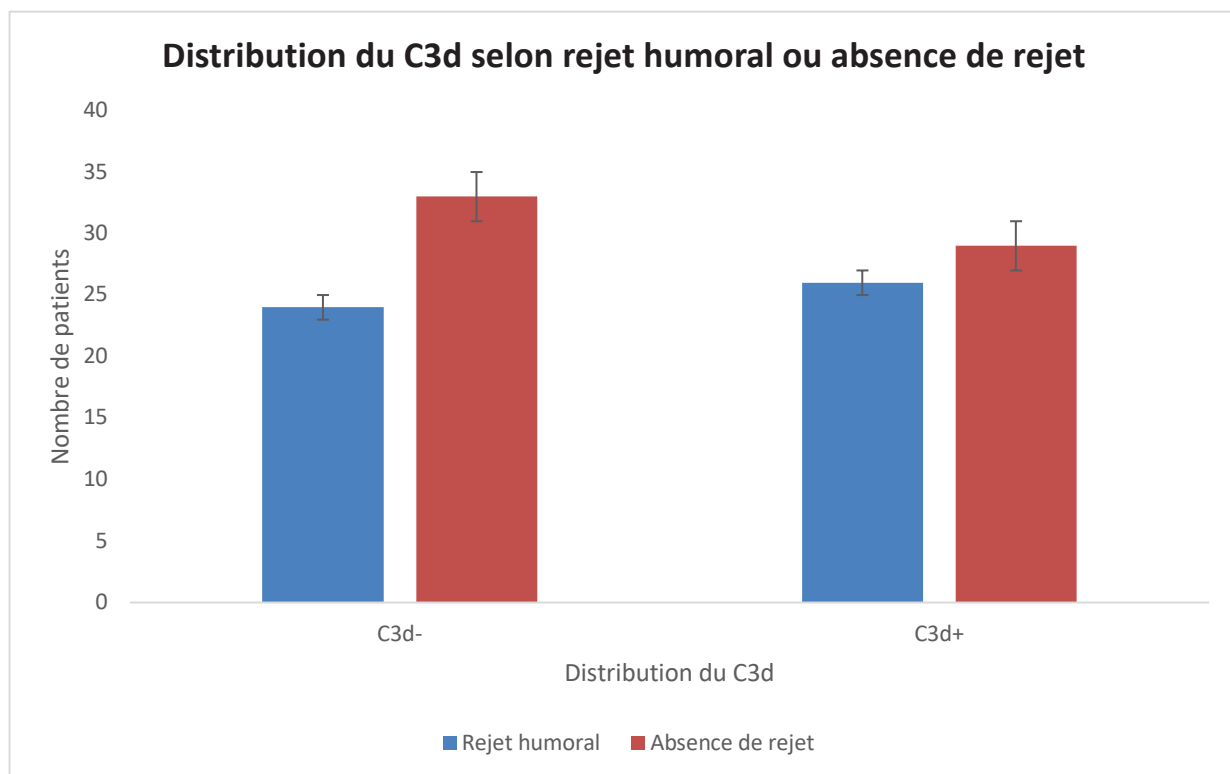


Figure 21: Répartition de la cohorte de patients selon leur statut C3d

54 soit 48% des patients remplissent les critères de positivité du test C3d. A partir de ces données nous allons créer les deux groupes suivants : patients C3d+ et patients C3d-. Ce sont ces deux groupes que nous allons comparer selon plusieurs variables dans l'étude statistique qui suit.



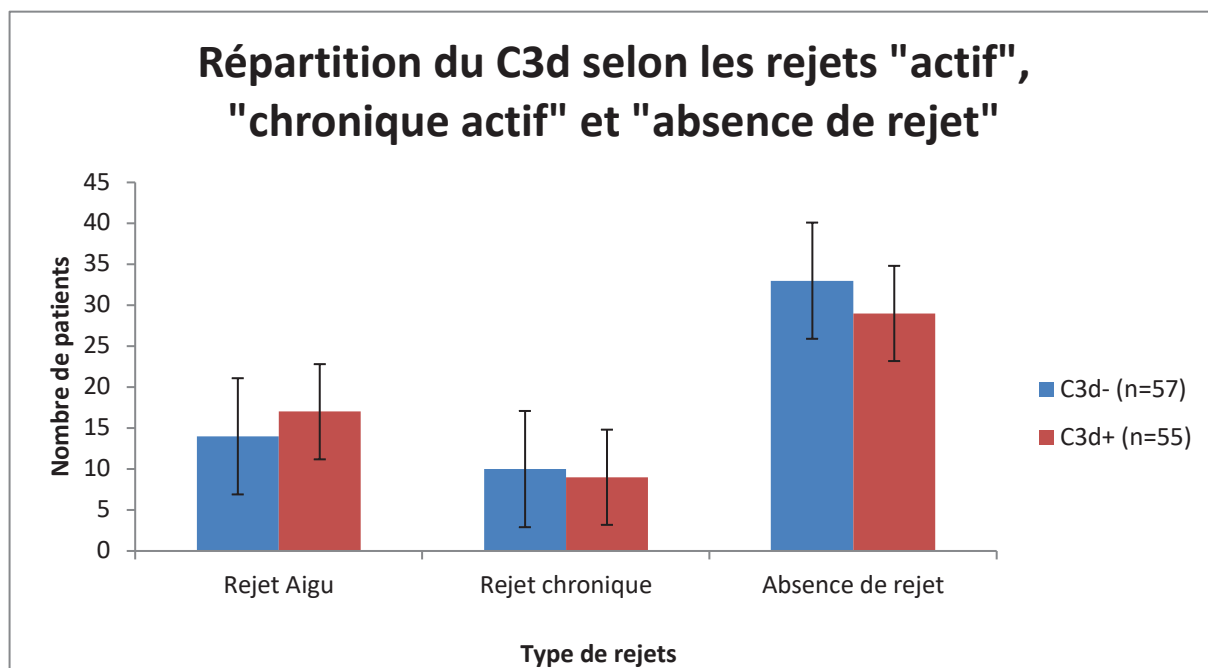
Type de rejet	Nombre de patients C3d-	Nombre de patients C3d+
Rejet humoral infra-clinique	24 soit 42,1%	26 soit 47,3%
Absence de rejet	33 soit 57,9%	29 soit 52,7%

Figure 22: Distribution du C3d selon les groupes « rejet humoral infra-clinique » et « absence de rejet »

Il n'y a pas de différence significative entre la proportion de patients C3d+ et C3d- au sein du groupe rejet humoral ($p=0,373$).

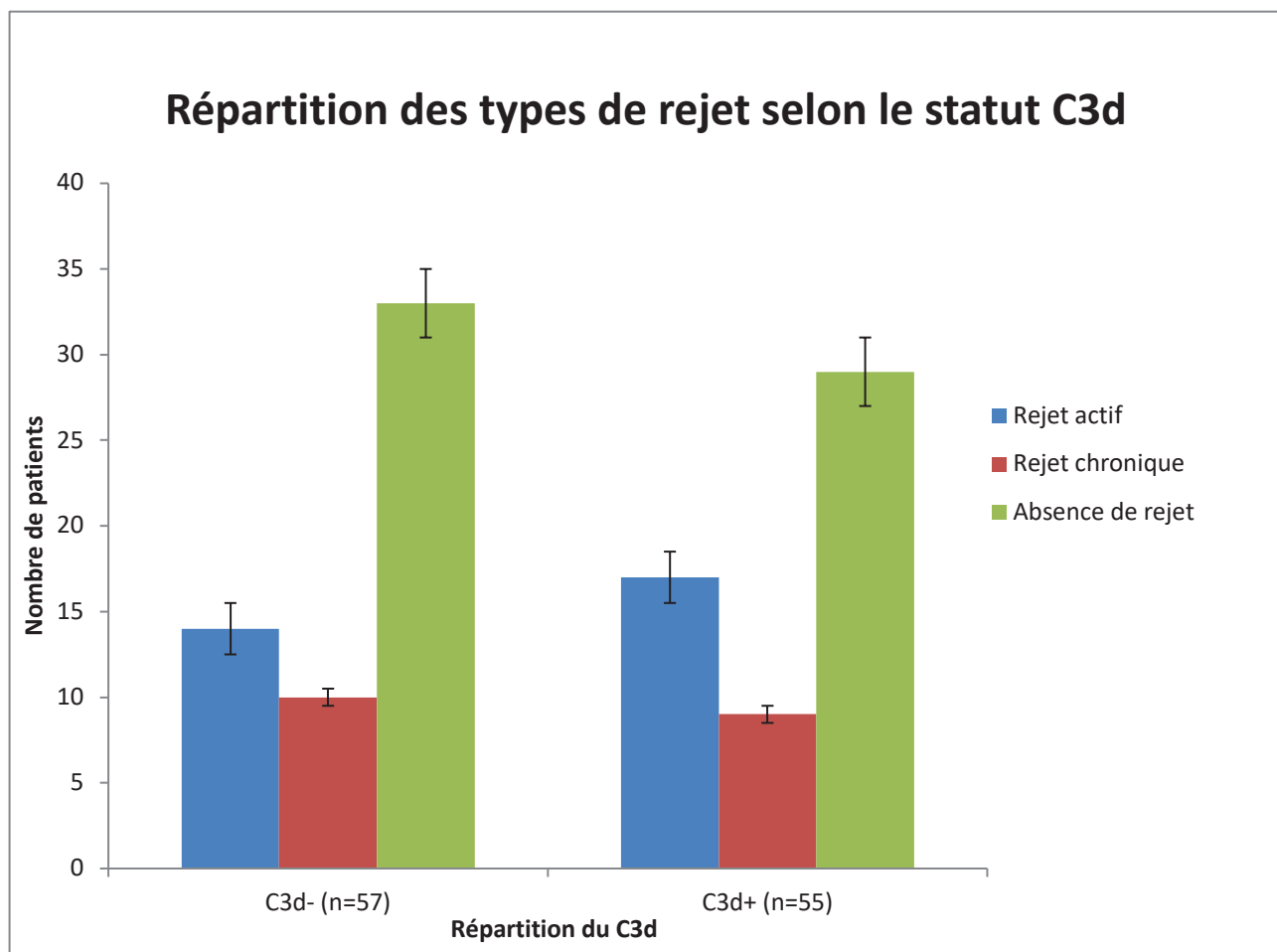
Il n'y a pas de différence significative entre les patients présentant un rejet humoral et les patients ne présentant pas de rejet humoral au sein du groupe de patients C3d+ ($p=0,365$).

Afin d'affiner ces observations, nous avons distingué le rejet actif du rejet chronique actif, toujours sur les critères histologiques de la biopsie.



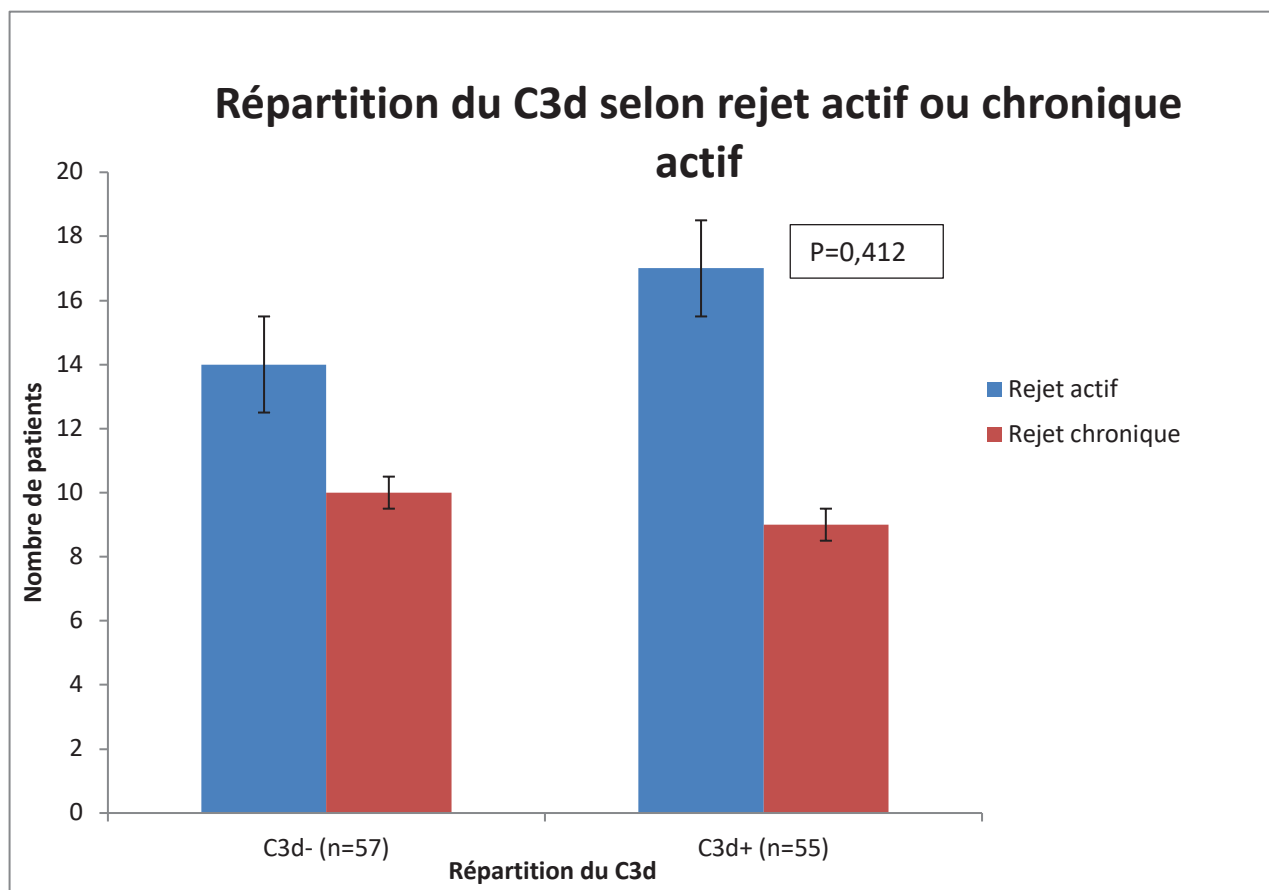
Nombre de patients	Rejet actif infra-clinique	Rejet chronique actif infra-clinique	Absence de rejet	Total
C3d-	14	10	33	57
C3d+	17	9	29	55

Figure 23: Répartition du C3d selon les groupes « rejet actif », « rejet chronique actif » et « absence de rejet »



Type de rejet	Nombre de patients C3d- (n=57)	Nombre de patients C3d+ (n=55)	TOTAL
Rejet actif infra-clinique	14	17	31
Rejet chronique infra-clinique	10	9	19
Absence de rejet	33	29	62

Figure 24: Répartition des types de rejet « actif infra-clinique », « chronique infra-clinique » et « absence de rejet » selon les groupes « C3d+ » et « C3d- »



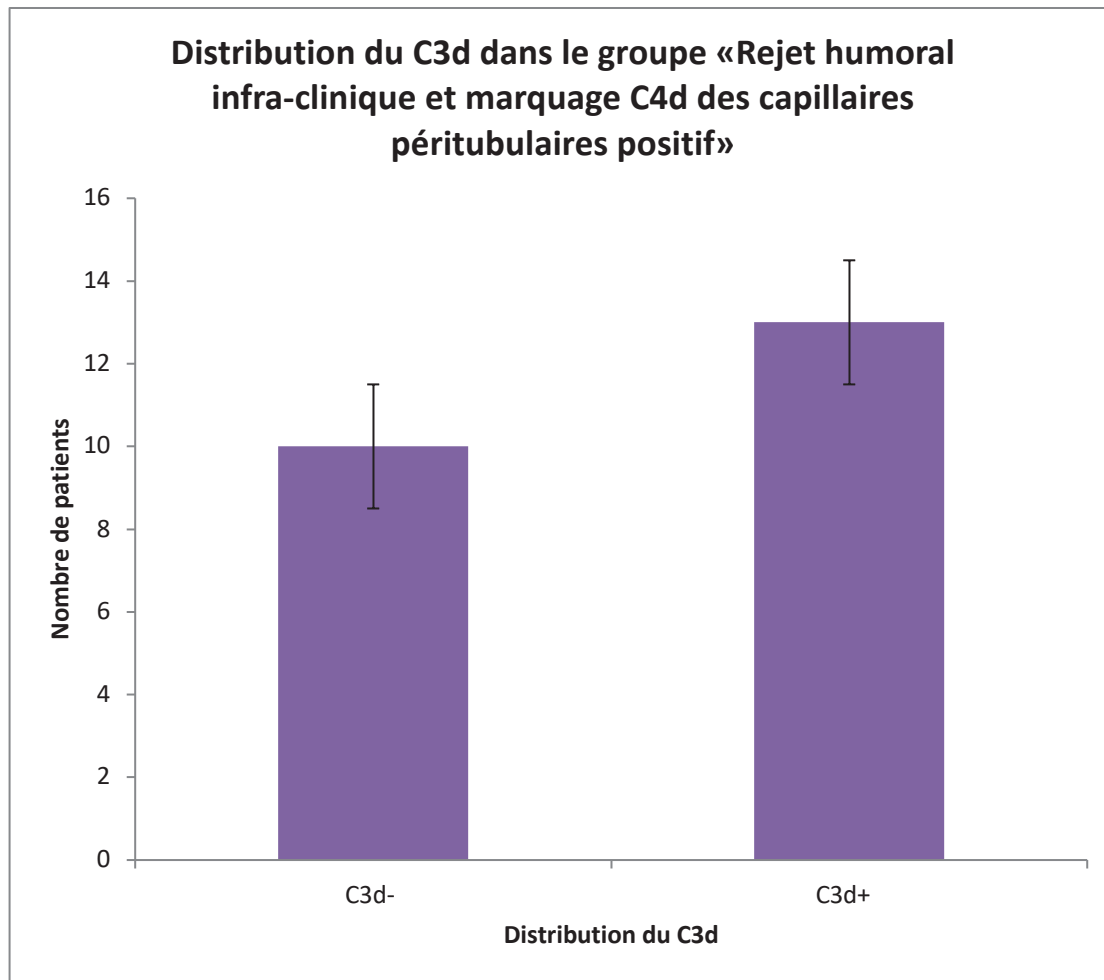
Type de rejet	Nombre de patients C3d-	Nombre de patients C3d+	TOTAL
Rejet actif infra-clinique	14	17	31
Rejet chronique actif infra-clinique	10	9	19

Figure 25: Répartition du C3d selon les groupes « rejet actif » ou « rejet chronique actif »

On ne retrouve pas plus de rejet actif chez les patients avec un test C3d positif que chez les patients avec un test C3d négatif ($p=0,375$).

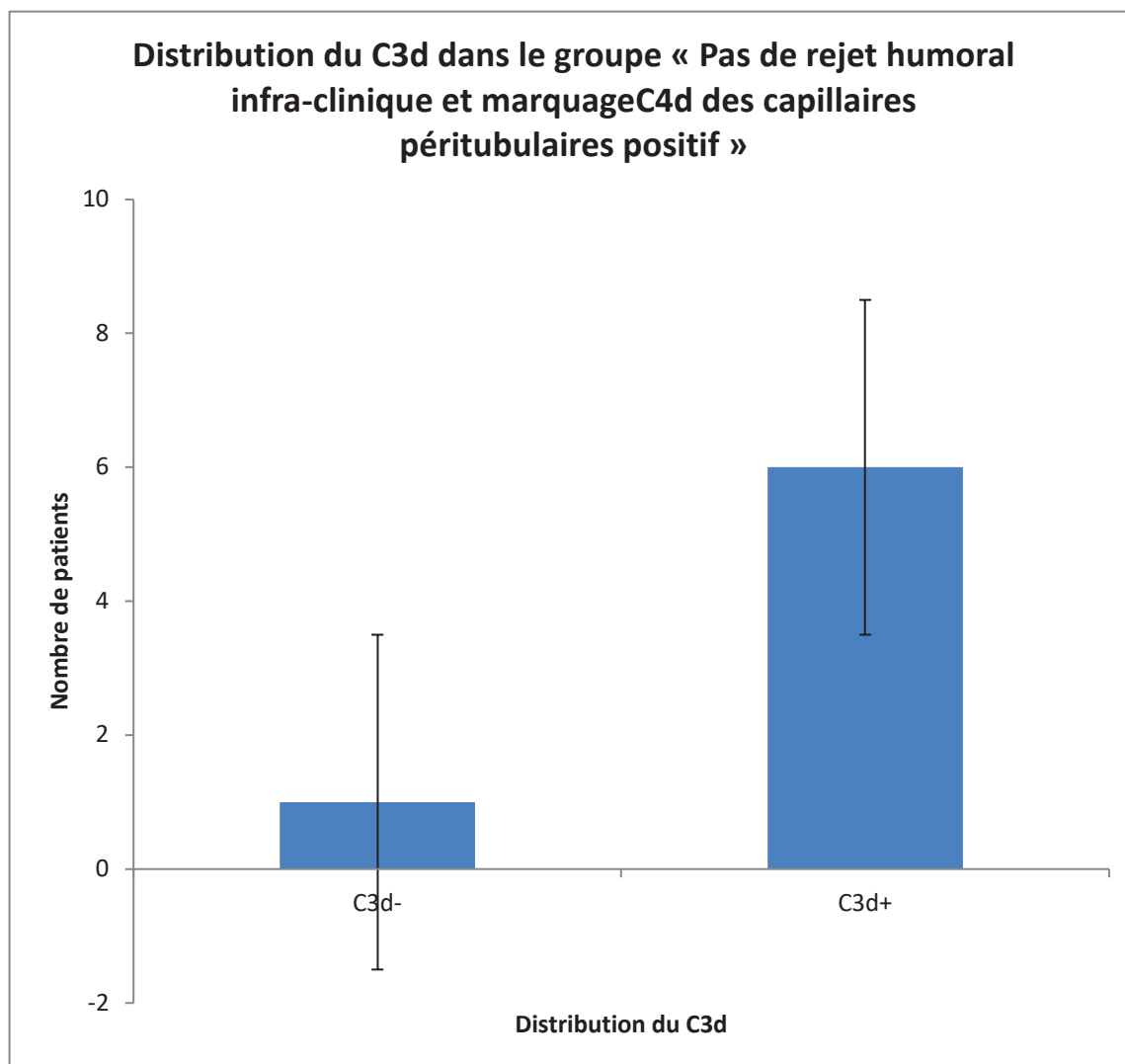
Il n'y a pas significativement plus de rejets actifs que chroniques actifs chez les patients avec un test C3d positif ($p\text{-value} = 0.4121$).

3.3 Rejet médié par les anticorps et histologie



	C3d-	C3d+
C4d IF + Paraffine n=14	10	13

Figure 26: Distribution du C3d dans le groupe présentant un rejet humoral infra-clinique à la biopsie et ayant un marquage C4d des capillaires péritubulaires positif

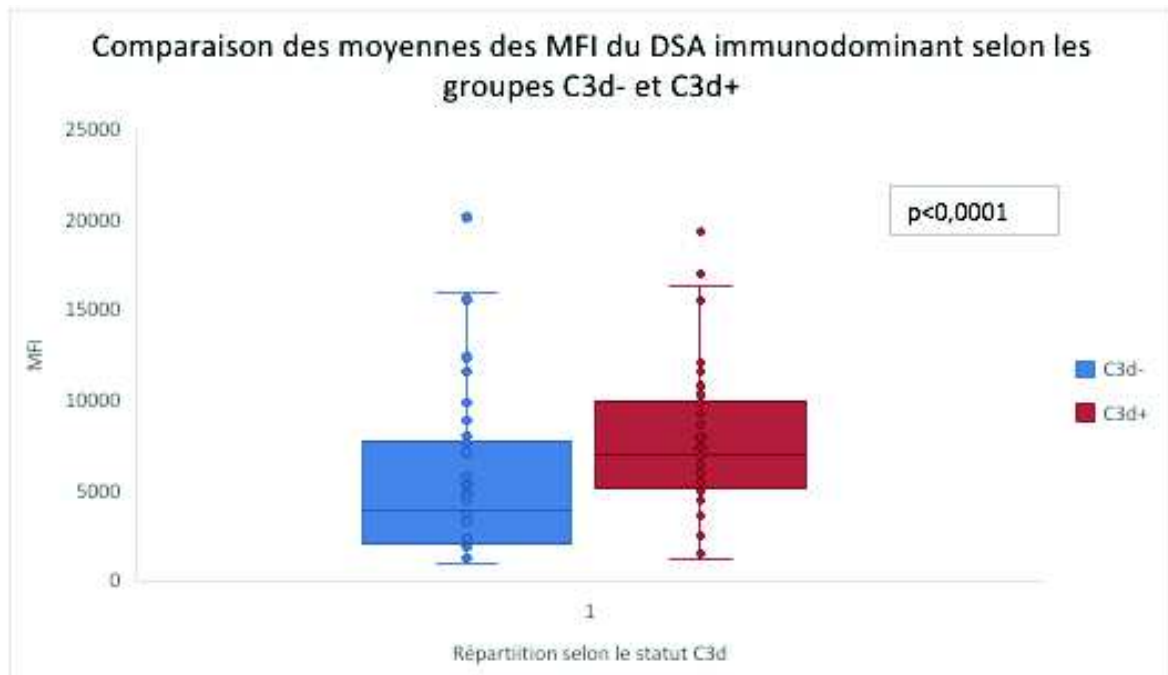


	C3d-	C3d+
C4d IF+ Paraffine	1	6

Figure 27: Distribution du C3d dans le groupe ne présentant pas de rejet humoral infra-clinique à la biopsie mais ayant un marquage C4d des capillaires péritubulaires positifs

Les résultats de l’histologie suggèrent qu’il y aurait proportionnellement plus de patients avec un test C3d positif (6 patients) que négatif (1 patient) dans le groupe sans rejet humoral par rapport au groupe avec rejet humoral, groupe dans lequel la distribution du C3d est équilibrée (13 patients C3d+ contre 10 patients C3d-).

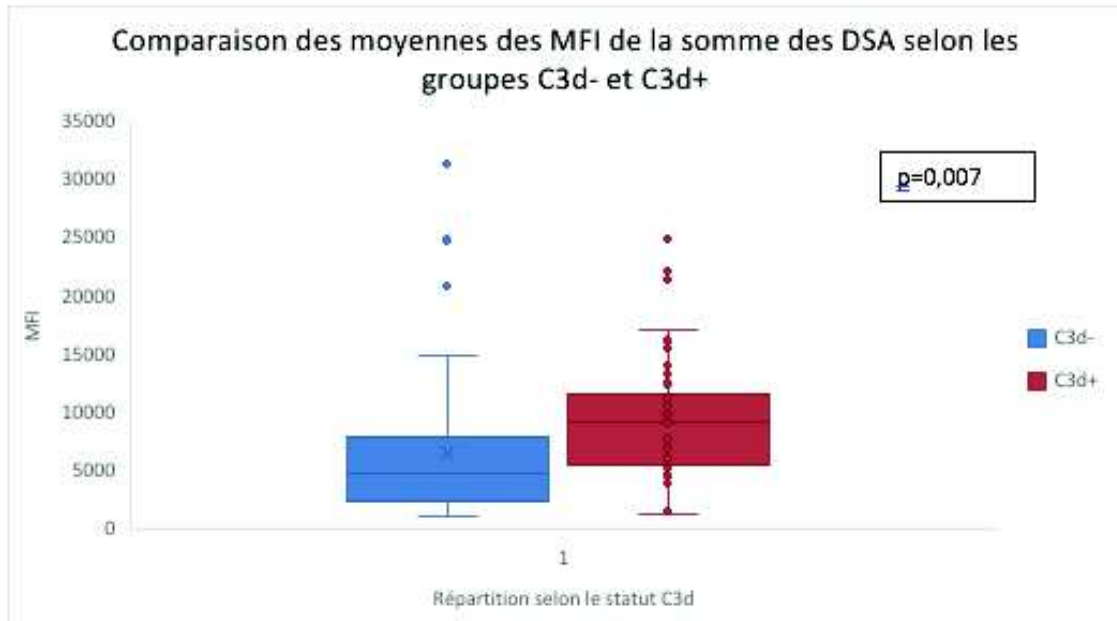
3.4 Test C3d et détection des DSA



Moyenne iDSA C3d- (n=57)	Moyenne iDSA C3d+ (n=55)
5154,1	7642,5

Figure 28: Comparaison des moyennes des MFI du DSA immunodominant selon les groupes C3d- et C3d+

La moyenne des MFI du DSA immunodominant est significativement supérieure dans le groupe C3d+ que dans le groupe C3d- ($p < 0.0001$)



Moyenne sDSA C3d- (n=57)	Moyenne sDSA C3d+ (n=55)
6462,2	9372,4

Figure 29: Comparaison des moyennes des MFI de la somme des DSA selon les groupes C3d- et C3d+

La moyenne de la somme des MFI des DSA est significativement supérieure dans le groupe C3d+ que dans le groupe C3d- ($p=0.007$).

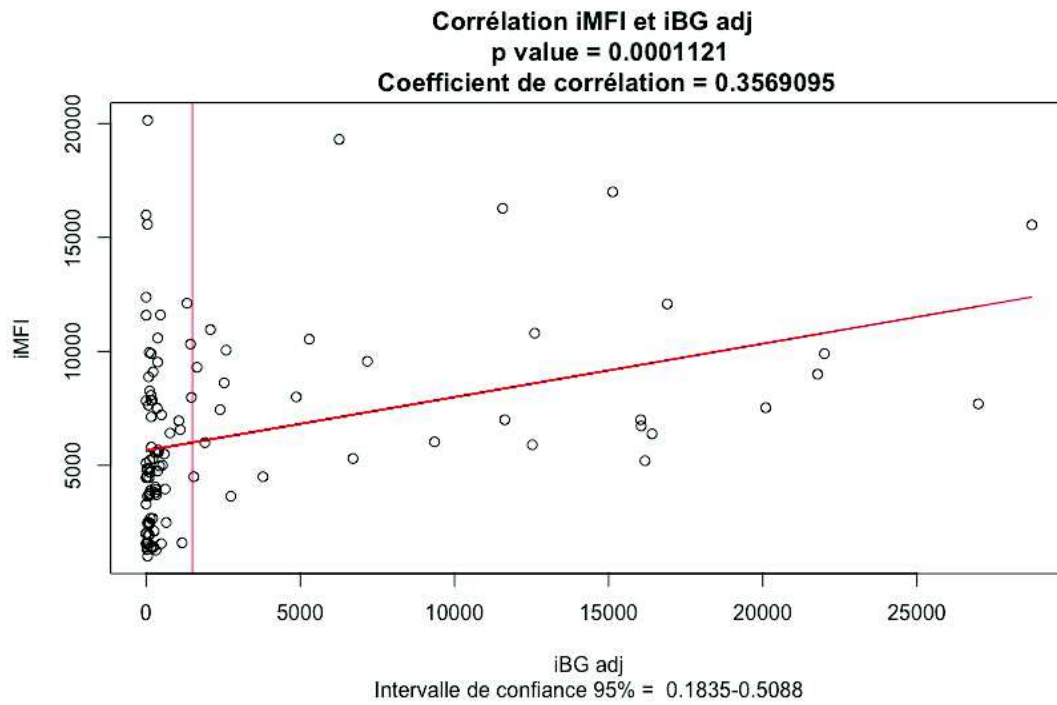


Figure 30: Corrélation entre la MFI du DSA immunodominant (iMFI) et iBG-Adj (MFI ajustée au bruit de fond du DSA immunodominant)

La positivité du test C3d est significativement corrélée à la MFI du DSA immunodominant (p= 0,0001)

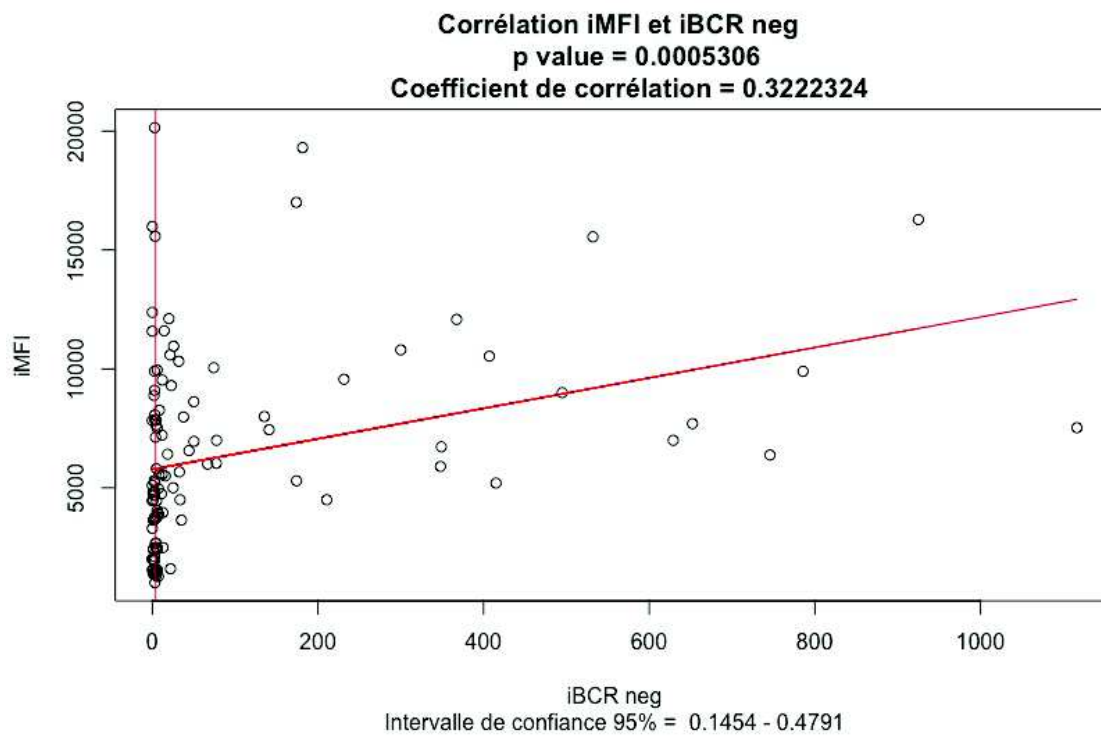
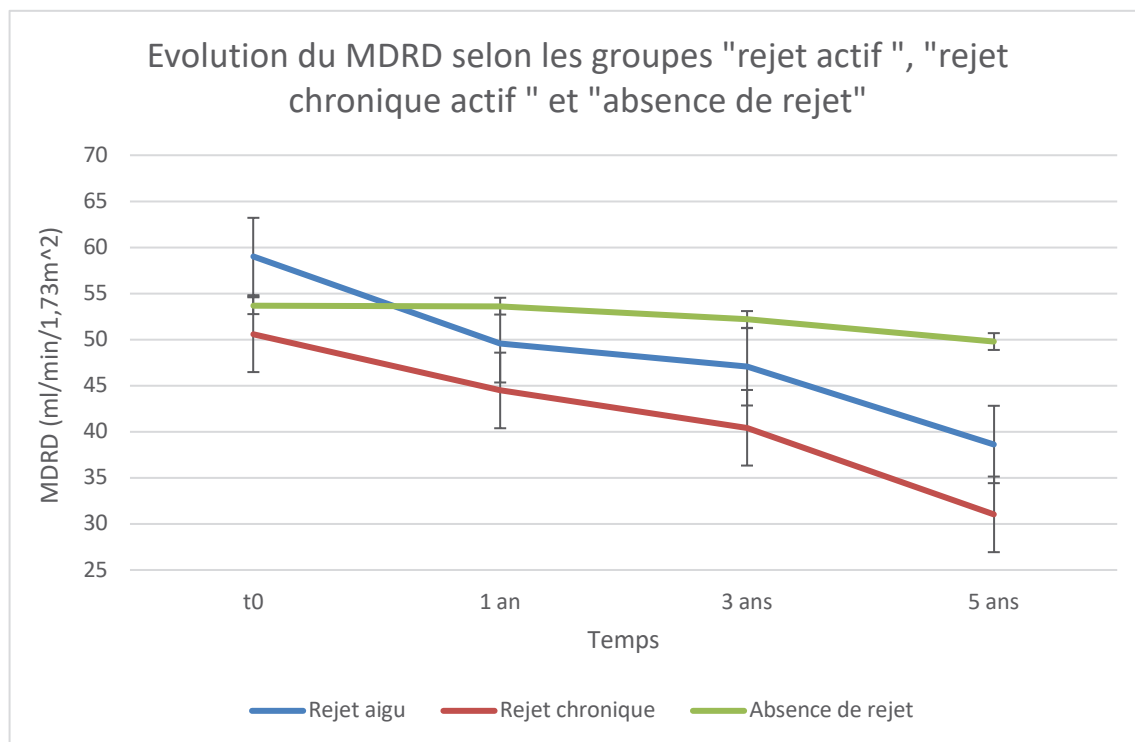


Figure 31: Corrélation entre la MFI du DSA immunodominant (iMFI) et iBCR-Neg

iBCR-Neg représente le rapport de la MFI ajustée au bruit de fond de l'antigène sur la valeur brute de la MFI de la bille la plus faible du même locus du DSA immunodominant, qui est l'un des critères de positivité du test C3d au même titre que BG-Adj. La positivité du test C3d est significativement corrélée à la MFI du DSA immunodominant ($p=0,0005$). Le coefficient de corrélation entre la MFI du DSA immunodominant et le BCR-Neg est de 0,32. Le coefficient de corrélation entre la MFI du DSA immunodominant et iBG-Adj est de 0,36. La corrélation n'est donc pas parfaite, mais ces valeurs sont surtout expliquées par les faibles valeurs de BCR Neg d'une part et les faibles valeurs de BG-Adj d'autre part, c'est-à-dire les valeurs pour lesquels les critères de positivité du test C3d ne sont pas atteints.

3.5 Fonction rénale et C3d

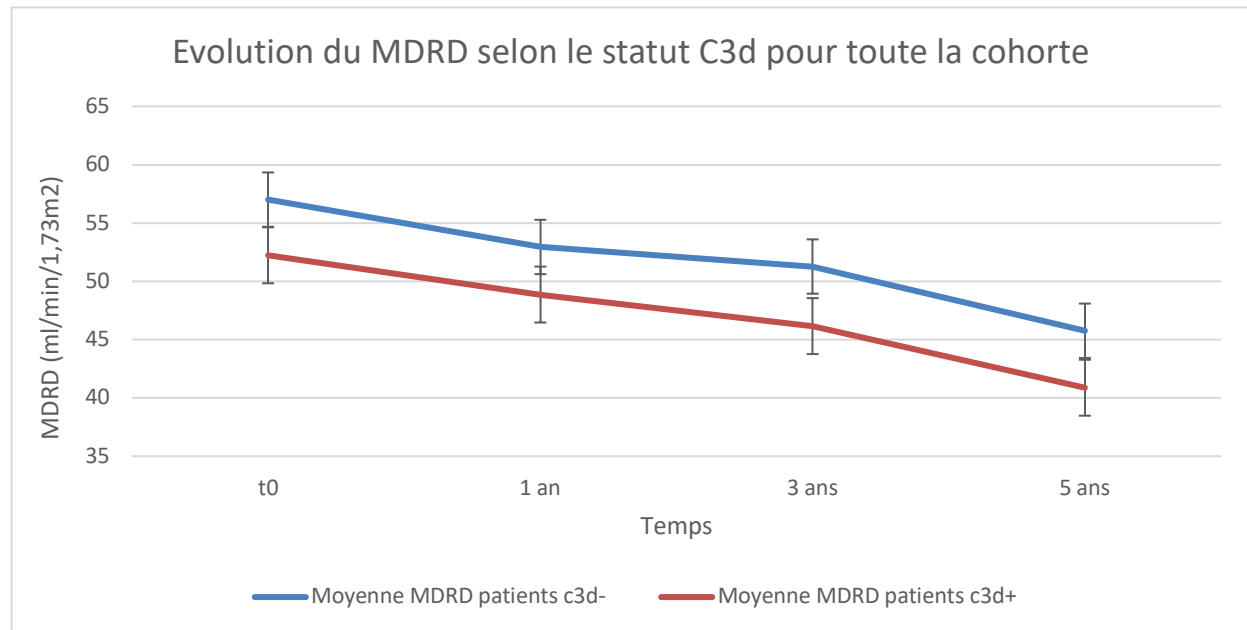


Valeurs	Moyenne MDRD t0	Moyenne MDRD 1 an	Moyenne MDRD 3 ans	Moyenne MDRD 5 ans
Rejet actif infra-clinique	59,0	49,5	47,0	38,6
Rejet chronique actif infra-clinique	50,6	44,5	40,4	31,0
Absence de rejet	53,7	53,6	52,2	49,8

Valeurs	Rejet actif infra-clinique	Rejet chronique actif infra-clinique	Absence de rejet
Nombre de patients t0	32	19	61
Nombre de patients 1 an	32	19	61
Nombre de patients 3 ans	30	17	55
Nombre de patients 5 ans	24	14	44

Figure 32: Évolution du MDRD selon les groupes « rejet actif infra-clinique », « rejet chronique actif infra-clinique », « absence de rejet » au moment de la découverte des DSA, à un an, à 3 ans puis à 5 ans

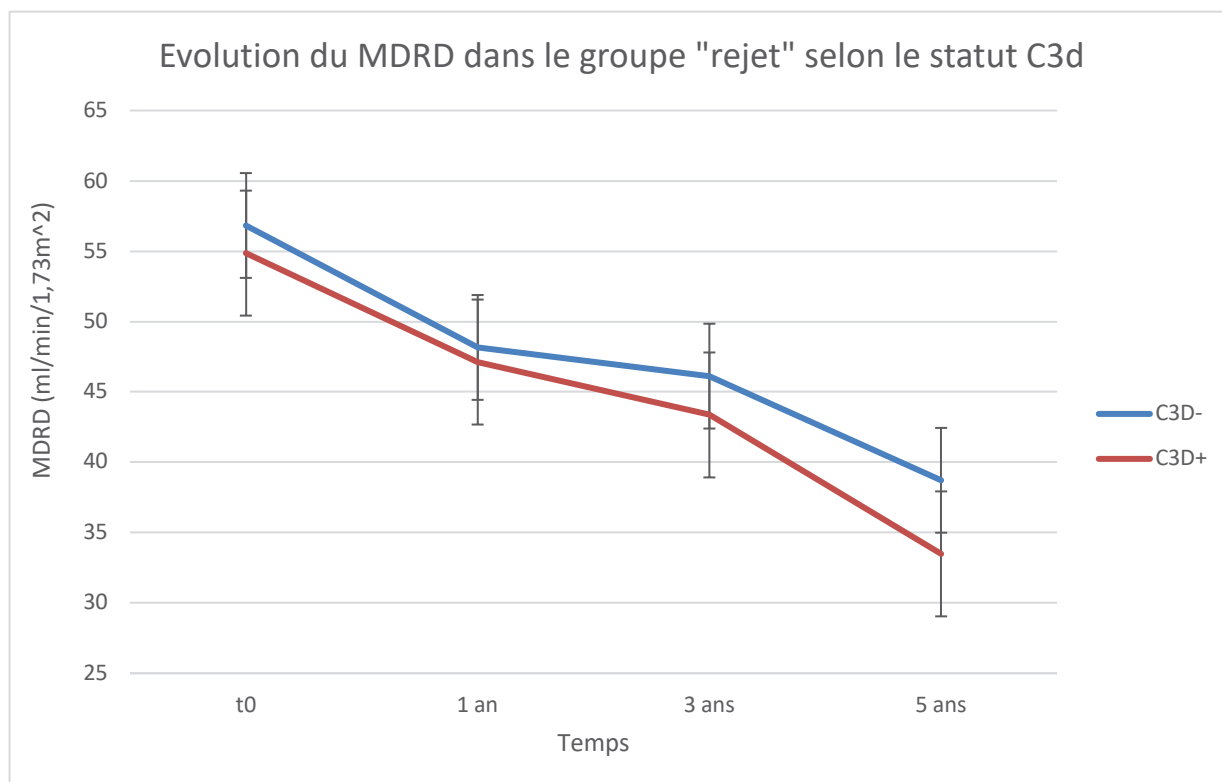
Quel que soit le statut C3d, les patients qui ne présentent pas de rejet humoral infra-clinique au moment de la biopsie ont la meilleure fonction rénale à 5 ans comparé aux groupes « rejet actif infra-clinique » et « rejet chronique actif infra-clinique ».



Temps	Moyenne MDRD patients C3d-	Moyenne MDRD patients C3d+	Nombre de patients C3d-	Nombre de patients C3d+
t0	57,0	52,2	57	55
1 an	52,9	48,9	57	55
3 ans	51,3	46,2	51	51
5 ans	45,8	40,9	41	41

Figure 33: Évolution du MDRD pour toute la cohorte selon les groupes « C3d+ » et « C3d- », au moment de la découverte des DSA, à un an, à 3 ans puis à 5 ans

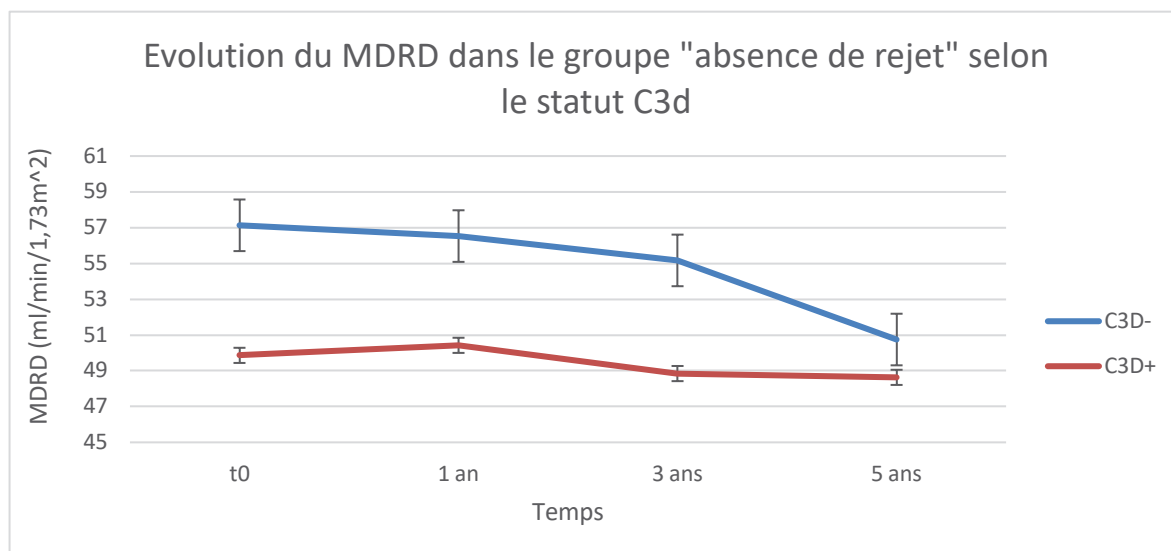
Concernant l'évolution du MDRD pour toute la cohorte, selon le statut C3d, on voit que la moyenne du MDRD des patients C3d- à 5 ans est de 45,8 ml/min+1,73m² contre 40,9 chez les patients C3d+. Bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative, elle montre quand même une moins bonne fonction rénale chez les patients C3d+ que chez les patients C3d-, quel que soit leur statut vis-à-vis du rejet au moment de la biopsie.



Temps	Moyenne MDRD patients	Moyenne MDRD patients	Nombre de patients C3d-	Nombre de patients C3d+
	C3d-	C3d+		
t0	56,8	54,9	24	26
1 an	48,2	47,1	24	26
3 ans	46,1	43,4	22	25
5 ans	38,7	33,5	17	21

Figure 34: Évolution du MDRD dans le groupe « rejet humoral infra-clinique » selon le statut C3d au moment de la découverte des DSA, à un an, à 3 ans puis à 5 ans

En se concentrant uniquement sur les patients présentant un rejet humoral infra-clinique au moment de la biopsie, on observe que le MDRD moyen dans le groupe C3d+ est encore une fois inférieur au MDRD moyen du groupe C3d- à 5 ans de la biopsie, mais cette différence n'est pas statistiquement significative.



Temps	Moyenne MDRD patients	Moyenne MDRD patients	Nombre de patients C3d-	Nombre de patients C3d+
	C3d-	C3d+		
t0	57,1	49,9	32	29
1 an	56,5	50,4	32	29
3 ans	55,2	48,8	29	26
5 ans	50,7	48,6	24	20

Figure 35: Évolution du MDRD dans le groupe « absence de rejet » selon le statut C3d au moment de la découverte des DSA, à un an, à 3 ans puis à 5 ans

L'évolution de la fonction rénale estimée par la valeur du MDRD n'est pas différente dans le groupe « absence de rejet », quel que soit le statut C3d.

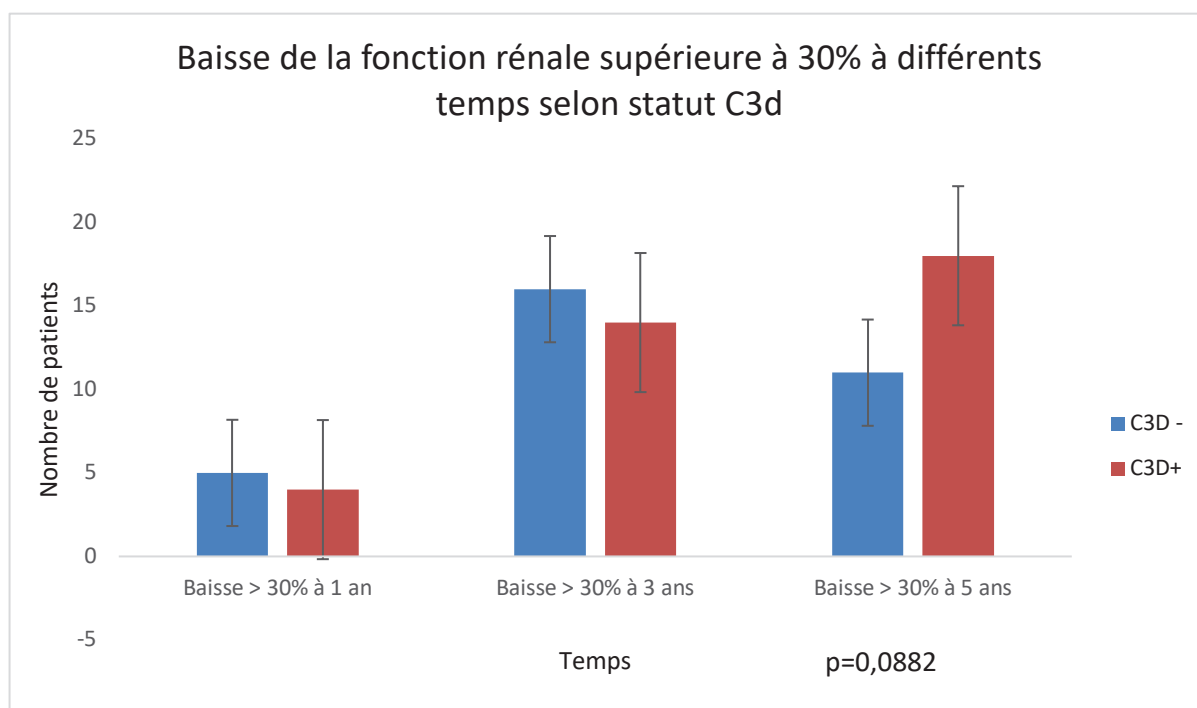


Figure 36: Comparaison à différents temps (1 an, 3 ans puis 5 ans après la biopsie) du nombre de patients avec une baisse de la fonction rénale supérieure à 30% par rapport au moment de la biopsie, selon les groupes « C3d+ » et « C3d- »

t= 1 an	C3d-	C3d+	Total
Nombre de patients avec baisse de la fonction rénale < 30%	51	51	102
Nombre de patients avec baisse de la fonction rénale > 30%	5	4	9

t= 3 ans	C3d-	C3d+	Total
Nombre de patients avec baisse de la fonction rénale < 30%	40	41	81
Nombre de patients avec baisse de la fonction rénale > 30%	16	14	30

t= 5 ans	C3d-	C3d+	Total
Nombre de patients avec baisse de la fonction rénale < 30%	30	23	53
Nombre de patients avec baisse de la fonction rénale > 30%	11	18	29

Si l'on s'intéresse aux résultats du déclin de la fonction rénale (fixée arbitrairement à une perte de 30% par rapport à la fonction rénale au moment de la découverte des DSA), quel que soit

le statut vis-à-vis du rejet au moment de la biopsie, on retrouve à 5 ans que parmi les patients ayant une baisse supérieure à 30% de leur fonction rénale initiale, 62% ont un test C3d positif au moment de la biopsie contre 28% qui ont un test C3d négatif au moment de la biopsie. Cette différence est presque significative, avec une p-value égale à 0,09, et elle suggère tout de même l'impact à long terme de la positivité du test C3d.

3.6 Fonctions de survie

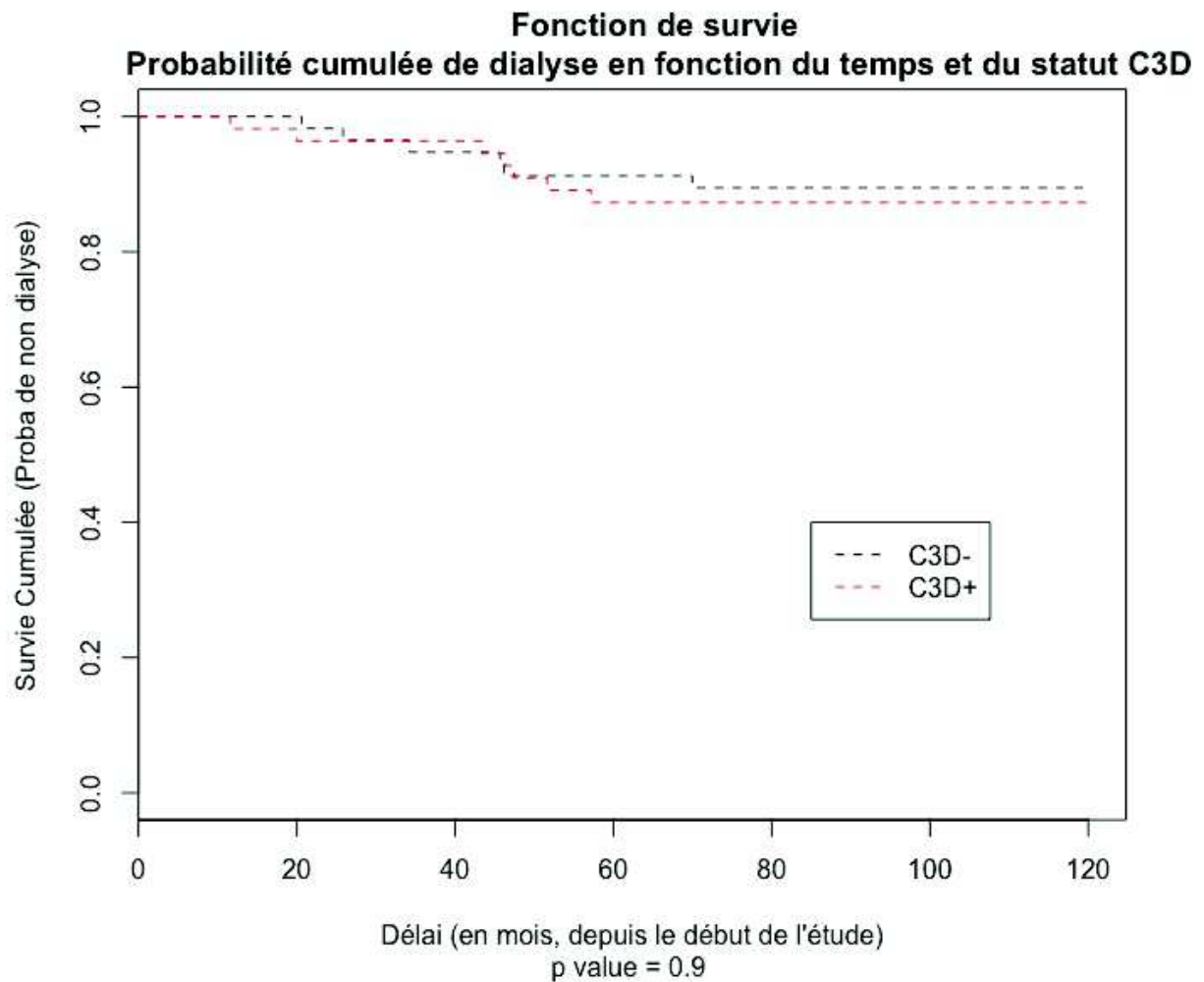


Figure 37: Probabilité cumulée de dialyse en fonction du temps et du statut C3d pour toute la cohorte

En prenant en compte tous les patients de la cohorte sans distinction vis-à-vis du rejet au moment de la biopsie, il n'y a pas de différence de survie cumulée entre les patients C3d+ et C3d-. La probabilité de non dialyse est d'environ 85% quel que soit le statut C3d à 120 mois de la première biopsie.

Fonction de survie
 Probabilité cumulée de non dialyse en fonction du temps et du statut C3d dans le groupe rejet (actif et chronique actif)
 $p=0,58$

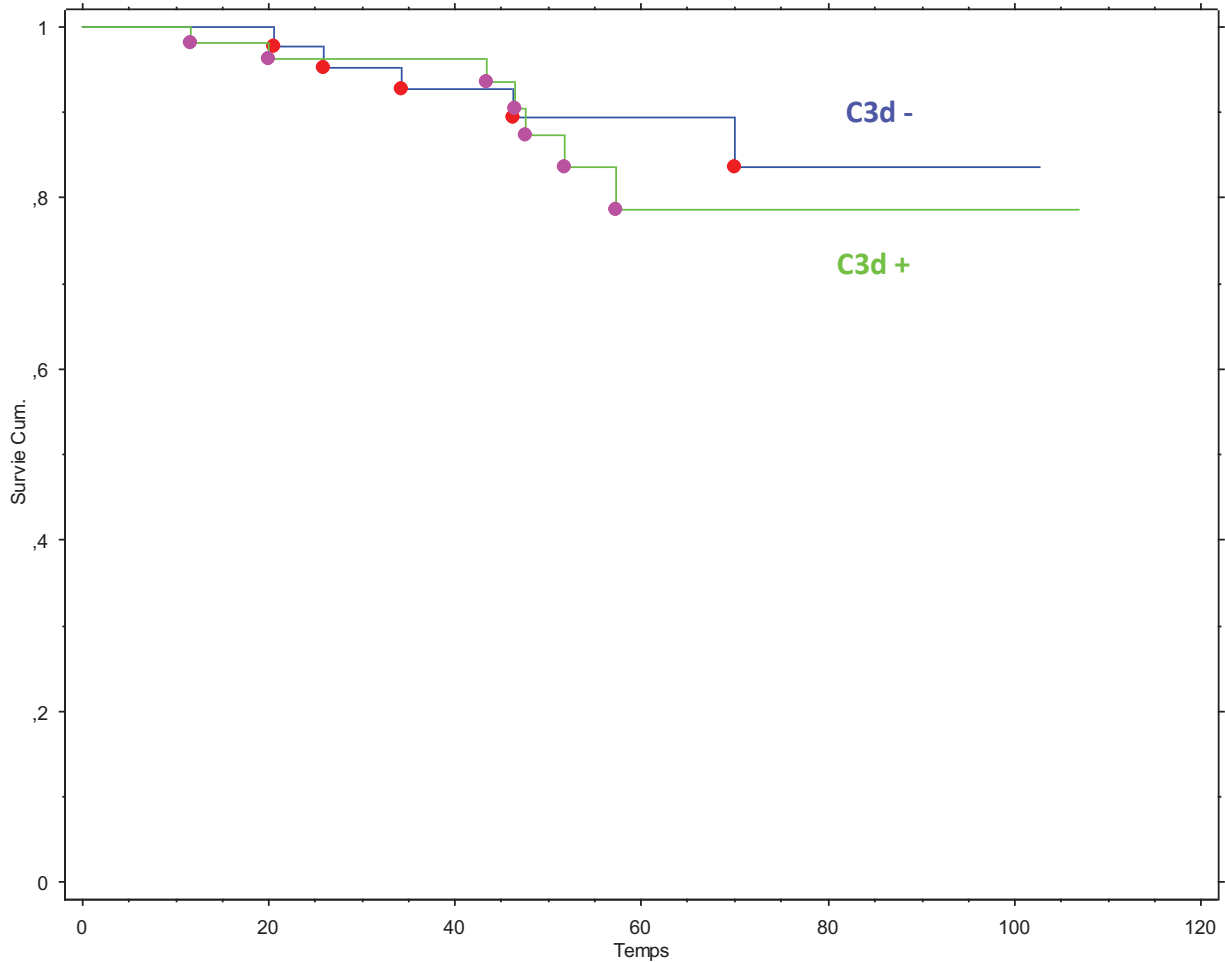


Figure 38 : Probabilité cumulée de dialyse en fonction du temps et du statut C3d pour le groupe rejet humoral infra-clinique (actif et chronique actif), suivi 5 ans post-biopsie

Dans le groupe « rejet humoral infra-clinique » (actif ou chronique actif), dans le sous-groupe de patients ayant 5 ans de suivi post-biopsie, on voit qu'avec le temps la survie du greffon devient moins bonne dans le groupe C3d+ que dans le groupe C3d-. A 20 mois après la première biopsie, la probabilité de non dialyse est de 98% pour les deux groupes. A 100 mois, la probabilité de non dialyse est de 83% dans le groupe C3d- et elle est de 75% dans le groupe C3d+. Cet écart semble se stabiliser avec le temps bien qu'un suivi plus long serait nécessaire pour l'affirmer. Cette différence n'est pas statistiquement significative ($p=0,58$).

4 CHAPITRE IV – Discussion

4.1 Synthèse des résultats

4.1.1 Facteurs prédictifs du rejet infra-clinique

Les caractéristiques descriptives des patients selon leur type de rejet au moment de la biopsie nous apportent plusieurs informations. Au moment de la biopsie, les patients du groupe « rejet actif infra-clinique » sont plus jeunes que ceux des groupes « rejet chronique infra-clinique » et « absence de rejet ». Concernant les anticorps, la MFI du DSA immunodominant, ainsi que la somme des MFI des DSA des patients est plus élevée dans le groupe « rejet actif infra-clinique » que dans le groupe « rejet chronique actif infra-clinique » ou « absence de rejet », de même que la somme des MFI des DSA propre à chaque patient. Dans nos modèles multivariés, le jeune âge du receveur au moment de la biopsie, le traitement par évérolimus, la MFI du DSA immunodominant supérieure à 3000 d'une part, La MFI de la somme des DSA supérieure à 6000 d'autre part sont des facteurs prédictifs indépendant de rejet actif infra-clinique. Dans une étude de Yamamoto et al sur une cohorte similaire à la nôtre, c'est-à-dire incluant des patients « infra-cliniques » avec apparition d'un DSA *de novo* et chez lesquels on effectue une biopsie pour l'apparition de ce DSA *de novo* [54], on retrouve les mêmes caractéristiques concernant le groupe avec rejet actif infra-clinique à la biopsie.

4.1.2 Test C3d

Pour les résultats propres au test C3d, on peut tout d'abord noter que dans notre cohorte constituée de patients greffés présentant au moins un DSA *de novo*, la distribution de la positivité de ce test concerne environ la moitié de notre échantillon : comme le montre la figure 21, le nombre de patients répondant aux critères de positivité du test C3d est de 54 soit 48%. Cette répartition est similaire à celle de l'étude de Yamamoto et al [54], dans laquelle la positivité du test C1q était étudiée. Dans notre cohorte, la répartition du nombre de patients dans chaque groupe, « C3d+ » et « C3d- » est donc homogène, et offre un nombre acceptable de patients pour pouvoir comparer les deux groupes par la suite. Concernant la positivité des données liées au test C3d (BG Adj, BCR Neg, R-Strength), on ne met pas en évidence de différence notable entre les groupes « absence de rejet », « rejet actif » et « rejet chronique

actif », que ce soit pour le DSA immuno-dominant ou pour la somme des DSA, et aucun de ces paramètres n'est prédictif du rejet infra-clinique d'après nos analyses univariées et multivariées. Ces premiers résultats ne semblent pas montrer de lien entre positivité du C3d et rejet humoral infra-clinique au moment de la biopsie. On ne retrouve pas de différence significative ($p=0,373$) entre la proportion de patients C3d+ et C3d- au sein du groupe rejet humoral : parmi les patients présentant un rejet humoral à la biopsie, on ne retrouve pas plus de patients avec un test C3d positif que de patients avec un test C3d négatif. De la même manière, au sein du groupe de patients avec un test C3d positif, on ne retrouve pas plus de patients avec un rejet humoral à la biopsie que de patients sans rejet humoral ($p=0,365$). Pour affiner ces données, nous nous sommes intéressés à la positivité du test C3d entre les groupes « rejet actif » et « rejet chronique actif ». On ne retrouve pas significativement plus de rejet actif chez les patients avec un test C3d positif que chez les patients avec un test C3d négatif ($p=0,375$). D'autre part, parmi les patients avec un test C3d positif, il n'y a pas plus de rejets actifs que chroniques actifs ($p\text{-value} = 0,412$).

4.1.3 Histologie

Au niveau de l'histologie, seuls les résultats concernant le dépôt de C4d dans les capillaires péri-tubulaires ont été retenus. L'échantillon dont on dispose est trop petit pour pouvoir tirer des conclusions significatives, mais les résultats suggèrent qu'il y aurait proportionnellement plus de patients avec un test C3d positif (6 patients) que négatif (1 patient) dans le groupe sans rejet humoral (figure 27) par rapport au groupe avec rejet humoral (figure 26), groupe dans lequel la distribution du C3d est équilibrée (13 patients C3d+ contre 10 patients C3d-). Cela signifie qu'au sein du groupe où il n'y a pas (encore) de rejet humoral infra-clinique au moment de la biopsie, mais déjà un dépôt de C4d dans les capillaires péri-tubulaires, on retrouve une grande majorité de patients ayant un test C3d positif. Cette positivité pourrait suggérer un début de rejet, pas encore mis en évidence à la biopsie, qui serait prédictif d'un rejet à plus long terme. Nous avons donc suivi l'évolution de la fonction rénale de ce petit groupe de patients, pour voir si ceux qui ont un test C3d positif voient leur fonction rénale se dégrader plus rapidement que les patients avec un test C3d négatif, parmi les patients ayant un dépôt de C4d dans les capillaires péri-tubulaires positif mais pas de rejet humoral infra-clinique. Il n'y a qu'une seule patiente avec un marquage C4d positif et un test C3d négatif,

sans rejet humoral à la biopsie. Son MDRD au moment de la biopsie était de 49,1 ml/min/1,73m² et de 49,5 à 5 ans ; soit une fonction rénale inchangée à 5 ans post-biopsie, et pas de dialyse. Il y a 6 patients avec un marquage C4d positif, sans rejet humoral infra-clinique à la biopsie et avec un test C3d positif. Leur MDRD moyen au moment de la biopsie était de 44,6 ml/min/1,73m², soit comparable à la patiente C3d- au même moment. A un an post-biopsie, le MDRD moyen du groupe était de 44,2. A trois ans, le MDRD des 5 patients était de 33,6. A 5 ans post-biopsie, le MDRD moyen des 3 patients restant dans le groupe était de 23,6 ml/min/1,73m². Soit une chute de la fonction rénale d'environ 50% dans ce groupe, alors qu'elle était inchangée à 5 ans pour la patiente dont le test C3d était négatif. Il faut souligner que l'un des patients dans le groupe C3d+ est retourné en dialyse. Mais même sans cet évènement notable, le MDRD moyen dans le groupe C3d+ diminue de manière visible alors qu'il est inchangé pour la patiente avec un test C3d négatif. Il est bien sûr très délicat d'interpréter des résultats sur de si faibles échantillons, on ne peut pas en tirer de conclusions, mais on pourrait supposer qu'une positivité précoce du test C3d, même en l'absence de rejet humoral infra-clinique à la biopsie et en cas de marquage C4d positif, pourrait entraîner une dégradation plus rapide de la fonction rénale. Si cette supposition se vérifie sur de plus larges cohortes, une positivité du test C3d aurait alors peut-être un intérêt pour le dépistage du rejet humoral infra-clinique, avant son installation histologique.

4.1.4 Évolution de la fonction rénale

D'après les résultats obtenus dans notre étude concernant l'évolution au long terme des patients, on observe plusieurs éléments. Tout d'abord, en regardant l'évolution de la fonction rénale pour toute la cohorte en fonction du type de rejet, quel que soit le statut C3d, les patients sans rejet humoral au moment de la biopsie ont la meilleure fonction rénale à 5 ans comparé aux groupes « rejet actif infra-clinique » et « rejet chronique actif infra-clinique ». Notre étude ne met pas en évidence une différence significative dans l'évolution de la fonction rénale à 5 ans entre les patients C3d+ et C3d-, même si une tendance semble se dessiner : les patients C3d+ ont globalement une fonction rénale moins bonne que les patients C3d- à 5 ans, mais cette différence n'est pas assez importante pour être significative. En se concentrant uniquement sur les patients avec un déclin de la fonction rénale supérieure à 30% entre la biopsie et 5 ans après, la majorité des patients est C3d+ et on s'approche du seuil de

significativité ($p=0,09$). Un meilleur recul et une cohorte plus importante pourraient peut-être permettre de conclure significativement.

4.1.5 MFI et C3d

Dans notre étude la moyenne des MFI du DSA immunodominant dans le groupe C3d+ est significativement supérieure à celle du groupe C3d- avec une p-value inférieure à 0,0001. Cela signifie que plus la valeur de la MFI du DSA immunodominant est élevée, plus on retrouvera un test C3d positif associé. Cela est également valable pour la moyenne de la somme des MFI des DSA. C'est une notion qui a beaucoup été retrouvée dans la littérature [55], [56], [57] car que ce soit pour le test C1q ou le test C3d, toutes les études ont montré un lien fort entre valeur élevée de MFI et positivité du C3d [58], [59], [60], [61]. Dans cette étude menée par Eskandary et al, les tests montrant l'activation du complément n'apportent pas de valeur diagnostique supplémentaire par rapport à la MFI des DSA [62]. La conclusion de notre étude est la même. En restreignant leur analyse aux DSA dont les MFI étaient inférieures à 10000 et en s'ajustant par rapport à l'effet prozone en diluant les sérums C3d+, les DSA fixant le C3d étaient quand même associés à une moins bonne survie du greffon que les DSA ne fixant pas le C3d dans cette étude menée par Lan et al [58]. Alors que dans l'étude menée par Yell et al [60], il a été montré qu'en augmentant artificiellement la concentration des DSA dans le sérum, une positivité en C1q pouvait apparaître. Inversement, les DSA C1q+ devenaient C1q- quand on dilue les sérums concernés pour obtenir des MFI comparables à celles des DSA C1q-. Ces résultats suggèrent que la « force » de l'anticorps est le principal élément pour le déclenchement de la cascade du complément, du moins dans les tests en phase solide. Dans des modèles expérimentaux, la liaison de deux anticorps poly-spécifiques à des épitopes distincts sur la même molécule HLA a produit un effet synergique d'activation du complément. Ce mécanisme coopératif est peu défini dans ces tests, et peut expliquer en partie pourquoi certains anticorps anti-HLA à faible MFI ont la capacité de déclencher le complément dans ces tests. Il faut encore évaluer si un processus similaire pourrait avoir lieu entre des anticorps qui se fixent à des antigènes HLA stériquement proches dans des conditions physiologiques, car cela pourrait expliquer la capacité, ou l'absence de capacité des tests en phases solide à prédire la fixation du complément in vivo. Cette notion fait questionner l'intérêt du test C3d et surtout sa valeur ajoutée par rapport à l'identification des DSA et leur MFI, que l'on a déjà

en routine pour l'aide au diagnostic du rejet humoral. Cependant on retrouve des valeurs qui ne respectent pas tout à fait ce schéma : on retrouve quelques patients dans le groupe C3d- qui ont des valeurs de MFI en dehors de la moyenne dans les valeurs hautes. Inversement, on trouve aussi parmi les patients C3d+ des valeurs de MFI basses. La corrélation n'est donc pas parfaite, et ce sont ces patients là qu'il serait intéressant de suivre : ont-ils présenté un rejet humoral au moment de la biopsie ou plus tard ? Est-ce que la positivité au test C3d était plus pertinente que la valeur de la MFI concernant la survenue d'un éventuel rejet ? Si tel était le cas, le test C3d pourrait éventuellement être intéressant chez les patients présentant un ou plusieurs DSA avec des MFI basses et chez qui on suspecte un rejet humoral infra-clinique.

Dans notre étude, la positivité du test C3d est significativement corrélée à la MFI du DSA immunodominant ; cette corrélation n'est pas parfaite comme le montre le coefficient de corrélation, mais ces valeurs sont surtout expliquées par les faibles valeurs de BCR Neg d'une part et les faibles valeurs de BG-Adj d'autre part, c'est-à-dire les valeurs pour lesquels les critères de positivité du test C3d ne sont pas atteints. En écartant les valeurs basses de BCR Neg et de BG-Adj, en se concentrant sur les valeurs positives du test, on trouverait sûrement une meilleure corrélation avec la MFI.

4.2 Limites de l'étude

4.2.1 Limites techniques de notre étude

Rappelons d'abord que les tests d'identification SAB en One Lambda ont tous été effectués dans les laboratoires HLA associés au centre greffeur des patients, au moment de la première biopsie donc sur sérum « frais », puis nous avons regroupé tous les résultats rétrospectivement. Pour les laboratoires n'utilisant pas One Lambda en première intention, comme l'EFS de Bois-Guillaume, l'identification SAB par technique One Lambda a été refaite au moment de l'étude sur des sérums congelés. Concernant nos résultats, il aurait été préférable de pouvoir effectuer tous les tests d'identification SAB sur le même lot, par la même personne au même moment, mais les conditions géographiques ainsi que le coût de ces tests ne le permettaient pas.

A Rouen, nous n'avons pas pré-traités les échantillons par EDTA. C'est une recommandation relativement récente et dans les autres laboratoires, l'identification des anticorps par

technique One Lambda été effectuée entre 2006 et 2018, les protocoles ont pu évoluer sur ce point et les sérums n'ont pas tous été traités par EDTA. Nous n'avons pas les données concernant quels sérums ont été pré-traités ou non dans les autres laboratoires. Cependant, rappelons que le pré-traitement des sérums permet de s'affranchir d'une éventuelle fausse négativité ou d'une sous-estimation de la MFI par effet zone, or tous nos patients possèdent bien des anticorps d'une MFI au moins égale à 1000 pour avoir pu être inclus dans l'étude. Le pré-traitement n'a donc ici pas d'impact sur la présence ou non de DSA.

Concernant le test C3d, tous les tests ont été effectués au laboratoire EFS de Bois-Guillaume par la même personne et au même moment, après rapatriement des sérums congelés depuis les différents laboratoires.

4.2.2 Données HLA manquantes

Certains patients de notre cohorte ont été greffés à une époque où l'on typait seulement les loci A, B et DR du donneur. Il se peut donc que ces patients aient développé des DSA dirigés contre d'autres loci, comme par exemple en DQ ou en DP, et qu'on n'ait pas pu les identifier comme tels par méconnaissance du typage du donneur. Par exemple dans nos résultats, un certain nombre d'anticorps anti-DP ou contre des molécules associées (DR51, DR52, DR53) avaient un test C3d positif, et on ne pouvait pas savoir s'ils devaient également être considérés comme des DSA ou non. On ne les a donc pas considérés comme des DSA, mais peut être qu'ils en sont et que cela peut modifier légèrement les statistiques de nos résultats concernant le test C3d. De nos jours, l'ADN du donneur est conservé et on peut ajouter des typages complémentaires des loci en cas d'apparition d'anticorps chez le receveur, afin de savoir si ces nouveaux anticorps sont des DSA ou non.

4.2.3 Durée de suivi

Nous avons pu suivre tous les patients un an après la biopsie (112 patients), puis un peu moins à 3 ans (102 patients) et encore un peu moins à 5 ans (82 patients). Il aurait été intéressant d'avoir l'ensemble des données à 5 ans, même si l'échantillon dont on dispose à 5 ans est représentatif de notre cohorte. Une étude prolongée permet un meilleur recul, sachant que

le rejet médié par les anticorps peut se développer même de nombreuses années après la greffe.

4.2.4 Biais du traitement immunosuppresseur

Le traitement immunosuppresseur est l'un des biais de notre étude, car notre cohorte n'est pas homogène sur ce point. En effet, certains patients ont été traités par des thérapies immunosuppressives à la suite de cette première biopsie, ou alors leur traitement initial a pu être modifié, quand d'autres patients n'ont pas nécessité de traitement. Nous ne nous sommes pas penchés sur l'impact du traitement sur l'évolution de la fonction rénale dans notre étude, ni sur la survie du greffon. Pourtant, c'est un des facteurs majeurs à prendre en compte pour le rejet humoral [63].

4.3 Comparaison avec la littérature

4.3.1 C1q et rejet

En premier lieu, le bilan des résultats concernant le test C1q est mitigé. On trouve dans la littérature plusieurs études qui suggèrent le potentiel pronostic de ce test. On peut citer par exemple cette étude de Cozzi et Biancone [64] qui trouve que la positivité du test C1q permet de stratifier les risques et pourrait être un bon outil pronostic pour le rejet médié par les anticorps. D'après Sutherland et al [65] également, la positivité du test C1q est associée à la perte de greffon. Une étude sur 1061 patients menée par Loupy et al [66] conclut que les patients dont les DSA sont positifs au test C1q ont une survie du greffon à 5 ans moins bonne que les patients dont les DSA ne fixent pas le C1q. Cette étude conclut aussi que les DSA fixant le C1q sont associés à un taux plus élevé de rejet médié par les anticorps, et un phénotype plus sévère concernant les lésions du greffon. La cohorte en question est peu homogène puisque le seul critère d'inclusion était d'avoir reçu une transplantation rénale entre 2005 et 2011. La distinction entre DSA *de novo* et DSA préformés n'a pas été évaluée, ni le statut clinique des patients.

A l'inverse, d'autres études concluent plutôt à des résultats peu probants concernant l'association entre positivité du C1q et rejet : dans cette étude de Okabe et al [67], on trouve

que les patients avec des DSA C1q+ pré-formés n'ont pas une incidence plus élevée de rejet médié par les anticorps que les patients DSA C1q-. Cette étude menée par Messina et al [68] a montré que pour des patients présentant des DSA de novo, la positivité du test C1q n'était pas associé à une moins bonne survie du greffon. Dans cette étude rétrospective menée par Kauke et al [69] sur des DSA de novo, il n'a pas été mis en évidence de différence dans la survie du greffon entre les patients DSA+ et C1q+ et DSA+ et C1q-. Mais il est intéressant de noter que chez les patients avec des anticorps qui n'étaient pas des DSA mais qui étaient C1q+, la survie du greffon à 5 ans était moins bonne que celle des patients qui avaient également des anticorps qui n'étaient pas des DSA mais qui étaient cette fois C1q-. Ces résultats semblent montrer que lorsque l'on se restreint à un certain type de DSA, par exemple seulement aux DSA *de novo* comme dans notre étude, les différences sur la survie du greffon semblent moins nettes entre les DSA fixant le complément et ceux ne le fixant pas.

4.3.2 C3d et rejet

Dans étude menée par Sicard et al sur une cohorte de 69 patients [57], une bonne corrélation a été établie entre la détection de DSA fixant le C3d et la perte de greffon au moment du diagnostic de rejet médié par les anticorps, par rapport au groupe témoin, dont les DSA ne fixaient pas le C3d. Il faut bien souligner que dans l'étude citée, le test C3d a été effectué seulement chez des patients présentant un rejet médié par les anticorps car c'est un critère d'inclusion. De la même manière, dans cette étude de Pelletier et al [56], les receveurs ayant des DSA C3d positifs ont une incidence de rejet médié par les anticorps et tout type de rejet significativement plus élevée que les receveurs avec des DSA C3d négatifs, ainsi qu'une moins bonne survie de greffon. Encore une fois, la cohorte étudiée est moins homogène que la nôtre car il s'agissait de patients transplantés rénaux avec un ou plusieurs DSA de novo, mais sans critère d'inclusion concernant le rejet : les patients ont été inclus sur la base d'un DSA de novo, sans distinguer ceux qui avaient déjà une dysfonction de greffon et ceux qui n'en avaient pas. Dans cette autre étude menée par Lan et al [58], le test C3d est encore une fois effectué au moment de la dysfonction du greffon, en moyenne 5 ans post-greffe. La conclusion de cette étude est que le groupe de patients C3d+ présente une moins bonne fonction rénale au moment du test, et que la survie du greffon au long terme est également moins bonne que pour le groupe C3d-. Cependant la valeur pronostique du test C3d est moins bonne que la

biopsie, c'est également notre conclusion : dans notre étude, nous testons le C3d en infra-clinique, donc sur des patients cliniquement stables et sans variation notable de leur fonction rénale initiale, au moment de la mise en évidence d'un DSA ; il peut ne pas y avoir de diagnostic de rejet lors de la biopsie faite en parallèle. D'après nos résultats, la positivité du test C3d en infra-clinique ne semble pas être d'une grande aide pour définir un groupe plus à risque de rejet. Dans une étude pédiatrique de meilleurs résultats prédisant la perte de greffe ont été obtenus avec des DSA de novo fixant le C3d par rapport aux DSA fixant le C1q [70] : la probabilité de survie du greffon à 10 ans est moins bonne chez les patients C3d+ que chez les patients C3d-. Cette cohorte se rapproche un peu plus de la nôtre car les tests ont été effectués dès l'apparition du DSA de novo, mais sans critère clinique. Cependant la différence majeure avec notre étude est qu'il s'agit d'une cohorte pédiatrique. Chez nos patients adultes, nous ne mettons pas en évidence de différence significative concernant le retour en dialyse entre le groupe C3d+ et C3d-. Mais très peu de patients dans notre cohorte sont retournés en dialyse. Dans cette grande méta-analyse [71] regroupant 7936 patients, il est montré que les DSA positifs pour le test C3d représentent un facteur déterminant de perte d'allogreffe avec un hazard ratio égal à 5,04. Les patients présentant des DSA fixant le C3d ont un risque cinq fois plus important de perte de greffon que les patients avec des DSA ne fixant pas le C3d ou sans DSA. D'après cette méta-analyse, au-delà de l'effet sur la survie du greffon, les anticorps anti-HLA activant le complément sont fortement associés à un risque plus élevé de rejet de greffon. Les auteurs pensent que ces résultats pourraient être utilisés en pratique clinique, et suggèrent un potentiel lien de causalité entre la présence d'anticorps activant le complément et le rejet de greffon. La grande limite de cette méta-analyse est qu'elle compare d'une part un groupe de patients possédant des DSA activant le complément, à un groupe de patients présentant des DSA n'activant pas le complément ou sans DSA du tout d'autre part. Il est donc attendu que le premier groupe montre un risque augmenté de rejet de greffon par rapport au deuxième. Il ne s'agit pas vraiment d'une méta-analyse comparant un groupe de patients dont les DSA activent le complément contre un autre groupe de patients, possédant bien des DSA, mais qui eux n'activent pas le complément. C'est le point fort de notre étude : la cohorte étudiée est extrêmement homogène puisqu'il s'agit de patients tous cliniquement stables à l'inclusion et présentant tous un ou plusieurs DSA de novo. L'étude de l'impact du C3d a donc bien sa place, on peut vraiment comparer des patients homogènes et voir leur évolution en

ce qui concerne le C3d. A l'inverse de cette méta-analyse, nous ne mettons pas en évidence un Hazard Ratio significatif concernant la positivité du C3d vis-à-vis du rejet humoral.

Quelques études ont comparé les deux tests C1q et C3d. On peut citer cette étude de Kim et al [72], puisque leur cohorte est intéressante bien que la population soit pédiatrique : les tests C1q et C3d ont été effectués au moment de l'apparition des DSA de novo, comme dans notre étude. Les résultats montrent que les DSA de novo fixant le C1q ne sont pas associés à une moins bonne survie du greffon, mais que les DSA de novo fixant le C3d le sont. Les DSA fixant à la fois le C1q et le C3d ne sont pas plus associés à une moins bonne survie du greffon que ceux fixant le C3d uniquement. Dans cette autre étude de Lee et al [61], les DSA de novo fixant le complément (C1q ou C3d) augmentent l'incidence de rejet médié par les anticorps, mais il n'y a pas de différence entre les DSA de novo fixant le C1q et ceux fixant le C3d concernant l'incidence du rejet médié par les anticorps. La positivité du C1q et du C3d est corrélée à la valeur de MFI des DSA de novo, ce que l'on retrouve dans notre étude pour le C3d, et ce qui limite la valeur ajoutée du test C3d.

Peu d'études ont été conduites uniquement sur des patients qui n'exprimaient pas encore de rejet clinique, comme c'est le cas dans notre étude. Puisque l'intérêt est de trouver des facteurs de risque d'apparition de rejet, des études sur une telle population sont nécessaires. On peut citer cette étude de Yamamoto et al [54], qui est la plus proche de la nôtre en ce qui concerne les critères d'inclusion : 43 patients qui ont eu une apparition de DSA de novo, sans signes de rejet clinique, et pour lesquels une biopsie a été faite, ont été inclus. Parmi ces 43 patients avec DSA de novo et sans dysfonction rénale, 18 présentaient un rejet à la biopsie soit 42% (dans notre étude, 45% des patients présentaient un rejet à la biopsie). Leur étude a été menée sur la positivité du test C1q, alors que nous avons mené la nôtre sur la positivité du test C3d ; 45% des patients avaient un test C1q positif et ceux-là avaient des MFI plus élevées que les patients C1q-. La fixation du C1q a été retrouvée significativement corrélée au dépôt de C4d dans les capillaires péri-tubulaires, et également significativement associée au rejet infra-clinique dans leur étude. Nous n'avons pas retrouvé ces associations significatives avec le test C3d, pourtant nous avons également trouvé une bonne corrélation entre MFI et positivité du test C3d. Les auteurs n'ont pas étudié la survie du greffon à long terme, il aurait été intéressant de pouvoir comparer nos résultats aux leurs.

Après une analyse critique de la littérature, on peut dire qu'il existe une certaine relation, mais encore imparfaite, entre les tests en phase solide dépendant de l'activité du complément et la possibilité de prévoir la survie du greffon. Les différents seuils de positivité, l'hétérogénéité dans la population et dans les critères étudiés selon les études sont des facteurs qui peuvent expliquer les conclusions divergentes que l'on retrouve. Si on s'intéresse aux mécanismes biologiques, on peut mettre en avant les différents facteurs dont il faut tenir compte dans l'activation du complément : concernant les facteurs dépendant du sérum en lui-même, on peut citer le titre, l'avidité, la sous classe et la glycosylation de l'anticorps. Parmi les immunoglobulines, les IgG3 ont le plus fort potentiel activateur du complément, suivi de près par les IgG1, puis bien après par les IgG2. Les IgG4 n'activent pas le complément en théorie. Cependant, dans certaines conditions comme par exemple une forte densité antigénique ou des concentrations élevées en complément et en immunoglobulines, toutes les sous-classes sont capables d'activer le complément. Il y aurait aussi un effet synergique entre les sous-classes qui activent beaucoup et celles qui activent peu le complément. Après une transplantation, les IgG1 reconnaissent à peu près 90% des spécificités antigéniques HLA alors que le reste des sous-classes en reconnaissent environ 40% [73]. Cela montre qu'une réponse anti-HLA polyclonale, avec un mélange en sous-classes d'IgG, augmente l'activation du complément. En ce qui concerne le greffon, l'expression de l'épitope, sa densité, le niveau d'inflammation locale et la concentration en complément sont des facteurs qui entrent aussi en compte pour expliquer les résultats divergents [74]. En effet, la densité des antigènes HLA à la surface des cellules ainsi que le nombre d'épitopes est un facteur déterminant pour l'activation du complément. La proximité des régions Fc des anticorps augmente quand plusieurs anticorps peuvent se lier à la même molécule HLA, donc les patients avec un fort titre de DSA polyclonaux pourraient être prédisposés à voir l'activation complément augmenter, surtout lors de périodes inflammatoires comme les infections, lorsque l'expression des molécules HLA à la surface cellulaire est augmentée [28]. Enfin, on retrouve des variations génétiques de l'expression des protéines du complément. Certaines protéines comme C2 ou C4 sont également situées sur le locus CMH, et sont polymorphiques. Il a été démontré que certains polymorphismes, notamment pour le C4 pouvaient avoir une influence sur le devenir du greffon. On comprend donc que les mécanismes pouvant intervenir sur l'activation du complément sont complexes et variés, ce qui peut expliquer les résultats ambivalents que l'on retrouve.

Avec ces résultats très variables d'une étude à l'autre, on peut se demander finalement si le test C3d trouvera vraiment sa place comme examen de routine, surtout si l'on prend en compte le coût de ces tests et sachant que l'on ne dispose pas vraiment de traitement efficace contre le rejet médié par les anticorps [75] [76].

4.4 Conclusion

Le premier objectif de cette étude était de savoir si ce test a un intérêt dans l'aide au diagnostic de rejet infra-clinique et en particulier si une positivité au test C3d chez un patient doit inciter à lui faire une biopsie. Les résultats détaillés précédemment ne vont pas dans ce sens ; au moment de la biopsie, la positivité du test Cd3 ne semble pas être une aide au diagnostic de rejet infra-clinique. En effet, cette positivité ne permet pas de distinguer clairement un groupe avec rejet infra-clinique, et ce test ne peut pas être utilisé pour le choix des patients nécessitant une biopsie.

Le deuxième objectif de l'étude concernait l'impact à long terme du test C3d sur la survie du greffon ; notre question était de savoir si la positivité précoce (infra-clinique) du test c3d est un marqueur prédictif d'une moins bonne survie du greffon. Nos résultats, bien que non significatifs statistiquement, vont dans le sens que la positivité précoce du test C3d est un marqueur prédictif d'une moins bonne survie du greffon. Cette conclusion est à nuancer car la positivité du test C3d est significativement corrélée à la MFI des DSA dans nos résultats et remet donc en cause l'intérêt du test C3d si la MFI qui est déjà utilisée en routine permet déjà de prédire la survie du greffon. Le test C3d ne semble pas apporter plus d'informations que la MFI au moment de la première biopsie.

4.5 Perspectives

Une des limites des tests en Single Antigen est l'utilisation d'antigènes fixés, qui nous donnent certes un degré d'immunisation, mais pas un risque de rejet. En effet, les panels SAB par technique Luminex sont très sensibles mais utilisent des molécules HLA recombinantes ; il est donc difficile de d'estimer vraiment le risque de rejet, et on n'est pas en mesure de connaître

la composition en amino-acides de l'épitope qui induit le ou les mismatches. D'autres approches se sont développées ces dernières années, comme par exemple le programme « HLA Matchmaker » [77]. Ce logiciel a pour but de modéliser les séquences et les aspects structurels du polymorphisme HLA, pouvant prédire des épitopes. Le logiciel permet de rechercher des motifs linéaires d'acides aminés par « triplets », qui permettraient de distinguer les molécules HLA du donneur et du receveur. Des « triplets » potentiellement immunogènes ont été identifiés. Le logiciel peut repérer certaines caractéristiques conformationnelles comme une distance de 3 Angstrom, et classe ces « triplets », considérés comme des épitopes, en « eplets ». Il a été confirmé expérimentalement que certains « eplets » peuvent effectivement reconnaître des séquences d'acides aminés qui définissent un épitope, mais cette approche reste encore très théorique et délicate à utiliser au quotidien, même si certains fournisseurs proposent maintenant des logiciels basés sur ce même principe mais plus simple à utiliser. Il s'agit d'une approche encore assez expérimentale à l'heure qu'il est mais qui pourrait bien se développer très prochainement, avec une utilité particulière pour aider au choix en cas de possibilité de plusieurs donneurs vivants pour un receveur. L'analyse épitopique fine proposée par le logiciel HLA MatchMaker pourrait permettre de mieux prédire le risque immunologique, en identifiant les incompatibilités les plus à risque d'allo-immunisation. Dans le même esprit, l'algorithme PIRCHE (Predicted Indirectly Recognizable HLA Epitopes) propose aussi d'attribuer un score en fonction du nombre de peptides reconnus comme « étrangers » du donneur, et pouvant être présentés par les molécules HLA du receveur. Plus le score est élevé, plus le nombre d'épitopes pouvant être présenté aux lymphocytes T est élevé. PIRCHE existe pour les molécules HLA de classe I et les molécules HLA de classe II. Le score PIRCHE pourrait avoir un impact sur la survie du greffon. Il pourrait également être une aide pour le choix du donneur le plus compatible dans le cadre des donneurs vivants [78]. Cependant, toutes les données ne sont pas encore prises en compte, notamment les molécules associées (DR51, DR52, DR53) ou les DP, ce qui induit des scores faussement négatifs. Également, le logiciel pourrait prendre en compte des peptides qui n'ont pas d'impact clinique, et induire des scores faussement positifs [79]. PIRCHE ne semble donc pas encore tout à fait au point mais pourrait peut-être se faire une place dans le futur.

Concernant le diagnostic moléculaire, il a été montré que la présence de DSA activant le complément modifiait l'expression génique et donc induisait des phénotypes différents selon

le type de rejet au niveau histologique ; l'expression de ces gènes donneraient des informations plus précises que l'histologie classique concernant le stade de rejet et permettrait d'adapter au mieux les traitements, notamment les traitements inhibiteurs du complément [46]. On peut aussi attribuer un score selon la présence ou non de certains transcripts au niveau de la biopsie. Ce score moléculaire permettrait d'attribuer une probabilité de rejet médié par les anticorps sans avoir connaissance du niveau d'immunisation par les anticorps anti-HLA, ni de l'histologie et du marquage C4d, et permettrait également de prédire une éventuelle perte de greffon [80]. De nouvelles méthodes encore plus personnalisées sont à l'étude, comme celle des « peptides arrays » [81], où des matrices de peptides personnalisées ont été synthétisées pour permettre la détection d'allo-anticorps d'épitopes HLA linéaires, associés à des mismatches donneur-receveur. Lors de la conférence pour la révision de la classification de Banff qui a eu lieu en 2017, la possibilité d'utiliser ces marqueurs moléculaires comme alternative au critère des DSA a été discutée. Il existe des sets de transcripts qu'il est possible d'utiliser comme outils de classification de rejet médié par les anticorps ; ces tests ne sont pas disponibles dans tous les centres et les seuils diagnostics doivent être validés indépendamment par chaque centre pour le moment [35]. Même si ces tests s'avéraient vraiment être plus spécifiques que l'identification des DSA, ils présentent le gros désavantage de s'effectuer à partir de biopsies ; ils sont donc bien plus invasifs que l'identification des DSA, qui reste la technique la plus rapide et moins invasive pour le diagnostic du rejet médié par les anticorps.

5 BIBLIOGRAPHIE

- [1] Agence de la Biomédecine, « Le rapport médical et scientifique du prélèvement et de la greffe en France ». 2017.
- [2] T. Alelign, M. M. Ahmed, K. Bobosha, Y. Tadesse, R. Howe, et B. Petros, « Kidney Transplantation: The Challenge of Human Leukocyte Antigen and Its Therapeutic Strategies », *J. Immunol. Res.*, vol. 2018, p. 5986740, 2018.
- [3] R. A. Montgomery, V. S. Tatapudi, M. S. Leffell, et A. A. Zachary, « HLA in transplantation », *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 14, n° 9, p. 558-570, sept. 2018.
- [4] T. Alelign, M. M. Ahmed, K. Bobosha, Y. Tadesse, R. Howe, et B. Petros, « Kidney Transplantation: The Challenge of Human Leukocyte Antigen and Its Therapeutic Strategies », *J. Immunol. Res.*, vol. 2018, p. 1-18, 2018.
- [5] E. Y. Song, E. Y. Roh, S. Shin, J. H. Yoon, et M. H. Park, « No gender differences in the frequencies of HLA-DRB3/B4/B5 heterozygotes in newborns and adults in Koreans », *Genes Genet. Syst.*, vol. 87, n° 1, p. 59-62, 2012.
- [6] B. R. Kornum *et al.*, « Narcolepsy », *Nat. Rev. Dis. Primer*, vol. 3, p. 16100, févr. 2017.
- [7] S. G. E. Marsh *et al.*, « Nomenclature for factors of the HLA system, 2010 », *Tissue Antigens*, vol. 75, n° 4, p. 291-455, avr. 2010.
- [8] D. J. Triulzi *et al.*, « The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy », *Transfusion (Paris)*, vol. 49, n° 9, p. 1825-1835, sept. 2009.
- [9] L. E. Morales-Buenrostro, P. I. Terasaki, L. A. Marino-Vázquez, J.-H. Lee, N. El-Awar, et J. Alberú, « "Natural" Human Leukocyte Antigen Antibodies Found in Nonalloimmunized Healthy Males », *Transplantation*, vol. 86, n° 8, 2008.
- [10] D. Lopes *et al.*, « Effect of Different Sensitization Events on HLA Alloimmunization in Kidney Transplantation Candidates », *Transplant. Proc.*, vol. 47, n° 4, p. 894-897, mai 2015.
- [11] C. Ehrnthaller, A. Ignatius, F. Gebhard, et M. Huber-Lang, « New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system », *Mol. Med. Camb. Mass*, vol. 17, n° 3-4, p. 317-329, 2011.
- [12] D. Ricklin, D. C. Mastellos, E. S. Reis, et J. D. Lambris, « The renaissance of complement therapeutics », *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 14, n° 1, p. 26-47, janv. 2018.
- [13] L. A. Trouw, M. C. Pickering, et A. M. Blom, « The complement system as a potential

therapeutic target in rheumatic disease », *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 13, p. 538, août 2017.

[14] J. M. Reichert, « Antibody Fc: Linking Adaptive and Innate Immunity: Editors Margaret E. Ackerman, Falk Nimmerjahn », *mAbs*, vol. 6, n° 3, p. 619-621, mai 2014.

[15] P. F. Halloran, « T Cell-mediated Rejection of Kidney Transplants: A Personal Viewpoint », *Am. J. Transplant.*, vol. 10, n° 5, p. 1126-1134, mai 2010.

[16] R. Snanoudj *et al.*, « The blockade of T-cell co-stimulation as a therapeutic stratagem for immunosuppression: Focus on belatacept », *Biol. Targets Ther.*, vol. 1, n° 3, p. 203-213, sept. 2007.

[17] P. I. Terasaki et M. Ozawa, « Predicting Kidney Graft Failure by HLA Antibodies: a Prospective Trial », *Am. J. Transplant.*, vol. 4, n° 3, p. 438-443, mars 2004.

[18] F. Cardarelli *et al.*, « Prevalence and significance of anti-HLA and donor-specific antibodies long-term after renal transplantation », *Transpl. Int.*, vol. 18, n° 5, p. 532-540, mai 2005.

[19] X. Li, H. Ishida, Y. Yamaguchi, et K. Tanabe, « Poor graft outcome in recipients with de novo donor-specific anti-HLA antibodies after living related kidney transplantation », *Transpl. Int.*, vol. 21, n° 12, p. 1145-1152, déc. 2008.

[20] B. J. Nankivell et S. I. Alexander, « Rejection of the Kidney Allograft », *N. Engl. J. Med.*, vol. 363, n° 15, p. 1451-1462, oct. 2010.

[21] S. A. Joosten, Y. W. J. Sijpkens, C. van Kooten, et L. C. Paul, « Chronic renal allograft rejection: Pathophysiologic considerations », *Kidney Int.*, vol. 68, n° 1, p. 1-13, juill. 2005.

[22] C. Wiebe *et al.*, « Evolution and Clinical Pathologic Correlations of De Novo Donor-Specific HLA Antibody Post Kidney Transplant », *Am. J. Transplant.*, vol. 12, n° 5, p. 1157-1167, mai 2012.

[23] A. Tagliamacco *et al.*, « DQ molecules are the principal stimulators of de novo donor-specific antibodies in nonsensitized pediatric recipients receiving a first kidney transplant », *Transpl. Int.*, vol. 27, n° 7, p. 667-673, juill. 2014.

[24] K. A. Thomas, N. M. Valenzuela, et E. F. Reed, « The perfect storm: HLA antibodies, complement, FcγRs, and endothelium in transplant rejection », *Trends Mol. Med.*, vol. 21, n° 5, p. 319-329, mai 2015.

[25] A. Loupy, G. S. Hill, et S. C. Jordan, « The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure », *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 8, n° 6, p. 348-357, juin 2012.

[26] A. Loupy et C. Lefaucheur, « Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts », *N. Engl. J. Med.*, vol. 379, n° 12, p. 1150-1160, sept. 2018.

- [27] A. Loupy *et al.*, « Significance of C4d Banff Scores in Early Protocol Biopsies of Kidney Transplant Recipients with Preformed Donor-Specific Antibodies (DSA) », *Am. J. Transplant.*, vol. 11, n° 1, p. 56-65, janv. 2011.
- [28] A. Loupy *et al.*, « Outcome of Subclinical Antibody-Mediated Rejection in Kidney Transplant Recipients with Preformed Donor-Specific Antibodies », *Am. J. Transplant.*, vol. 9, n° 11, p. 2561-2570, nov. 2009.
- [29] M. Haas *et al.*, « The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials », *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.*, vol. 18, n° 2, p. 293-307, févr. 2018.
- [30] M. Miura *et al.*, « Donor-specific antibody in chronic rejection is associated with glomerulopathy, thickening of peritubular capillary basement membrane, but not C4d deposition », *Clin. Transplant.*, vol. 21, n° 18, p. 8-12, juill. 2007.
- [31] J. M. Gloor *et al.*, « Transplant Glomerulopathy: Subclinical Incidence and Association with Alloantibody », *Am. J. Transplant.*, vol. 7, n° 9, p. 2124-2132, sept. 2007.
- [32] R. B. Colvin, « Antibody-Mediated Renal Allograft Rejection: Diagnosis and Pathogenesis », *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 18, n° 4, p. 1046, avr. 2007.
- [33] M. Haas, « The Revised (2013) Banff Classification for Antibody-Mediated Rejection of Renal Allografts: Update, Difficulties, and Future Considerations », *Am. J. Transplant.*, vol. 16, n° 5, p. 1352-1357, mai 2016.
- [34] M. Haas *et al.*, « Banff 2013 Meeting Report: Inclusion of C4d-Negative Antibody-Mediated Rejection and Antibody-Associated Arterial Lesions », *Am. J. Transplant.*, vol. 14, n° 2, p. 272-283, févr. 2014.
- [35] J. W. Min *et al.*, « Clinical Impact of Pre-transplant Antibodies Against Angiotensin II Type I Receptor and Major Histocompatibility Complex Class I-Related Chain A in Kidney Transplant Patients », *Ann. Lab. Med.*, vol. 38, n° 5, p. 450-457, sept. 2018.
- [36] C. Morath, M. Zeier, B. Döhler, G. Opelz, et C. Süsal, « ABO-Incompatible Kidney Transplantation », *Front. Immunol.*, vol. 8, p. 234, 2017.
- [37] F. G. Scurt, L. Ewert, P. R. Mertens, H. Haller, B. M. W. Schmidt, et C. Chatzikyrikou, « Clinical outcomes after ABO-incompatible renal transplantation: a systematic review and meta-analysis », *The Lancet*.
- [38] Agence de la Biomédecine, « Recomandations : Le suivi immunologique des patients en attente de greffe d'organe ou greffés ». 2010.
- [39] R. Callus, J. Buttigieg, A. A. Anastasi, et A. Halawa, « Basic concepts in kidney

transplant immunology », *Br. J. Hosp. Med.*, vol. 78, n° 1, p. 32-37, janv. 2017.

[40] D. Milongo *et al.*, « Interference of therapeutic antibodies used in desensitization protocols on lymphocytotoxicity crossmatch results », *Transpl. Immunol.*, vol. 32, n° 3, p. 151-155, juin 2015.

[41] N. Lachmann, K. Todorova, H. Schulze, et C. Schönemann, « Luminex[®]) and its applications for solid organ transplantation, hematopoietic stem cell transplantation, and transfusion », *Transfus. Med. Hemotherapy Off. Organ Dtsch. Ges. Transfusionsmedizin Immunhamatologie*, vol. 40, n° 3, p. 182-189, juin 2013.

[42] K. J. Clerkin *et al.*, « Comparative Assessment of Anti-HLA Antibodies Using Two Commercially Available Luminex-Based Assays », *Transplant. Direct*, vol. 3, n° 11, p. e218-e218, oct. 2017.

[43] J. H. Lan et K. Tinckam, « Clinical Utility of Complement Dependent Assays in Kidney Transplantation »:, *Transplantation*, vol. 102, p. S14-S22, janv. 2018.

[44] H. E. Feucht *et al.*, « Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection », *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 86, n° 3, p. 464-470, déc. 1991.

[45] M. D. Stegall, M. F. Chedid, et L. D. Cornell, « The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation », *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 8, p. 670, oct. 2012.

[46] C. Lefaucheur *et al.*, « Complement-Activating Anti-HLA Antibodies in Kidney Transplantation: Allograft Gene Expression Profiling and Response to Treatment », *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 29, n° 2, p. 620-635, févr. 2018.

[47] M. Wahrmann *et al.*, « [C4d]FlowPRA Screening—A Specific Assay for Selective Detection of Complement-Activating Anti-HLA Alloantibodies », *Hum. Immunol.*, vol. 66, n° 5, p. 526-534, mai 2005.

[48] G. Chen, F. Sequeira, et D. B. Tyan, « Novel C1q assay reveals a clinically relevant subset of human leukocyte antigen antibodies independent of immunoglobulin G strength on single antigen beads », *Hum. Immunol.*, vol. 72, n° 10, p. 849-858, oct. 2011.

[49] C. Weinstock et M. Schnaidt, « The complement-mediated prozone effect in the Luminex single-antigen bead assay and its impact on HLA antibody determination in patient sera », *Int. J. Immunogenet.*, vol. 40, n° 3, p. 171-177, juin 2013.

[50] M. Schnaidt, C. Weinstock, M. Jurisic, B. Schmid-Horch, A. Ender, et D. Wernet, « HLA Antibody Specification Using Single-Antigen Beads—A Technical Solution for the Prozone Effect », *Transplantation*, vol. 92, n° 5, 2011.

[51] C. A. Schinstock, M. J. Gandhi, et M. D. Stegall, « Interpreting Anti-HLA Antibody

Testing Data: A Practical Guide for Physicians », *Transplantation*, vol. 100, n° 8, p. 1619-1628, août 2016.

[52] J. Visentin *et al.*, « Denatured Class I Human Leukocyte Antigen Antibodies in Sensitized Kidney Recipients: Prevalence, Relevance, and Impact on Organ Allocation », *Transplantation*, vol. 98, n° 7, 2014.

[53] A. Konvalinka et K. Tinckam, « Utility of HLA Antibody Testing in Kidney Transplantation », *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 26, n° 7, p. 1489-1502, juill. 2015.

[54] T. Yamamoto *et al.*, « De Novo Anti-HLA DSA Characteristics and Subclinical Antibody-Mediated Kidney Allograft Injury », *Transplantation*, vol. 100, n° 10, 2016.

[55] G. Guidicelli *et al.*, « Non-Complement-Binding De Novo Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Kidney Allograft Survival », *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 27, n° 2, p. 615-625, févr. 2016.

[56] R. P. Pelletier, I. Balazs, P. Adams, A. Rajab, N. R. DiPaola, et M. L. Henry, « Clinical utility of C3d binding donor-specific anti-human leukocyte antigen antibody detection by single antigen beads after kidney transplantation—a retrospective study », *Transpl. Int.*, vol. 31, n° 4, p. 424-435, avr. 2018.

[57] A. Sicard *et al.*, « Detection of C3d-binding donor-specific anti-HLA antibodies at diagnosis of humoral rejection predicts renal graft loss », *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 26, n° 2, p. 457-467, févr. 2015.

[58] J. H. Lan *et al.*, « Clinical utility of complement-dependent C3d assay in kidney recipients presenting with late allograft dysfunction », *Am. J. Transplant.*, vol. 18, n° 12, p. 2934-2944, déc. 2018.

[59] S. Schaub, G. Hönger, M. T. Koller, R. Liwski, et P. Amico, « Determinants of C1q Binding in the Single Antigen Bead Assay », *Transplantation*, vol. 98, n° 4, 2014.

[60] M. Yell, B. L. Muth, D. B. Kaufman, A. Djamali, et T. M. Ellis, « C1q Binding Activity of De Novo Donor-specific HLA Antibodies in Renal Transplant Recipients With and Without Antibody-mediated Rejection », *Transplantation*, vol. 99, n° 6, 2015.

[61] H. Lee *et al.*, « Clinical impact of complement (C1q, C3d) binding De Novo donor-specific HLA antibody in kidney transplant recipients », *PloS One*, vol. 13, n° 11, p. e0207434-e0207434, nov. 2018.

[62] F. Eskandary *et al.*, « Diagnostic Contribution of Donor-Specific Antibody Characteristics to Uncover Late Silent Antibody-Mediated Rejection—Results of a Cross-Sectional Screening Study », *Transplantation*, vol. 101, n° 3, 2017.

[63] G. A. Böhmig, F. Eskandary, K. Doberer, et P. F. Halloran, « The therapeutic challenge

of late antibody-mediated kidney allograft rejection », *Transpl. Int.*, vol. 0, n° ja, avr. 2019.

[64] E. Cozzi et L. Biancone, « C1q-binding donor-specific antibody assays help define risk and prognosis in antibody-mediated rejection », *Kidney Int.*, vol. 94, n° 4, p. 657-659, oct. 2018.

[65] S. M. Sutherland, G. Chen, F. A. Sequeira, C. D. Lou, S. R. Alexander, et D. B. Tyan, « Complement-fixing donor-specific antibodies identified by a novel C1q assay are associated with allograft loss », *Pediatr. Transplant.*, vol. 16, n° 1, p. 12-17, févr. 2012.

[66] A. Loupy *et al.*, « Complement-Binding Anti-HLA Antibodies and Kidney-Allograft Survival », *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, n° 13, p. 1215-1226, sept. 2013.

[67] Y. Okabe *et al.*, « Preformed C1q-binding Donor-specific Anti-HLA Antibodies and Graft Function After Kidney Transplantation », *Transplant. Proc.*, vol. 50, n° 10, p. 3460-3466, déc. 2018.

[68] M. Messina *et al.*, « Relationship among C1q-fixing de novo donor specific antibodies, C4d deposition and renal outcome in transplant glomerulopathy », *Transpl. Immunol.*, vol. 33, n° 1, p. 7-12, sept. 2015.

[69] T. Kauke *et al.*, « De novo donor-specific anti-HLA antibodies after kidney transplantation are associated with impaired graft outcome independently of their C1q-binding ability », *Transpl. Int.*, vol. 30, n° 4, p. 360-370, avr. 2017.

[70] P. Comoli *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.*, vol. 16, n° 7, p. 2106-2116, juill. 2016.

[71] A. Bouquegneau *et al.*, « Complement-activating donor-specific anti-HLA antibodies and solid organ transplant survival: A systematic review and meta-analysis », *PLoS Med.*, vol. 15, n° 5, p. e1002572-e1002572, mai 2018.

[72] J. J. Kim *et al.*, « Clinical risk stratification of paediatric renal transplant recipients using C1q and C3d fixing of de novo donor-specific antibodies », *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.*, vol. 33, n° 1, p. 167-174, 2018.

[73] F. Kishihata, J. Watanabe, A. Mulder, F. Claas, et J. C. Scornik, « Human Leukocyte Antigen Antibodies and Human Complement Activation: Role of IgG Subclass, Specificity, and Cytotoxic Potential », *Transplantation*, vol. 78, n° 7, 2004.

[74] E. J. Filippone et J. L. Farber, « The Humoral Theory of Transplantation: Epitope Analysis and the Pathogenicity of HLA Antibodies », *J. Immunol. Res.*, vol. 2016, p. 1-12, 2016.

[75] F. Eskandary *et al.*, « A Randomized Trial of Bortezomib in Late Antibody-Mediated

Kidney Transplant Rejection », *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 29, n° 2, p. 591-605, févr. 2018.

[76] G. Gupta *et al.*, « Late Antibody-Mediated Rejection in Renal Allografts: Outcome After Conventional and Novel Therapies », *Transplantation*, vol. 97, n° 12, 2014.

[77] R. J. Duquesnoy, « HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. I. Description of the algorithm », *Hum. Immunol.*, vol. 63, n° 5, p. 339-352, mai 2002.

[78] K. Geneugelijk *et al.*, « PIRCHE-II Is Related to Graft Failure after Kidney Transplantation », *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 321-321, mars 2018.

[79] G. Guidicelli, J.-L. Taupin, et J. Visentin, « Predicted indirectly recognizable HLA epitopes (PIRCHE): Only the tip of the iceberg? », *Am. J. Transplant.*, vol. 18, n° 2, p. 521-522, févr. 2018.

[80] J. Sellarés *et al.*, « Molecular Diagnosis of Antibody-Mediated Rejection in Human Kidney Transplants », *Am. J. Transplant.*, vol. 13, n° 4, p. 971-983, avr. 2013.

[81] P. Liu, T. Souma, A. Z.-S. Wei, X. Xie, X. Luo, et J. Jin, « A Novel Method for Anti-HLA Antibody Detection Using Personalized Peptide Arrays », *Transplant. Direct*, vol. 2, n° 11, p. e109-e109, oct. 2016.

Annexe 1 : Classification de Banff révisée, 2017

Category 1: Normal biopsy or nonspecific changes

Category 2: Antibody-mediated changes

Active ABMR; all 3 criteria must be met for diagnosis

1. Histologic evidence of acute tissue injury, including 1 or more of the following:

Microvascular inflammation ($g > 0$ and/or $ptc > 0$), in the absence of recurrent or de novo glomerulonephritis, although in the presence of acute TCMR, borderline infiltrate, or infection, $ptc \geq 1$ alone is not sufficient and g must be ≥ 1

Intimal or transmural arteritis ($v > 0$)

Acute thrombotic microangiopathy, in the absence of any other cause

Acute tubular injury, in the absence of any other apparent cause

2. Evidence of current/recent antibody interaction with vascular endothelium, *including 1 or more of the following*:

Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d > 0 by IHC on paraffin sections)

At least moderate microvascular inflammation ($[g + ptc] \geq 2$) in the absence of recurrent or de novo glomerulonephritis, although in the presence of acute TCMR, borderline infiltrate, or infection, $ptc \geq 2$ alone is not sufficient and g must be ≥ 1

Increased expression of gene transcripts/classifiers in the biopsy tissue strongly associated with ABMR, if thoroughly validated

3. Serologic evidence of donor-specific antibodies (DSA to HLA or other antigens). **C4d staining or expression of validated transcripts/classifiers as noted above in criterion 2 may substitute for DSA; however thorough DSA testing, including testing for non-HLA antibodies if HLA antibody testing is negative, is strongly advised whenever criteria 1 and 2 are met**

Chronic active ABMR; all 3 criteria must be met for diagnosis^C

1. Morphologic evidence of chronic tissue injury, including 1 or more of the following:

Transplant glomerulopathy ($cg > 0$) if no evidence of chronic TMA or chronic recurrent/de novo glomerulonephritis; includes changes evident by electron microscopy (EM) alone ($cg1a$)

Severe peritubular capillary basement membrane multilayering (requires EM)

Arterial intimal fibrosis of new onset, excluding other causes; leukocytes within the sclerotic intima favor chronic ABMR if there is no prior history of TCMR, but are not required

2. Identical to criterion 2 for active ABMR, above

3. Identical to criterion 3 for active ABMR, above, including strong recommendation for DSA testing whenever criteria 1 and 2 are met

C4d Staining without Evidence of Rejection; all 4 features must be present for diagnosis

1. Linear C4d staining in peritubular capillaries (C4d2 or C4d3 by IF on frozen sections, or C4d>0 by IHC on paraffin sections)

2. Criterion 1 for active or chronic, active ABMR not met

3. No molecular evidence for ABMR as in criterion 2 for active and chronic, active ABMR

4. No acute or chronic active TCMR, or borderline changes

Category 3: Borderline changes

Suspicious (Borderline) for acute TCMR

Foci of tubulitis (t > 0) with minor interstitial inflammation (i0 or i1), or moderate-severe interstitial inflammation (i2 or i3) with mild (t1) tubulitis; retaining the i1 threshold for borderline with t > 0 is permitted although this must be made transparent in reports and publications

No intimal or transmural arteritis (v = 0)

Category 4: TCMR

Acute TCMR

Grade IA Interstitial inflammation involving >25% of nonsclerotic cortical parenchyma (i2 or i3) with moderate tubulitis (t2) involving 1 or more tubules, not including tubules that are severely atrophic

Grade IB	Interstitial inflammation involving >25% of nonsclerotic cortical parenchyma (i2 or i3) with severe tubulitis (t3) involving 1 or more tubules, not including tubules that are severely atrophic
Grade IIAc	Mild to moderate intimal arteritis (v1), with or without interstitial inflammation and/or tubulitis
Grade IIBc	Severe intimal arteritis (v2), with or without interstitial inflammation and/or tubulitis
Grade IIIC	Transmural arteritis and/or arterial fibrinoid necrosis of medial smooth muscle with accompanying mononuclear cell intimal arteritis (v3), with or without interstitial inflammation and/or tubulitis

Chronic Active TCMR

Grade IA	Interstitial inflammation involving >25% of the total cortex (ti score 2 or 3) and >25% of the sclerotic cortical parenchyma (i-IFTA score 2 or 3) with moderate tubulitis (t2) involving 1 or more tubules, not including severely atrophic tubules ; other known causes of i-IFTA should be ruled out
Grade IB	Interstitial inflammation involving >25% of the total cortex (ti score 2 or 3) and >25% of the sclerotic cortical parenchyma (i-IFTA score 2 or 3) with severe tubulitis (t3) involving 1 or more tubules, not including severely atrophic tubules ; other known causes of i-IFTA should be ruled out
Grade II	Chronic allograft arteriopathy (arterial intimal fibrosis with mononuclear cell inflammation in fibrosis and formation of neointima)

The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials (Haas et al. 2018)

Les modifications par rapport aux classifications précédentes sont en gras

Annexe 2 : SERMENT DE GALIEN

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



Rangolie KAVERI

Anticorps spécifiques du greffon fixant le C3d et rejet humoral infra-clinique en transplantation rénale

Thèse pour le Doctorat en Pharmacie, Rouen, 2019, 95 p.

RESUME

Contexte : La transplantation rénale représente la thérapeutique de choix dans la prise en charge des patients insuffisants rénaux chroniques. Outre l'accès à la greffe, le rejet du greffon reste le principal enjeu aujourd'hui. On sait maintenant que le contrôle de la réponse humorale, et en particulier la meilleure compréhension du rejet de greffe médié par les anticorps (ABMR) est la clé pour parvenir à de meilleurs résultats sur la survie du greffon et le rejet chronique. La présence d'anticorps dirigés spécifiquement contre le greffon, appelés DSA, dans le sérum du receveur est l'un des critères biologiques du rejet humoral. Or, ces DSA n'ont pas tous le même pouvoir pathogène vis-à-vis du greffon. Il serait utile de trouver de nouveaux outils pronostiques qui permettraient une classification des DSA, pour faciliter le diagnostic précoce de rejet médié par les anticorps afin de prendre en charge plus rapidement les patients à risque de rejet. L'étude de la capacité de fixation du complément par les DSA est une des voies étudiées.

Patients et Méthodes : Nous avons étudié une cohorte multicentrique de 112 patients transplantés rénaux, tous cliniquement stables (créatininémie avec moins de 20% de variation sur les trois derniers mois et protéinurie inférieure à 0.5g/g) et qui ont développé au moins un DSA de novo avec une MFI supérieure à 1000. Nous avons étudié la capacité de ces DSA à fixer le complément, et plus spécifiquement leur positivité au test C3d. Le premier objectif est de savoir si ce test a un intérêt dans l'aide au diagnostic de rejet infra-clinique et en particulier si une positivité au test C3d chez un patient doit inciter à lui faire une biopsie. Le deuxième objectif est de savoir si la positivité précoce du test c3d est un marqueur prédictif d'une moins bonne survie du greffon.

Le logiciel de statistiques R a été utilisé. Les résultats avec une p-value inférieure à 0,05 sont considérés significatifs.

Résultats : On ne retrouve pas de différence significative ($p=0,373$) entre la proportion de patients C3d+ et C3d- au sein du groupe rejet humoral. Au sein du groupe de patients avec un test C3d positif, on ne retrouve pas plus de patients avec un rejet humoral à la biopsie que de patients sans rejet humoral ($p=0,365$). 5 ans après la première biopsie, parmi les patients avec une baisse supérieure à 30% de leur fonction rénale initiale, on observe une majorité de patients C3d+ ($p=0,09$). A 100 mois post-biopsie, la probabilité de non dialyse est de 83% dans le groupe C3d- et elle est de 75% dans le groupe C3d+ ($p=0,58$). La positivité du test C3d est significativement corrélée à la MFI du DSA immunodominant ($p=0,0001$).

Conclusion : La positivité du test Cd3 ne semble pas être une aide au diagnostic de rejet infra-clinique. Ce test ne peut pas être utilisé pour le choix des patients nécessitant une biopsie. En revanche la positivité précoce du test C3d semble être un marqueur prédictif d'une moins bonne survie du greffon. Mais le test C3d ne semble pas apporter plus d'informations que la MFI au moment de la première biopsie.

MOTS CLES : HLA – DSA – Complément – Transplantation rénale – Rejet médié par les anticorps

JURY

Président : Professeur Loïc FAVENNEC
Membres : Docteur Dominique BERTRAND
Professeur Sophie CANDON
Docteur Fabienne FARCE
Docteur Françoise HAU

DATE DE SOUTENANCE : 28 juin 2019