

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2015

N° 061

THESE

Pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

DES de NEPHROLOGIE

Par

Clément DELTOMBE

Né le 17 février 1987 à Compiègne

Présentée et soutenue publiquement le 05 Juin 2015

Etude de l'immunisation non HLA contre le récepteur de
type 1 à l'angiotensine sur la survie des transplants rénaux

Président du jury: Madame le Professeur Hourmant

Directeur de thèse : Madame le Professeur Giral

COMPOSITION DU JURY

Président du jury : Madame le Professeur Hourmant, Professeur Universitaire et Praticien Hospitalier, chef du service de néphrologie-immunologie clinique, CHU Nantes.

Directeur de thèse : Madame le Professeur Giral, Professeur Universitaire et Praticien Hospitalier, service de néphrologie-immunologie clinique, CHU Nantes.

Membres du jury :

Monsieur le Professeur Anglicheau, Professeur Universitaire et Praticien Hospitalier, service de néphrologie, CHU Necker-enfants malades, Paris.

Monsieur le Docteur Foucher Maître de Conférence Universitaire en Biostatistiques, Equipe SPHERE EA4275, Faculté de Médecine de Nantes.

Monsieur le Docteur Couvrat-Desvergnès, Praticien Hospitalier, service de néphrologie CHD La Roche Sur Yon.

REMERCIEMENTS

Au Professeur Hourmant, présidente du jury

Merci d'avoir accepté de juger notre travail et de présider ce jury.

Merci également pour votre enseignement, votre accompagnement attentionné et votre soutien durant ces années d'internat.

Soyez assurée de ma sincère reconnaissance et gratitude.

Au Professeur Giral, directrice de thèse

Merci de ta disponibilité constante, de ton accessibilité, de ta rigueur et de ton implication.

Tu as su me guider à chaque étape de ce travail avec simplicité et sympathie afin de rendre ce travail de thèse motivant.

Au Professeur Anglicheau

Vous avez accepté de vous intéresser à notre travail et de le juger, recevez ici l'expression de mes remerciements et de mon profond respect.

Au Docteur Foucher

Tu as participé à nos débats sur ce projet dès sa création et tu as accepté sans hésiter d'être membre de ce jury. Merci.

Au Docteur Couverat Desvergues

Tu as été mon premier Chef de clinique, mon premier chef de garde. Pour ton enseignement et ton amitié, merci.

A l'ensemble de l'équipe médicale et paramédicale de la néphrologie, mais aussi aux équipes de cardiologie de Saint Nazaire, de néphrologie de la Roche sur Yon, d'hématologie, de réanimation et d'infectiologie du CHU de Nantes qui ont tous de près ou de loin participé à ma formation de médecin,

A l'EA4275, Florence, Florent, Katy

A mes co-internes Marion, Awena, et surtout Vianney qui en quelques semaines de travail sont devenus des amis. Avec vous, les congrès n'ont pas la même saveur,

A mes amis de toujours Adrien et Béné, Thibault, Thomas, Benjamin et Bertille,

A mes amis de Fac Caroline, Constance, Emilie, Louis, Matthieu, Maxime, Mathilde, Florent et Olivier, Marion, Pauline et tous les autres...

A mes amis d'internat : Arnaud-Felix, Alex et Anne, Carelle et Etienne, Delphine et Camille, Jeremy, Anaïs, Clothilde et Erwan,

A mes parents qui, entre autre, ont instillé cette petite fibre de médecine en moi. A mes frères Simon et Damien. A mes grands parents,

A Marie, pour tout, et encore plus...,

Je dédie cette thèse.

TABLE DES MATIERES

Première partie : Revue de la littérature : l'immunisation non HLA en transplantation d'organe.

I Introduction.....	9
II Les anticorps non CMH (complexe majeur d'histocompatibilité).....	12
1) L'immunisation non HLA (nHLA).....	12
2) Les anticorps anti cellules endothéliales (AECA)	13
A/ Les anticorps anti HLA non classique: les anti MIC-A et MIC-B.....	14
B/ Anticorps anti récepteur type A de l'endothéline (ETAR)	16
C/ Anticorps anti vimentine	17
D/ Anticorps anti molécules d'adhésion inter-cellulaires.....	18
E/ Anticorps anti héparanes sulfates et perlecan	19
F/ Anticorps anti collagène V	20
G/ Anticorps anti K- α 1 tubuline	21
H/ Immunisation non HLA : conclusion	22
III Les anticorps anti récepteur de type 1 à l'angiotensine II (AT1R).....	24
1) Le récepteur de type 1 à l'angiotensine II: physiologie et physiopathologie.	24
2) Les anticorps anti AT1R.....	27
A/ L'exemple de la pré-éclampsie.....	27
B/ Le modèle de l'hypertension	29
C/ Le modèle de la sclérodémie	30
D/ Pourquoi ces anticorps apparaissent-ils?.....	31
E/ La détection des anticorps anti AT1R	32
IV Les anticorps anti AT1R en transplantation d'organe solide.....	33
1) En transplantation rénale	33
2) Mécanismes des lésions des greffons.....	39
3) Les anticorps anti AT1R dans les autres types de transplantation d'organes solides	40
V Conclusion	41
Bibliographie	43
Deuxième partie: Is pre-transplant sensitization against Angiotensin II Type 1 Receptor an etiologic factor in the evolution of kidney transplant recipients?.....	51

TABLE DES ICONOGRAPHIES

<i>Figure 1 : Dimérisation du récepteur AT1R par un anticorps</i>	<i>25</i>
<i>Figure 2: Les facteurs biologiques et génétiques interférants avec l'activité de AT1R</i>	<i>27</i>
<i>Figure 3: Anticorps anti AT1R et hypertension artérielle essentielle et réfractaire.....</i>	<i>30</i>
<i>Figure 4: Détection par ELISA des anticorps anti AT1R</i>	<i>32</i>
<i>Figure 5: Induction de rejet aigus vasculaires chez des rats transplantés traité par des IgG humaine anti AT1R et immunofixation sur les IgG humaine anti AT1R dans la média des vaisseaux lésés</i>	<i>34</i>
<i>Figure 6: comparaison du niveau d'anticorps anti AT1R entre les patients avec perte de fonction du greffon et patients avec greffon fonctionnel. D'après Taniguchi et al., AJT, 2013</i>	<i>37</i>
<i>Figure 7 : Courbes de Kaplan-Meier de survie des greffons selon la présence de DSA et/ou d'anticorps anti AT1R chez des patients avec biopsies anormales D'après Tanguchi et al., AJT, 2013</i>	<i>38</i>

LISTE DES ABREVIATIONS

AT1R : Angiotensin II Type 1 receptor : récepteur de type 1 à l'angiotensine II

AT1R-Abs : AT1R- Antibodies : Anticorps anti AT1R

CDC : Complement Dependant Cytotoxicity : cytotoxicité dépendante du complément

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

ColV : collagène V

CRAR : clinical relevant acute rejection : Rejet aigu cliniquement pertinent

DSA: Donor Specific Antibody: anticorps spécifique du donneur

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay : dosage immuno-enzymatique.

HLA : Human leukocyte antigen : Antigène leucocytaire humain

Ig : Immunoglobuline

MBG : Membrane basale glomérulaire.

nHLA : non HLA

NK : Natural Killer

RAAS : Renin Angiotensin Aldosterone System : Système rénine- angiotensine aldostérone.

SAB: Single Antigen Bead : Bille avec simple antigène

SCAR : Subclinical Acute Rejection : Rejet infraclinique

Première partie :

**Revue de la littérature : l'immunisation non
HLA en transplantation d'organe.**

I Introduction

La transplantation rénale est actuellement le meilleur traitement de l'insuffisance rénale terminale, si l'on considère le bénéfice pour le patient et le coût pour la société (1). Le succès de ce traitement a été possible principalement grâce à une meilleure compréhension des mécanismes immunitaires impliqués dans l'allo-transplantation. Le développement de traitements immunosuppresseurs agissant sur les principales voies de signalisations lymphocytaires ont permis au fil de leur découverte de réduire très significativement l'incidence des rejets aigus et de conserver les allogreffes sur une, voire plusieurs décennies. Cependant, la proportion de perte de greffon tardive reste à ce jour relativement constante sur le long terme. Actuellement, la durée de fonctionnement d'un greffon rénal est de 14 ans pour un donneur décédé et de 17 ans pour un donneur vivant haplo-identique (2). A l'ère de l'immunosuppression moderne comprenant majoritairement un traitement d'induction et des inhibiteurs de la calcineurine, il apparaît que l'immunisation dirigée contre les antigènes du système majeur d'histocompatibilité HLA, pré-formés avant la greffe (lors d'une grossesse, une transfusion, des greffes antérieures) ou apparaissant en post greffe (de novo) pourrait jouer un rôle majeur dans le pronostic à long terme des greffes (3)(4). Des progrès technologiques récents ont permis durant ces 10 dernières années de mieux dépister et identifier la présence d'anticorps anti HLA en pré et post greffe notamment ceux spécifiques du donneur (DSA pour Donor Specific Antibodies). La technique historique de lymphotoxicité dépendante du complément (LCT) permet d'identifier une immunisation anti HLA sur un panel de lymphocytes T et/ou B provenant d'une trentaine de donneurs différents (PRA pour

Panel Reactive Antibody) et de réaliser les Cross matches avant transplantation. Ce sont des tests fonctionnels et reproductibles mais assez peu sensibles. Ces techniques sont progressivement remplacées par des techniques de phase dites «solides» utilisant des molécules HLA solubilisées. Les techniques ELISA puis plus récemment Luminex® s'avèrent plus performantes et plus sensibles en terme d'identification d'immunisation anti-HLA, mais ont cependant des valeurs prédictives positives (35%) similaires aux PRA en terme de prédiction de survenu d'un rejet humoral en post greffe mais d'excellentes valeurs prédictives négatives (95%) (5). Plus récemment, des études ont permis de montrer que le risque de rejet humoral aigu était corrélé à la présence d'anticorps anti HLA spécifique du donneur fixant le C1q (6) introduisant une hypothèse mécanistique lié à la présence de ces anticorps spécifiques du donneur. Si un meilleur dépistage et identification en pré et post greffe de l'existence ou de la survenue de novo d'une immunisation anti HLA et la puissance des protocoles immunosuppresseurs actuels a considérablement réduit l'incidence des rejets aigus, elle demeure actuellement aux alentours de 10 à 15% lors de la première année de transplantation (7).

Malgré l'importance du rôle potentiellement pathogène des anticorps anti HLA, il a été montré que des rejets aigus ou chroniques pouvaient survenir en absence de détection d'anticorps anti HLA et même chez des receveurs ayant reçu des greffes HLA identiques entre jumeaux, suggérant la présence d'anticorps non HLA dont la plupart seraient des auto-anticorps (8)(9). Des rejets hyperaigus et aigus ont été décrits sans aucun anticorps anti-HLA détectable (10). Plusieurs de ces autoanticorps ont été récemment décrits comme étant

potentiellement impliqués dans la survenue de rejets aigus voire même corrélés à la survie des greffons. Une étude de survie des greffons publiée en 1997 et basée sur le registre américain UNOS, montrait que près de 38% des pertes de greffons pourraient être liées à des anticorps non-HLA contre 18% à une immunisation anti HLA, mettant en évidence l'importance d'une identification de tels anticorps(11). Ces résultats sont bien sûr à nuancer car établis sur la base de techniques de lymphocytotoxicité dont les limites sont connues aujourd'hui (12).

Les innovations technologiques permettent l'exploration de nouvelles cibles antigéniques, différentes du système HLA (13). Bien qu'il n'y a actuellement pas de lien étiologique clair entre la présence de ces anticorps non-HLA et la survenue de rejet aigu (14) les recommandations internationales considèrent utile désormais d'estimer le risque de cette nouvelle immunisation dans le suivi des patients transplantés (15). Faute d'un niveau de preuve suffisant, leur dépistage en routine avant et/ou après la transplantation reste cependant encore très controversé.

Nous proposons ici d'introduire l'étude que nous menons actuellement à l'Institut de Transplantation d'Urologie et Néphrologie (ITUN), intitulée « L'immunisation prétransplantation contre le récepteur de type 1 à l'angiotensine II(AT1R) est elle un facteur de risque dans l'évolution des patients transplantés rénaux ? » (« Is pre-transplant sensitization against Angiotensin II Type1 Receptor an etiologic factor in the evolution of kidney transplant recipients ? »)(Manuscrit en préparation) en faisant dans une première partie une revue de littérature des anticorps non HLA les plus pertinents

cliniquement, les plus fréquemment identifiés et publiés dans la presse scientifique avec un focus particulier sur les anticorps anti récepteur de type 1 à l'angiotensine II (AT1R). Dans une deuxième partie nous présenterons notre travail actuel sous la forme d'une publication en cours de rédaction.

II Les anticorps non CMH (complexe majeur d'histocompatibilité)

1) L'immunisation non HLA (nHLA)

La première publication décrivant une immunisation nHLA apparaît à la fin des années 70 (16). Les antigènes nHLA les plus ubiquitaires contre lesquels la population est « naturellement » immunisée sont ceux du système ABO des groupes sanguins. La compatibilité ABO reste requise, sauf dérogation, en allo-transplantation à partir de donneurs décédés. Par contre, la greffe ABO incompatible dans le cadre de la greffe à partir de donneur vivant apparenté ou non est aujourd'hui entrée dans la pratique courante grâce à des protocoles de désensibilisation des receveurs permettant d'obtenir de très bons résultats sur le long terme (17).

La technique du cross-match en LCT peut révéler la présence d'autoanticorps, qui reconnaissent probablement des antigènes nHLA du « soi » par des mécanismes qui sont aujourd'hui incomplètement compris. Ils sont potentiellement dirigés contre des antigènes de surface tels que des récepteurs membranaires et sont le plus souvent des IgM. Ils sont éluables par DTT (Dithiothreitol) permettant de dépolymériser les IgM et sont connus pour être non pathogènes(18).

Il a été montré que des anticorps nHLA pouvaient apparaître lors de stimulations immunologiques telle que une infection virale (à CMV par exemple) sans être spécifique d'une cible antigénique précise, mais plutôt de manière polyclonale (19). Le concept d'immunisation s'est pourtant progressivement confirmé par des études en transplantation chez l'animal puis chez l'Homme (9)(10). Les caractéristiques de ces anticorps nHLA, leur développement, leur cible et leur action immunologique restent à ce jour encore incertains. Certains sont similaires à ceux retrouvés dans des maladies auto-immunes comme la sclérodermie (20)(21) ou semblent plus corrélés à l'artériopathie d'allogreffe plutôt qu'avec le rejet aigu (22). In vitro, les études suggèrent que les anticorps nHLA induiraient un phénotype pro-inflammatoire des cellules endothéliales, une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion cellulaire, une activation et une majoration de la migration des lymphocytes T ou des neutrophiles (23), une agrégation plaquettaire avec formation de thrombus (24) ainsi que l'induction de l'apoptose cellulaire (25). Il reste encore incertain que ces anticorps puissent activer le complément. Si la présence de DSA et l'existence de dépôts de C4d sur les biopsies étaient précédemment la signature d'un rejet médié par des anticorps, l'absence de ces 2 marqueurs posait un sérieux problème lorsque l'on évoquait les rejets par anticorps nHLA: cela a longtemps retardé la compréhension des mécanismes immuno-pathologiques de ce type de rejet.

2) Les anticorps anti cellules endothéliales (AECA)

Les cellules endothéliales étant le premier contact entre les cellules de l'immunité et les antigènes du donneur, elles ont été décrites comme cible idéale pour ces anticorps nHLA.

Les lésions histologiques telles que les thromboses ainsi que les lésions endothéliales des micro-vaisseaux, à l'occasion de rejets hyper-aigus, aigus ou chroniques suggèrent le rôle prépondérant de l'endothélium au cours de ces phénomènes immunologiques (26)(27).

Un système antigénique des cellules endothéliales et monocytaires a même été décrit et des anticorps spécifiques ont été associés à des effets délétères dans différents types de greffe: en transplantation cardiaque, pulmonaire ou rénale, les AECA sont liés à une perte précoce de la fonction du greffon et à une diminution de la survie du transplant (28-31). Néanmoins, la raison pour laquelle certains receveurs ne produisent pas d'AECA reste mal comprise et suggère l'existence d'un système non HLA polymorphique (32). De plus nous ne disposons pas actuellement de méthode de routine disponible pour effectuer un cross-match endothélial. L'exploration de ces hypothèses reste complexe du fait de l'hétérogénéité des antigènes des cellules endothéliales, et de la grande distribution du lit vasculaire dans le corps humain. De plus la cytotoxicité de ces anticorps n'est pas élucidée, mais semble ne pas être médiée par le complément (33).

A/ Les anticorps anti HLA non classique: les antis MIC-A et MIC-B

Les antigènes HLA de type non classiques sont un groupe hétérogène d'antigènes issus de gènes polymorphiques. Les gènes de MIC-A et -B (MHC class I-related molecules A and B) sont très proches des gènes du HLA-B sur le chromosome 6. Ces protéines partagent avec les HLA de classe I des homologies structurelles mais ne sont pas associées à une chaîne de β 2-microglobuline. Ils ont un rôle d'immuno-régulation et d'immuno-présentation. A la différence des molécules HLA classiques de classe I, MIC-A ne présente aucun antigène

mais se comporte comme un ligand pour plusieurs cellules de l'immunité comme les cellules naturels killers (NK) porteuses du récepteur NKG2D. Les MIC sont exprimés de manière constitutive sur les cellules épithéliales, comprenant les cellules endothéliales, les fibroblastes gastriques ou cutanés, les cellules dendritiques, les monocytes et sont inductibles sur les lymphocytes T via des sécrétions cytokiniques.

Les anticorps anti MIC-A sont issus de gènes hautement polymorphiques. Ils ont été décrits dans le sérum de patients avec rejet hyper aigu irréversible avec atteinte micro vasculaire ou thrombose aiguë du greffon (34). Ces anticorps ont été élués de pièces histologiques de rein greffés, après un rejet aigu. De plus, il a été montré que l'incubation de pièce de biopsies avec des anticorps anti MIC-A était associée avec une augmentation de l'expression endothéliale de MIC-A et avec une reproduction des lésions de rejet. L'immunisation pré et post transplantation contre MIC-A avec une spécificité anti donneur est statistiquement associée à une moins bonne survie des greffons rénaux (24) (35-37). En transplantation cardiaque, il a été montré que la prévalence des Ac anti MIC-A était significativement plus élevée chez les patients présentant un rejet aigu associé à une augmentation de l'antigène MIC-A dans le greffon cardiaque et à une meilleure évolution des greffons cardiaques associée à l'expression d'une forme soluble de MIC-A (38). Cependant les résultats concernant l'association étiologique des MIC-A avec le devenir des greffons cardiaques restent controversés (39). Les anticorps anti MIC-A induisent également un phénotype pro-thrombotique dans les microvaisseaux en augmentant la synthèse de facteur tissulaire et d'activateur du plasminogène et en diminuant la thrombomoduline. Il ne

semble pas y avoir de mécanisme complément dépendant car la présence d'anticorps anti MIC-A ne s'associe pas à la présence de C4d sur les biopsies de greffon.

Concernant MIC-B, le niveau d'expression, dans les biopsies de greffons rénaux est plus élevé en post-transplantation qu'en pré transplantation (14). Le niveau d'expression de MIC-B est également plus bas dans les biopsies de patients transplantés avec donneur vivant. L'allo-reconnaissance semble exercer une régulation positive sur l'expression de MIC-B, mais à ce jour il n'est pas clairement défini si des anticorps spécifiques apparaissent et quel serait leur rôle.

Malgré tous ces arguments, il n'est pas encore clairement établi qu'une immunisation contre MIC-A ou MIC-B puisse induire des lésions immunologiques en transplantation d'organe. L'hypothèse actuelle serait en faveur d'une action synergique négative des anticorps anti-HLA, anti MIC-A/-B sur les cellules endothéliales plutôt qu'une action propre.

B/ Anticorps anti récepteur type A de l'endothéline (ETAR)

L'endothéline est le plus puissant vasoconstricteur physiologique connu (40). Les endothélines ont deux sous types de récepteurs: type A et B (ETAR et ETBR). Les deux sont présents sur les cellules musculaires lisses, médient la vasoconstriction et induisent aussi une prolifération des cellules musculaires lisses et des signaux inflammatoires. La présence d'anticorps dirigés contre ETAR est liée à une moins bonne survie des transplants rénaux pendant la première année. Dans une étude prospective, Banasik *et al.* ont montré une moins bonne fonction des greffons du groupe anticorps anti ETAR (+) comparé au groupe

anticorps anti ETAR(-) à un mois et à un an de transplantation. Il n'y avait pas de différence sur la survenue des épisodes de rejets aigus (41). Il y a peu de travaux étudiant ce type d'immunisation et sa signification n'est pas cliniquement évidente.

C/Anticorps anti vimentine

La vimentine est une molécule du cytosol des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des cellules rénales (telle que les cellules tubulaire, mésangiales, et stromales) (42). Son expression peut aussi se retrouver sur les leucocytes, les plaquettes et les macrophages activés, ainsi que sur les neutrophiles apoptotiques. En tant que protéine mono morphique commune à tous les êtres humains, elle devrait être tolérée lors du processus de transplantation. Or, son exposition extra cellulaire au système immunitaire, par destruction cellulaire lors de la chirurgie ou lors de rejets chroniques, aboutit à la formation d'anticorps qui peuvent ensuite provoquer d'autres dommages. De plus il a été montré que les anticorps anti vimentine sont capables de fixer le complément (43). Cette protéine du soi se comporte comme un allo-antigène ou comme un déclencheur d'auto-immunité (44).

En transplantation cardiaque, les anticorps anti vimentine sont associés à un plus haut risque de maladie coronarienne (45). Chez des souris greffées cardiaques une immunisation préalable contre la vimentine aboutit à un rejet accéléré. Cela ne survient pas chez des souris déficientes en lymphocytes B mais peut être reproduit par l'injection d'anticorps anti vimentine (43). Les anticorps antivimentine ne provoquent pas de dommage dans les greffons cardiaques syngéniques ou sur les cœurs natifs.

En transplantation rénale, il a été montré un taux significativement plus élevé d'anticorps anti vimentine chez les patients qui avaient rejeté leur greffon comparativement aux patients qui n'avaient pas été greffés. Cependant ici aussi le niveau de preuve reste faible avec chez la majorité des patients la présence concomittante d'anticorps anti HLA (44). Dans l'étude de Besarani *et al.* les patients avec Fibrose interstitielle/Atrophie Tubulaire (FIAT) avaient significativement plus d'IgG anti vimentine que le groupe contrôle (46). Ces résultats soulèvent la question d'une auto-immunité comme déclencheur d'une réponse allo-immune accélérée. De plus, le développement des anticorps anti vimentine semble ne pas être atténué par un traitement par ciclosporine (47). L'action de ces immunoglobulines semble provoquer une apoptose des leucocytes et/ou des plaquettes dont la disposition dans les organes rejetés coïncide avec les dépôts de C4d, soulevant l'hypothèse d'un mécanisme dépendant du complément (48)

D/ Anticorps anti molécules d'adhésion inter-cellulaires

Les molécules d'adhésion intercellulaires (ICAM) ou CD54 sont des molécules d'adhésion avec des résidus polymorphiques, exprimés à la surface de cellules endothéliales. Le ligand de ICAM-1 est l'intégrine LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen 1) présente à la surface des lymphocytes T et B des neutrophiles et des macrophages. L'interaction ICAM-1 – LFA1 joue un rôle clé dans le rejet de greffe en permettant aux lymphocytes de proliférer et de se différencier, en participant à la présentation antigénique, la migration transendothéliale de leucocytes ou encore la lymphocytotoxicité. Il a été montré dans des modèles de cellules ovariennes de hamster transfectées par des variants

polymorphiques de ICAM 1 que des IgM anti ICAM 1 étaient présentes dans le sérum de 34 sur 50 patients greffés cardiaque. Par contre il n'a pas été montré de différence de production d'anticorps anti ICAM, que les patients soient bien matchés ou non pour les différents allèles de cette molécule (49).

E/Anticorps anti héparanes sulfates et perlecan

Les héparanes sulfates sont des protéoglycanes structuraux impliqués dans la maintenance de la filtration glomérulaire et dans la signalisation cellulaire (50). Des anticorps (de type IgG) se liant à une chaîne latérale de l'héparane sont capables d'induire une duplication de la membrane basale glomérulaire, une dysfonction de la filtration et une protéinurie. Ceci est reproductible in vitro (51). La raison pour laquelle des IgG spécifiques apparaissent semble être en lien avec des épisodes immunisants antérieurs : en effet, les patients avec des anticorps anti membrane basale glomérulaire (MBG) semblent avoir un nombre plus important d'épisode de rejet. Dans des modèles murins il a été montré une absence de production d'anticorps anti héparanes sulfates sous traitement par ciclosporine A (52).

Des anticorps anti MBG ciblant des molécules appelées « perlecan » (de la famille des héparanes sulfates) induisent de profond changement dans l'activité biologique de cette molécule. Il a été montré dans des modèles murins que des fragments de perlecans nommés LG3 et relargués lors de l'apoptose de cellules endothéliales, étaient impliqués dans l'induction de formation néointimale (53) et dans l'oblitération microvasculaire (54). Dans une étude cas-contrôle rétrospective, Cardinal *et al.* ont montré chez l'homme une

association statistique entre la survenue de rejets vasculaires aigus, la présence de LG3 urinaire et l'augmentation du taux d'anticorps pré transplantation anti-LG3 entre des groupes avec biopsies normales et biopsies avec score de Banff > I. Ces résultats étaient indépendants de l'immunisation anti HLA (55). De plus, l'injection d'anticorps anti LG3 à un modèle murin de rejet vasculaire aboutissait à une néoformation intinale, sans que les résultats soient significatifs statistiquement.

Il semblerait que la présence d'anticorps anti héparane sulfate, et surtout les antis LG3, agissent comme un catalyseur de l'inflammation vasculaire déclenchée par un phénomène ischémique ou une agression allogénique comme l'on peut voir au cours de transplantation d'organe.

F/ Anticorps anti collagène V

Le collagène V (colV) est une protéine de structure de la matrice intercellulaire. Elle est considérée comme un collagène mineur, intercalé avec des fibrilles de collagène de type I par exemple dans le poumon. Sa localisation est principalement péri-vasculaire ; il est donc considéré comme un antigène caché. Lors de lésions d'ischémie/reperfusion comme lors de la transplantation, cet antigène est relargué dans la cavité alvéolaire du poumon ou dans la circulation sanguine systémique (56). Bien que classiquement décrit comme un collagène interstitiel, un rapport de Haralson *et al.* montre que le colV peut être exprimé par des lignées de cellules épithéliales (57).

Dans un modèle de transplantation syngénique de poumon, le transfert passif d'IgG purifiées, de sérum ou de lymphocytes B purifiés issus de receveurs immunisés contre le ColV a induit des lésions de type rejet. De plus, en transplantation pulmonaire humaine, la présence d'un taux d'anticorps anti colV plus important était associé à une dysfonction primaire du greffon suggérant la présence d'anticorps préformés et d'une possible activation de lymphocytes B mémoires spécifiques chez le receveur (58).

G/ Anticorps anti K- α 1 tubuline

K- α 1 tubulin est une protéine de 50 kDa et polyglycosylée. Elle est impliquée dans la signalisation cellulaire, dans le maintien structurel des microtubules et dans les mouvements intracellulaires basés sur les microtubules. Cette protéine peut atteindre la surface cellulaire et être immunogène dans certaines circonstances.

Goers *et al.* ont montré qu'une large proportion de receveurs (37%) de transplant pulmonaires a développé des anticorps anti K- α 1 tubuline durant la période post transplantation. Ceci est fortement associé avec le développement d'une bronchiolite oblitérante ou un rejet chronique de poumons allogreffés. Ils ont montré que ces anticorps se liant sur les cellules épithéliales augmentaient l'expression de facteurs de transcription de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. Ils semblent être un évènement central dans l'immunopathologie de la bronchiolite oblitérante du transplant pulmonaire. In vitro, la reconnaissance spécifique de l'épithélium pulmonaire par le sérum des patients avec ce type de lésion était évidente alors que ce même sérum ne reconnaissait pas les cellules épithéliales d'origine rénales ou les cellules mononuclées périphériques (porteuses des

spécificités HLA). De plus, le blocage par des anticorps anti K- α 1 tubuline spécifiques inhibait l'immunoréactivité des sérums issus de patients avec bronchiolite oblitérante. Ces observations ont confirmé par la suite que la reconnaissance par le sérum des transplantés pulmonaires de l'épithélium était bien une reconnaissance de la molécule K- α 1 tubuline (59).

Dans une étude publiée en 2014 sur un modèle murin de greffe pulmonaire syngénique, il a été montré qu'une réponse immune contre des antigènes du soi présents dans le poumon, et en absence de toute allo-immunité, pouvait mener à une inflammation et à une fibrose des voies aériennes. La perfusion quotidienne d'anticorps spécifiques de la K- α 1 tubuline, du colV, seul ou en association, et après lésions épithéliales d'origine chirurgicales, provoquaient une forte incidence d'inflammation et de fibrose des voies respiratoires (60).

En transplantation cardiaque, une association significative a été trouvée entre le développement d'anticorps anti HLA, d'anti colV et d'anti K- α 1 tubuline et la survenue de rejets aigus humoraux et de vasculopathie d'allogreffe. Les patients avec un rejet aigu humoral développaient plus d'anticorps anti K- α 1 tubuline, et d'anti colV que les patients sans rejet aigu humoral (61).

H/ Immunisation non HLA : conclusion

Les progrès technologiques de ces dernières années n'ont pas permis de comprendre ni d'éviter la survenue de rejet de greffe sans immunisation HLA prouvée. L'hypothèse d'une immunisation contre une nouvelle classe d'antigène à l'origine de ces rejets non HLA

apparaît probable. Les cibles antigéniques non HLA précédemment décrites ont toutes un rationnel immunologique pouvant être responsables de lésions de rejet aigu ou chronique.

Parmi ces molécules, MIC-A/-B sont probablement celles avec le plus grand nombre d'études. Leurs similitudes avec les molécules HLA en font une cible potentielle pour l'immunisation. L'impact en transplantation apparaît de plus en plus évident et une immunisation contre MIC-A est désormais recherchée en pré-transplantation dans de nombreux centres de greffe de rein, de cœur ou encore de moelle osseuse.

Si l'immunisation contre ETAR n'a pas montré d'impact sur le rejet de rein, la présence de tels anticorps semble toutefois influencer la fonction du greffon rénal dans des études sur l'homme de faibles effectifs. De plus amples recherches sont nécessaires.

Des résultats prometteurs entourent les études sur l'immunisation anti vimentine, notamment en greffe cardiaque. Mais ces études sont principalement faites sur des modèles animaux.

Les autres cibles non HLA décrites ici sont encore du domaine de la recherche, avec peu d'études de grands effectifs en population humaine. Néanmoins elles permettent une meilleure compréhension de ce phénomène nouveau et promettent de nouvelles pistes afin de mieux comprendre des rejets jusqu'alors inexpliqués. On voit apparaître de nouvelles approches telle que la génomique dans l'exploration des rejets comme le propose Sarwal et son équipe dans une étude récente (62). A l'heure actuelle, une limite non négligeable à l'extension des connaissances dans ce domaine, est l'absence de tests commercialisés,

reproductibles et validés pour de nombreux dosage d'anticorps dirigés contre d'encore plus nombreux antigènes.

Une cible antigénique non HLA, explorée dans plusieurs maladies à caractère auto-immun, a fait l'objet depuis dix ans d'une attention particulière de la part de la communauté scientifique. L'étude de l'immunisation contre un récepteur à l'angiotensine a en effet montré d'intéressants résultats en transplantation de rein, avec d'intéressantes ouvertures thérapeutiques.

III Les anticorps anti récepteur de type 1 à l'angiotensine II (AT1R)

1) Le récepteur de type 1 à l'angiotensine II: physiologie et physiopathologie.

AT1R appartient à la super famille des récepteurs couplés à la protéine G (protein-coupled receptor superfamily GPCRs) et comporte une région extracellulaire connectée à une hélice α à sept domaines transmembranaires, chacun étant relié par 3 boucles intra et extracellulaires (63) (figures 1 et 2). Le gène humain de AT1R est localisé sur le chromosome 3 et code 4 exons qui aboutissent à 4 transcrits principaux avec un taux de translation différent et donc un niveau d'expression différent.

Le gène AT1R a 14 polymorphismes décrits. Certains se traduisent par une protéine avec un gain ou une perte de fonction de l'activation du récepteur (64). Le polymorphisme le plus étudié A1166C est associé à une réactivité plus importante à l'angiotensine II et à différentes pathologies cardiovasculaires et rénales (65). Zhang *et al.* ont montré une

association significative entre ce polymorphisme et la survenue de rejets aigus réfractaires aux stéroïdes en transplantation rénale (66).

Le récepteur AT₁R médie la plus part des effets de l'angiotensine II dans les cellules cibles telles que les cellules de l'appareil cardiovasculaire, les cellules rénales, endocrines, ou encore hépatiques. Ces actions sont responsables de la régulation de la pression artérielle, de la balance hydro-électrolytique, de la sensation de soif, de sécrétions hormonales. L'angiotensine II se liant au récepteur AT₁R induit un changement de conformation qui permet une interaction avec les protéines G qui à leur tour déclenchent un signal de transduction via plusieurs systèmes effecteurs membranaires. Une activation par un agoniste divalent, comme un anticorps, a la capacité selon certains auteurs de dimériser et donc stabiliser le récepteur, permettant une activation plus prononcée et prolongée (67).

(Figure 1)

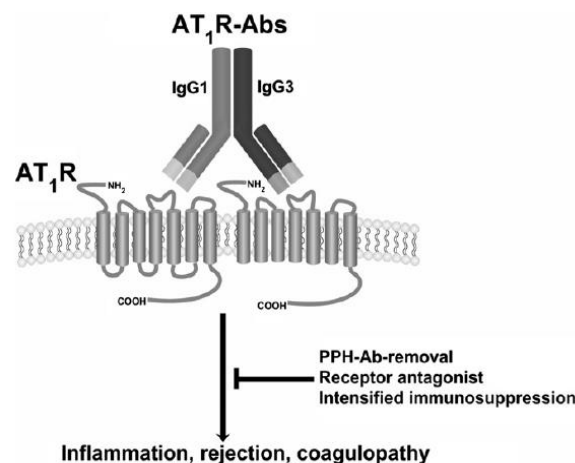


Figure 1 : Dimérisation du récepteur AT₁R par un anticorps

D'après Dragun et al. Human Immunology, 2012

L'activation de AT1R provoque une contraction des cellules musculaires lisses, une sécrétion de stéroïdes et d'aldostérone, une activation neuronale, des transports ioniques, une croissance et une prolifération cellulaire. Le récepteur AT1R est couplé non seulement à une signalisation via une protéine C kinase, mais aussi à des cascades de signalisation intracellulaires qui s'étendent jusqu'en intranucléaire. Ces voies MAPK/ERK régulent la transcription de gènes et l'expression de protéines qui sont impliquées dans la prolifération cellulaire dans plusieurs organes cibles de l'angiotensine II. L'angiotensine II a d'autres actions moins connues : Elle accélère l'hypertrophie des cellules musculaires lisses vasculaires via un mécanisme de stress oxydatif, stimule le relargage de cytokines et l'expression de molécules d'adhésion leucocytaires qui médient une inflammation transmurale vasculaire. Les cellules inflammatoires relarguent des enzymes qui génèrent en retour de l'angiotensine II (telle que l'enzyme de conversion de l'angiotensinogène ACE) : il y a donc un rétrocontrôle positif local (68). L'angiotensine II induit donc une dysfonction endothéliale et active l'expression de phénotypes proinflammatoires des cellules musculaires lisses (69). Ceci pouvant être accompagné par des anomalies de la coagulation : En effet la liaison du AP-1 et NF- κ B au facteur tissulaire, provoque une augmentation de la synthèse du facteur tissulaire et forme avec le facteur VII un complexe enzymatique capable d'initier la voie extrinsèque de la coagulation. Or il a été montré que la liaison sur AT1R, via les voies ERK1/2, active la synthèse de NF- κ B, stimule l'expression de VCAM et le relargage de cytokines telle que l'interleukine IL6 (70) ou le Tumor necrosis Factor- α (TNF- α) (71). De plus le blocage de AT1R réduit significativement le taux d'interferon-gamma in vitro et in vivo (72).

L'ensemble de ces données semblent donc montrer que l'angiotensine II se liant à AT1R se comporterait comme une cytokine proinflammatoire.

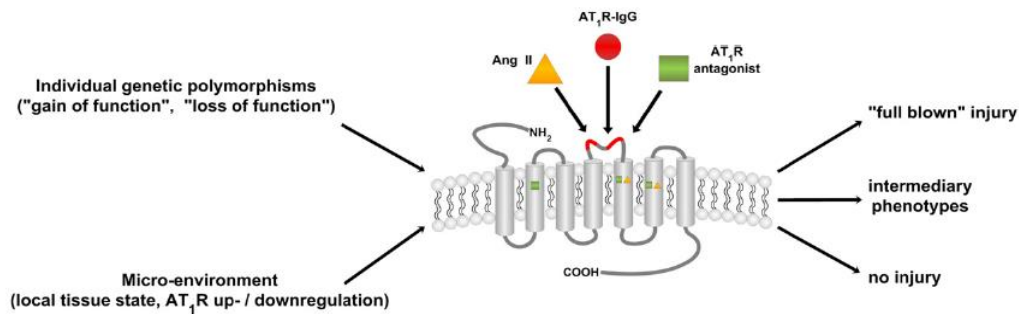


Figure 2: Les facteurs biologiques et génétiques interférants de manière complexe avec l'activité de AT1R selon Dragun et al, human immunology, 2012

2) Les anticorps anti AT1R

La communauté scientifique a porté son attention sur le versant immunitaire de pathologies mimant les effets de l'angiotensine. Par intérêt pour des pathologies impliquant une élévation de la pression artérielle, d'anomalies vasculaires, de dysfonction rénale de la balance hydrosodée ou une anomalie de la coagulation, les patients avec de tels symptômes ont été explorés. Les anticorps anti AT1R ont été pour la première fois décrits dans des maladies comme la pré-éclampsie, l'hypertension essentielle ou la sclérodémie systémique.

A/ L'exemple de la pré-éclampsie

Le système rénine angiotensine aldostérone (RAAS) a été impliqué dans la pathogénèse de la pré-éclampsie (73). Au-delà de la dysrégulation de la concentration plasmatique en rénine et de l'activité rénine plasmatique, le taux d'angiotensine II est augmenté au cours d'une grossesse normale. Au contraire, les patientes avec pré-éclampsie

sont plus sensibles à l'angiotensine II alors que leur taux circulant est diminué par rapport aux patientes sans pathologie de la grossesse (74). La dysrégulation du RAAS lors d'une pré-éclampsie est liée à la présence d'anticorps agonistes anti AT1R dans la circulation des patients pré-éclamptiques.

Les immunologistes de la reproduction postulent que le premier événement de la pré-éclampsie est une réduction de la perfusion placentaire qui aboutit à une hypertension, des lésions des microvaisseaux et à une activation du complément par des mécanismes non élucidés pour le moment. L'hypothèse est qu'il existe une médiation humorale des lésions microvasculaires placentaires réduisant le débit sanguin intra placentaire (75). Ils ont identifié des auto anticorps (IgG1 et IgG3) capables de reconnaître une séquence de sept acides aminés présents sur la seconde boucle extracellulaire d'AT1R (76)(77). La présence de cet anticorps sérique, dans un test fonctionnel, a montré qu'il pouvait stimuler la contraction spontanée des cardiomyocytes néonataux de rats (78), permettant une mesure semi-quantitative par la pulsatilité de ces cellules par rapport à des témoins sans anticorps. Il a par ailleurs été montré que le transfert d'anticorps anti AT1R purifiés chez des rongeurs en gestation pouvait induire un phénotype de pré-éclampsie avec hypertension, protéinurie, endothéliose glomérulaire, anomalies placentaires et retard de croissance intra-utérin (79). Le taux d'anticorps corrélait avec la sévérité de la maladie (80) et ceci était prévenu par l'administration d'antagonistes de AT1R (81). L'injection d'anticorps anti AT1R purifié à une souris non gestante provoquait tout de même une hypertension mais pas d'anomalie de la filtration glomérulaire comme chez la souris gestante. Ces résultats indiquent qu'un facteur anti-angiogénique produit par le placenta est délétère pour la fonction endothéliale rénale

entraînant une endothéliose glomérulaire et une protéinurie. Ce facteur est la forme soluble de FLT1. Les effets hypertensifs des anticorps anti AT1R en l'absence de grossesse sont conformes avec la contribution des anticorps dans les maladies comme l'hypertension essentielle ou maligne (79).

B/ Le modèle de l'hypertension

L'hypertension idiopathique touche plusieurs million de personnes. L'implication du RAAS est désormais évidente. C'est pourquoi l'utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) ou d'antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II (ARAI), est une approche thérapeutique très fréquente. L'observation d'un titre d'anti AT1R plus élevé dans le sérum de patients avec une HTA réfractaire (selon les définitions de la WHO-ISH) que dans le sérum de patients avec HTA non réfractaire ou de patients normo-tendus supporte l'hypothèse d'une étiologie auto immune (figure 3)(82). Le taux d'anticorps anti AT1R chez les patients avec une hypertension essentielle, dépendant du niveau de positivité choisi, s'étend de 48% à 69% avec augmentation de la pression artérielle, selon des études récentes (83). Chez ces patients, l'efficacité des ARAII est meilleure que celle des IEC dans la baisse la pression artérielle, soulignant la contribution probable de AT1R dans cette pathologie (84). Aujourd'hui, les explorations d'ordre immunologique restent rares lors de la découverte d'une HTA essentielle refractaire.

A Association With Level of AT ₁ -AAs and Blood Pressure			
	N	AT ₁ -AA(+), N (%)	P Value
Normotensive subjects	224	51 (22.76)	0.0001 ^a
Patients with EH			
Grade 1	145	75 (51.72)	0.027 ^b
Grade 2	152	90 (59.21)	
Grade 3	97	67 (69.07)	
Total	394	232 (58.88)	

Abbreviations: AT₁-AA, autoantibody against AT₁-receptor; EH, essential hypertension. ^aComparisons between EH patients and normotensive subjects. ^bComparisons between groups of different blood pressure grades in EH.

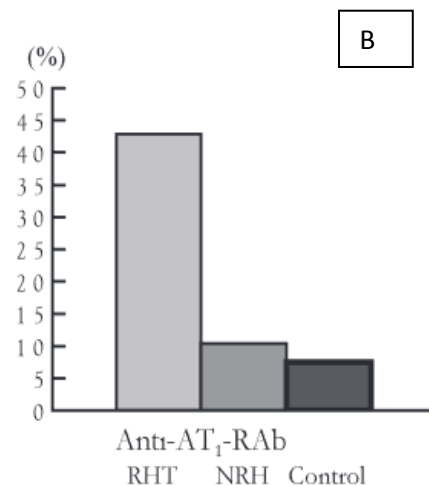


Figure 3: Anticorps anti AT₁R et hypertension artérielle essentielle et réfractaire

Selon Liao et al. *Hypertens*, 2002

A : comparaison entre les patients normo tendus et les patients avec hypertension essentielle : Les patients avec une hypertension essentielle avaient un taux de AT₁R (défini selon le ratio de densité optique positif/négatif > 2,1) plus élevé ($p=0,0001$). Plus le grade d'hypertension augmentait plus le taux d'anti AT₁R retrouvé était élevé. ($p<0,027$)

B : comparaison du taux d'anticorps anti AT₁R chez les patients avec HTA réfractaire (RHT) et non réfractaire (NRH) et non hypertendu (contrôle). La fréquence des anticorps anti AT₁R dans le groupe RHT était plus élevée dans le groupe RHT que dans les 2 autre groupe ($p<0,01$)

C/ Le modèle de la sclérodermie

La sclérodermie est une maladie endothéliale autoimmune, avec des anomalies des microvaisseaux aboutissant à une fibrose cutanée, des ulcérations digitales, des atteintes cardiaques, rénales secondaires à l'hypertension. Les IEC, ARAII ou les antagonistes de l'endothéline sont des options thérapeutiques majeures dans le traitement de cette maladie. Dragun et al. ont montré que la proportion de patients positifs aux anticorps anti AT₁R était

plus importante dans la population de patients sclérodermiques que dans une population saine. Comme évoqué précédemment, la stimulation de ces récepteurs induit une activation de ERK1/2, puis du TGF β et finalement de la synthèse de collagène par les fibroblastes. Ces effets étaient inhibés par un blocage de AT1R, appuyant l'hypothèse d'une médiation par des anticorps du phénomène. Un taux élevé d'anticorps anti AT1R était associé à un phénotype plus sévère de la maladie avec une hypertension pulmonaire, une fibrose pulmonaire, des ulcérations digitales. Selon ces auteurs, les anticorps anti AT1R et anti ETAR peuvent contribuer à la pathogénèse de cette maladie (20)(85).

D/ Pourquoi ces anticorps apparaissent-ils?

Les mécanismes par lesquels les anticorps dirigés contre AT1R apparaissent ne sont pas encore entièrement compris. Deux hypothèses principales sont proposées. Un mimétisme antigénique pourrait provenir d'une infection par le parvovirus B19 humain (PvB19). En effet, le PvB19 partage avec AT1R des homologies protéiques sur sa capside (86). Mais les résultats sont discordants. Les données épidémiologiques montrent qu'il n'y a pas de taux d'immunisation plus important chez les patientes pré-éclampsiques par exemple.

La seconde hypothèse est que le système immunitaire a parfois des pertes de tolérance vis à vis de protéine du soi. C'est probablement le *primum movens* des maladies auto immunes. Il arrive relativement souvent qu'une protéine subisse une modification post-translationnelle aboutissant à une modification mineure de la conformation sans perte de fonction. Cela suffit à « rompre la tolérance » et à provoquer une reconnaissance par le

système immunitaire, une présentation antigénique aux lymphocytes B et T auxiliaires pour finalement déclencher la synthèse d'anticorps spécifiques. Un état pro inflammatoire est connu pour contribuer à la production de néoantigènes.

E/ La détection des anticorps anti AT1R

La première technique de mesure des anticorps anti AT1R était un bio-test fonctionnel qui impliquait des cardiomyocytes néonataux de rats spontanément pulsatiles et exprimant AT1R. Il y a une relation dose dépendante linéaire entre la concentration d'IgG ou d'angiotensine II activatrice et la pulsatilité spontanée de ces cellules. Pour étudier la spécificité de AT1R, les cellules stimulées par des IgG étaient traitées par un AT1R bloqueur ou un antagoniste du récepteur à l'angiotensine II (78).

Puis un test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) a été développé avec des extraits de cellules ovariennes de hamster chinois transfectées (chinese Hamster ovary) avec le gène de l'AT1R humain. Cet ELISA a une spécificité de 100%, une sensibilité de 88% comparativement au bio-test avec cardiomyocytes. La variabilité inter test est de 12% (87). Il y a désormais un kit ELISA commercialisé pour une détermination quantitative du titre d'anticorps anti AT1R (Onelambda®, inc. CA, USA) (figure 4).

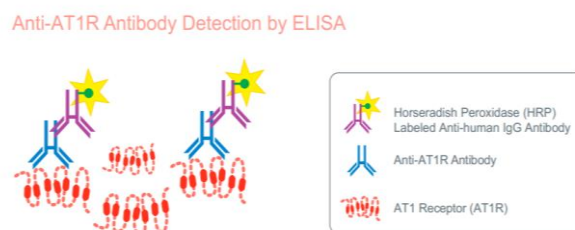


Figure 4: *Détection par ELISA des anticorps anti AT1R selon Onelambda®*

IV Les anticorps anti AT1R en transplantation d'organe solide

1) En transplantation rénale

Le transfert des connaissances concernant les anticorps anti AT1R depuis la maladie prééclampsique vers la transplantation d'organe solide émane de l'observation d'une patiente de l'hôpital de la Charité à Berlin (Allemagne) allogreffée d'un rein sans mismatch HLA et présentant au 7^{ème} Jour post transplantation un rejet aigu vasculaire réfractaire aux stéroïdes, avec une hypertension maligne, des convulsions. Cette patiente avait dans ses antécédents une grossesse compliquée de pré-éclampsie. Plus tard, Dragunet *al.* ont rapporté 9 patients avec des rejets similaires, parmi lesquels 4 avaient eu des convulsions, sans aucun anticorps anti HLA détectable. Le sérum de ces patients avaient la capacité de stimuler la contractilité des cardiomyocytes néonataux contrairement au sérum des patients avec un rejet mais non réfractaire aux stéroïdes (88). Puis ces observations ont été confirmées chez 16 autres patients avec un rejet vasculaire réfractaire sans anticorps anti HLA et dont le sérum présentait un titre élevé d'anticorps anti AT1R mesuré par bio-test (78). Des thérapies déplétantes en anticorps telle que la plasmaphérèse et les immunoglobulines polyvalentes associées à des antagonistes de AT1R comme le losartan ont montré un bénéfice en terme de survie des greffons.

Des modèles animaux ont étayé ces premières observations. La greffe de rein dans le modèle de rat «Fischer 344-sur-Lewis » a été utilisé pour tester les effets physiologiques d'une perfusion d'anticorps anti AT1R une semaine après une transplantation rénale. Les reins des animaux expérimentaux ont montré des signes d'artérite, des infiltrats intra

vasculaires et des lésions de rejet aigu vasculaire. Les transplants des animaux contrôles perfusés avec des IgG polyvalentes ont seulement montré une activation endothéliale. Les anticorps anti AT1R n'avaient aucun effet sur les reins natifs des rats uni-néphrectomisés. La transplantation d'un rein non natif chez un receveur apparaissait comme un facteur de sensibilisation aux effets des anticorps anti AT1R (78). (Figure 5)

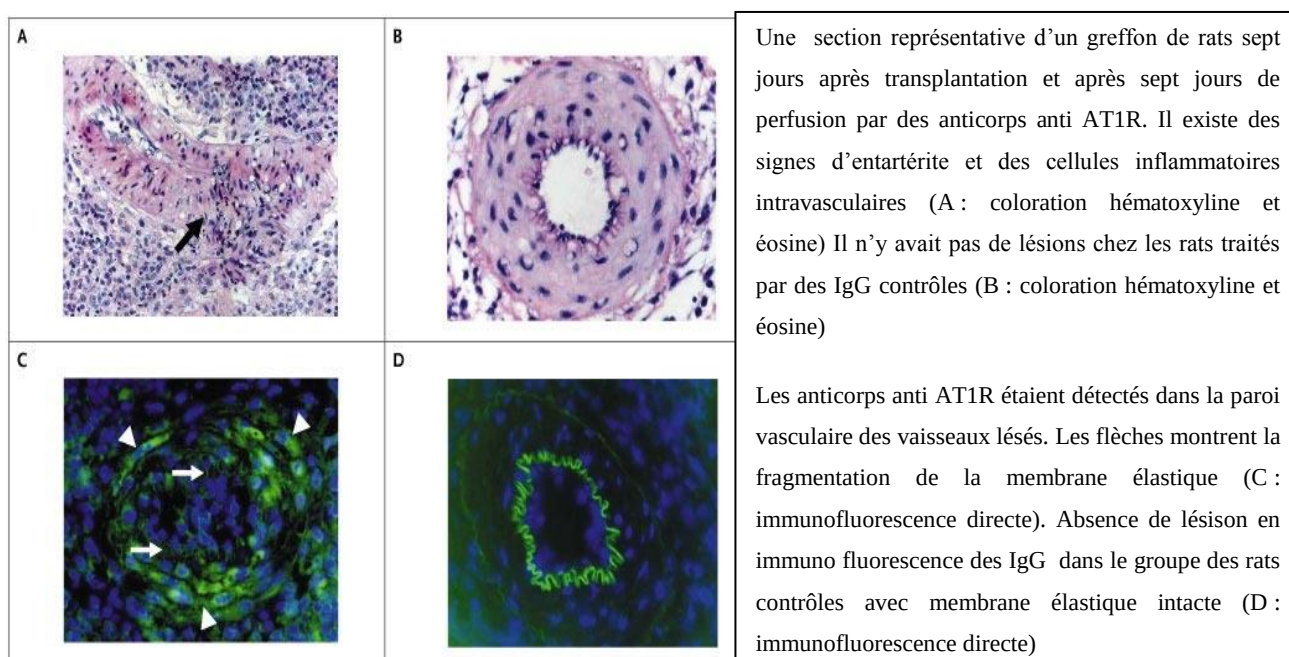


Figure 5: *Induction de rejet aigus vasculaires chez des rats transplantés traité par des IgG humaine anti AT1R et immunofixation sur les IgG humaine anti AT1R dans la media des vaisseaux lésés selon Dragun et al. NEJM, 2005*

Plus récemment, il a été montré sur une cohorte de 63 receveurs de greffe de rein, ne présentant ni anticorps anti HLA spécifiques du donneur (DSA : donor specific antibodies) ni anti MIC-A avant la transplantation et au jour du rejet aigu que 16 patients avaient présenté un rejet aigu dont 7 avec un rejet aigu humoral (RHA) et 9 avec un rejet cellulaire (RAC). La présence d'anticorps anti AT1R à un taux $> 17\text{U/mL}$ était identifiée chez 6 des 7 patients avec un RHA et pour aucun des 9 patients avec un RAC ($p=0,0009$). Seuls quelques patients avaient des dépôts de C4d sur leur biopsie (89). Depuis 2013, des études de plus grandes ampleurs ont montré d'intéressantes corrélations entre la présence d'un taux élevé d'anticorps anti AT1R et le devenir des greffons rénaux. En effet, nous avons montré à l'ITUN (87) en 2013 que dans une cohorte de 599 patients transplantés rénaux, 10% des patients présentaient un épisode de rejet aigu cliniquement prouvé et traité. L'immunisation anti AT1R $> 10\text{U/mL}$ en pré-transplantation augmentait significativement le risque de rejet aigu d'un facteur 2 dans les 4 premiers mois de transplantation. Les patients avec des anticorps anti AT1R $> 10\text{U/mL}$ avaient aussi 2,6 fois plus de risque de perdre leur greffon après 3 ans de transplantation (87). Mais la survenue d'un rejet aigu et la perte de fonction de greffon sont 2 événements compétitifs, le rejet notamment humoral, étant un facteur de risque majeur de perte des greffons. Utilisant la même cohorte rétrospective, une seconde analyse utilisant une modélisation biostatistique multi-état pour prendre en compte la compétition entre le rejet aigu et la perte des greffons a été réalisée. Cette seconde étude a montré qu'il existait une corrélation significative entre le taux d'anticorps anti AT1R en pré-transplantation $> 10\text{U/mL}$ et le risque d'échec de greffe et de passer par un état de rejet aigu cliniquement parlant et en « intention de traiter » (90). Malgré une

large cohorte, les résultats étaient à interpréter avec prudence car il y avait de nombreuses limites dans ces 2 premières observations : 1) Il s'agissait d'une cohorte historique de patients greffés entre 1997 et 2006. L'immunisation pré transplantation était alors évaluée par PRA historique et du jour par la technique de lymphotoxicité dépendante du complément (complement dependant cytotoxicity). Le taux de rejet était relativement bas (10%). De plus, si les patients n'avaient pas de rejet aigu clinique, ils pouvaient avoir un rejet infraclinique, non détecté en l'absence de biopsies systématiques de surveillance.

A la même période, Taniguchi *et al.* ont comparé 134 patients avec une biopsie de greffon rénal anormale (lésions de rejet ou autre) et 217 patients sans indication de biopsie. Il a montré que les patients avec une biopsie anormale avaient un taux d'anticorps anti AT1R significativement plus élevé que le groupe contrôle (18% *versus* 6%, $p < 0,001$) et un lien significatif entre les anticorps anti AT1R, spécialement *de novo*, et la perte de fonction du greffon après diagnostic d'une biopsie anormale (figure 6). Une survie moindre des greffons des patients ayant développé à la fois des DSA et des anticorps anti AT1R suggèrent l'action synergique négative des anticorps anti HLA et non HLA sur le devenir du greffon rénal (figure 7). Cette étude ne montrait aucune corrélation entre le taux pré-transplantation d'anticorps anti AT1R et la survie du greffon rénal. Les anticorps évoluaient selon différents modèles avec des augmentations en pré ou post transplantation, avant ou après les DSA, soulignant le fait qu'actuellement la physiopathologie des anticorps anti AT1R reste mal comprise (91).

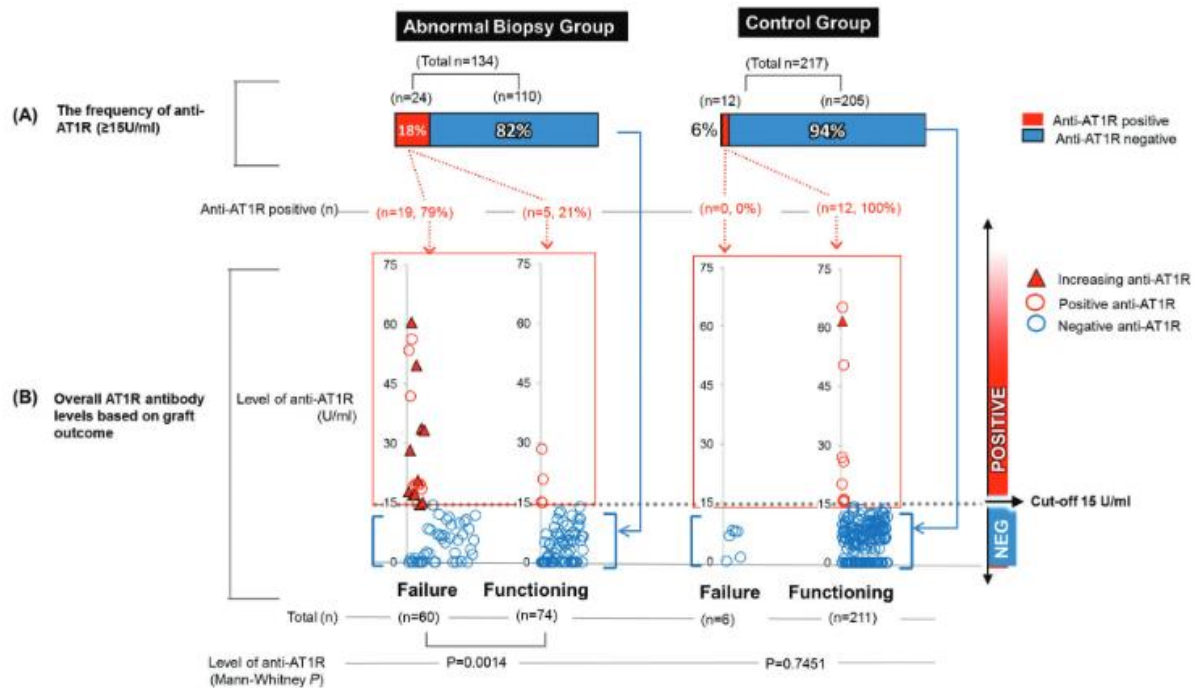
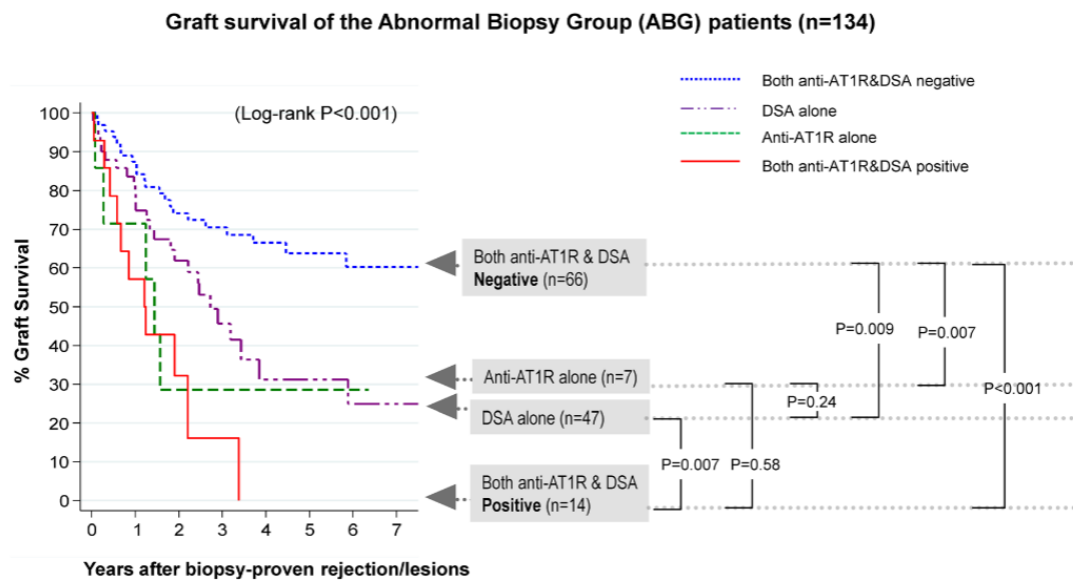


Figure 6: comparaison du niveau d'anticorps anti AT1R entre les patients avec perte de fonction du greffon et patients avec greffon fonctionnel. D'après Taniguchi et al., AJT, 2013

-(A) : dans le groupe avec biopsies anormales, le taux d'anticorps anti AT1R positif est de 18% (24/134). Parmi ces patients, 79% (n=19) ont perdu leur greffon alors que 21% seulement ont maintenu une fonction correcte. Dans le groupe contrôle, sans anomalie à la biopsie, seulement 6% (12/217) avait des anticorps anti AT1R positifs et tous ont maintenu une fonction du greffon correcte.

-(B) Parmi les patients avec biopsies anormales, des taux significativement plus haut d'anticorps anti AT1R ont été observés dans le groupe ayant perdu son greffon comparativement aux patients avec greffon fonctionnel (test de Mann-whitney, $p=0,0014$).



ABG : groupe des biopsies anormales DSA : Donor spécifique antibody

Figure 7 : Courbes de Kaplan-Meier de la survie des greffons basées sur la présence de DSA et/ou d'anticorps anti AT1R chez des patients avec biopsies anormales (n=134)

d'après Tanguchi et al., AJT, 2013

Les patients sans DSA ni anticorps anti AT1R avaient la meilleure survie de greffon. Les patients développant DSA et anticorps anti AT1R avaient la survie de greffon la plus basse (log-rank $< 0,001$). La survie des greffons en présence de DSA et d'anticorps anti AT1R était significativement plus basse que celle du groupe avec des DSA seuls ($p=0,007$)

Banasik et al. confirmaient dans une cohorte de 117 patients greffés en 2011 et 2012 une association statistique entre les anticorps anti AT1R $> 9\text{U/mL}$ (23% de la cohorte) et la moins bonne survie rénale à un an post transplantation. Chaque sérum était dépisté de manière prospective pour les anticorps anti AT1R avant la chirurgie, et au 1^{er}, 3^{ème}, 6^{ème} et 12^{ème} mois post transplantation (92). Les données étaient ajustées sur les facteurs de confusions principaux comme l'immunisation HLA, l'âge, le genre, l'ischémie froide. Comme Giral et al. mais contrairement à Taniguchiet al., Banasik et al. observaient un taux

significativement plus bas d'anticorps anti AT1R après la transplantation. De plus, tous les patients avec un rejet aigu et des anticorps anti AT1R > 9U/mL avaient un taux d'anticorps plus bas à la date de la biopsie. Cette singularité a été observée dans les études sur l'immunisation anti HLA et pourrait être en rapport avec une possible adsorption des anticorps dans le greffon.

D'autres centres de transplantation ont leur propre observation dans des cohortes plus petites et appuient l'hypothèse d'un rôle physiopathologique des anticorps anti AT1R dans la survie des greffons rénaux (93)(94).

2) Mécanismes des lésions des greffons

Comme vu précédemment, l'activation de AT1R aboutit non seulement aux effets de l'angiotensine mais aussi à un phénotype inflammatoire des cellules. Les immunoglobulines type IgG, en tant que molécules divalentes, provoquent une dimérisation du récepteur, ce qui potentialise ses effets(67). Le plus faible taux d'anticorps anti AT1R circulant après la greffe pourrait potentiellement s'expliquer par une adsorption des Ig dans le greffon rénal. Les IgG1 et IgG3 sont connues pour fixer le complément. Si le dépôt de C4d est la signature du rejet humoral aigu, Dragun *et al.* ainsi que Reinsmoen *et al.* ont remarqué un plus faible taux de dépôts de C4d au niveau des biopsies (89)(95). Le mécanisme de cytotoxicité des cellules vasculaires semblerait être lié *a priori* à la régulation de l'expression de certains gènes lors de l'activation de AT1R plutôt qu'à un mécanisme complément dépendant lié aux anticorps. D'autres mécanismes non complément dépendants peuvent intervenir dans la

lyse cellulaire, comme par exemple par le récepteur Fc à la surface des cellules NK et des macrophages. Cependant il y a peu de preuves que ce mécanisme soit à l'origine de rejets aigus (96). Donc, par une activation de AT1R, une cytotoxicité médiée par une possible action complément dépendante ou cellulaire, l'inflammation est entretenue localement. Il est aujourd'hui évident qu'un environnement inflammatoire favorise les lésions infligées par les DSA sur le greffon et permet une action synergique avec d'autres anticorps tels les anticorps anti AT1R. Ces mécanismes physiopathologiques impliquent que les anticorps anti AT1R seraient plutôt responsables d'une vasculopathie chronique que d'un rejet aigu humoral.

3) Les anticorps anti AT1R dans les autres types de transplantation d'organes solides

Les anticorps anti AT1R sont aussi étudiés dans d'autres types de transplantations. En 2014, Reismoen *et al.* ont montré une action synergique de DSA *de novo* et des anticorps anti AT1R > 12 U/mL sur la survie sans rejet aigu (cellulaire ou humoral) comparativement aux autres paramètres seuls chez des patients transplantés cardiaques (97). Hiemann *et al.* ont rapporté un niveau élevé d'anticorps anti AT1R et anti ETAR, corrélant avec des rejets aigus cellulaires ou humoraux à l'origine de microvasculopathies et de vasculopathies épiscopardiques à un an post transplantation (22). Jusqu'à ce jour, il n'y a pas de preuve que l'immunisation contre AT1R ait un impact dans d'autre type d'allogreffe d'organe que la transplantation rénale.

V Conclusion

L'immunisation anti HLA n'est pas une raison suffisante pour expliquer une partie des rejets de greffons qui échappent encore à notre contrôle malgré des progrès technologiques dans la détection des anticorps et de plus fortes thérapies immunosuppressives. Comme nous l'avons montré dans cette revue de littérature, les anticorps non HLA sont aujourd'hui une des alternatives pour comprendre certaines pertes chroniques de greffons. La plupart de ces anticorps nécessitent des études supplémentaires pour approfondir leur rôle étiologique et physiopathologique ainsi que leur significativité clinique en transplantation. Actuellement, seule l'immunisation contre les MICA et l'AT1R ont atteint des niveaux de preuve suffisants pour commencer à envisager leur entrée dans la pratique clinique. Plus particulièrement les Ac anti AT1R seraient des candidats pertinents avec les caractéristiques suivantes :

1/ Les anticorps sont décrits dans la circulation systémique de patients avec des désordres tensionnels

2/ Ces anticorps contribuent à la physiopathologie de ces maladies.

3/ Un taux d'anticorps plus élevé est corrélé à une sévérité plus importante de la maladie.

4 / L'utilisation de molécules bloquant ou supprimant ces anticorps ont un effet thérapeutique.

5/ Ces anticorps apparaissent avant ou au moment des symptômes cliniques et donc peuvent être des biomarqueurs dans les maladies dysimmunitaires.

6/ Les preuves d'une action synergique avec les DSA sont fortes.

Depuis quelques années, la détection des anticorps anti AT1R est facilement accessible, en termes de technologie (ELISA commercialisé) ou de coût. De plus, des thérapeutiques non invasives et bon marché comme les antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II pourraient être des moyens aisés de prévenir de telles lésions de greffons.

A ce jour, pour promouvoir le dosage en routine des anticorps anti AT1R, il manque une large étude prospective avec une évaluation « moderne » de l'immunisation anti HLA (Luminex®) pour confirmer la corrélation clinique des anticorps anti AT1R avec la survenue de rejet aigu et/ou de perte chronique des greffons et confirmer son potentiel apport dans la pratique clinique de routine pour améliorer les pratiques médicales. C'est l'objectif principal de l'étude présentée dans ce travail de thèse. Ce travail est présenté sous la forme d'un article en cours de préparation.

NB : Nous avons été confrontés à de nombreuses difficultés techniques qui ont considérablement retardé l'obtention de résultats pertinents sur ce travail multicentrique de grande ampleur (plus de 900 patients inclus). De nombreux écueils subsistent à ce jour et nous travaillons à les résoudre. Certains résultats du travail présenté ici sont encore très préliminaires et leur interprétation doit être faite avec précaution.

Bibliographie

1. Garcia GG, Harden P, Chapman J, World Kidney Day Steering Committee 2012. The global role of kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* août 2013;28(8):e1 - 5.
2. Chantrel F, de Cornelissen F, Deloumeaux J, Lange C, Lassalle M, registre REIN. [Survival and mortality in ESRD patients]. *Néphrologie Thérapeutique.* sept 2013;9 Suppl 1:S127 - 37.
3. Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI, Mizutani K, Moreau A, Meurette A, et al. Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol JASN.* sept 2005;16(9):2804 - 12.
4. Lefaucheur C, Loupy A, Vernerey D, Duong-Van-Huyen J-P, Suberbielle C, Anglicheau D, et al. Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study. *Lancet.* 26 janv 2013;381(9863):313 - 9.
5. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol JASN.* août 2010;21(8):1398 - 406.
6. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen J-P, Mooney N, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med.* 26 sept 2013;369(13):1215 - 26.
7. Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* févr 2012;12(2):388 - 99.
8. Sumitran-Karuppan S, Tyden G, Reinholt F, Berg U, Moller E. Hyperacute rejections of two consecutive renal allografts and early loss of the third transplant caused by non-HLA antibodies specific for endothelial cells. *Transpl Immunol.* déc 1997;5(4):321 - 7.
9. Opelz G, Collaborative Transplant Study. Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. *Lancet.* 30 mai 2005;365(9470):1570 - 6.
10. Scalea JR, Villani V, Gillon BC, Weiner J, Gianello P, Turcotte N, et al. Development of antidonor antibody directed toward non-major histocompatibility complex antigens in tolerant animals. *Transplantation.* 15 sept 2014;98(5):514 - 9.
11. Cecka JM. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry--ten years of kidney transplants. *Clin Transpl.* 1997;1 - 14.
12. Terasaki PI. Deduction of the fraction of immunologic and non-immunologic failure in cadaver donor transplants. *Clin Transpl.* 2003;449 - 52.

13. Zhang Q, Reed EF. Non-MHC antigenic targets of the humoral immune response in transplantation. *Curr Opin Immunol.* oct 2010;22(5):682 - 8.
14. Dragun D. Humoral responses directed against non-human leukocyte antigens in solid-organ transplantation. *Transplantation.* 27 oct 2008;86(8):1019 - 25.
15. Tait BD, Süsal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FHJ, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation.* 15 janv 2013;95(1):19 - 47.
16. Opelz G, Territo MC, Gale RP, Sparkes R. Sensitization against non-HLA antigens following bone marrow graft rejection. *Tissue Antigens.* avr 1977;9(4):209 - 19.
17. Muramatsu M, Gonzalez HD, Cacciola R, Aikawa A, Yaqoob MM, Puliatti C. ABO incompatible renal transplants: Good or bad? *World J Transplant.* 24 mars 2014;4(1):18 - 29.
18. Taylor CJ, Chapman JR, Ting A, Morris PJ. Characterization of lymphocytotoxic antibodies causing a positive crossmatch in renal transplantation. Relationship to primary and regrant outcome. *Transplantation.* déc 1989;48(6):953 - 8.
19. Toyoda M, Petrosian A, Jordan SC. Immunological characterization of anti-endothelial cell antibodies induced by cytomegalovirus infection. *Transplantation.* 15 nov 1999;68(9):1311 - 8.
20. Riemekasten G, Philippe A, Näther M, Slowinski T, Müller DN, Heidecke H, et al. Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 3 janv 2011;70(3):530 - 6.
21. Holmén C, Christensson M, Pettersson E, Bratt J, Stjärne P, Karrar A, et al. Wegener's granulomatosis is associated with organ-specific antiendothelial cell antibodies. *Kidney Int.* sept 2004;66(3):1049 - 60.
22. Hiemann NE, Meyer R, Wellnhofer E, Schoenemann C, Heidecke H, Lachmann N, et al. Non-HLA antibodies targeting vascular receptors enhance alloimmune response and microvasculopathy after heart transplantation. *Transplantation.* 15 nov 2012;94(9):919 - 24.
23. Ehrnfelt C, Serrander L, Holgersson J. Porcine endothelium activated by anti-alpha-GAL antibody binding mediates increased human neutrophil adhesion under flow. *Transplantation.* 15 oct 2003;76(7):1112 - 9.
24. Sumitran-Holgersson S, Wilczek HE, Holgersson J, Söderström K. Identification of the nonclassical HLA molecules, mica, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. *Transplantation.* 27 juill 2002;74(2):268 - 77.
25. Le Bas-Bernardet S, Hourmant M, Coupel S, Bignon J-D, Souillou J-P, Charreau B. Non-HLA-type endothelial cell reactive alloantibodies in pre-transplant sera of kidney recipients trigger apoptosis. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* févr 2003;3(2):167 - 77.

26. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, et al. Banff 07 Classification of Renal Allograft Pathology: Updates and Future Directions. *Am J Transplant*. 1 avr 2008;8(4):753- 60.
27. Sis B, Mengel M, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, et al. Banff '09 Meeting Report: Antibody Mediated Graft Deterioration and Implementation of Banff Working Groups. *Am J Transplant*. 1 mars 2010;10(3):464- 71.
28. Sun Q, Liu Z, Chen J, Chen H, Wen J, Cheng D, et al. Circulating anti-endothelial cell antibodies are associated with poor outcome in renal allograft recipients with acute rejection. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. sept 2008;3(5):1479- 86.
29. Dunn MJ, Crisp SJ, Rose ML, Taylor PM, Yacoub MH. Anti-endothelial antibodies and coronary artery disease after cardiac transplantation. *Lancet*. 27 juin 1992;339(8809):1566- 70.
30. Magro CM, Klinger DM, Adams PW, Orosz CG, Pope-Harman AL, Waldman WJ, et al. Evidence that humoral allograft rejection in lung transplant patients is not histocompatibility antigen-related. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. oct 2003;3(10):1264- 72.
31. Piotti G, Palmisano A, Maggiore U, Buzio C. Vascular endothelium as a target of immune response in renal transplant rejection. *Front Immunol*. 2014;5:505.
32. Canet E, Devallière J, Gérard N, Karam G, Giral M, Charreau B, et al. Profiling posttransplant circulating antibodies in kidney transplantation using donor endothelial cells. *Transplantation*. 15 févr 2012;93(3):257- 64.
33. Diuvestijn AM, Derhaag JG, van Breda Vriesman PJ. Complement activation by anti-endothelial cell antibodies in MHC-mismatched and MHC-matched heart allograft rejection: anti-MHC-, but not anti non-MHC alloantibodies are effective in complement activation. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2000;13(5):363- 71.
34. Luo L, Li Z, Wu W, Luo G, Xu C, Sun Z, et al. Role of MICA antibodies in solid organ transplantation. *Clin Transplant*. févr 2014;28(2):152- 60.
35. Zou Y, Stastny P, Süsal C, Döhler B, Opelz G. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med*. 27 sept 2007;357(13):1293- 300.
36. Terasaki PI, Ozawa M, Castro R. Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. févr 2007;7(2):408- 15.
37. Mizutani K, Terasaki P, Rosen A, Esquenazi V, Miller J, Shih RNJ, et al. Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. sept 2005;5(9):2265- 72.
38. Suárez-Alvarez B, López-Vázquez A, Díaz-Molina B, Bernardo-Rodríguez MJ, Alvarez-López R, Pascual D, et al. The predictive value of soluble major histocompatibility complex class I chain-related molecule A (MICA) levels on heart allograft rejection. *Transplantation*. 15 août 2006;82(3):354- 61.

39. Smith JD, Brunner VM, Jigjidsuren S, Hamour IM, McCormack AM, Banner NR, et al. Lack of effect of MICA antibodies on graft survival following heart transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* août 2009;9(8):1912-9.
40. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 31 mars 1988;332(6163):411-5.
41. Banasik M, Boratyńska M, Kościelska-Kasprzak K, Krajewska M, Mazanowska O, Kamińska D, et al. The impact of non-HLA antibodies directed against endothelin-1 type A receptors (ETAR) on early renal transplant outcomes. *Transpl Immunol.* janv 2014;30(1):24-9.
42. Yaoita E, Franke WW, Yamamoto T, Kawasaki K, Kihara I. Identification of renal podocytes in multiple species: higher vertebrates are vimentin positive/lower vertebrates are desmin positive. *Histochem Cell Biol.* 1 janv 1999;111(2):107-15.
43. Mahesh B, Leong H-S, McCormack A, Sarathchandra P, Holder A, Rose ML. Autoantibodies to vimentin cause accelerated rejection of cardiac allografts. *Am J Pathol.* avr 2007;170(4):1415-27.
44. Carter V, Shenton BK, Jaques B, Turner D, Talbot D, Gupta A, et al. Vimentin Antibodies: A Non-HLA Antibody as a Potential Risk Factor in Renal Transplantation. *Transplant Proc.* mars 2005;37(2):654-7.
45. Jurcevic S, Ainsworth ME, Pomerance A, Smith JD, Robinson DR, Dunn MJ, et al. Antivimentin antibodies are an independent predictor of transplant-associated coronary artery disease after cardiac transplantation. *Transplantation.* 15 avr 2001;71(7):886-92.
46. Besarani D, Cerundolo L, Smith JD, Procter J, Barnardo MCN, Roberts ISD, et al. Role of anti-vimentin antibodies in renal transplantation. *Transplantation.* 15 juill 2014;98(1):72-8.
47. Azimzadeh AM, Pfeiffer S, Wu GS, Schröder C, Zhou H, Zorn GL, et al. Humoral immunity to vimentin is associated with cardiac allograft injury in nonhuman primates. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* oct 2005;5(10):2349-59.
48. Rose ML. Role of anti-vimentin antibodies in allograft rejection. *Hum Immunol.* nov 2013;74(11):1459-62.
49. Lawson C, Holder AL, Stanford RE, Smith J, Rose ML. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibodies in sera of heart transplant recipients: a role in endothelial cell activation. *Transplantation.* 27 juill 2005;80(2):264-71.
50. Raats CJ, Van Den Born J, Berden JH. Glomerular heparan sulfate alterations: mechanisms and relevance for proteinuria. *Kidney Int.* févr 2000;57(2):385-400.
51. Joosten SA, Sijpkens YWJ, van Ham V, Trouw LA, van der Vlag J, van den Heuvel B, et al. Antibody response against the glomerular basement membrane protein agrin in patients with

transplant glomerulopathy. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* févr 2005;5(2):383- 93.

52. Joosten SA, van Dixhoorn MGA, Borrias MC, Benediktsson H, van Veelen PA, van Kooten C, et al. Antibody response against perlecan and collagen types IV and VI in chronic renal allograft rejection in the rat. *Am J Pathol.* avr 2002;160(4):1301- 10.
53. Tran P-K, Tran-Lundmark K, Soininen R, Tryggvason K, Thyberg J, Hedin U. Increased intimal hyperplasia and smooth muscle cell proliferation in transgenic mice with heparan sulfate-deficient perlecan. *Circ Res.* 5 mars 2004;94(4):550- 8.
54. Soulez M, Pilon E-A, Dieudé M, Cardinal H, Brassard N, Qi S, et al. The perlecan fragment LG3 is a novel regulator of obliterative remodeling associated with allograft vascular rejection. *Circ Res.* 6 janv 2012;110(1):94- 104.
55. Cardinal H, Dieudé M, Brassard N, Qi S, Patey N, Soulez M, et al. Antiperlecan antibodies are novel accelerators of immune-mediated vascular injury. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* avr 2013;13(4):861- 74.
56. Haque MA, Mizobuchi T, Yasufuku K, Fujisawa T, Brutkiewicz RR, Zheng Y, et al. Evidence for Immune Responses to a Self-Antigen in Lung Transplantation: Role of Type V Collagen-Specific T Cells in the Pathogenesis of Lung Allograft Rejection. *J Immunol.* 8 janv 2002;169(3):1542- 9.
57. Federspiel SJ, DiMari SJ, Howe AM, Guerry-Force ML, Haralson MA. Extracellular matrix biosynthesis by cultured fetal rat lung epithelial cells. III. Effects of chronic exposure to epidermal growth factor on growth, differentiation, and collagen biosynthesis. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* avr 1991;64(4):463- 73.
58. Iwata T, Philipovskiy A, Fisher AJ, Presson RG, Chiyo M, Lee J, et al. Anti-Type V Collagen Humoral Immunity in Lung Transplant Primary Graft Dysfunction. *J Immunol.* 15 oct 2008;181(8):5738- 47.
59. Goers TA, Ramachandran S, Aloush A, Trulock E, Patterson GA, Mohanakumar T. De Novo Production of K- α 1 Tubulin Specific Antibodies: Role in Chronic Lung Allograft Rejection. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 avr 2008;180(7):4487- 94.
60. Subramanian V, Ramachandran S, Banan B, Bharat A, Wang X, Benshoff N, et al. Immune Response to Tissue-Restricted Self-Antigens Induces Airway Inflammation and Fibrosis Following Murine Lung Transplantation. *Am J Transplant.* 2014;14(10):2359- 66.
61. Nath DS, Tiriveedhi V, Bash HI, Phelan D, Moazami N, Ewald GA, et al. A ROLE FOR ANTIBODIES TO HLA, COLLAGEN-V AND K- α 1-TUBULIN IN ANTIBODY MEDIATED REJECTION AND CARDIAC ALLOGRAFT VASCULOPATHY. *Transplantation.* 15 mai 2011;91(9):1036- 43.
62. Jackson AM, Sigdel TK, Delville M, Hsieh S-C, Dai H, Bagnasco S, et al. Endothelial Cell Antibodies Associated with Novel Targets and Increased Rejection. *J Am Soc Nephrol JASN.* 7 nov 2014;

63. De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* sept 2000;52(3):415 - 72.
64. Mogi M, Iwai M, Horiuchi M. New insights into the regulation of angiotensin receptors. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* mars 2009;18(2):138 - 43.
65. Spiering W, Kroon AA, Fuss-Lejeune MM, Daemen MJ, de Leeuw PW. Angiotensin II sensitivity is associated with the angiotensin II type 1 receptor A(1166)C polymorphism in essential hypertensives on a high sodium diet. *Hypertension.* sept 2000;36(3):411 - 6.
66. Zhang G, Wang H, Wang F, Yu L, Yang X, Meng J, et al. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system and angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal rejection. *Tohoku J Exp Med.* nov 2007;213(3):203 - 14.
67. AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem.* 26 oct 2001;276(43):39721 - 6.
68. Dzau VJ. Tissue Angiotensin and Pathobiology of Vascular Disease A Unifying Hypothesis. *Hypertension.* 4 janv 2001;37(4):1047 - 52.
69. Kranzhöfer R, Schmidt J, Pfeiffer CAH, Hagl S, Libby P, Kübler W. Angiotensin Induces Inflammatory Activation of Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 7 janv 1999;19(7):1623 - 9.
70. Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II Induces Interleukin-6 Transcription in Vascular Smooth Muscle Cells Through Pleiotropic Activation of Nuclear Factor- κ B Transcription Factors. *Circ Res.* 4 févr 1999;84(6):695 - 703.
71. Hahn AW, Jonas U, Bühler FR, Resink TJ. Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. *FEBS Lett.* 27 juin 1994;347(2-3):178 - 80.
72. Weidanz JA, Jacobson LM, Muehrer RJ, Djamali A, Hullett DA, Sprague J, et al. ATR blockade reduces IFN-gamma production in lymphocytes in vivo and in vitro. *Kidney Int.* juin 2005;67(6):2134 - 42.
73. Wolf G, Wenzel U, Stahl RA, Hüneke B. [Hypertensive disorders in pregnancy]. *Med Klin Munich Ger* 1983. 15 févr 2001;96(2):78 - 86.
74. Shah DM. The role of RAS in the pathogenesis of preeclampsia. *Curr Hypertens Rep.* mai 2006;8(2):144 - 52.
75. Walther T, Wallukat G, Jank A, Bartel S, Schultheiss H-P, Faber R, et al. Angiotensin II type 1 receptor agonistic antibodies reflect fundamental alterations in the uteroplacental vasculature. *Hypertension.* déc 2005;46(6):1275 - 9.
76. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jüpner A, et al. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest.* 1 avr 1999;103(7):945 - 52.

77. Verloren S, Muller DN, Luft FC, Dechend R. Immunology in Hypertension, Preeclampsia, and Target-Organ Damage. *Hypertension*. 9 janv 2009;54(3):439- 43.
78. Dragun D, Müller DN, Bräsen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelhä M, Dechend R, et al. Angiotensin II Type 1–Receptor Activating Antibodies in Renal-Allograft Rejection. *N Engl J Med*. 2005;352(6):558- 69.
79. Herse F, LaMarca B. Angiotensin II type 1-Receptor Autoantibody (AT1-AA) -mediated pregnancy hypertension. *Am J Reprod Immunol N Y N* 1989 [Internet]. avr 2013 [cité 7 janv 2015];69(4). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3845346/>
80. Siddiqui AH, Irani RA, Blackwell SC, Ramin SM, Kellems RE, Xia Y. Angiotensin receptor agonistic autoantibody is highly prevalent in preeclampsia: correlation with disease severity. *Hypertension*. févr 2010;55(2):386- 93.
81. Dechend R, Gratze P, Wallukat G, Shagdarsuren E, Plehm R, Bräsen J-H, et al. Agonistic autoantibodies to the AT1 receptor in a transgenic rat model of preeclampsia. *Hypertension*. avr 2005;45(4):742- 6.
82. Liao Y-H, Wei Y-M, Wang M, Wang Z-H, Yuan H-T, Cheng L-X. Autoantibodies against AT1-receptor and alpha1-adrenergic receptor in patients with hypertension. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens*. juill 2002;25(4):641- 6.
83. Zhu F, Sun Y, Wang M, Ma S, Chen X, Cao A, et al. Correlation between HLA-DRB1, HLA-DQB1 polymorphism and autoantibodies against angiotensin AT(1) receptors in Chinese patients with essential hypertension. *Clin Cardiol*. mai 2011;34(5):302- 8.
84. Wei F, Jia X-J, Yu S-Q, Gu Y, Wang L, Guo X-M, et al. Candesartan versus imidapril in hypertension: a randomised study to assess effects of anti-AT1 receptor autoantibodies. *Heart Br Card Soc*. mars 2011;97(6):479- 84.
85. Kill A, Tabeling C, Undeutsch R, Kühl AA, Günther J, Radic M, et al. Autoantibodies to angiotensin and endothelin receptors in systemic sclerosis induce cellular and systemic events associated with disease pathogenesis. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(1):R29.
86. Stepan H, Wallukat G, Schultheiss H-P, Faber R, Walther T. Is parvovirus B19 the cause for autoimmunity against the angiotensin II type receptor? *J Reprod Immunol*. avr 2007;73(2):130- 4.
87. Giral M, Foucher Y, Dufay A, Van Huyen JPD, Renaudin K, Moreau A, et al. Pretransplant sensitization against angiotensin II type 1 receptor is a risk factor for acute rejection and graft loss. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. oct 2013;13(10):2567- 76.
88. Dragun D, Bräsen JH, Schönemann C, Fritsche L, Budde K, Neumayer H-H, et al. Patients with steroid refractory acute vascular rejection develop agonistic antibodies targeting angiotensin II type 1 receptor. *Transplant Proc*. sept 2003;35(6):2104- 5.

89. Reinsmoen NL, Lai C-H, Heidecke H, Haas M, Cao K, Ong G, et al. Anti-angiotensin type 1 receptor antibodies associated with antibody mediated rejection in donor HLA antibody negative patients. *Transplantation*. 27 déc 2010;90(12):1473 - 7.
90. Gillaizeau F. Multi-state analysis of kidney transplant recipients outcome: a semi-Markov model for studying the role of pre-transplant sensitization against Angiotensin II Type 1 receptor. *Journal de la Société Française de Statistique* , Vol. 155 No. 1 117- 133
91. Taniguchi M, Rebellato LM, Cai J, Hopfield J, Briley KP, Haisch CE, et al. Higher risk of kidney graft failure in the presence of anti-angiotensin II type-1 receptor antibodies. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. oct 2013;13(10):2577 - 89.
92. Banasik M, Boratyńska M, Kościelska-Kasprzak K, Kamińska D, Bartoszek D, Zabińska M, et al. The influence of non-HLA antibodies directed against angiotensin II type 1 receptor (AT1R) on early renal transplant outcomes. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 6 juin 2014;
93. Jobert A, Rao N, Deayton S, Bennett GD, Brealey J, Nolan J, et al. Angiotensin II type 1 receptor antibody precipitating acute vascular rejection in kidney transplantation. *Nephrol Carlton Vic*. mars 2015;20 Suppl 1:10 - 2.
94. In JW, Park H, Rho EY, Shin S, Park KU, Park MH, et al. Anti-Angiotensin Type 1 Receptor Antibodies Associated With Antibody-Mediated Rejection in Patients Without Preformed HLA-Donor-Specific Antibody. *Transplant Proc*. déc 2014;46(10):3371 - 4.
95. Dragun D. Agonistic antibody-triggered stimulation of Angiotensin II type 1 receptor and renal allograft vascular pathology. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. juill 2007;22(7):1819 - 22.
96. Yuan FF, Watson N, Sullivan JS, Biffin S, Moses J, Geczy AF, et al. Association of Fc gamma receptor IIA polymorphisms with acute renal-allograft rejection. *Transplantation*. 15 sept 2004;78(5):766 - 9.
97. Reinsmoen NL, Lai C-H, Mirocha J, Cao K, Ong G, Naim M, et al. Increased negative impact of donor HLA-specific together with non-HLA-specific antibodies on graft outcome. *Transplantation*. 15 mars 2014;97(5):595 - 601.

Deuxième partie:

**Is pre-transplant sensitization
against Angiotensin II Type1 Receptor
an etiologic factor in the evolution of
kidney transplant recipients?**

Is pre-transplant sensitization against Angiotensin II Type1 Receptor an etiologic factor in the evolution of kidney transplant recipients?

*Clément Deltombe¹, *Florence Gillaizeau^{1,2,3}, Katy Trébern-Launay^{1,2,4}, Florent Le borgne^{1,2,3},
Marie Rimbart^{5,6}, Pierrick Guérif¹, Stéphanie Castagnet⁷, Dany Anglicheau^{4,8}, Emmanuel Morelon^{4,9},
Yohann Foucher^{1,2,3} and Magali Giral^{1,2,3,4,6}

¹Institute for Transplantation, Urology and Nephrology (ITUN) Nantes University Hospital, Nantes, France

²Inserm U1064, LabEx Transplantex, Nantes, France,

³EA 4275 SPHERE: bioStatistics, Pharmacoepidemiology and Human sciences Research team, Nantes University, France.

⁴ Thematic Research and Care Network RTRS « Centaure »

⁵ Plateforme CIMNA, CHU Nantes

⁶ Biotherapy Clinical Investigation Center, Nantes University Hospital, Nantes, France.

⁷ Etablissement Français du Sang, Nantes, France.

⁸Department of kidney transplantation, Necker University Hospital, AP-HP, Paris, France.

⁹ Department of Transplantation and Clinical Immunology, Hospices Civils de Lyon, Hopital Edouard Herriot, Lyon, France

*The two first authors contributed equally

Corresponding author contact information:

Pr Magali Giral

Transplantation Urology Nephrology Institute

Hôtel Dieu University Hospital

30, bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01

Tel: +33 2 40 08 47 69 / Fax: +33 2 40 08 74 11

magali.giral@chu-nantes.fr

Introduction

In kidney transplantation, the organ survival improved since years through a better understanding of the allo-immune response and the increased efficacy of immunosuppressive therapy (1)(2). While the frequency of acute rejection dramatically decreased, acute rejection still occurs and can be observed, even in transplantation from HLA-identical siblings(3). This raised the possibility of a non-HLA sensitization, and the exploration of new targets for allo-antibodies (4)(5). If the non-classical HLA system is an interesting pathway (6), new immunological antigens have been identified for being able to induce, *in vitro*, cell injuries and organ damages(7)(8). Among these new non-HLA targets, Angiotensin II receptor, type 1 (AT1R) antibodies (Abs) have shown their implication in the pathophysiology of many immune diseases such as pre-eclampsia and systemic sclerosis(10)(11). In allograft sensitization (12) it acts as agonist on the endothelial cell of the graft (13)(14). Anti AT1R-Abs seem to exert direct effects on endothelial and smooth-muscle cells via induction of Erk 1/2 signal transduction cascade. The binding antibodies, by linking the second extracellular loop of the receptor (12), induce physiological effects closed to those expected in the renin-angiotensin system (RAS). Dragun *et al.* have shown for the first time their involvement in patients presenting acute rejection episodes with severe hypertensive crisis (9). In a large cohort of kidney transplanted patients in our transplantation Institute in Nantes, we confirmed a significant association of pre-transplant level of AT1R-Abs greater or equal to 10 U/mL with the risk of experiencing an acute rejection episode (ARE) within the first 4 months after the transplantation and a graft failure

from 3 years post-transplantation on wards (15). However since these two events were analyzed independently using two separated multivariate Cox regression models, it was not possible to assess the etiologic pathway of AT1R-Abs on graft failure either directly or through a first stage of acute rejection episode. Therefore, to overcome these limitations we built a multistate model by considering death with a functional graft, return to dialysis and acute rejection episode as competitive events (16). In this second study we showed that a pretransplantation level of AT1R-Abs above 10 U/mL significantly increased the risk of graft failure regardless the first occurrence of clinically relevant ARE. Nevertheless, the interpretation of these first observations was limited since it was a monocentric cohort with patients transplanted between 1998 and 2007 in whom pre-transplant HLA sensitization was assessed by Complement Dependent Cytotoxicity and only clinically relevant ARE were considered. Moreover, if the immunized patient did not get through a clinical ARE, they may experience a subclinical ARE.

Thus based on these first observations, the objective of this study was to consider whether pre-transplant sensitization against Angiotensin II Type1 Receptor could have an etiologic role in kidney transplant recipients' evolution independently from pre-transplant HLA sensitization.

Patients and methods

Patients

We studied kidney transplant recipients from the French DIVAT clinical prospective cohort (www.divat.fr) belonging to the transplantation centers of Nantes, Paris Necker and Lyon of the CENTAURE Network (www.fondation-centaure.org). These three transplantation centers represent 20% of the French Kidney Transplantation activity. They share a common prospective biobank (the DIVAT biocollection, <http://www.divat.fr/biocollection>) since 2008. Inclusion criteria were the following: patients older than 18 years old, who received a first or second kidney and/or pancreas transplantation from heart beating deceased donors between January, 1st 2008 and December, 31st 2012. Standard induction treatment was IL2 Receptor antagonist (Anti IL2R, Basiliximab, Simulect®, Novartis, France) or anti-thymocyte globulins (ATG, Thymoglobulin®, Sanofi, France). All patients were screened for anti HLA sensitization by Luminex® technology within the 6 months before the transplantation. We excluded patients with another type of graft, blood ABO incompatibilities, focal and segmental glomerulosclerosis, uncommon type of induction treatment (alefacept, eculizumab, ofatumumab)

Studied parameters

Donor and recipient's data were extracted from the DIVAT prospective database approved by the French National Commission on Computing and Liberty (DR-2025-087 (N°914184) the

15 February 2015). Recipients all provide written, informed consent for biocollection codes were used to ensure donor and recipient anonymity.

Covariates analysed for the donors were: age, gender, last kidney function and cause of death. Covariates analysed for the recipients were: age, gender, body mass index, comorbidities (diabetes, dyslipidemia, hypertension and antihypertension treatment, cardiovascular disease), disease history (initial kidney disease, history of dialysis and type of renal replacement therapy), pre-transplantation characteristics linked to immunization (previous transfusion, HLA-A-B-DR incompatibilities, HLA sensitization at transplantation), transplantation characteristics (rank, type, cold ischemia time), treatments (induction, maintenance), and anti AT1R immunization.

Anti HLA immunization

HLA -A, -B, -DR and -DQ typing of transplant recipients and their corresponding donors was performed by molecular biology (PCR-SSP or PCR-SSO, One lambda Inc, Bionis, Linkage Biosciences or Olerup).

Pre-transplantation immunization identification against HLA Class I and II antigens was prospectively performed using the Luminex® screening (One lambda® or Gen-probe®) technology in each transplantation center within the 6 months pre-transplantation. For Luminex® assay screening, antibodies were detected by the fluorescent signal for each bead coated with HLA antigen, normalized to the value measured with the negative control serum. The positivity level depended on the laboratory recommendation. The Necker and Nantes center performed the test by using the assay LABScreen Mixed LSM12 assay, (One

Lambda Inc. CA, USA). The Lyon Center used Gen-probe® technology. When available, we considered the result of the single beads antigen assay (SAB), (LABScreen LS1A04, LS2A01, One Lambda Inc), Luminex® to determine the anti-donor specific immunization. When Luminex® SAB was available, we defined anti HLA immunization: a) positive if at least one DSA was identify by Luminex® SAB in the 6 months pre-transplantation, b) negative if all Luminex® SAB were negative in the 6 months pre-transplantation unless a later determination performed only by Luminex screening was positive. MFI threshold values taken into account to detect DSA were specific to each centre, according to their yearly internal and external validations. In the whole cohort all pre-transplant crossmatches performed by direct CDC on total and separated T and B lymphocytes, according to National Institute of Health rules were negative.

Anti AT1R immunization determination

All serum samples have been systematically prospectively collected the day of transplantation and stored in each center biobank. For this study, sera were centralized and ELISA assays for AT1R-Abs titration (One Lambda®, CA, USA) were performed in blind and in “duplicate” on the CIMNA platform of the immunological laboratory of Nantes University Hospital. The procedures followed manufacturer’s instructions (see appendix) on a 96 well plate, with 1:100 diluted serum, during a 20 minutes incubation. The AT1R titration was determined by the absorbance within 30 minutes at 450 nm. According to our previous publication, an AT1R-Abs level equal or up to 10 U/mL was considered positive.

Acute rejection episodes

All AREs were biopsy proven and classified according to the 2007 Banff classification in acute cellular rejection, acute humoral rejection, mixed humoral and cellular rejection (“mixed rejection”) or borderline. The three centers of the study systematically performed surveillance biopsies at 3 months and 1 year post-transplantation (only since 2009 for the 3 months biopsy in Nantes) (18-25). However some patients may have been contra indicated for a surveillance biopsy if the risk was judged to high compared to the benefit. Immunological events were studied into two categories: 1) “sub-clinical” acute rejection (SCAR) and “clinically relevant” acute rejections (CRAR). SCAR included ARE or borderline lesions diagnosed on surveillance biopsies without any sign of graft function deterioration (18) and that were not treated, 2) CRAR gathered all treated biopsy proven ARE or borderlines.

Statistical analyses

The goal of this study was to test hypotheses about the etiologic role of pre-transplant AT1R-Abs on ARE and death-censored graft survival. The time-to-CRAR is the time from transplantation to CRAR, by censoring return to dialysis and death with a functional graft. The time-to-ARE, and time-to-SCAR are respectively the time to first observed event immunological event (SCAR or CRAR), and the time to SCAR diagnosis, by censoring return to dialysis and death with a functional graft. These two times are interval-censored because the exact time of SCAR is unknown (the diagnostic is made on the histological results of the surveillance biopsy). The death-censored graft survival is the time from transplantation to

return to dialysis by censoring death with a functional graft. In a first step, clinical events were studied independently. The time-to-event distributions were described using the Kaplan-Meier estimator. We compared the characteristics of patients according to the presence of pre-transplant AT1R-Abs to identify potential confounding factors of the relationship between AT1R-Abs and clinical events (donor characteristics and post-transplant characteristics such as treatment were not considered as potential confounding factors). Factors differently distributed according to the presence of AT1R-Abs ($p < 0.20$) were then studied in a univariate Cox model. Variables with p -values < 0.20 were included in the multivariable Cox model and retained using a backward selection ($p < 0.05$). The model was stratified on center and adjustment on HLA pre-transplant immunization (class I and class II panel antigens) was forced. Proportional hazard assumption was checked by using the Schoenfeld's global test.

In a second step, the clinical evolution of kidney transplant recipients will be represented by a multistate model with: $\{Y=1\}$ the initial state (alive with a functional graft), $\{Y=2A\}$ a transient state corresponding to SCAR, $\{Y=2B\}$ a transient state corresponding to CRAR rejection, $\{Y=3\}$ the return to dialysis, and $\{Y=4\}$ the death with a functional graft. The model will assume CRAR is always preceded by a SCAR and will take into consideration the interval-censoring of the time-to-SCAR.

Results

Patient characteristics at transplantation

1,705 patients underwent a kidney transplantation in Lyon, Paris-Necker and Nantes hospitals between 2008 and 2012 (see Figure 1). We excluded 765 patients for missing serum samples (N= 103) or anti-HLA immunization within 6 months pre-transplantation not performed using Luminex[®] screening (N=572) and segmental glomerulosclerosis (N=90). Characteristics of patients excluded from analysis were close to those included; however some significant differences existed (see Table S1 in supplementary materials). The excluded patients have more often received grafts from standards donors, were younger, have more often a recursion of their disease and it was more frequently a second transplant. Finally, a total of 940 patients were included in the analysis: 36.4% (N=342) from Nantes, 35.3% (N=332) from Lyon, and 28.3% (N=266) from Paris-Necker hospital. The clinical and biological characteristics of the whole cohort and according to the center are shown in Table 1.

The mean recipient age was 51.6 ($\pm$ 13.3) years old. Males represented 59.8% of this cohort. Most of them (78.2%) were dialyzed. It was the first transplantation for 781 recipients (83.1%) and 872 received a kidney transplantation alone (92.8%). 86.2% had a past history of hypertension. Half of recipients (52.0%) had at least 4 HLA-A-B-DR incompatibilities. Anti HLA class I or class II sensitization was observed in 35.3% and 37.2% respectively of the whole cohort with an unequal repartition between the 3 centers as shown in Table 1. DSA was identified in 145 patients (15.4%) who underwent a desensitization protocol (with IVIg, plasmapheresis, rituximab). An induction therapy with ATG was provided to 60.4% of

recipients and 38.8% received IL-2 receptor antagonist. Almost all patients (97.9%) received a standard immunosuppressive treatment with Calcineurin Inhibitor and Mycophenolate Mofetil and 86.2% received corticosteroids.

The mean pre-transplant level of AT1R-Abs was 10.0 U/mL (± 6.2) in the whole cohort with mean of 9.2U/mL for Nantes, 11.6U/mL for Lyon and 9.2U/mL for Necker. A total of 387 patients (41.2%) had a level above 10U/mL with 33.6% for Nantes, 54.8% for Lyon and 33.8% for Paris-Necker.

Patient characteristics according to the pre-transplant level of anti AT1R-Abs

Patient characteristics according to a pre-transplant anti AT1R-Abs level above or below 10 U/mL are presented in Table 2. Patients with AT1R sensitization above 10 U/mL at transplantation were younger (50.0 versus 52.8 years old, $p=0.002$), had less history of hypertension (82.4% versus 88.8%, $p=0.005$), had less sensitization against HLA class I (30.7% versus 38.5%, $p=0.014$) and HLA class II (31.3% versus 41.4%, $p=0.002$). However this results aren't adjusted on confounding factors.

Pre-transplantation anti AT1R sensitization and risk of acute rejection episodes.

The cumulative probabilities to have a histological examination at 1 year and 3 years post-transplantation were estimated to be 75.0% (95%CI: 71.9% to 77.7%) and 87.0% (95%CI: 84.3% to 89.3%), respectively (see Kaplan-Meier curves in Figure S2 of supplementary materials).

During the follow-up study, a CRAR was diagnosed in 249 recipients. The cumulative probability of CRAR was estimated to be 23.3% (95%CI: from 20.5% to 26.2%) and 31.2% (95%CI: from 27.7% to 34.5%) at 1 year and 3 years post-transplantation (see Figure S3 of supplementary materials). Kaplan-Meier curve for cumulative incidence of CRAR according to the pretransplant anti AT1R-Abs level is presented in Figure 3. Univariate analysis did not show a significant difference between patients with and without AT1R sensitization at transplantation (log-rank test: $p=0.81$). After adjustment on identified confounding factors (see Table S4 for univariate Cox model) and pretransplant anti-HLA immunization, the Cox multivariate model stratified on centre found no significant difference between pretransplant anti AT1R-Abs level above and below 10U/ml (HR=1.01, 95%CI: from 0.78 to 1.31, $p=0.95$) (see Table 3). Patients with pretransplant class I sensitization tended to have more risk of SCAR (HR= 1.24, 95%CI: from 0.92 to 1.68, $p= 0.164$).

Of the 249 CRAR, 71.1% ($n=177$) were classified as acute cellular rejections and 28.9% ($n=72$) as antibodies mediated rejections. Among the 177 acute cellular rejections, 74 (41.8%) had pretransplant anti AT1R-Abs level greater than 10 U/mL. Kaplan-Meier curve for cumulative incidence of cellular CRAR according to the pretransplant anti AT1R-Abs level is presented in Figure S5 (antibodies mediated CRAR, return to dialysis and death with a functional graft censored). Among the 72 antibodies mediated rejections, 29 (40.3%) had pretransplant anti AT1R-Abs level greater than 10 U/mL. Kaplan-Meier curve for cumulative incidence of antibodies mediated CRAR according to the pretransplant anti AT1R-Abs level is presented in Figure S6 (cellular CRAR, return to dialysis and death with a functional graft censored).

A SCAR was diagnosed in 39 recipients. The cumulative probability of ARE (taking into account observed SCAR rejection) was estimated to be 25.5% (95CI: from 22.5% to 28.3%) and 35.1% (95CI: from 31.5% to 38.5%) at 3 years post transplantation (See Figure S7 in supplementary materials). However, these probabilities were probably underestimated due to interval-censoring of time-to-SCAR.

Pre-transplant level of anti AT1R-Abs and death-censored graft survival

The death-censored graft survival was estimated to be 94.4% (95%CI: from 92.9% to 95.9%), 89.2% (95%CI: from 86.7% to 91.8%) and 78.4% (95%CI: from 73.5% to 83.7%) at 1, 3 and 5 years post-transplantation, respectively (see Figure S8 in supplementary materials). 100 recipients returned to dialysis (10.6%), 49 died (5.2%).

Kaplan-Meier analysis of death-censored graft survival according to the pre-transplant anti AT1R-Abs level is presented in Figure 4. Univariate analysis did not show a significant difference between patients with and without AT1R sensitization >10U/mL at transplantation ($p=0.66$). The search of observed confounding factors between pre-transplant anti AT1R-Abs level and death-censored graft survival is presented in Table S9 (univariate Cox model). After adjustment on identified confounding factors and pre-transplant anti-HLA immunization, the Cox multivariate model stratified on center found no significant difference between pre-transplant anti AT1R-Abs level above and below 10U/mL ($HR=0.93$, 95%CI: from 0.61 to 1.41, $p=0.73$). Patients with pre-transplant class I sensitization tended to return to dialysis more likely ($HR= 1.54$, 95%CI: from 0.95 to 2.48, $p= 0.078$).

Discussion

In this preliminary study we didn't observed any effect of pretransplantation AT1R sensitization on kidney graft outcome. Among 940 patients, the AT1R sensitization rate was 41% with a mean titer of 10.05U/mL. Sensitized patients had less history of hypertension, compared to what we thought concerning the pathophysiology of AT1R. Our data base didn't report anti hypertensive therapies such as angiotensin converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor antagonists. The induction treatment and the maintenance immune suppressive therapies were standard but the induction strategy was heterogeneous between the three centers. One third of this cohort was HLA sensitized against class I or Class II. Fifteen percent of patients needed desensitization therapies. Interestingly, the sensitized population against AT1R was less sensitized against HLA. We didn't find any explication to this fact: There was no difference in the immunizing factors such as transfusions or previous transplantation.

According to our knowledge, this is until this day the only one study to be performed in such a large cohort in kidney transplantation. Using a prospective multicenter historical cohort, we obtained a higher number of patients, transplanted during a quite recent period. We aimed to correct the previous study limits. The HLA sensitization was evaluated in Luminex® screening or SAB for all patients. Even if all patients didn't underwent a immunological evaluation by a high definition technical, they all have been evaluated by a screening technical which have a higher sensitivity, with a lower rate of false negative and a higher rate of false positive. We thus have in this study an overestimated number of

immunized recipients. Moreover, each center uses to control by Luminex® SAB every screening positive test. Thus we're sure enough to have the right evaluation of the immunological risk for each recipient. In our study, recipient of living donor kidney weren't included. This is now well accepted that they have a very different immunologic outcome. The way to manage the immune suppressive therapy is different. We willingly included kidney-pancreas combined transplantation in our study. Even if pancreas is more immunogenic than kidneys, the way to manage this kind of grafts is similar to kidney alone transplantation. A high number of patients underwent a biopsy and thus we looked for most of the SCAR. Those who didn't, have most of the time contra indication to this procedure and a highly stable graft function which make the hypothesis of an acute rejection even very unlikely.

The level of positivity for the SAB technical was different for each transplantation center. There is no international consensus for the level of positivity: each transplantation team decided their own level, according to their technicals, their internal and external validation, and to the recipient history.

In this cohort, and with our definition of the clinical rejection which included rejection lesions found on systematical biopsies, the ARE rate is higher than in the general transplanted population since we found more than 25% of clinical rejection at 3 years posttransplantation. We chose a wild definition of rejection, including every histological lesions treated by the medical staff with an immune suppressive therapy. There is today no consensual decision of treatment on every lesion, especially on borderline lesions. We thus

may have an over estimated number of acute rejection, weakening the possible role of AT1R-Abs. Moreover, the histological diagnosis of ARE was multicentric and therefore operator dependant.

The AT1R sensitization level was quite heterogeneous between the three centers. The prevalence rate of sensitization in Nantes and Paris-Necker was around 33% whereas it reached 54,8% in Lyon. Further controls of the antibodies titration are in progress to understand these differences.

This study failed to confirm our previous study which showed a negative effect of the pretransplantation sensitization on the graft outcome in kidney transplantation(15). We didn't analyze the posttransplantation sensitization against AT1R. To our knowledge, no other study analyzed only the pretransplantation level of AT1R-Abs and the graft outcome. Most of the published studies reported a negative effect of the *de novo* AT1R sensitization on the graft function, and/or on the rejection rate. But the number of patients are lower and the findings reported only a statistical association and not a causal relationship (27). A 2015 study in 115 living donor kidney transplant recipients reported that positive patients for pre or posttransplantation AT1R-Abs (> 17U/mL) behaved like recipient without any antibodies against HLA or non HLA with a follow-up of one year (28). Nevertheless, in a multicenter observational cohort with 166 consecutive kidney recipient, a titer of AT1R-Abs >9,05U/mL was significantly associated with a higher incidence of biopsy proven rejection. There was no graft failure (29).

No evidence of a role of AT1R sensitization appeared in this large multicenter study, despite a strong methodology. We may have non-significant results because of an important heterogeneity of our cohort between the three centers in the AT1R sensitization, a wild definition of acute rejection and a too small number of patients who lost their graft. After a data check, a semi Markov multi state model will be used on this cohort, avoiding the competition bias between the loss of graft function and the acute rejection event. Further analyses are needed to explore whether AT1R-Abs could induce a chronic graft loss through a chronic endothelial activation.

CONCLUSION

Dans ce travail de thèse nous n'avons pas observé d'impact de l'immunisation pré transplantation contre AT1R sur la survie des greffons rénaux ou sur la survenue des rejets, cliniques ou histologiques.

Ces résultats sont extrêmement préliminaires et à considérer avec précaution. Nous avons réuni une cohorte multicentrique de grande taille. Nous avons rencontré des difficultés liées aux différences de pratiques médicales de chaque centre, liées aux différentes techniques d'évaluation immunologiques ou histologiques multicentrique dont l'interprétation peut être opérateur dépendante, liées aux données manquantes dans chaque centre.

Nous avons donc retrouvé une grande hétérogénéité de notre cohorte. Tout d'abord le taux de rejets parmi les patients de l'étude est supérieure à celui retrouvé dans les études publiées, en lien avec une définition arbitraire de rejets cliniques incluant les lésions borderlines ou suspectes qui ont été traitées : il n'y a pas, à ce jour, de consensus sur la nécessité de traiter ce type de lésions. Nous observons sur cette cohorte une différence de prise en charge de ces lésions : cela peut provoquer une surestimation du nombre de rejet et nécessite une réévaluation de la fonction du greffon de chaque patient inclus afin de statuer sur le caractère significatif des lésions. Les stratégies immunosuppressives sont

différentes selon les centres et l'utilisation de sérum antilymphocytaires ou d'antagonistes de l'IL2 en traitement d'induction, par exemple, peut influencer le devenir des greffons rénaux. Des analyses ultérieures sont à réaliser pour comprendre ces différences.

Nous retrouvons également des liens statistiques opposés à ceux décrits dans la physiopathologie des récepteurs à l'angiotensine II et dans la littérature: il est par exemple surprenant de constater que les patients immunisés contre AT1R ont statistiquement moins d'antécédents d'hypertension. Notre base de données informatisée complétée prospectivement dans chaque centre ne prend pas en compte le type de traitement antihypertenseur et notamment le traitement par IEC ou ARAI qui peut interagir avec le récepteur AT1R comme décrit par Dragunet *al.*

Le niveau d'immunisation, la proportion de patients immunisés selon les centres et l'effet de l'immunisation contre AT1R sur la survie des greffons ou le taux de rejet est différent voire opposé selon le centre dans des analyses en sous groupes (résultats non exposés). En effet alors que de nombreuses études publiées retrouvent un effet négatif, statistiquement significatif ou non, sur le devenir des greffons, notre analyse montre un effet neutre voire protecteur non significatif de l'immunisation anti AT1R en prétransplantation sur la survie des greffons rénaux dans certains centres inclus dans cette étude. Ces données nécessitent une vérification avant toute publication.

Nous avons pour projet d'appliquer un modèle statistique multi état afin d'évaluer les transitions entre les différents états de fonctionnalité des greffons rénaux en

s'affranchissant de l'interaction de compétition qui existe entre le fait d'avoir présenté un rejet et le fait de perdre la fonctionnalité du greffon et de retourner en dialyse. Celui-ci sera effectif une fois la base de données vérifiée.

Ce travail de grande ampleur nécessite des analyses approfondies afin que les résultats exposés ici soient confirmés avant d'être présentés à la communauté médicale.

TABLES

Table 1: Characteristics of the 940 kidney recipients according to the centre

Table 2: Characteristics of the 940 kidney recipients according to the pretransplant anti AT1R-Abs level above or below 10U/ml.

Table 3: Multivariate analysis of time-to-CRAR (Cox model adjusted on pretransplant anti-HLA immunization and identified confounding factors of pretransplant anti AT1R-Abs level, and stratified on centre).

Table 4: Multivariate analysis of death-censored graft survival (Cox model adjusted on pretransplant anti-HLA immunization and identified confounding factors of pretransplant anti AT1R-Abs level, and stratified on centre).

Table 1: Demographic Characteristics of the 940 kidney recipients according to the center

	All (n=940)		Nantes (n=342)	Lyon(n=332)	Paris (n=266)
Characteristics	N	N (%) mean $\pm$ SD	N (%) mean $\pm$ SD	N (%) mean $\pm$ SD	N (%) mean $\pm$ SD
Donor					
Male	0	557 (59.3)	201 (58.8)	215 (64.8)	141 (53.0)
Donor after cardiac death	6	40 (4.3)	16 (4.7)	21 (6.3)	3 (1.1)
Expanded Criteria Donor	2	411 (43.8)	165 (48.2)	114 (34.4)	132 (49.8)
Recipient					
Age at transplantation (yrs)	0	51.6 $\pm$ 13.3	52.9 $\pm$ 13.1	51. $\pm$ 13.4	50.0 $\pm$ 13.4
Male	0	562 (59.8)	199 (58.2)	200 (60.2)	163 (61.3)
Body Mass Index (kg/m ²)	2	24.5 $\pm$ 4.3	25 $\pm$ 4.5	24. $\pm$ 4.0	24 $\pm$ 4.3
End stage renal disease					
Recurrent disease	0	195 (20.7)	65 (19.0)	74 (22.3)	56 (21.1)
Autoimmune disease	0	275 (29.3)	112 (32.7)	107 (32.2)	56 (21.1)
Renal replacement therapy					
pre-emptive graft	0	124 (13.2)	77 (22.5)	35 (10.5)	12 (4.5)
peritoneal dialysis	0	81 (8.6)	36 (10.5)	35 (10.5)	10 (3.8)
hemodialysis	0	735 (78.2)	229 (67.0)	262 (78.9)	244 (91.7)
Chronic glomerulonephritis	0	157 (16.7)	58 (17.0)	63 (19.0)	36 (13.5)
Tubulo-interstitial nephropathy	0	86 (9.1)	42 (12.3)	18 (5.4)	26 (9.8)
Renal vascular disease	0	96 (10.2)	28 (8.2)	48 (14.5)	20 (7.5)
Diabetes	0	167 (17.8)	70 (20.5)	65 (19.6)	32 (12.0)
Other or unknown	0	434 (46.2)	144 (42.1)	138 (41.6)	152 (57.1)
History					
Transfusion	41	399 (44.4)	159 (46.5)	113 (34.9)	127 (54.5)
Diabetes	0	219 (23.3)	96 (28.1)	82 (24.7)	41 (15.4)
Hypertension	0	810 (86.2)	315 (92.1)	269 (81.0)	226 (85.0)
Cardiac	0	252 (26.8)	109 (31.9)	62 (18.7)	81 (30.5)
Cardiac and/or vascular	0	329 (35.0)	153 (44.7)	80 (24.1)	96 (36.1)
Dyslipidemia	0	361 (38.4)	170 (49.7)	115 (34.6)	76 (28.6)
Hepatitis B or C	0	57 (6.1)	23 (6.7)	17 (5.1)	17 (6.4)
Neoplasia	0	108 (11.5)	49 (14.3)	33 (9.9)	26 (9.8)
Transplantation					
Kidney alone	0	872 (92.8)	307 (89.8)	299 (90.1)	266 (100.0)
First transplantation	0	781 (83.1)	269 (78.7)	286 (86.1)	226 (85.0)
ABDR incompatibilities $\geq$ 4	2	488 (52.0)	170 (49.7)	181 (54.5)	137 (51.9)
ABDR incompatibilities $\geq$ 5	2	180 (19.2)	71 (20.8)	64 (19.3)	45 (17.0)
Cold ischemia time (hours)	6	18.1 $\pm$ 7.0	18.5 $\pm$ 6.7	15. $\pm$ 5.28	20.9 $\pm$ 7.9
Delayed graft function (days)	5	4.4 $\pm$ 6.2	6.4 $\pm$ 7.4	2.4 $\pm$ 4.36	4.3 $\pm$ 5.6
Immunisation at transplantation					
Positive CMV serologic status	12	592 (63.8)	171 (50.0)	240 (74.8)	181 (68.3)
Positive hepatitis C	43	24 (2.7)	10 (2.9)	6 (2.1)	8 (3.0)
Positive HBs antigen	3	19 (2.0)	7 (2.0)	6 (1.8)	6 (2.3)
DSA (Luminex SAB)	1	145 (15.4)	39 (11.4)	1 (0.3)	105 (39.6)
Anti HLA class I (current lum.Sc) screen	0	332 (35.3)	107 (31.3)	59 (17.8)	166 (62.4)
Anti HLA class III (current lum.Sc)	0	350 (37.2)	98 (28.7)	74 (22.3)	178 (66.9)
Anti AT1R-Abs (U/mL)	0	10.0 $\pm$ 6.2	9.2 $\pm$ 6.4	11. $\pm$ 6.6	9.2 $\pm$ 5.2
Anti AT1R-Abs AT1R $\geq$ 10U/mL	0	387 (41.2)	115 (33.6)	182 (54.8)	90 (33.8)

Table 1 (continued)

		All (n=940)	Nantes (n=342)	Lyon (n=332)	Paris (n=266)
Characteristics		N (%) NA mean ± SD	N (%) mean ± SD	N (%) mean ± SD	N (%) mean ± SD
Treatment					
Induction					
	ATG	1 567 (60.4)	161 (47.1)	296 (89.2)	110 (41.5)
	Basiliximab	1 364 (38.8)	175 (51.2)	52 (15.7)	137 (51.7)
Maintenance					
	CNI	1 921 (98.1)	337 (98.5)	331 (99.7)	253 (95.5)
	Ciclosporine A	1 192 (20.4)	2 (0.6)	131 (39.5)	59 (22.3)
	Tacrolimus	1 749 (79.8)	335 (98.0)	217 (65.4)	197 (74.3)
	mTORi	1 17 (1.8)	1 (0.3)	8 (2.4)	8 (3.0)
	Mycophenolatemofetil	1 919 (97.9)	341 (99.7)	327 (98.5)	251 (94.7)
	Azathioprine	1 2 (0.2)	0 (0.0)	1 (0.3)	1 (0.4)
	Corticoid	1 809 (86.2)	224 (65.5)	328 (98.8)	257 (97.0)

NA=Not Available

Table 2: Characteristics of the 940 kidney recipients according to the pretransplant anti AT1R-Abs level above or below 10U/ml

	All (n=940)			AT1R<10U/mL (n=553)		AT1R≥10U/mL (n=387)		p-value
	NA	mean	±SD	mean	±SD	mean	±SD	
Hospital								<0.0001
Lyon	0	332	(35.3)	150	(27.1)	182	(47.0)	
Nantes	0	342	(36.4)	227	(41)	115	(29.7)	
Paris-Necker	0	266	(28.3)	176	(31.8)	90	(23.3)	
Demographic								
Age at transplantation (yrs)	0	51.6	±13.3	52.8	±13.2	50	±13.4	0.0016
Male	0	562	(59.8)	331	(59.9)	231	(59.7)	0.9594
Body Mass Index (kg/m2)	2	24.5	±4.3	24.5	±4.2	24.4	±4.4	0.7731
End stage renal disease								
Recurrent disease	0	195	(20.7)	112	(20.3)	83	(21.4)	0.6569
Autoimmunedisease	0	275	(29.3)	145	(26.2)	130	(33.6)	0.0145
Chronicglomerulonephritis	0	157	(16.7)	91	(16.5)	66	(17.1)	0.8087
Tubulo-interstitialnephropathy	0	86	(9.1)	53	(9.6)	33	(8.5)	0.5801
Renalvasculardisease	0	96	(10.2)	65	(11.8)	31	(8)	0.0621
Diabetes	0	167	(17.8)	89	(16.1)	78	(20.2)	0.1089
Other or unknown	0	434	(46.2)	255	(46.1)	179	(46.3)	0.9659
History								
Transfusion	41	399	(44.4)	245	(46.6)	154	(41.3)	0.1157
Diabetes	0	219	(23.3)	125	(22.6)	94	(24.3)	0.5474
Hypertension	0	810	(86.2)	491	(88.8)	319	(82.4)	0.0054
Cardiac	0	252	(26.8)	158	(28.6)	94	(24.3)	0.1447
Cardiac and/or vascular	0	329	(35)	207	(37.4)	122	(31.5)	0.0616
Dyslipidemia	0	361	(38.4)	218	(39.4)	143	(37)	0.4434
Hepatitis B or C	0	57	(6.1)	27	(4.9)	30	(7.8)	0.0697
Neoplasia	0	108	(11.5)	71	(12.8)	37	(9.6)	0.1209
Transplantation								
Kidney transplantation alone	0	872	(92.8)	523	(94.6)	349	(90.2)	0.0105
First transplantation	0	781	(83.1)	451	(81.6)	330	(85.3)	0.1347
Immunisation at transplantation								
Positive CMV serologicstatus	12	592	(63.8)	350	(64)	242	(63.5)	0.8839
Positive EBV serologicstatus	15	896	(96.9)	534	(97.8)	362	(95.5)	0.0496
Positive hepatitis C	43	24	(2.7)	13	(2.4)	11	(3.1)	0.5404
Positive HBsantigen	3	19	(2)	9	(1.6)	10	(2.6)	0.2969
Anti HLA class I at transplantation	0	332	(35.3)	213	(38.5)	119	(30.7)	0.0142
Anti HLA class II at transplantation	0	350	(37.2)	229	(41.4)	121	(31.3)	0.0015

NA=Not Available

Table 3: Multivariate analysis of time-to-CRAR (Cox model adjusted on pretransplant anti-HLA immunization and identified confounding factors of pretransplant anti AT1R-Abs level, and stratified on centre, n=940).

Characteristics	HR [95%CI]	p-value
Pre-transplant Anti AT1R-Abs $\geq$ 10U/mL (yes versus no)	1.01 [0.78-1.31]	0.9448
Anti HLA class I at transplantation (yes versus no)	1.24 [0.92-1.68]	0.1640
Anti HLA class II at transplantation (yes versus no)	0.97 [0.71-1.31]	0.8337
Recipient age at transplantation (for 10-year increase)	0.95 [0.86-1.05]	0.3247
History of hepatitis B or C (yes versus no)	0.51 [0.26-1.01]	0.0517
History of hypertension (yes versus no)	0.82 [0.58-1.15]	0.2462
History of cardio/vascular disease (yes versus no)	0.99 [0.75-1.30]	0.9292
Kidney transplantation alone (versus kidney-pancreas)	1.07 [0.63-1.82]	0.8053

Table 4: Multivariate analysis of death-censored graft survival (Cox model adjusted on pre-transplant anti-HLA immunization and identified confounding factors of pretransplant anti AT1R-Abs level, and stratified on centre, n=940).

Characteristics	HR [95%CI]	p-value
Pre-transplant Anti AT1R-Abs $\geq$ 10U/mL (yes versus no)	0.93 [0.61-1.41]	0.7337
Anti HLA class I at transplantation (yes versus no)	1.54 [0.95-2.48]	0.0785
Anti HLA class II at transplantation (yes versus no)	0.85 [0.51-1.40]	0.5210
Recipient age at transplantation (for 10-year increase)	1.14 [0.95-1.36]	0.1469
History of cardiac and/or vascular disease (yes versus no)	1.86 [1.23-2.79]	0.0030
History of neoplasia (yes versus no)	1.81 [1.08-3.05]	0.0253
History of hypertension (yes versus no)	0.61 [0.35-1.05]	0.0745
Kidney transplantation alone (versus kidney-pancreas)	1.58 [0.60-4.15]	0.3542

FIGURES

Figure 1: Flowchart of the study.

Figure 2: Clinical evolution of the 940 kidney transplant recipients.

Figure 3: Kaplan-Meier curve for cumulative incidence of CRAR according to the pretransplant anti AT1R-Abs level above or below 10U/ml

Figure 4: Kaplan-Meier analysis of death-censored graft survival according to the pretransplant anti AT1R-Abs level above or below 10U/ml.

Figure 1: Flowchart of the study

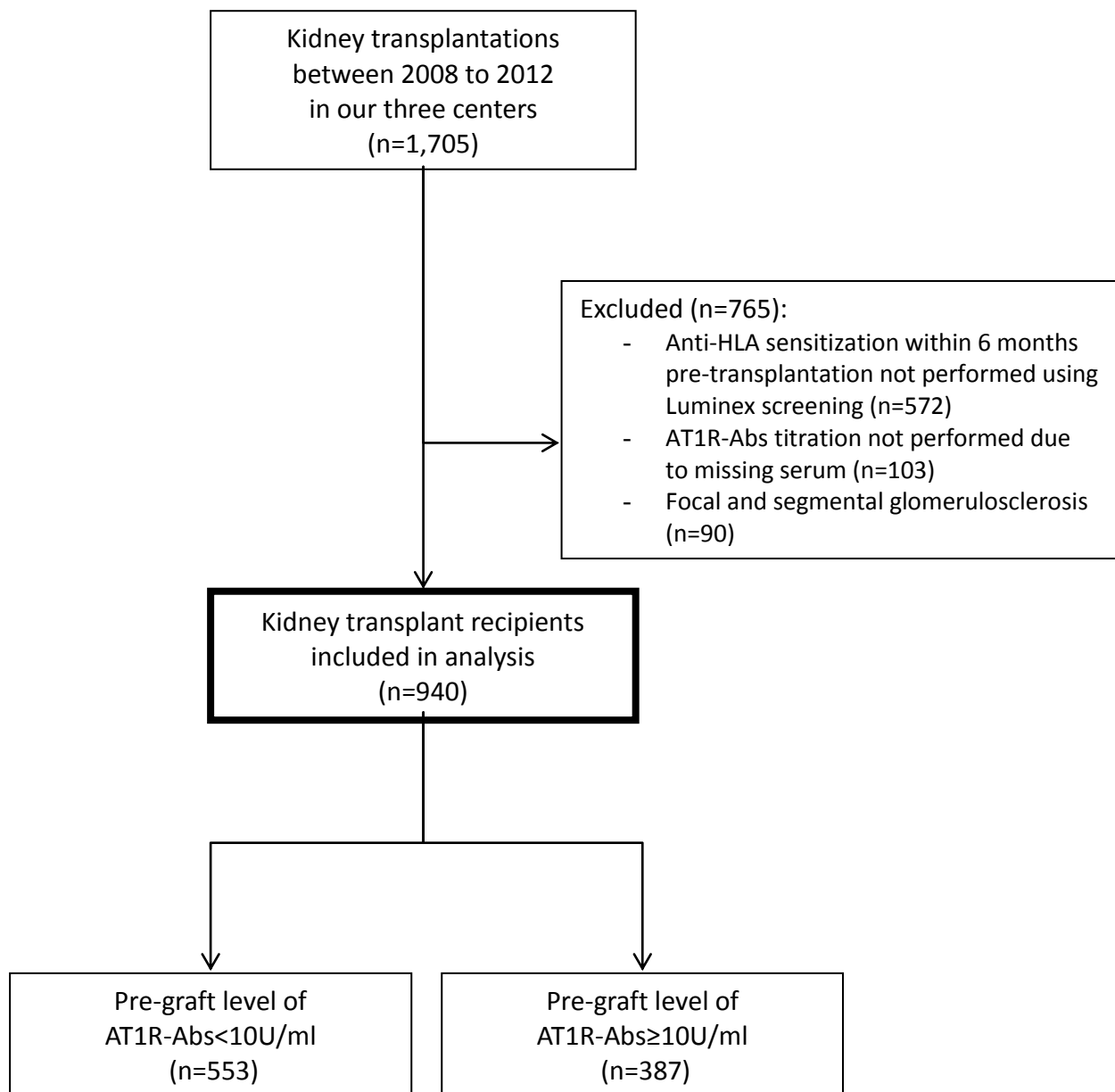


Figure 2: Clinical evolution of the 940 kidney transplant recipients.

Squares represent transient states and ellipses absorbing state. Arrows correspond to possible transitions between the states at beginnings of arrows and the state sat points. Numbers above arrows indicate the numbers of observed transitions among the 940 patients initially included. Of the 940 recipients, 567 had none of these clinical events during the follow-up study.

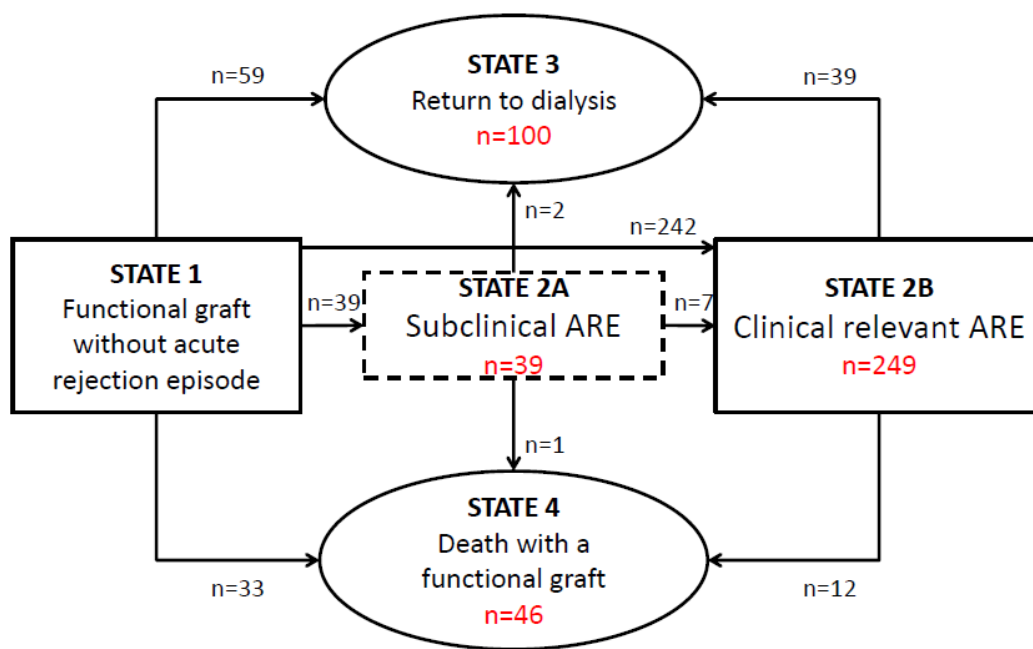


Figure 3: Kaplan-Meier curve for cumulative incidence of CRAR according to the pretransplant anti AT1R-Abs level above or below 10U/ml.

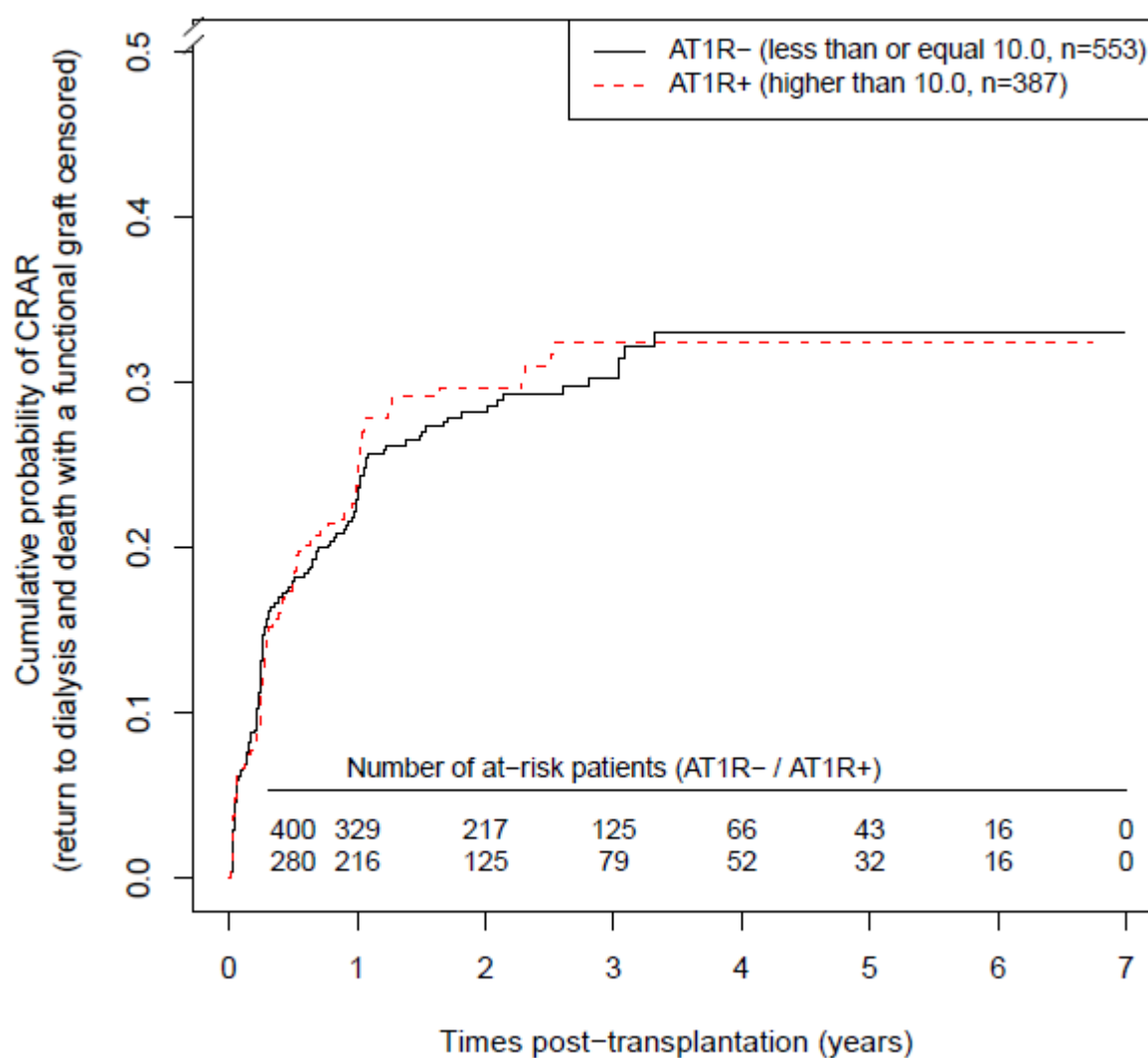
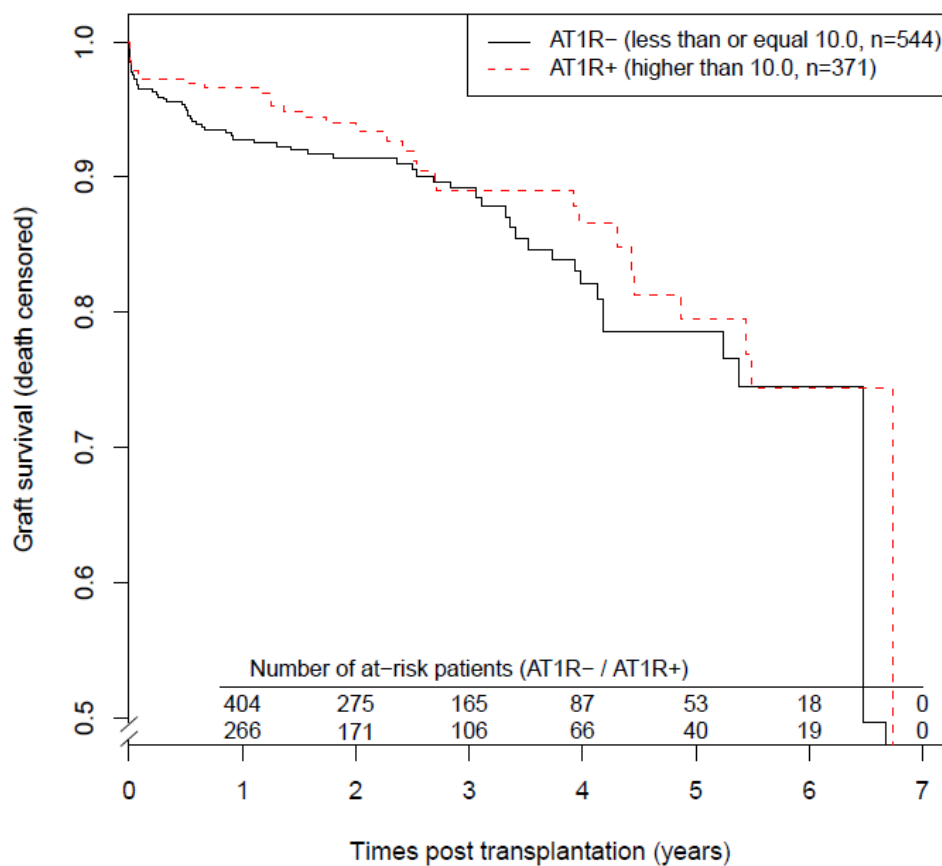


Figure 4: Kaplan-Meier analysis of death-censored graft survival according to the pretransplant anti AT1R-Abs level above or below 10U/ml (log-rank test: $p=0.66$).



SUPPLEMENTARY MATERIALS

Table S1: Comparison of characteristics of kidney transplant recipients included and excluded from analysis among eligible recipients.

Figure S2: Probability to have a biopsy during the follow-up according to the Kaplan-Meier estimator.

Figure S3: Kaplan-Meier curve for cumulative incidence of CRAR (return to dialysis and death with functional graft censored).

Table S4: Univariate analysis (Cox model) for risk of CRAR (potential confounding factors of pretransplant anti AT1R-Abs level).

Figure S5: Kaplan-Meier curve for cumulative incidence of cellular CRAR according to the pretransplant anti AT1R-Abs level above or below 10U/ml.

Figure S6: Kaplan-Meier curve for cumulative incidence of antibodies mediated CRAR according to the pretransplant anti AT1R-Abs level above or below 10U/ml.

Figure S7: Kaplan Meier curve for cumulative incidence of ARE (return to dialysis and death with functional graft censored)

Figure S8: Kaplan Meier curve for death-censored graft survival

Table S9: Univariate analysis (Cox model) of the risk factor for death-censored graft survival (potential confounding factors of pretransplant anti AT1R-Abs level).

Table S1: Comparison of characteristics of kidney transplant recipients included and excluded from analysis among eligible recipients.

	All (n=1705)			Analyzed (n=940)		Not analyzed (n=765)		
	NA	N (%)		N (%)		N (%)		
		mean	±SD	mean	±SD	mean	±SD	p-value
Hospital								
Lyon	0	603	(35.4)	332	(35.3)	271	(35.4)	0.9638
Nantes	0	649	(38.1)	342	(36.4)	307	(40.1)	0.1129
Paris-Necker	0	453	(26.6)	266	(28.3)	187	(24.4)	0.0732
Donor								
Male	12	1015	(60.0)	554	(59.3)	461	(60.7)	0.5523
Donor after cardiac death	10	461	(27.2)	243	(26.0)	218	(28.6)	0.2263
Expanded Criteria Donor	20	676	(40.1)	397	(42.6)	279	(37.0)	0.0188
Age at transplantation (yrs)	2	51.7	±16.6	52.4	±17.0	50.8	±16.1	0.0507
Recipient								
Age at transplantation (yrs)	0	51	±13.5	51.6	±13.3	50.2	±13.6	0.0280
Male	0	1026	(60.2)	562	(59.8)	464	(60.7)	0.7163
Body Mass Index (kg/m2)	8	24.3	±4.3	24.4	±4.3	24.1	±4.3	0.1285
End stage renal disease								
Recurrent disease	2	449	(26.4)	194	(20.7)	255	(33.4)	<0.0001
Autoimmune disease	0	504	(29.6)	275	(29.3)	229	(29.9)	0.7598
Purification technique								
pre-emptive	0	218	(12.8)	125	(13.3)	93	(12.2)	0.4829
peritonealdialysis	0	142	(8.3)	81	(8.6)	61	(8.0)	0.6326
hemodialysis	0	1345	(78.9)	734	(78.1)	611	(79.9)	0.3693
History								
Transfusion	105	741	(46.3)	398	(44.6)	343	(48.5)	0.1160
Diabetes	0	374	(21.9)	218	(23.2)	156	(20.4)	0.1648
Hypertension	0	1462	(85.7)	809	(86.1)	653	(85.4)	0.6790
Cardiac and/or vascular	0	597	(35.0)	326	(34.7)	271	(35.4)	0.7487
Dyslipidemia	0	670	(39.3)	360	(38.3)	310	(40.5)	0.3495
Neoplasia	0	198	(11.6)	108	(11.5)	90	(11.8)	0.8599
Transplantation								
Kidney transplantation alone	0	1583	(92.8)	872	(92.8)	711	(92.9)	0.8890
First transplantation	0	1374	(80.6)	781	(83.1)	593	(77.5)	0.0038
ABDR incompatibilities ≥ 4	8	872	(51.4)	487	(52.0)	385	(50.7)	0.5895
Cold ischemia time (hours)	9	18	±6.8	18.1	±7.0	17.8	±6.5	0.3680
Immunisation at transplantation								
Positive CMV serologic status	20	1071	(63.6)	590	(63.8)	481	(63.3)	0.8338
Treatment								
Induction								
SAL (horse /rabbit)	5	1008	(59.3)	567	(60.4)	441	(58.0)	0.3099
Basiliximab	5	669	(39.4)	364	(38.8)	305	(40.1)	0.5813
Maintenance								
CNI	5	1673	(98.4)	920	(98.0)	753	(98.9)	0.1109
Mammalian Target Of Rapamycin	5	26	(1.5)	17	(1.8)	9	(1.2)	0.2943
Mycophenolatemofetil	5	1667	(98.1)	918	(97.8)	749	(98.4)	0.3270
Corticoid	5	1470	(86.5)	808	(86.0)	662	(87.0)	0.5724

Figure S2: Probability to have a biopsy during the follow-up according to the Kaplan-Meier estimator.

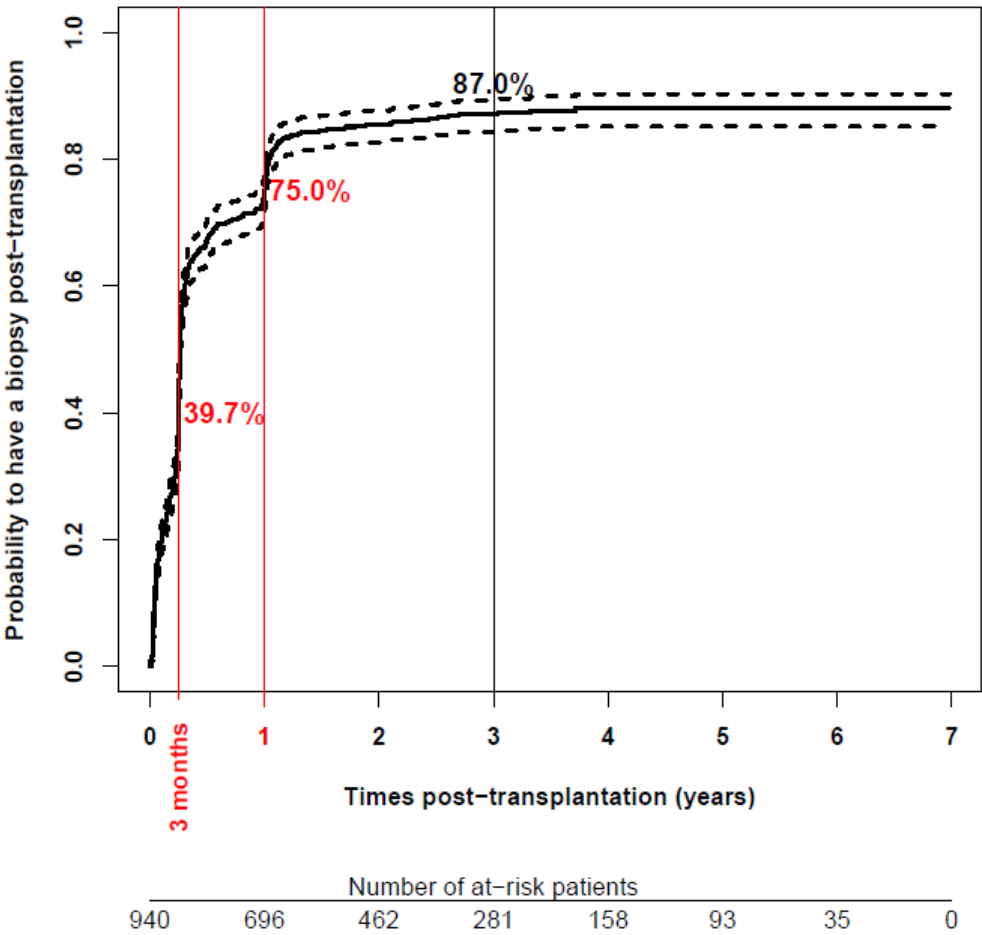


Figure S3: Kaplan-Meier curve for cumulative incidence of CRAR (return to dialysis and death with functional graft censored).

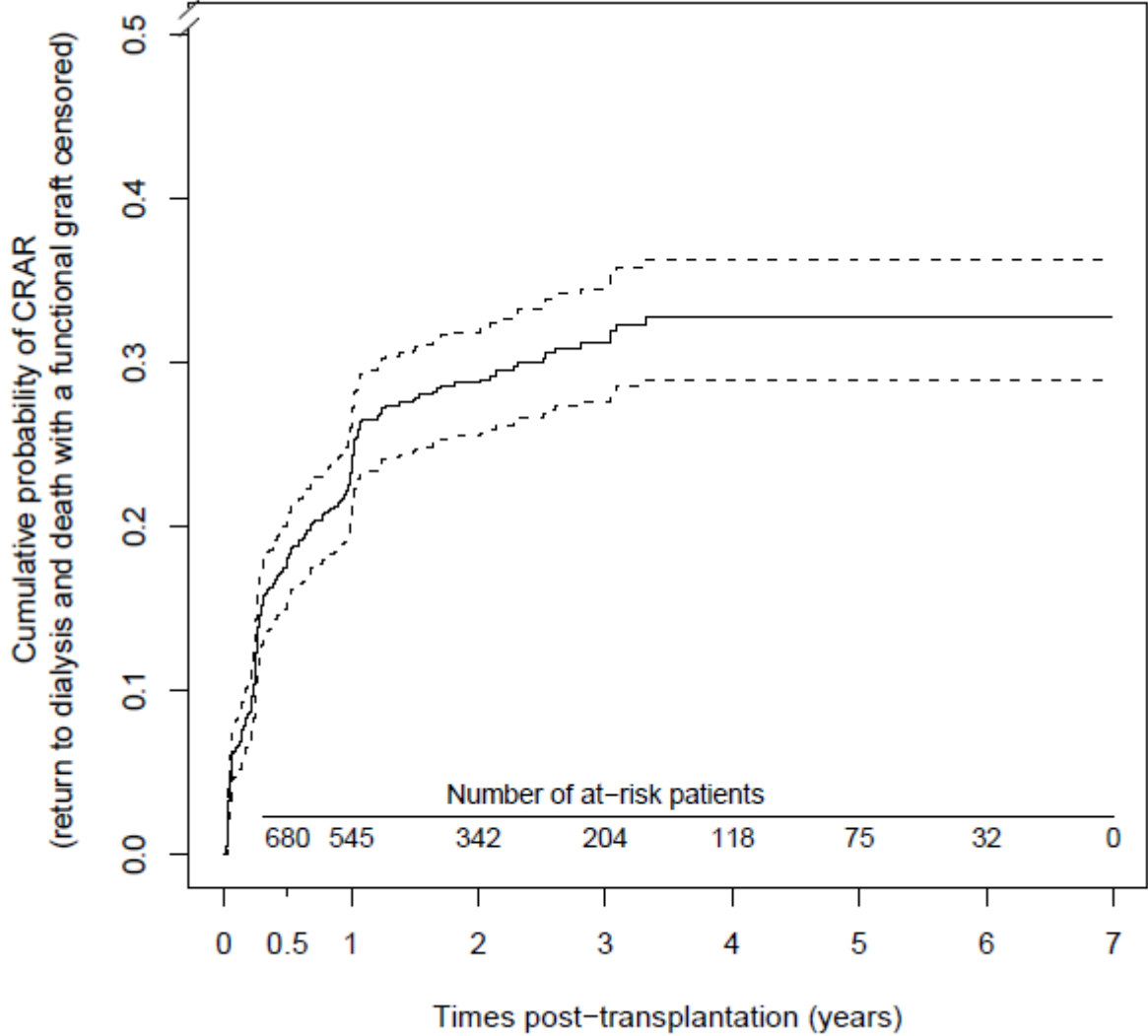


Table S4: Univariate analysis (Cox model) of the risk factor for CRAR (potential confounding factors of pretransplant anti AT1R-Abs level, n=940).

Characteristics	Missing value	HR	[95%CI]	p-value
Recipient age at transplantation (for 10-year increase)	0	0.92	[0.84-1.01]	0.0961
Transfusion before transplantation (yes versus no)	41	1.09	[0.84-1.41]	0.5050
Autoimmune disease (yes versus no)	0	0.90	[0.69-1.19]	0.4604
Renal vascular initial disease (yes versus no)	0	0.98	[0.64-1.50]	0.9329
Diabetes initial disease (yes versus no)	0	1.04	[0.76-1.43]	0.8061
History of hypertension (yes versus no)	0	0.73	[0.52-1.02]	0.0774
History of cardiac disease (yes versus no)	0	0.92	[0.69-1.22]	0.5597
History of cardiac and/or vascular disease (yes versus no)	0	0.87	[0.66-1.13]	0.2806
History of hepatitis B or C (yes versus no)	0	0.54	[0.28-1.04]	0.0420
History of neoplasia (yes versus no)	0	1.10	[0.76-1.61]	0.6155
Kidney transplantation alone (versus kidney-pancreas)	0	1.29	[0.79-2.10]	0.3000
First transplantation (versus second)	0	1.10	[0.78-1.53]	0.5883
Positive EBV serologic status (yes versus no)	15	0.86	[0.44-1.68]	0.6682
Positive class I at transplantation (yes versus no)	0	1.55	[1.21-1.99]	0.0007
Positive class II at transplantation (yes versus no)	0	1.41	[1.10-1.82]	0.0073

Figure S5: Kaplan-Meier curve for cumulative incidence of cellular CRAR according to the pretransplant anti AT1R-Abs level above or below 10U/ml.

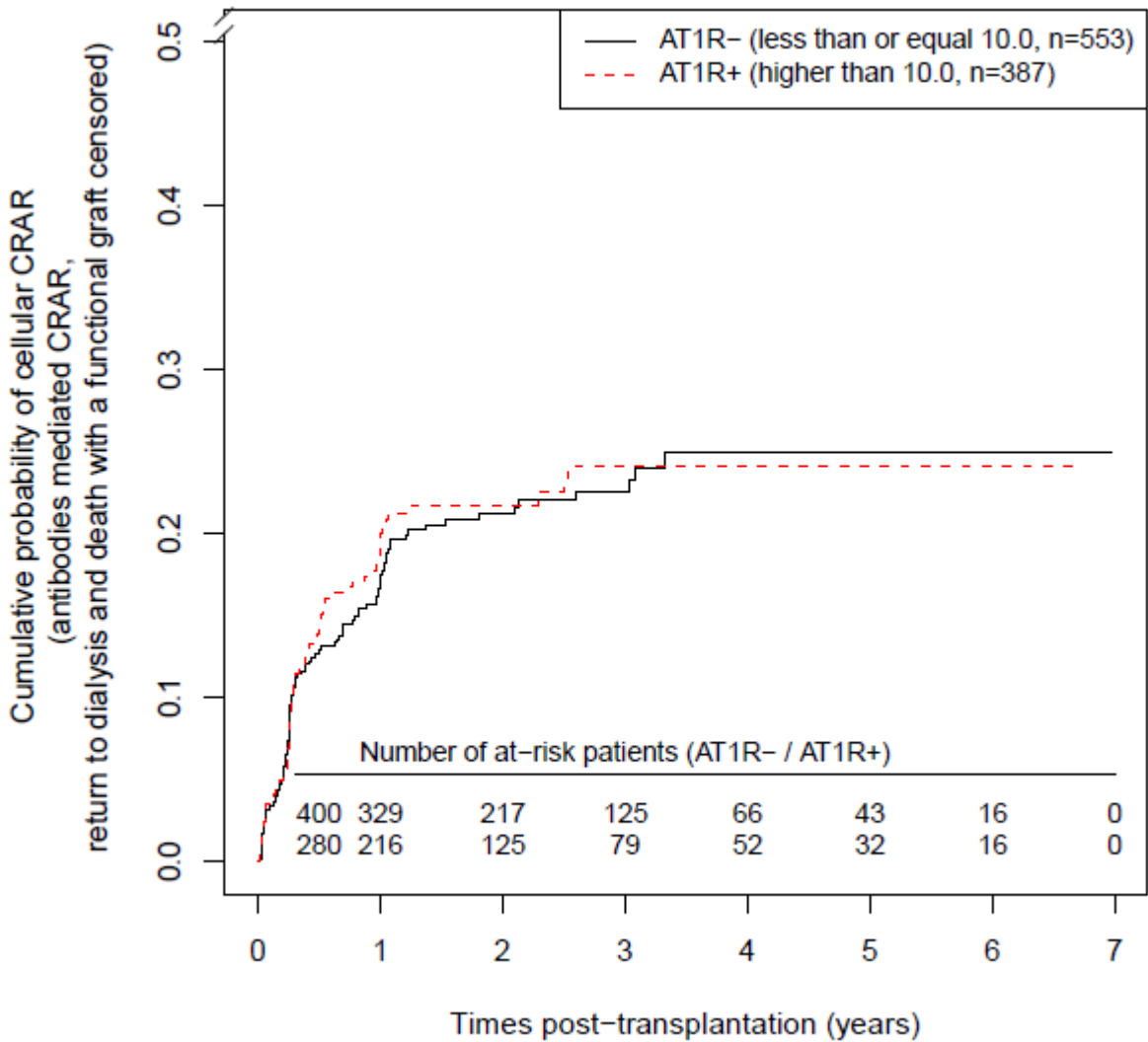


Figure S6: Kaplan-Meier curve for cumulative incidence of antibodies mediated CRAR according to the pretransplant anti AT1R-Abs level above or below 10U/ml.

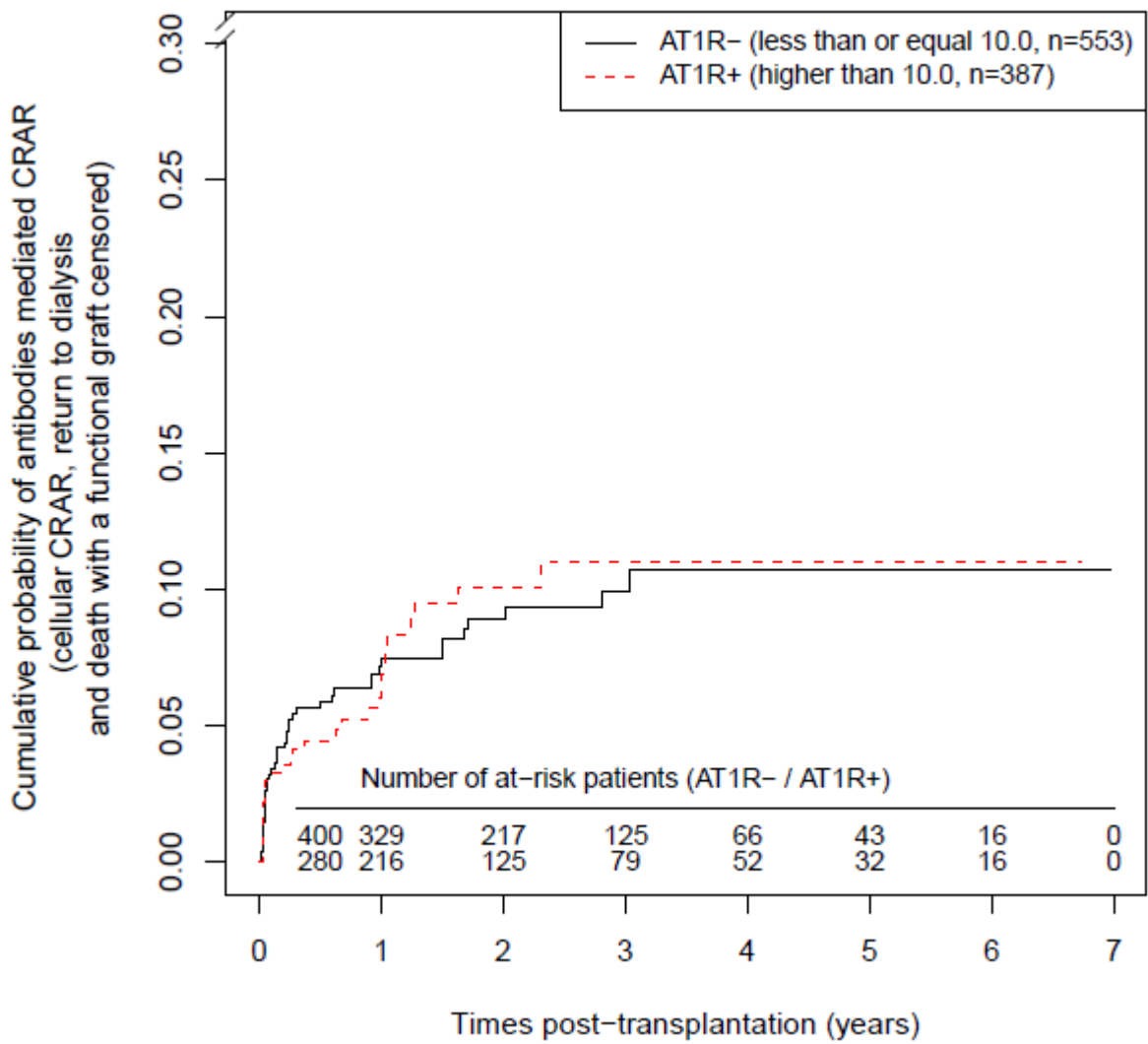


Figure S7: Kaplan Meier curve for cumulative incidence of ARE (return to dialysis and death with functional graft censored)

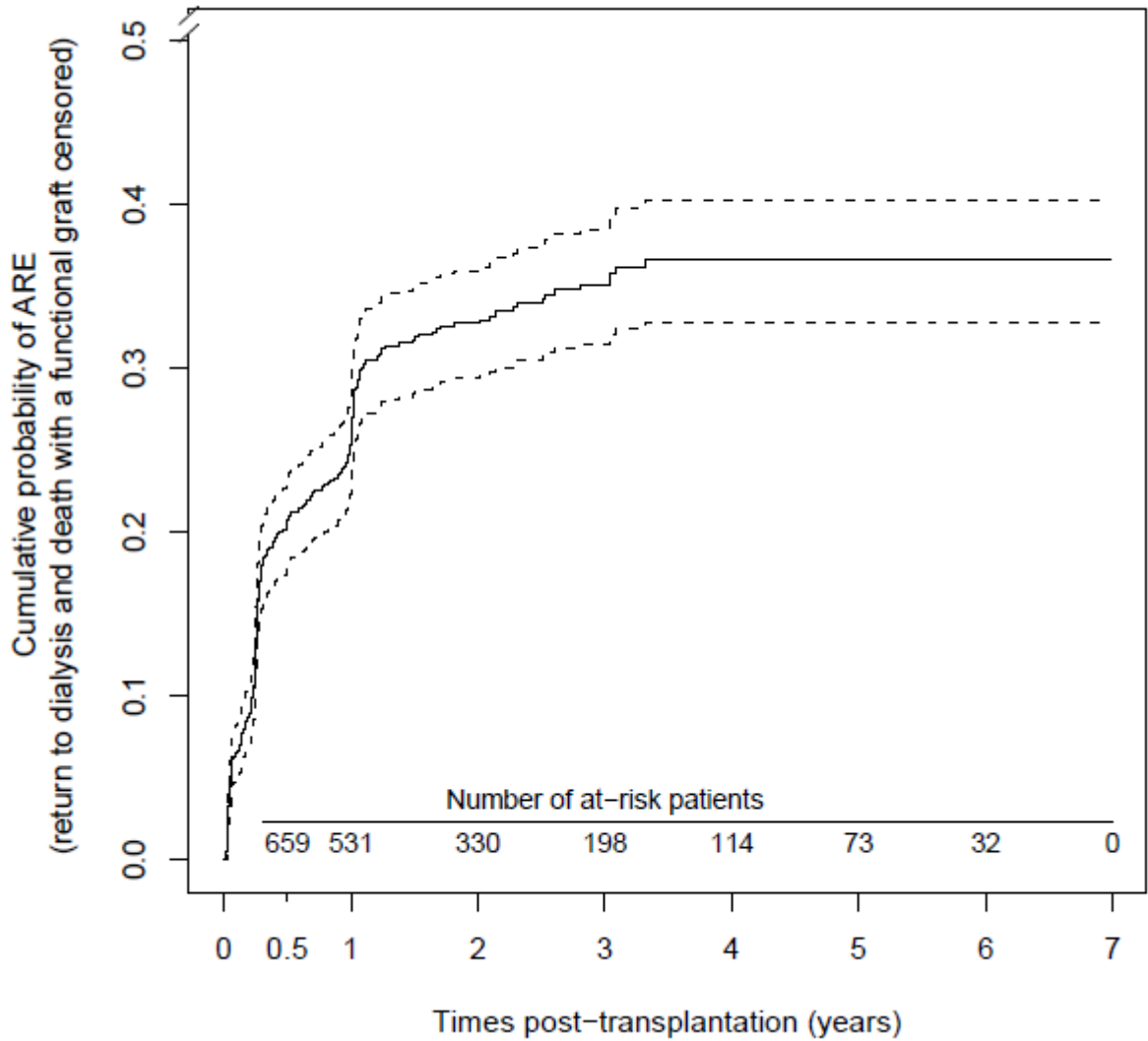


Figure S8: Kaplan Meier curve for death-censored graft survival

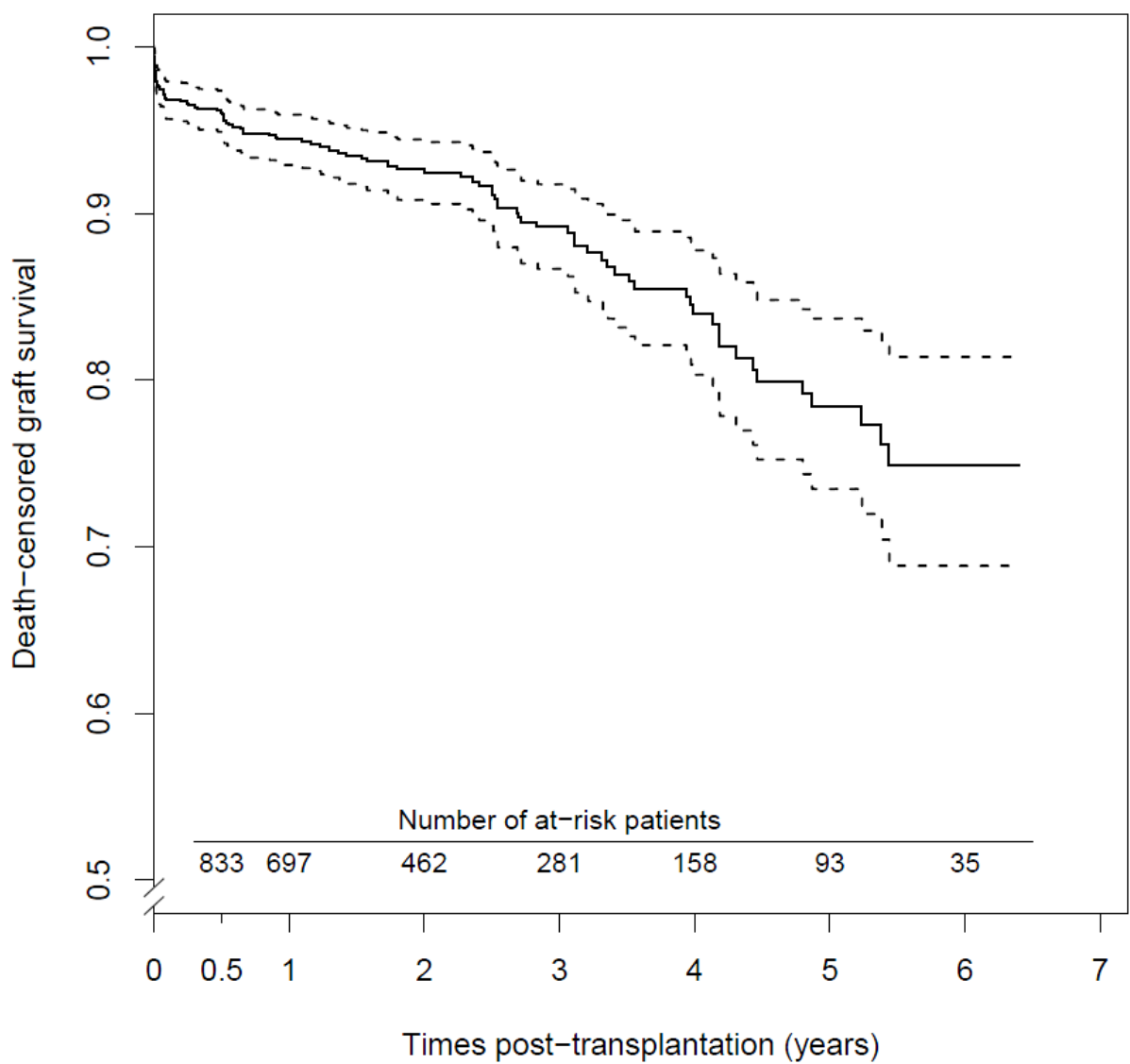


Table S9: Univariate analysis (Cox model) of the risk factor for death-censored graft survival (potential confounding factors of pretransplant anti AT1R-Abs level, n=940).

Characteristics	Missing value	HR	[95%CI]	p-value
Recipient age at transplantation (for 10-year increase)	0	1.23	[1.05-1.44]	0.0087
Transfusion before transplantation (yes versus no)	41	1.07	[0.71-1.60]	0.7430
Autoimmune disease (yes versus no)	0	1.04	[0.68-1.59]	0.8590
Renal vascular initial disease (yes versus no)	0	1.14	[0.61-2.14]	0.6797
Diabetes initial disease (yes versus no)	0	0.83	[0.49-1.43]	0.4990
History of hypertension (yes versus no)	0	0.62	[0.37-1.06]	0.0947
History of cardiac disease (yes versus no)	0	1.78	[1.19-2.66]	0.0062
History of cardiac and/or vascular disease (yes versus no)	0	1.81	[1.22-2.69]	0.0032
History of hepatitis B or C (yes versus no)	0	0.92	[0.40-2.10]	0.8351
History of neoplasia (yes versus no)	0	1.98	[1.20-3.27]	0.0131
Kidney transplantation alone (versus kidney-pancreas)	0	1.93	[0.78-4.76]	0.1149
First transplantation (versus second)	0	0.93	[0.56-1.53]	0.7742
Positive EBV serologic status (yes versus no)	15	0.97	[0.31-3.05]	0.9521
Positive class I at transplantation (yes versus no)	0	1.21	[0.80-1.82]	0.3723
Positive class II at transplantation (yes versus no)	0	0.89	[0.58-1.36]	0.5860

APPENDIX

PRODUCT INSERT

EIA FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTI-AT1R ANTIBODIES

EIA-AT1R, EIA-AT1RS

EU ONLY: For In Vitro Diagnostic Use.

USA/Canada: For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

INTENDED USE

For the determination of antibodies against the Angiotensin II receptor subtype I (AT1R) in serum and plasma.

SUMMARY AND EXPLANATION

Angiotensin II is a peptide hormone which causes vasoconstriction, increased blood pressure, and release of aldosterone from the adrenal cortex. It occupies an important role in the Renin-Angiotensin-System (RAS). Angiotensin II mediates the effects through G-Protein-coupled receptors, the Angiotensin receptors. This product is designed for the determination of antibodies against the Angiotensin II receptor subtype I in serum and plasma.

PRINCIPLE(S)

The anti-Angiotensin receptor 1-Antibody EIA test is an antibody screening test. Angiotensin II Receptor has been precoated onto a microtiter plate. During the first incubation the anti-Angiotensin II receptor 1-antibodies of the samples are immobilized on the plate. The autoantibodies are detected with a POD labeled anti-human IgG antibody. In the following enzymatic substrate reaction the intensity of the color correlates with concentration and/or avidity of the anti-Angiotensin II receptor 1-antibody.

REAGENTS

A. Identification

The EIA for Quantitative Determination Anti-Angiotensin II Receptor Antibody test provides plates pre-coated with Angiotensin II Receptor for the detection of anti-Angiotensin receptor 1-antibodies in human serum using an ELISA based test.

B. Warning or Caution

1. Refer to the Material Safety Data Sheet for detailed information.
2. Please read the instructions carefully before using the kit. The assay procedure should be carried out only by qualified and well-trained employees.
3. **Warning:** AT1R contains thimerosal as a preservative, and 3, 3', 5'-tetramethylbenzidine, and 0.5M sulphuric acid.
4. **Warning:** Some components of the kit contain human blood derivatives. No known test method can offer complete assurance that products derived from human blood will not transmit infectious agents. Therefore, all blood derivatives should be considered potentially infectious. It is recommended that these reagents and human specimens be handled using established good laboratory working practices.
5. **Warning:** Therapy should not be decided based on results alone. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests. Furthermore, we recommend that each laboratory establish its own range for the population tested.

6. **Caution:** Do not use the reagents beyond the expiration date marked on box label.
7. **Caution:** Lipaemic, icteric, haemolysed or microbially contaminated specimen may cause interference.
8. **Caution:** Do not mix reagents from different lots.
9. **Caution:** Do not allow wells to become dry once the assay has begun.

C. Instructions for Use See **Directions for Use**.

D. Storage Instructions

1. AT1R is shipped to the end user at room temperature.
2. Store the kit at 2-8 °C until the expiry date.

E. Purification or Treatment Required for Use See **Directions for Use**.

F. Instability Indications None. Do not use beyond the expiration date.

INSTRUMENT REQUIREMENTS

A. Required Equipment: Standard ELISA reader.

B. Equipment Calibration: Follow manufacturer's instructions for calibration.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

A. Sample Collection and Storage

1. Collect serum or plasma according to your standard procedure.
2. May store at room temperature up to 48 hrs.
3. May store at 2-8 °C up to 4 days.
4. Long term storage up to 12 month at - 20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

B. Preparation of Samples

1. Dilute the human serum or plasma samples with Sample Diluent **1:100** (e. g. 5 µl + 495 µl diluent).

PROCEDURE

A. Materials Provided: Description EIA-AT1R EIA-AT1RS, Cat ID To Contain
Microtiter strips, Angiotensin II-Receptor type 1 coated ATP-MS 12 x 8 ATPS-MS 6 x 8

Wash buffer (10X) • ATP-WB 50 ml ATPS-WB 40 ml

Sample Diluent, ready to use • ATP-SD 50 ml ATPS-SD 30 ml

Conjugate Diluent, ready to use • ATP-CD 14 ml ATPS-CD 7ml

Calibration Standards, ready to use [2.5-5-10-20-40 U/ml] • ATP-CS1

Positive control, ready to use • ATP-PC 1 ml ATPS-PC 0.5ml

Negative control, ready to use • ATP-NC 1 ml ATPS-NC 0.5ml

Anti-human IgG, HRP conjugate, 100fold conc. • ATP-IGG 0.2 ml ATPS-IGG 0.1ml

TMB substrate, ready to use ATP-TMB 12 ml ATPS-TMB 7ml

Stop solution, ready to use (0.5 M sulphuric acid) ATP-SS 12 ml ATPS-SS 7ml : contains Thimerosal

B. Materials Required, But Not Provided

- Deionized or distilled water

- Graduated cylinder
- Micropipettes, multipipette
- Microplate shaker
- Microplate reader
- Refrigerator (2-8 °C)

C. Step-by-step procedure: See **Directions for Use**.

DIRECTIONS FOR USE

It is recommended that all test samples and standards be assayed in duplicate.

If samples generate values higher than the highest standard, dilute the samples with the appropriate Sample Diluent and repeat the assay.

Any variation in standard diluent, operator, pipetting technique, washing technique, incubation time or temperature, and kit age can cause variation in binding.

1. Bring all reagents to room temperature before use. If crystals have formed, mix gently until the crystals have completely dissolved.
2. The microtiter strips are ready to use. Remove excess strips (breakable) from the frame, reseal in the bag with the desiccant and store at 2-8 °C.
3. Dilute the wash buffer with deionized or distilled water **1:10** (e. g. 50 ml + 450 ml water). The diluted solution is stable for 30 days at 2-8 °C.
4. Dilute the HRP conjugate with conjugate diluent **1:100** (e. g. 50 µl + 4950 µl conjugate diluent). The required amount of conjugate solution should be prepared freshly.
5. Calibration standards 1-5, positive control, negative control, sample diluent, conjugate diluent, TMB substrate, and the stop solution are ready to use.
6. Prepare all samples as directed in the previous section.
7. Pipette 100 µl of diluted samples, standards, controls or sample diluent (as blank) into the wells.
8. Seal wells with adhesive strip and incubate for 2 hours at 2-8°C temperature.
9. Remove fluid from wells and wash three times with 300 µl wash buffer. After the last wash, invert the plate and place it on a clean paper towel; tap the plate to remove fluid.
10. Dispense 100 µl of diluted HRP conjugate into each well.
11. Seal wells with adhesive strip and incubate for 1 hour (with shaking) at room temperature.
12. Repeat the wash as in step 9.
13. Dispense 100 µl of TMB substrate solution into each well.
14. Incubate for 20 minutes at room temperature in the dark.
15. Add 100 µl of stop solution to each well.
16. Determine the absorbance within 30 minutes at 450 nm. A reference wavelength of 620 nm/690 nm is recommended.

RESULTS

Calculation of results

Create a four parameter logistics fit curve (x-axis: linear, anti-AT1R-Ab standard points (2.5 U/ml, 5 U/ml, 10 U/ml, 20 U/ml, 40 U/ml); y-axis: linear, absorbance). The sample concentrations can be calculated from this curve.

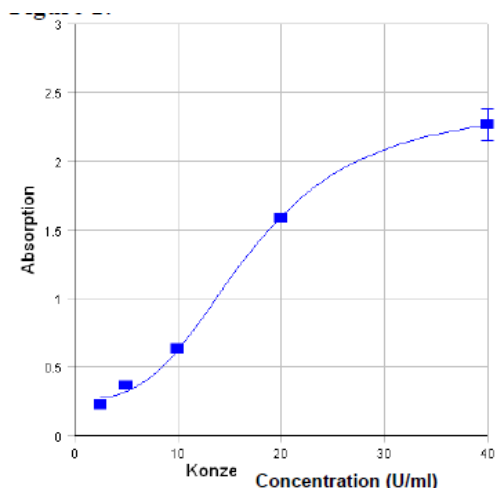


Figure 1:

This standard curve is provided for demonstration only.

A standard curve must be run with each assay.

Concentration (U/ml)

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The possibility of interference by soluble receptors, binding proteins, and other factors present in biological samples cannot be excluded.

EXPECTED VALUES

A. Data Analysis

1. A run is considered valid if the positive control is in the expected range (see positive control vial label for the expected range) and the negative control is less than the cut off (10 U/ml).
2. Samples >17 U/ml are positive, samples 10-17 U/ml are at risk. Samples <10 U/ml are negative. Samples over the standard curve can be assayed again using a higher dilution factor (e.g. 1:500). In this case the concentration read from the standard curve must be multiplied by the additional dilution factor (e.g. 5 for 1:500 dilution).

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Ten identical samples were assayed at the same time, using the same reagents, and by the same technician. The coefficient of variation was found to be as follows: - Intra-assay precision (CV) (n=10) Sample 1 (21.4 U/ml): 3.9% Twenty identical samples were assayed independently on different days, using different reagents, and by different technicians. The coefficient of variation was found to be as follows: - Inter-assay precision (CV) (n=20) Sample 1 (22.9 U/ml): 5.1%

BIBLIOGRAPHY

1. Reinsmoen NL, Lai C-H, Heidecke H, Haas M, Cao K, Ong G, Naim M, Wang Q, Mirocha J, Kahwaji J, Vo AA, Jordan SC, Dragun D: *Anti-Angiotensin Type 1 Receptor Antibodies Associated With Antibody Mediated Rejection in Donor HLA Antibody Negative Patients*. Transplantation 2010;90: 1473–1477
2. Kelsch R, Everding AS, Kuwertz-Bröking E, Brand E, Spriewald BM, Sibrowski W, Konrad M, Dragun D: *Accelerated Kidney Transplant Rejection and Hypertensive Encephalopathy in a Pediatric Patient Associated With Antibodies Against Angiotensin Type 1 Receptor and HLA Class II*. Transplantation 2011 Nov 27;92(10):e57-9

PATENTS

Protected under U.S. Patent No. 8,110,374

EUROPEAN AUTHORIZED REPRESENTATIVE

MDSS GmbH, Schiffgraben 41, D-30175, Hannover, Germany

REVISION HISTORY

Revision Date Revision Description

0 2012/07 Initial Release.Addition of instructions for Use of new product.

1 2013/05 Addition of Sample CAT ID and Components for Sample-Size, EIA-AT1RS.Modified Table under the Procedure/Material Provided section. Added Patent Information Section.

Bibliography

1. Halloran PF. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *N Engl J Med*. 2004;351(26):2715–29.
2. Terasaki P, Lachmann N, Cai J. Summary of the effect of de novo HLA antibodies on chronic kidney graft failure. *ClinTranspl*. 2006;455–62.
3. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am SocNephrol JASN*. avr 2007;18(4):1046–56.
4. Dragun D, Philippe A, Catar R. Role of non-HLA antibodies in organ transplantation. *CurrOpin Organ Transplant*. août 2012;17(4):440–5.
5. Tinckam KJ, Chandraker A. Mechanisms and role of HLA and non-HLA alloantibodies. *Clin J Am SocNephrol CJASN*. mai 2006;1(3):404–14.
6. Zou Y, Stastny P, Süsal C, Döhler B, Opelz G. Antibodies against MICA Antigens and Kidney-Transplant Rejection. *N Engl J Med*. 2007;357(13):1293–300.
7. Dragun D, Catar R, Philippe A. Non-HLA antibodies in solid organ transplantation: recent concepts and clinical relevance. [Miscellaneous Article]. *CurrOpin Organ Transplant* August 2013. 2013;18(4):430–5.
8. Zachary AA, Montgomery RA, Jordan SC, Reinsmoen NL, Claas FHJ, Reed EF. 14th International HLA and Immunogenetics Workshop: Report on understanding antibodies in transplantation. *Tissue Antigens*. 1 avr 2007;69:160–73.
9. Dragun D, Müller DN, Bräsen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelhä M, Dechend R, et al. Angiotensin II Type 1–Receptor Activating Antibodies in Renal-Allograft Rejection. *N Engl J Med*. 2005;352(6):558–69.
10. Riemekasten G, Philippe A, Näther M, Slowinski T, Müller DN, Heidecke H, et al. Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 3 janv 2011;70(3):530–6.
11. Dragun D. Humoral responses directed against non-human leukocyte antigens in solid-organ transplantation. *Transplantation*. 27 oct 2008;86(8):1019–25.
12. Reinsmoen NL. Role of angiotensin II type 1 receptor-activating antibodies in solid organ transplantation. *Hum Immunol*. nov 2013;74(11):1474–7.
13. Ingelfinger JR. Agonistic autoantibodies and rejection of renal allografts. *N Engl J Med*. 10 févr 2005;352(6):617–9.

14. Dragun D, Müller DN, Bräsen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelhä M, Dechend R, et al. Angiotensin II Type 1–Receptor Activating Antibodies in Renal-Allograft Rejection. *N Engl J Med*. 2005;352(6):558– 69.
15. Giral M, Foucher Y, Dufay A, Van Huyen JPD, Renaudin K, Moreau A, et al. Pretransplant sensitization against angiotensin II type 1 receptor is a risk factor for acute rejection and graft loss. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am SocTranspl Surg*. oct 2013;13(10):2567– 76.
16. Gillaizeau F. Multi-state analysis of kidney transplant recipients outcome: a semi-Markov model for studying the role of pre-transplant sensitization against Angiotensin II Type 1 receptor. *Journal de la Société Française de Statistique* , Vol. 155 No. 1 117-133 <http://www.sfds.asso.fr/journal> © Société Française de Statistique et Société Mathématique de France (2014) ISSN: 2102-6238.
17. Reinsmoen NL, Lai C-H, Mirocha J, Cao K, Ong G, Naim M, et al. Increased negative impact of donor HLA-specific together with non-HLA-specific antibodies on graft outcome. *Transplantation*. 15 mars 2014;97(5):595– 601.
18. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL-S, O’Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. *Transplantation*. 27 juill 2004;78(2):242– 9.
19. Rush D. Protocol biopsies for renal transplantation. *Saudi J Kidney Dis Transplant Off Publ Saudi Cent Organ Transplant Saudi Arab*. janv 2010;21(1):1– 9.
20. Mengel M, Chapman JR, Cosio FG, Cavallé-Coll MW, Haller H, Halloran PF, et al. Protocol biopsies in renal transplantation: insights into patient management and pathogenesis. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am SocTranspl Surg*. mars 2007;7(3):512– 7.
21. Nankivell BJ. Subclinical renal allograft rejection and protocol biopsies: quo vadis? *Nat ClinPractNephrol*. mars 2008;4(3):134– 5.
22. Henderson LK, Nankivell BJ, Chapman JR. Surveillance protocol kidney transplant biopsies: their evolving role in clinical practice. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am SocTranspl Surg*. août 2011;11(8):1570– 5.
23. Shishido S, Asanuma H, Nakai H, Mori Y, Satoh H, Kamimaki I, et al. The impact of repeated subclinical acute rejection on the progression of chronic allograft nephropathy. *J Am SocNephrol JASN*. avr 2003;14(4):1046– 52.
24. Nankivell BJ, Chapman JR. The significance of subclinical rejection and the value of protocol biopsies. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am SocTranspl Surg*. sept 2006;6(9):2006– 12.

25. Kee TY-S, Chapman JR, O'Connell PJ, Fung CL-S, Allen RDM, Kable K, et al. Treatment of subclinical rejection diagnosed by protocol biopsy of kidney transplants. *Transplantation*. 15 juill 2006;82(1):36- 42.
26. Suthanthiran M, Schwartz JE, Ding R, Abecassis M, Dadhania D, Samstein B, et al. Urinary-Cell mRNA Profile and Acute Cellular Rejection in Kidney Allografts. *N Engl J Med*. 2013;369(1):20- 31.
27. Taniguchi M, Rebellato LM, Cai J, Hopfield J, Briley KP, Haisch CE, et al. Higher risk of kidney graft failure in the presence of anti-angiotensin II type-1 receptor antibodies. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am SocTranspl Surg*. oct 2013;13(10):2577- 89.
28. Cuevas E, Arreola-Guerra J, Hernandez-Mendez E, Salcedo I, Vilatoba M, Contreras A, et al. Are AT1R Antibodies as Dangerous as HLA-DSAs in Renal Allografts? American Transplant Congress 2015 Abstracts number: 397.
29. Huh K, Lee J, Kim Y, Ahn C. Pretransplant Antibodies Against Angiotensin II Type 1 Receptor in Renal Transplantation: Preliminary Data from the KNOW-KT Study. American Transplan Congress 2015 Abstracts number 1340.

**L'immunisation pré-transplantation contre le récepteur de type 1 à l'angiotensine II (AT1R)
est-elle un facteur de risque dans l'évolution des patients transplantés rénaux ?**

Résumé :

Introduction : Malgré les progrès technologiques dans la détection d'anticorps, certains rejets humoraux restent inexpliqués, car sans anticorps anti HLA détectables. L'étude de l'immunisation non HLA contre le récepteur de type 1 à l'angiotensine II (AT1R) commence à apporter des réponses. L'objectif de notre étude est d'évaluer le rôle étiologique de l'immunisation pré-transplantation contre AT1R dans le devenir des patients transplantés rénaux.

Patients et méthodes : étude d'une cohorte prospective historique multicentrique réunissant les patients greffés rénaux +/- pancréas entre 2008 et 2012 des CHU de Lyon, Nantes et Paris Necker, ayant eu une recherche d'anticorps antiHLA par une technique Luminex® dans les 6 mois pré-transplantation. L'immunisation contre AT1R est évaluée par ELISA sur le sérum pré-transplantation de manière centralisée. Les rejets cliniques sont les lésions histologiques traitées par immunosuppresseurs. Les rejets infra-cliniques sont les lésions histologiques découvertes fortuitement sur une biopsie systématique et non traitées. Les variables influençant la survie sont analysées selon un modèle de Cox.

Résultats : parmi les 940 patients inclus, 342 (36,4%) venaient de Nantes, 332 (35,3%) de Lyon et 266 (28,3%) de Paris Necker. Les incompatibilités HLA > 4 concernaient 52 % des patients. Quinze pourcent des patients avaient des DSA au jour de la greffe. Le taux moyen d'anticorps anti AT1R était de 10.05U/mL. 41.2% des patients avaient des anticorps anti AT1R > 10U/mL. 249 patients ont eu un rejet clinique et 39 un rejet infra clinique. 100 patients ont perdu leur greffon. L'immunisation contre AT1R n'avait pas d'impact sur la survie des greffons HR=0,93 IC95%[0,61-1,41]p=0,7337 ou sur la survie sans rejet clinique HR= 1,01 IC95% [0,781-1,318] p=0,94.

Discussion : Cette étude avec un effectif important de patient n'a pas confirmé le lien entre immunisation contre AT1R et perte de fonction des greffons rénaux. Le taux élevé de rejets selon notre définition, la grande hétérogénéité de suivi, de pratique et d'immunisation selon les centres nécessite de plus amples analyses.

Mots-clés : greffe rénale, immunisation non-HLA, anticorps anti recepteur de type 1 à l'angiotensine II, AT1R.