

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2014

N° 020

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

DES DE PEDIATRIE

par

Alexandra Bruel

née le 29 novembre 1985 à Nantes

Présentée et soutenue publiquement le *24 janvier 2014*

**Biopsies de greffon systématiques en transplantation rénale
pédiatrique : intérêt pour l'adaptation de l'immunosuppression**

Président : Madame le Professeur Véronique Gournay

Directeur de thèse : Madame le Docteur Gwenaëlle Roussey Kesler

REMERCIEMENTS

Au professeur Véronique Gournay

Merci de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Merci pour ton enseignement et ta disponibilité.

Au Docteur Gwenaëlle Roussey Kesler

Merci de m'avoir encadrée pour ce travail. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, pour ton écoute, tes conseils et ta disponibilité. Merci de m'avoir donné le goût de la néphrologie pédiatrique. C'est une chance et un plaisir d'apprendre et de travailler avec toi.

Au professeur Jean-Christophe Roze

Merci de me faire l'honneur de juger ce travail. Merci pour le temps et l'énergie que vous consacrez à notre enseignement. Merci de si bien nous transmettre votre passion pour la pédiatrie et pour la recherche.

Au professeur Magali Giral

Merci de me faire l'honneur de juger ce travail.

Au professeur Georges Karam

Merci de me faire l'honneur de juger ce travail.

Au docteur Anne Moreau

Merci de me faire l'honneur de juger ce travail.

A tous les médecins ayant marqué mon internat

Au professeur Christelle Gras Le guen

Merci pour ton enseignement et ta disponibilité.

Au professeur Fadi Fakhouri

Merci de m'avoir accueillie dans votre équipe. Merci pour votre enseignement et pour votre humour.

A Emma Allain Launay,

Merci pour tout ce que tu as fait pour moi depuis le début de mon internat. Merci de t'être si bien occupée de ma formation avec Gwenaëlle. Merci pour tes bons conseils et ton écoute. C'est également une chance et un plaisir de travailler avec toi.

A Gaëlle Le Henaff,

Merci pour cet excellent semestre en spé et pour ton amitié.

A Bénédicte Leroux,

Ma première chef de clinique et un super coach.

A Sophie Denizot, Gaëlle Caillaux, Cyril Flamant, Louis Baraton, Anne Frondas, Cécile Boscher, Jean-michel Liet, Jean-marc Dejode, Nicolas Joram et tous les autres

Merci pour votre enseignement, pour votre humour et pour votre présence souvent rassurante.

A mes très chers parents,

Merci de m'avoir toujours soutenue et encouragée, merci d'être toujours là pour moi.

A mes frères et sœur, Stéphane, Nico et Natacha, et à leurs moitiés Sophie, Marlen et Sébastien

Merci pour votre présence et votre soutien en toute circonstance, pour tous nos rires et les excellents moments passés tous ensemble.

A mes neveux, Antoine, Mathis, Charlotte, Camille, Anna, Matilda, Tiago et Uma

Parce que vous participez vous aussi largement à mon bonheur.

A mes amis de la fac avec qui j'ai fait mes premiers pas à l'hôpital

Marie, Marie-laure, Anne-laure, Estelle, Seamus, Benjamin, Géraldine, Amélie et Lucie. Merci pour toutes ces années.

A tous mes co-internes, mais plus particulièrement à Elise, Margaux, Mélanie et Sylvie

Sans qui mon internat aurait été beaucoup moins fun ! Merci pour tous ces bons moments partagés avec vous, mais aussi pour les moins faciles où vous avez toujours été là.

A la team 10 de l'INSERM

Merci pour cette très bonne année avec vous, et merci de m'avoir initiée à « La Science »

A Benoît

Parce que c'est toi...

ABREVIATIONS

AMR :	Antibody Mediated Rejection
BSA :	Body Surface Area
CAKUT :	Congenital Anomalies of Kidney and Urinary tract
CMV:	Cytomégalovirus
CNI :	Inhibiteurs des Calcineurines
DSA :	Donor Specific Antibody
EBV :	Epstein Bar Virus
ESRD :	End Stage Renal Disease
FI/AT :	Fibrose Interstitielle et Atrophie Tubulaire
GPB :	Graft Ponction Biopsy
HTA :	Hypertension Artérielle
IL2R :	Interleukin 2 receptor
MMF :	Mycophenolate Mofetil
PMH :	Par Million d'Habitants
PRT :	Pediatric Renal Transplantation
PTLD :	Post Transplantation Lymphoproliferative Disease
TGI :	Taux de Greffons Incompatibles

TABLE DES MATIERES

Introduction	P 6-8
Article	
Introduction	P 9-10
Matériels et Méthodes	P 10-11
Résultats	P 11-13
Discussion	P 13-15
Bibliographie	P 15-16
Annexe 1 : protocole de transplantation rénale pédiatrique	P 17-18
Annexe 2 : Synthèse des résultats et perspectives	P 19-20
Annexe 3 : Classification de Banff 2007	P 21-22
Annexe 4 : Formules d'estimation du débit de filtration glomérulaire	P 23
Bibliographie	P 24-26

INTRODUCTION

L'insuffisance rénale chronique est rare chez l'enfant. Ses causes les plus fréquentes sont les uropathies malformatives et les hypodysplasies rénales, viennent ensuite les glomérulopathies acquises (hyalynose segmentaire et focale, néphropathie à IgA, lupus...) les causes génétiques (syndrome néphrotique congénital, maladies kystiques) et enfin les atteintes vasculaires (syndrome hémolytique et urémique) et les néphrites interstitielles acquises (1,2). Au stade d'insuffisance rénale terminale, lorsque le débit de filtration glomérulaire est inférieur à 15 ml/min/1.73m², ou lorsque les complications de l'insuffisance rénale chronique deviennent menaçantes, la mise en place d'un traitement de suppléance devient indispensable. Le registre REIN (Réseau Epidémiologie et Information en Néphrologie) rapporte en 2011 une prévalence de l'insuffisance rénale terminale chez les moins de 20 ans de 53 par millions d'habitants (pmh) et une incidence de 8 pmh, soit 112 nouveaux cas en 2011 (3). A ce stade, 2 options peuvent être envisagées: l'épuration extra rénale (hémodialyse ou dialyse péritonéale) ou la transplantation rénale (4,5). La transplantation rénale est la solution de choix, augmentant de façon considérable la qualité et l'espérance de vie de l'enfant, en diminuant notamment le risque de complications cardio-vasculaires (1,4). Lorsqu'elle peut être anticipée, la transplantation rénale préemptive (avant mise en dialyse) doit être privilégiée. En France, 27% des enfants en insuffisance rénale terminale reçoivent une transplantation rénale préemptive (3).

Ces dernières décennies, le développement de nouveaux traitements immunosuppresseurs a permis une amélioration considérable du pronostic à court terme du greffon rénal avec un taux de survie à 1 an supérieur à 90%. L'immunosuppression classique en greffe rénale pédiatrique comprend le plus souvent un traitement d'induction avec des anticorps (basiliximab ou globulines anti-lymphocytaires) et de la méthylprednisolone, et un traitement d'entretien par anti calcineurines (CNI : ciclosporine ou tacrolimus), mycophenolate mofetil (MMF) et corticoïdes (prednisone)(6–8). La ciclosporine est de plus en plus souvent abandonnée au profit du tacrolimus, d'autant plus que certaines études ont montré une diminution des rejets infracliniques avec le tacrolimus (9,10) . L'adjonction de MMF aux CNI a diminué le risque de rejet et amélioré le pronostic rénal à court terme (10–12). Ces puissants immunosuppresseurs ont permis de diminuer considérablement le taux de rejet aigu, mais sont responsables de nombreux effets secondaires (hypertension artérielle, néphrotoxicité, infections, tumeurs...). Les corticoïdes, en particulier, entraînent hypertension artérielle (HTA), dyslipidémies (pouvant à long terme altérer la fonction du greffon), ostéoporose et fractures, intolérance

glucidique, et enfin chez l'enfant un ralentissement de la croissance et des complications esthétiques parfois difficiles à tolérer (13). Des protocoles d'épargne en corticoïdes se développent en transplantation rénale pédiatrique dans le monde, mais leur utilisation en France reste limitée.

Par ailleurs, en dépit des progrès importants sur le rejet aigu, le pronostic rénal à long terme n'a que peu évolué avec une dysfonction chronique du greffon conduisant inéluctablement à sa perte après quelques années (7,14,15). De nombreuses études avec biopsies de transplant systématiques répétées jusqu'à 30 ans post greffe ont permis de décrire l'évolution des lésions chroniques du greffon. La première année sont retrouvées des lésions de rejet infraclinique ou des lésions borderline, prépondérantes dans les premiers mois suivant la greffe, avec des lésions de fibrose interstitielle et atrophie tubulaire (FI/AT) qui augmentent progressivement et deviennent quasi universelles après quelques années de greffe (16). Apparaissent secondairement des lésions de la microcirculation et des lésions glomérulaires. Les lésions de néphrotoxicité des CNI apparaissent progressivement au cours des années et ont longtemps été tenues pour principales responsables de la « néphropathie chronique d'allogreffe », avec des essais de minimisation de leur utilisation, aux résultats controversés (17–19). Le terme de néphropathie chronique d'allogreffe, terme imprécis et peu spécifique, utilisé pour décrire de façon générale la dysfonction chronique du greffon, a été supprimé lors de la conférence de consensus de Banff en 2005, faisant apparaître le terme de FI/AT (20). Les causes spécifiques de FI/AT, qu'elles soient immunologiques ou non immunologiques, doivent être recherchées afin de pouvoir mettre en place la prise en charge adaptée. Plus récemment plusieurs études ont montré le rôle prépondérant du rejet chronique humoral ou cellulaire dans la dysfonction chronique du greffon. Deux études ont repris à posteriori les résultats de toutes les biopsies rénales de patients ayant perdu leur greffon et ont retrouvé une part importante de FI/AT dont la première cause était un rejet humoral ou cellulaire, et de façon inattendue peu de lésions de néphrotoxicité des CNI (15,21,22). Les critères de Banff de lésions histologiques du greffon rénal sont présentés en annexe 3.

Les biopsies systématiques, c'est-à-dire réalisées à un moment déterminé après la transplantation, en dehors de toute modification clinique ou biologique (protéinurie, ascension de la créatinine, HTA, apparition d'anticorps contre le donneur) faisant craindre un rejet aigu ou une dysfonction du greffon, se sont développées initialement en transplantation rénale chez l'adulte. Leur objectif est de déceler précocement des lésions asymptomatiques du greffon afin de pouvoir les traiter. La biopsie rénale est un geste à risque. Les complications peuvent aller de l'hématurie macroscopique isolée, à l'hématome du greffon, la fistule artérioveineuse, et dans de très rares cas à la perte du greffon. Chez l'enfant, l'intérêt des biopsies systématiques de dépistage est toujours discuté même si en pratique, elles sont de plus en plus souvent réalisées. Les enfants sont particulièrement à risque de

rejet infra-clinique. Premièrement, une réponse plus importante aux stimulations antigéniques a été décrite dans cette population avec un risque de rejet aigu qui serait ainsi majoré (23–25). Ensuite la disproportion entre la masse musculaire de l'enfant et la masse rénale d'un greffon d'adulte a été évoquée dans le retard d'ascension de la créatinine comme marqueur de rejet (8,23,26). Les rejets aigus infra-cliniques, qui sont retrouvés le plus fréquemment dans les premiers mois de la greffe, sont associés à une moins bonne survie du greffon et à une moins bonne fonction rénale à long terme (7,10,11,27,28). Il semble donc important de réaliser des biopsies systématiques de dépistage précoces dans les 6 mois suivant la greffe. Kanzelmeyer a souligné l'intérêt du dépistage des lésions de rejet infra-clinique en montrant à 3,5 ans un meilleur débit de filtration glomérulaire chez les enfants ayant bénéficié de biopsies systématiques (avec traitement des rejets infra-cliniques) par rapport aux enfants contrôles n'ayant pas eu de biopsies systématiques (29).

Deux préoccupations importantes à l'heure actuelle en greffe rénale sont d'une part la minimisation des effets secondaires des traitements immunosuppresseurs (néphrotoxicité, infections, croissance, HTA, tumeurs) sans augmenter le risque de rejet et d'autre part le dépistage précoce et le traitement adapté des différentes lésions immunologiques ou non conduisant à la dysfonction du greffon. Nous avons souhaité décrire les résultats des biopsies de greffon systématiques entre 3 et 6 mois, et le devenir à un an, d'une cohorte de 28 enfants ayant reçu une transplantation rénale avec un protocole d'épargne en corticoïdes adapté à leur risque immunologique. L'objectif principal de cette étude était d'évaluer la sécurité de notre protocole d'immunosuppression avec minimisation de la corticothérapie adaptée au risque immunologique. L'objectif secondaire était d'étudier l'intérêt des biopsies systématiques en transplantation rénale pédiatrique et leur impact éventuel sur la prise en charge des patients.

Cette étude a été acceptée pour publication par *pediatric transplantation*. L'article est présenté tel qu'il sera publié en version originale.

Le protocole de transplantation rénale pédiatrique du CHU de Nantes est présenté en annexe 1.

Les principaux résultats et conclusions en français sont présentés en annexe 2.

Early protocol biopsies in pediatric renal transplantation: Interest for the adaptation of immunosuppression

Bruel A, Allain-Launay E, Humbert J, Ryckewaert A, Champion G, Moreau A, Renaudin K, Karam G, Roussey-Kesler G. Early protocol biopsies in pediatric renal transplantation: Interest for the adaptation of immunosuppression.

Abstract: GPB are often performed in PRT to detect subclinical acute rejection or IF/TA. Reducing immunosuppression side effects without increasing rejection is a major concern in PRT. We report the results of GPB in children transplanted with a steroid-sparing protocol adapted to immunological risk. Children under 18 yr who received a renal transplantation between April 1, 2009 and May 31, 2012 were included. Immunosuppression consisted of an antibody induction therapy, tacrolimus, and MMF for all recipients. CSs were administered to children under five yr old, or receiving a second allograft. Twenty-eight children were included, 50% were CSs free. GPB were performed between three and six months. IF/TA was documented in seven biopsies; four of these seven children were CS free. One child, with CSs, presented a borderline rejection, and another child, steroid free, with significant inflammatory interstitial infiltrate, considered as a subclinical rejection, was treated with CSs pulses. The median eGFR was stable (74, 67.5, and 82 mL/min/1.73 m² at, respectively, seven days, three months, and one yr). Patient and graft survival were 100%. These results have to be confirmed in a larger cohort, with long-term follow-up.

Alexandra Bruel¹, Emma Allain-Launay¹, Julie Humbert¹, Amélie Ryckewaert², Gérard Champion³, Anne Moreau⁴, Karine Renaudin⁴, Georges Karam⁵ and Gwenaelle Roussey-Kesler¹

¹Department of Pediatrics, Nantes University Hospital, Nantes, France, ²Department of Pediatrics, Rennes University Hospital, Rennes, France, ³Department of Pediatrics, Angers University Hospital, Angers, France, ⁴Department of Anatomopathology, Nantes University Hospital, Nantes, France, ⁵Department of Urology and Renal Transplantation, Nantes University Hospital, Nantes, France

Key words: pediatric renal transplantation – steroid minimization – protocol biopsies – immunological risk

Gwenaelle Roussey-Kesler, Clinique Medicale Pédiatrique, Hôpital Mère enfants, Centre Hospitalier Universitaire, Quai Moncoussu, 44093 Nantes, France
Tel.: +33 2 40 08 36 60
Fax: +33 2 40 08 36 65
E-mail: gwenaelle.roussey@chu-nantes.fr

Accepted for publication 25 October 2013

Over the last two decades, the development of new immunosuppressive drugs and treatment regimens has improved the short-term prognosis for renal transplantation considerably, with a graft survival rate at one yr approaching 90%. In spite of this significant progress, long-term

graft survival has not improved, with chronic dysfunction of the transplant leading inevitably to its loss (1–4). Several studies using GPB repeated until 30 yr post-transplant have permitted the evolution of chronic renal allograft injury to be studied (4, 5). During the first year post-transplant, protocol biopsies reveal subclinical rejection and borderline lesions, mostly during the first six months, often associated with IF/TA, which progressively increases and becomes almost universal after a few years post-transplant (4). Beyond one yr, microvascular and glomerular injuries appear. Nephrotoxic lesions are frequent after a few years, and CAN was for a long time attributed, at least partially, to CNI nephrotoxicity. CNI minimization trials have been developed with controversial results (6, 7). The term “CAN” while imprecise and unspecific to describe chronic allograft dysfunction was modified during the 2005 Banff meeting,

Abbreviations: AMR, antibody-mediated rejection; anti-IL2R, anti-interleukin 2 receptor; ATG, antithymocyte globulin; BSA, body surface area; CAKUT, congenital anomalies of kidney and urinary tract; CAN, chronic allograft nephropathy; CMV, cytomegalovirus; CNI, calcineurin inhibitor; CS, corticosteroid; DSA, donor-specific antibodies; EBV, Epstein–Barr virus; eGFR, estimated glomerular filtration rate; ESRD, end-stage renal disease; GFR, glomerular filtration rates; GPB, graft protocol biopsies; IF/TA, interstitial fibrosis and tubular atrophy; MDRD, Modification of the diet in renal disease; MMF, mycophenolate mofetil; PRT, pediatric renal transplantation; PTLD, post transplantation lymphoproliferative disease; Scr, serum creatinine; TGI, incompatible graft rate.

and IF/TA is now used. Specific immunological and/or non-immunological causes of IF/TA are yet to be fully determined and are sorely required to allow adaptive treatments to be applicable. More recently, several studies have shown the dominant role of antibody-mediated or chronic cellular rejection in the chronic dysfunction of renal transplants. Several retrospective studies combining the results of all renal biopsies from patients who had lost their renal transplant revealed an important role for IF/TA, with the primary cause being antibody-mediated or chronic cellular rejection while only a few were attributable to CNI nephrotoxicity (2, 3, 8).

The rationale for protocol biopsies in PRT is still debated even though they are routinely performed by many transplantation teams in clinical practice (9). Renal biopsy is an invasive procedure that is not without risk (hemorrhage, loss of graft...), even though serious complications are rare. Subclinical acute rejection most frequently occurs during the first months after transplantation and is associated with reduced graft survival and long-term renal function (3, 10–13). Children are particularly at risk of subclinical rejection, partly because of a more important response to antigenic stimulation (9, 14, 15), and because traditional biomarkers of rejection such as rising SCr are difficult to detect in the setting of low recipient body mass and high nephron mass when adult donors are used (9, 16, 17). In this context, it is particularly important to perform early protocol biopsies during the first six months following the transplantation. To support this, Kanzelmeyer et al. (18) showed that children subjected to protocol biopsies and when necessary treated for subclinical rejection, had better GFR at three and a half yr, compared with children without protocol biopsies. Presently, two major concerns in PRT are on the one hand minimizing the side effects of immunosuppressive therapy (nephrotoxicity, infections, growth retardation, hypertension, tumors) without increasing the risk of rejection, and on the other hand, the early detection and appropriate treatment for various immunological or non-immunological lesions that may lead to graft dysfunction. Although steroid minimization protocols have been developed to lower their side effects, they remain part of the classical immunosuppressive regimen in pediatric and adult renal transplantation. In this retrospective monocentric study, we describe the results of protocol biopsies performed between three and six months post-transplant in a cohort of 28 children who received a renal transplant along with a protocol of CS sparing that was adapted to their immunological risk.

Materials and methods

Patients

All children under 18 yr old who received a renal transplantation between April 1, 2009 and May 31, 2012 at Nantes University Hospital were included in the study. Clinical and biological data were retrospectively extracted from a prospectively entered database. The study was accepted by the local ethics committee.

Immunosuppression

All the children receiving a first renal allograft received induction therapy of one pulse of methylprednisolone (300 mg/m²) and two doses of anti-IL2R antibodies (basiliximab, 10 mg under 35 kg and 20 mg above, at day 0 and day 4). MMF was administered from day 1 at the dose of 600 mg/m² twice a day for the first 14 days, then tapered to 300 mg/m² twice daily. At day 0, children also received tacrolimus 0.1 mg/kg, then adapted to residual blood concentration (objective: 8–12 ng/mL initially).

A CS-sparing protocol was used and was adapted according to the immunological risk: complete CS avoidance for children with low immunological risk, or classical immunosuppression regimen including CS for children at high immunological risk. We distinguish three levels of immunological risk: low-risk patients, high-risk patients, and very high-risk patients. Children older than five yr old, at low immunological risk (no alloimmunization), receiving a first renal transplant were totally steroid free after induction therapy. Children under five yr, considered at high risk of graft rejection because of a stronger immune response, received classic immunosuppression with prednisone 60 mg/m²/day on day 1, 40 mg/m²/day between day 2 and 7, 30 mg/m²/day from day 8 to 14, 20 mg/m²/day between day 15 and 28, 10 mg/m²/day between day 29 and 42, and finally 5 mg/m²/day. CSs were then withdrawn on a case-by-case basis, depending on the immunological risk, growth, and if the protocol biopsy was normal, usually after five yr old. Children receiving a second renal allograft, or hyperimmunized were considered at very high risk and had an induction therapy including ATG over seven days, and in the post-transplant period, they received CS with the same decreasing protocol as described earlier, but without interruption. The maintenance regimen also included MMF and tacrolimus, as for the other children. The immunosuppression protocol is presented in Fig. 1.

Infectious prophylaxis

All children received prophylaxis against *Pneumocystis carinii* by trimethoprim–sulfamethoxazole, with the dose adapted to GFR, during the first six months. Digestive candidosis was prevented by the administration of oral amphotericin B at a dose of 50 mg/kg/day for two months.

In case of an unfavorable mismatch for EBV or CMV (i.e., Donor+ and Recipient–), children received valganciclovir for six months. The dose was adapted to their renal function (19). Until 2011, acyclovir was used for EBV prophylaxis and valganciclovir for CMV prophylaxis.

Monitoring of the children

At discharge after transplantation, systematic clinical visits were planned at least three times a week for two wk, then twice a week for two wk, once a week for one month, once

Protocol biopsies in renal transplantation

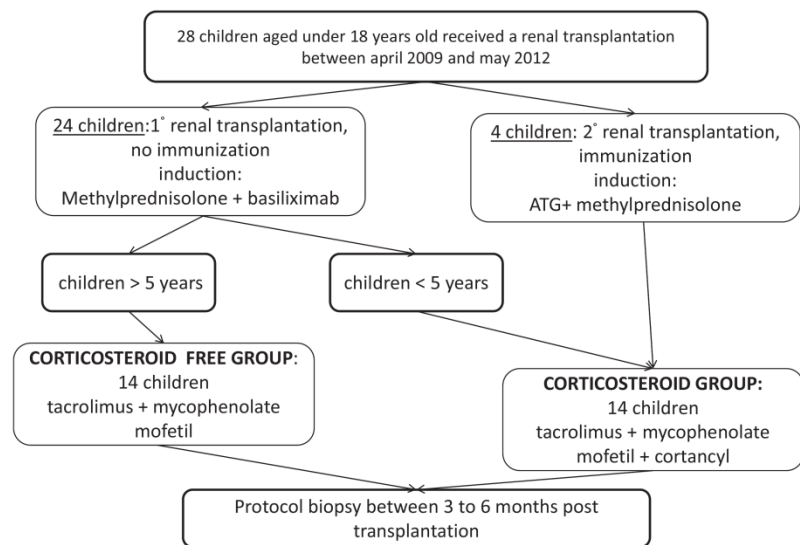


Fig. 1. Immunosuppression protocol.

every two wk for one month, once every three wk for two months, and finally once a month. At each visit, proteinuria was measured and assessed by calculating the proteinuria/creatininuria ratio (g/g). SCr was also measured, and the glomerular filtration rate was estimated by the Schwartz formula in young children and by the MDRD equation after puberty (20, 21). Anti-HLA antibodies were measured at one, three, and six months following the transplant, and then yearly.

The residual blood tacrolimus concentration was also measured each time. The objective progressively decreased to 8 ng/mL at months 3–6, to 6–8 ng/mL thereafter.

Protocol biopsies

Protocol biopsies were performed from April 2009, at six months post-transplant initially, and then from January 2010, at three months post-transplant, with the objective to detect and treat more precociously lesions of subclinical rejection. In case of anomalies on the initial biopsy, it was controlled within a variable time, depending on the abnormality found and on the eventual therapies applied. Biopsies for cause were also performed in the case of clinical or biochemical parameters that suggested acute rejection such as rising SCr, proteinuria, or graft pain. Biopsies were performed for younger children in the operating room under general anesthesia. For older children, they were performed under local anesthesia (lidocaine) and nitrous oxide with a premedication by hydroxyzine and nalbuphine.

Prebiopsy ultrasound guidance was performed by a radiologist. Two samples were collected using an automatic pistol with an 18-gauge needle: A frozen sample was used for immunofluorescence histology, and the second was preserved in Carnoy's fluid and used for H&E histological analysis by light microscopy.

Histological analysis

Histological lesions were interpreted according to the Banff classification 2007 (22). Subclinical rejection was defined as interstitial inflammation $i \geq 2$, and tubulitis $t \geq 2$ on protocol biopsies without either a significant increase in the baseline SCr ($\leq 15\%$), or clinical signs of rejection (graft

tenderness, hypertension, or fever). Borderline lesions were defined as interstitial infiltration $i < 2$ associated with tubulitis $t \geq 1$. AMR was defined by the association of histological lesions (glomerulitis and capillaritis) and of C4d staining on peritubular capillaries. IF/TA was graded based on the score of interstitial fibrosis (ci) and tubular atrophy (ct).

Statistical analysis

Quantitative variables were expressed as median and quartiles, and qualitative variables as number and percentage. We compared characteristics of children with or without lesions of IF/TA at three months. Fisher's exact test was performed for qualitative variables, and a Wilcoxon test was used for quantitative variables. p Values < 0.05 were considered to indicate statistical significance.

Results

Patients

Between April 1, 2009 and May 31, 2012, 28 children received a renal transplant at Nantes University Hospital. The main causes were CAKUT: posterior urethral valves, renal dysplasia associated or not with vesicoureteral reflux, and congenital nephrotic syndromes. Cystic diseases were TCF2 mutations and autosomal recessive polycystic disease. Causes for ESRD are presented in Fig. 2. Thirteen cases were preemptive transplantations (46%). Four children received a second renal allograft during this period. Ten patients were aged under five, and 15 had a small BSA < 1 . Eight children had anti-HLA antibodies at the time of transplantation (precedent transplantation or transfusions). Three hypersensitized recipients were considered as high immunological risk (incompatible graft rate [TGI] $> 85\%$) according to the French biomedicine agency, after their first kidney transplantation.

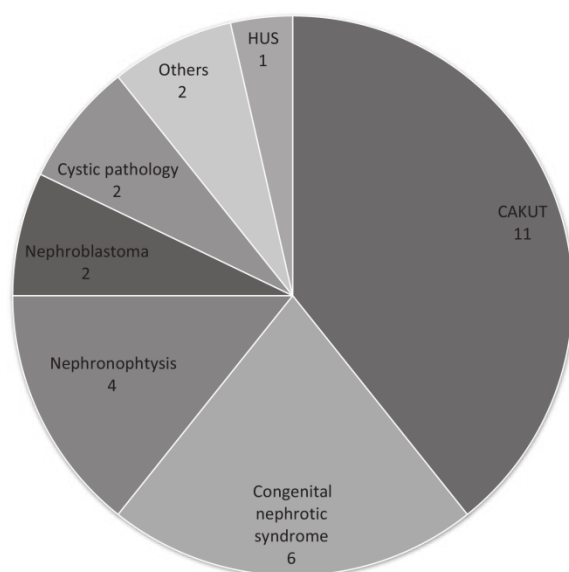


Fig. 2. Initial nephropathy.

Table 1. Donor and recipient characteristics

	Recipient n = 28	Donor n = 28
Age	9.0 [2.7; 14.0]	15.5 [9.7; 16.4]
Weight	21.0 [10.6; 41.0]	60.0 [41.0; 69.0]
BSA	0.84 [0.47; 1.28]	1.69 [1.27; 1.83]
EBV+	11 (39%)	24 (86%)
Previous transfusion	16 (57%)	
Previous alloimmunization	8 (29%)	
Dialysis	15 (54%)	
Cold ischemia (hours)	14 [9.7; 16.4]	
HLA mismatch (A-B-DR)	4 [4; 5.25]	
Living donor	5 (17.8%)	
Corticosteroids post-transplantation	14 (50%)	

Results presented as median/quartiles or number (%).

Renal transplantation

Median age at transplantation was nine yr (2.7; 14.0). Most of the donors were deceased donors (82%). Median cold ischemia time was 14 h (9.7; 16.4). Recipient and donor characteristics are presented in Table 1. Two children presented delayed graft function (designated as requiring dialysis during the first post-transplant week). They both recovered a correct renal function after a few days. Lymphocytotoxicity cross-match was negative for all the children. Fourteen children (50%) were steroid free after transplantation. Median peak of tacrolimus was 11.9 ng/mL (10.7; 13.3) and was reached around day 14.

Biopsies

Six children had a biopsy for cause during the first three months post-transplant. Biopsy indications

included an increase in SCr from baseline >15% for five of them, and the presence of DSA for the last one. All six biopsies were considered as normal. Twenty-six protocol biopsies were performed: four of them at six months post-transplant and the others at three months post-transplant. None of these biopsies showed subclinical rejection meeting the Banff 2007 criteria. A child in the CS-free treatment group was however treated as so: He presented grade 1 IF/TA lesions with a significant inflammatory infiltrate (ti1), C4d staining was negative, SCr was stable, and there was no DSA. He received methylprednisolone pulses and then oral CS. A control biopsy, six wk after the treatment, showed a significant decrease in the inflammation, but IF/TA remained. Another child, receiving CS, presented borderline lesions with moderate interstitial infiltration (i1) and tubulitis (t2), C4d staining was negative. His immunosuppressive treatment was optimized: increase in MMF, tacrolimus, and of CS (10 mg/m²/day). Control biopsy at six months post-transplant showed persistent IF/TA without borderline lesions.

IF/TA

Five children presented isolated grade 1 IF/TA on protocol biopsy. Other biopsies were considered as normal or showed minimal microcirculation lesions. Among the seven children with IF/TA, four were steroid free ($p = 1$). Six of them received a graft from a deceased donor ($p = 0.57$). Donors were significantly older in the group of children with IF/TA (20 yr [16; 42] vs. 15 yr [10; 16], $p = 0.03$). There was no other significant difference concerning baseline patient or donor characteristics or transplantation data between children presenting IF/TA and children with normal biopsies. There was no significant difference regarding eGFR at seven days and one yr between the two groups, but eGFR at three months was significantly lower in the group without IF/TA (60 vs. 92 mL/min/1.73 m²; $p < 0.01$). At that time, tacrolimus residual level was higher in this group (8.3 vs. 6; $p = 0.05$). Their characteristics are presented in Table 2.

To summarize, at three to six months, we found one borderline rejection, and one child treated as subclinical rejection because of important inflammatory infiltration (7% of the cohort), and seven children presented IF/TA grade 1 (25%).

Complications

Seventeen children were seronegative for EBV (EBV-) at the time of renal transplantation, with an unfavorable mismatch (Donor+/Recipient-)

Protocol biopsies in renal transplantation

Table 2. Characteristics and evolution of patients presenting IF/TA

	IF/TA n = 7	No IF/TA n = 21	p
Characteristics at transplantation			
Donor age (yr)	20 [16; 42]	15 [10; 16]	0.03
Recipient age (yr)	14 [6; 14.5]	9 [2.12]	0.13
Donor weight (kg)	66 [62; 71]	49 [40; 66]	0.25
Recipient weight (kg)	41 [16; 50]	20 [10; 33]	0.10
Cold ischemia (hours)	10.0 [5.7; 12.2]	15.5 [11.3; 16.5]	0.15
Delta BSA	1.6 [1.4; 2.3]	1.6 [1.3; 2.5]	0.97
HLA mismatch (A, B, DR, DQ)	4 [3; 5]	4 [4; 5]	0.34
Alloimmunization	2 (28.6)	6 (28.6)	1.00
Dialysis	2 (28.6)	13 (61.9)	0.19
Transfusion	2 (28.6)	14 (66.7)	0.10
Living donor	2 (28.6)	3 (14.3)	0.57
Corticosteroids	3 (42.9)	11 (52.4)	1.00
Evolution of renal function			
eGFR day 7	88 [66; 105]	67 [60; 104]	0.67
eGFR 3 months	92 [78; 100]	60 [58; 68]	<0.01
Residual tacrolimus 3 months	6 [5.2; 6.7]	8.3 [7.1; 9.0]	0.05
eGFR 1 yr	85 [80; 99]	76 [60; 92]	0.25

Results presented as median and quartiles or number (%). eGFR (mL/min/1.73 m²).

for 14 of them. Ten children of them (72%) presented EBV primoinfection (positive viral PCR). One child had a severe primoinfection with refractory anemia and biopsy-proven EBV gastritis. Two children had adenoidectomy (non-specific lymphoid hyperplasia on biopsy), and another, a normal tonsillar biopsy. For six children, there was a decrease in immunosuppressive treatment. One child had BK virus nephropathy that evolved favorably with reduction in immunosuppression, and another one had important BK virus viremia (>4 log) without nephropathy. There were two CMV primoinfections, treated with valganciclovir for one and IV ganciclovir for the other. One child was hospitalized for ethmoiditis. There was no other severe infectious complication. There was neither tumoral complication nor recurrence of the initial nephropathy.

Three children presented macroscopic hematuria after the graft biopsy, which disappeared spontaneously in <24 h. There was no severe biopsy complication and arteriovenous fistula.

Evolution

Children and graft survival at one yr was 100%. The eGFR was stable during the first year (Table 3). The median eGFR at one yr was 82 mL/min/1.73 m² (71.7; 95). Two children had a biopsy for cause at one yr post-transplant, revealing IF/TA grade 1, although their biopsies at three months were normal (one child was CS free, and the other was under CS).

Table 3. Evolution of renal function

	Mean	s.d.	Median	Quartiles
eGFR day 7	83	37.3	74	[60.0; 106.2]
eGFR 3 months	74.9	22.9	67.5	[59.7; 85.2]
eGFR 1 yr	84	26.2	82.0	[71.7; 95.0]

eGFR (mL/min/1.73 m²); s.d., standard deviation.

Discussion

We present here the results of early protocol biopsies and the evolution of renal function during the first year post-transplant for 28 children who received a renal allograft with a protocol of steroid sparing adapted to their immunological risk: total CS avoidance in low-risk patients, classical immunosuppressive regimen including CS, with possible late withdrawal, on case-by-case basis in high-risk patients. Patient and graft survival were 100%, with a low rate of subclinical rejection, and no clinical rejection.

Children are at higher risk of subclinical rejection with a delayed elevation of SCr, occurring well after the onset of histological lesions (9, 17). Bunchman et al. have shown that the rise of SCr was only found in 45% of cases within eight wk prior to the biopsy, whereas hypertension seemed to have a greater predictive value. In our cohort, SCr was not found to be a predictive factor for rejection or IF/TA. Estimated GFR at the time of the biopsy for children with histological lesions was even higher than that of the rest of the cohort. These data are in accordance with Birk et al. (16), who found that SCr was not a good predictive indication of acute rejection, or of good response to antirejection therapy. Furthermore, protocol biopsies leading to treatment adaptation may improve long-term graft function (18). Thus, protocol biopsies seem to be essential for detection of lesions precociously and to provide the appropriate care. The results of graft biopsies have to be interpreted cautiously; indeed, some studies have shown that two fragments taken from different locations of the graft were not always similar (23).

Subclinical rejection (Banff grade ≥ IA) detected by protocol biopsies is more common in the first months after transplantation with a frequency of 7–17% between three and six months post-transplant (2–4). In our cohort, even considering that the child treated with methylprednisolone pulses for IF/TA with inflammatory interstitial infiltrate had a subclinical rejection, subclinical rejection rates (3.5%) were lower than previously reported. Borderline lesions are present in 20–30% of biopsies performed between

three and six months in pediatric and adult renal transplantation, which is also superior to the rate found in our cohort (3.5%) (3, 24, 25). It seems important to detect subclinical rejection, which is associated with the progression of IF/TA and to long-term graft dysfunction, especially when subclinical rejection and IF/TA are combined (10, 11, 24, 26).

Lesions of IF/TA are associated with poorer long-term renal function and are found in 30% of graft losses, and are often associated with AMR or cellular rejection (2, 12, 13, 25). The IF/TA rate in our population was 25%, which corresponds with previously published data (25–30%) (4, 18, 27).

Known risk factors for IF/TA are divided into immunological and non-immunological factors (3, 5, 24, 28, 29). In seven patients with IF/TA, donors were significantly older (20 yr [16; 42] vs. 15 yr [10; 16], $p = 0.03$), which is known as a risk factor for IF/TA. Surprisingly, their eGFR was significantly higher at the time of the biopsy. This could be partly explained by the fact that they also had lower residual tacrolimus levels, or could reflect hyperfiltration secondary to nephronic reduction. One-yr eGFR was similar in the two groups. There was no difference in donor/recipient BSA ratios between the two groups, but three children with IF/TA were small recipients with BSA <0.8. In our cohort, subclinical rejection was associated with IF/TA, the two children with rejection also presenting IF/TA. Steroids did not seem to prevent from IF/TA (42.9 vs. 52.4%, $p = 1$).

Currently, in PRT, most of the immunosuppression protocols include antibody induction therapy (thymoglobulin or anti-IL2R) and a pulse of CS, and maintenance immunosuppression with a CNI (cyclosporine or tacrolimus), MMF, and prednisone (3, 16, 28). CSs have many side effects such as arterial hypertension, dyslipidemia, cosmetic changes, osteoporosis and fractures, and finally, in pediatric transplantation, growth retardation which can influence compliance (30). Over the last decades, with the development of new immunosuppression drugs, steroid minimization has become a major concern, especially in pediatric transplantation. Whereas the first steroid minimization studies conducted, with immunosuppression sometimes limited to cyclosporine, gave alarming results, more recent studies, using monoclonal antibodies, CNI and MMF are more promising (31–33). There are actually two main options: total steroid avoidance or steroid withdrawal, with no proven superiority of one approach compared with the other. Steroid minimizing studies

showed improved growth, especially in prepubertal children, reduction in hypertension and hypercholesterolemia (34–36). Two major randomized pediatric studies of steroid avoidance or early withdrawal reported no increase in subclinical or clinical rejection or graft loss (37, 38). These results have to be confirmed on the long term, and consequences of steroid avoidance on immunoactivation and on chronic lesions of IF/TA have to be evaluated (39–41). In fact, some centers maintain long-term low-dose CS with good results, and low-dose CS with individualized dosing based on drug exposure monitoring could be discussed (42). We present here a steroid minimization protocol adapted to immunological risk based on basiliximab induction. Low-risk patients were steroid free. Young children who respond strongly to immunological stimuli are considered as at higher risk for rejection, and children under five yr received classical dose of prednisone after transplantation (17). CS were then progressively reduced, to be stopped generally after the age of five. Children hyperimmunised or receiving a second renal transplantation also received CSs, but CS were not secondarily withdrawn. We did not find neither clinical rejection nor subclinical rejection corresponding to Banff criteria. One child, steroid free, was treated as subclinical rejection because of inflammatory IF/TA and another one, under CSs, for borderline lesions. Rejection treatment was based on methylprednisolone, and those children, newly considered at risk were then maintained under low-dose CSs. Half of our patients were steroid free. Most of our patients (61%) were EBV– at the time of transplantation with an unfavorable mismatch. One of them presented a severe primoinfection. We noticed one BK virus nephropathy and one ethmoiditis. No other serious infectious complication was found, but immunosuppression had to be lowered for infections for nine children. There was no PTLT or other tumoral complication. There was no severe biopsy complication.

Kanzelmeyer et al. (18) showed the importance to detect early subclinical rejection. In their study, children subjected to protocol biopsies and treated in case of subclinical rejection had a better glomerular filtration rate at three and a half yr than the group control. They used a classical immunosuppression protocol with CSs, MMF, and CNI or mTor inhibitor, and subclinical rejection was treated with methylprednisolone pulses. However, the short duration of follow-up of our patients did not allow us to evaluate their long-term renal function, but the implementation

of the protocol biopsies at three months post-transplantation led us to evaluate and modify our practices. Given the limited number of sub-clinical lesions on biopsy and the risk of infectious complications with mainly primary EBV infection in young infants, we reduced the early objectives of tacrolimus trough levels between 10 and 12 ng/mL initially to eight currently. Detection of early lesions leads us to increase immunosuppression. On the contrary, when a biopsy is normal, immunosuppression can sometimes be lowered, particularly in the case of infectious complications.

The main limit of this study is the small number of patients, which should prompt us to interpret these results with caution. Moreover our protocol being applied to all our patients, we could not compare them to a reference population. We decided not to compare them to historical cohorts, because as management of patients is rapidly evolving, bias would have been inevitable.

It is important to detect and specifically treat histological lesions of the renal graft before they result in chronic dysfunction. Meanwhile, it is major benchmark to try to reduce the side effects of immunosuppressive therapy without increasing the risk of rejection. We describe here the results and one-yr evolution of a monocentric cohort of children, who received a renal transplantation with a steroid minimization protocol adapted to their immunological risk. Low rate of rejection and IF/TA were found on three-month post-transplant biopsies, and eGFR was stable and correct. This protocol thus seems to be effective and safe. Prospective randomized studies to confirm our findings are needed.

Authors' contributions

Alexandra Bruel designed the study, acquired and analyzed the data, drafted the paper, revised and approved the submitted and final manuscript. Emma Allain Launay, Julie Humbert, Amélie Ryckewaert and Gérard Champion acquired the data, revised and approved the submitted and final manuscript. Anne Moreau and Karine Renaudin analyzed the biopsies, revised and approved the submitted and final manuscript. Georges Karam performed the renal transplantations, revised and approved the submitted and final manuscript. Gwenaelle Roussey Kesler designed the study, acquired the data, revised and approved the submitted and final manuscript.

References

1. ROUSSEY-KESLER G, DECRAMER S. Outcomes of pediatric renal transplantation in France. *Nephrol Ther* 2011; 7: 611–617.
2. EL-ZOGHBY ZM, STEGALL MD, LAGER DJ, et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant* 2009; 9: 527–535.
3. DART AB, SCHALL A, GIBSON IW, BLYDT-HANSEN TD, BIRK PE. Patterns of chronic injury in pediatric renal allografts. *Transplantation* 2010; 89: 334–340.
4. NANKIVELL BJ, BORROWS RJ, FUNG CL-S, O'CONNELL PJ, ALLEN RDM, CHAPMAN JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349: 2326–2333.
5. NANKIVELL BJ, KUYPERS DRJ. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *Lancet* 2011; 378: 1428–1437.
6. NAESENS M, KUYPERS DRJ, SARWAL M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4: 481–508.
7. FLECHNER SM, KOBASHIGAWA J, KLINTMALM G. Calcineurin inhibitor-sparing regimens in solid organ transplantation: Focus on improving renal function and nephrotoxicity. *Clin Transplant* 2008; 22: 1–15.
8. EINECKE G, SIS B, REEVE J, et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant* 2009; 9: 2520–2531.
9. BIRK PE. Surveillance biopsies in children post-kidney transplant. *Pediatr Nephrol* 2012; 27: 753–760.
10. CHOI BS, SHIN MJ, SHIN SJ, et al. Clinical significance of an early protocol biopsy in living-donor renal transplantation: Ten-year experience at a single center. *Am J Transplant* 2005; 5: 1354–1360.
11. 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* 2004; 78: 242–249.
12. SCHWARZ A, MENGEL M, GWINNER W, et al. Risk factors for chronic allograft nephropathy after renal transplantation: A protocol biopsy study. *Kidney Int* 2005; 67: 341–348.
13. MORESO F, IBERNON M, GOMÀ M, et al. Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as a risk factor for late graft loss. *Am J Transplant* 2006; 6: 747–752.
14. ETTINGER RB. Age and the immune response in pediatric renal transplantation. *Eur J Pediatr* 1992; 151(Suppl 1): S7–S8.
15. SCORNIK JC, PFAFF WW, HOWARD RJ, et al. Increased antibody responsiveness to blood transfusions in pediatric patients. *Transplantation* 1994; 58: 1361–1365.
16. BIRK PE, STANNARD KM, KONRAD HB, et al. Surveillance biopsies are superior to functional studies for the diagnosis of acute and chronic renal allograft pathology in children. *Pediatr Transplant* 2004; 8: 29–38.
17. BUNCHMAN TE, FRYD DS, SIBLEY RK, MAUER SM. Manifestations of renal allograft rejection in small children receiving adult kidneys. *Pediatr Nephrol* 1990; 4: 255–258.
18. KANZELMEYER NK, AHLNSTIEL T, DRUBE J, et al. Protocol biopsy-driven interventions after pediatric renal transplantation. *Pediatr Transplant* 2010; 14: 1012–1018.
19. VAUDRY W, ETTINGER R, JARA P, et al. Valganciclovir dosing according to body surface area and renal function in pediatric solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009; 9: 636–643.
20. SCHWARTZ GJ, MUÑOZ A, SCHNEIDER MF, et al. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 629–637.
21. FROISSART M, ROSSERT J, JACQUOT C, PAILLARD M, HOUILLIER P. Predictive performance of the modification of diet in renal disease and Cockcroft-Gault equations for estimating renal function. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 763–773.
22. SOLEZ K, COLVIN RB, RACUSEN LC, et al. Banff '05 Meeting Report: Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ("CAN"). *Am J Transplant* 2007; 7: 518–526.
23. PIOVESAN AC, LUCON AM, DAVID DSR, NAHAS WC, ANTONOPOULOS IM, SROUGI M. Multifocal renal allograft

- biopsy: Impact on therapeutic decisions. *Transplant Proc* 2008; 40: 3397–3400.
24. HEILMAN RL, DEVARAPALLI Y, CHAKKERA HA, et al. Impact of subclinical inflammation on the development of interstitial fibrosis and tubular atrophy in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2010; 10: 563–570.
25. SHISHIDO S, ASANUMA H, NAKAI H, et al. The impact of repeated subclinical acute rejection on the progression of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1046–1052.
26. THIERRY A, THERVET E, VUIBLET V, et al. Long-term impact of subclinical inflammation diagnosed by protocol biopsy one year after renal transplantation. *Am J Transplant* 2011; 11: 2153–2161.
27. MORESO F, CARRERA M, GOMA M, et al. Early subclinical rejection as a risk factor for late chronic humoral rejection. *Transplantation* 2012; 93: 41–46.
28. NAESENS M, KAMBHAM N, CONCEPCION W, SALVATIERRA O Jr, SARWAL M. The evolution of nonimmune histological injury and its clinical relevance in adult-sized kidney grafts in pediatric recipients. *Am J Transplant* 2007; 7: 2504–2514.
29. GIULIANI S, GAMBA PG, CHOKSHI NK, GASPARELLA P, MURER L, ZANON GF. The effect of donor/recipient body surface area ratio on outcomes in pediatric kidney transplantation. *Pediatr Transplant* 2009; 13: 290–299.
30. VEENSTRA DL, BEST JH, HORNBERGER J, SULLIVAN SD, HRICK DE. Incidence and long-term cost of steroid-related side effects after renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 1999; 33: 829–839.
31. HRICK DE, O'TOOLE MA, SCHULAK JA, HERSON J. Steroid-free immunosuppression in cyclosporine-treated renal transplant recipients: A meta-analysis. *J Am Soc Nephrol* 1993; 4: 1300–1305.
32. DELUCCHI A, VALENZUELA M, LILLO AM, et al. Early steroid withdrawal in pediatric renal transplant: Five years of follow-up. *Pediatr Nephrol* 2011; 26: 2235–2244.
33. SARWAL MM, VIDHUN JR, ALEXANDER SR, SATTERWHITE T, MILLAN M, SALVATIERRA O Jr. Continued superior outcomes with modification and lengthened follow-up of a steroid-avoidance pilot with extended daclizumab induction in pediatric renal transplantation. *Transplantation* 2003; 76: 1331–1339.
34. HÖCKER B, WEBER LT, FENEBERG R, et al. Improved growth and cardiovascular risk after late steroid withdrawal: 2-year results of a prospective, randomised trial in paediatric renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 617–624.
35. GREYDA R. Steroid withdrawal in renal transplantation. *Pediatr Nephrol* 2013; 28: 2107–2112.
36. SARWAL MM, YORGIN PD, ALEXANDER S, et al. Promising early outcomes with a novel, complete steroid avoidance immunosuppression protocol in pediatric renal transplantation. *Transplantation* 2001; 72: 13–21.
37. SARWAL MM, ETTINGER RB, DHARNIDHARKA V, et al. Complete steroid avoidance is effective and safe in children with renal transplants: A multicenter randomized trial with three-year follow-up. *Am J Transplant* 2012; 12: 2719–2729.
38. GREYDA R, WATSON A, TROMPETER R, et al. A randomized trial to assess the impact of early steroid withdrawal on growth in pediatric renal transplantation: The TWIST study. *Am J Transplant* 2010; 10: 828–836.
39. AL-SINANI S, DHAWAN A. Corticosteroids usage in pediatric liver transplantation: To be or not to be! *Pediatr Transplant* 2009; 13: 160–170.
40. IOREMBER FM, PATEL HP, OHANA A, et al. Steroid avoidance using sirolimus and cyclosporine in pediatric renal transplantation: One year analysis. *Pediatr Transplant* 2010; 14: 93–99.
41. GUPTA P, HART J, MILLIS JM, CRONIN D, BRADY L. De novo hepatitis with autoimmune antibodies and atypical histology: A rare cause of late graft dysfunction after pediatric liver transplantation. *Transplantation* 2001; 71: 664–668.
42. SEIKKU P, RAIVIO T, JÄNNE OA, NEUVONEN PJ, HOLMBERG C. Methylprednisolone exposure in pediatric renal transplant patients. *Am J Transplant* 2006; 6: 1451–1458.

ANNEXE 1 : Protocole de transplantation rénale pédiatrique au CHU de Nantes.

Nous évaluons pour chaque enfant le risque immunologique au moment de la greffe :

- Enfants à faible risque immunologique : enfants âgés de plus de 5 ans, recevant une première greffe rénale
- Enfants à haut risque immunologique : enfants âgés de moins de 5 ans.
- Enfants à très haut risque : enfants immunisés et/ou recevant une deuxième greffe rénale.

Pour les enfants à faible et haut risque, le traitement d'induction comprend un bolus de méthylprednisolone ($300\text{mg}/\text{m}^2$), et 2 injections d'anticorps anti récepteur de l'IL2 (basiliximab 20mg pour les plus de 35kg , et 10mg pour les autres) à J0 et J4 de la greffe. Pour les enfants à très haut risque, le traitement d'induction est réalisé par du sérum anti lymphocytaire.

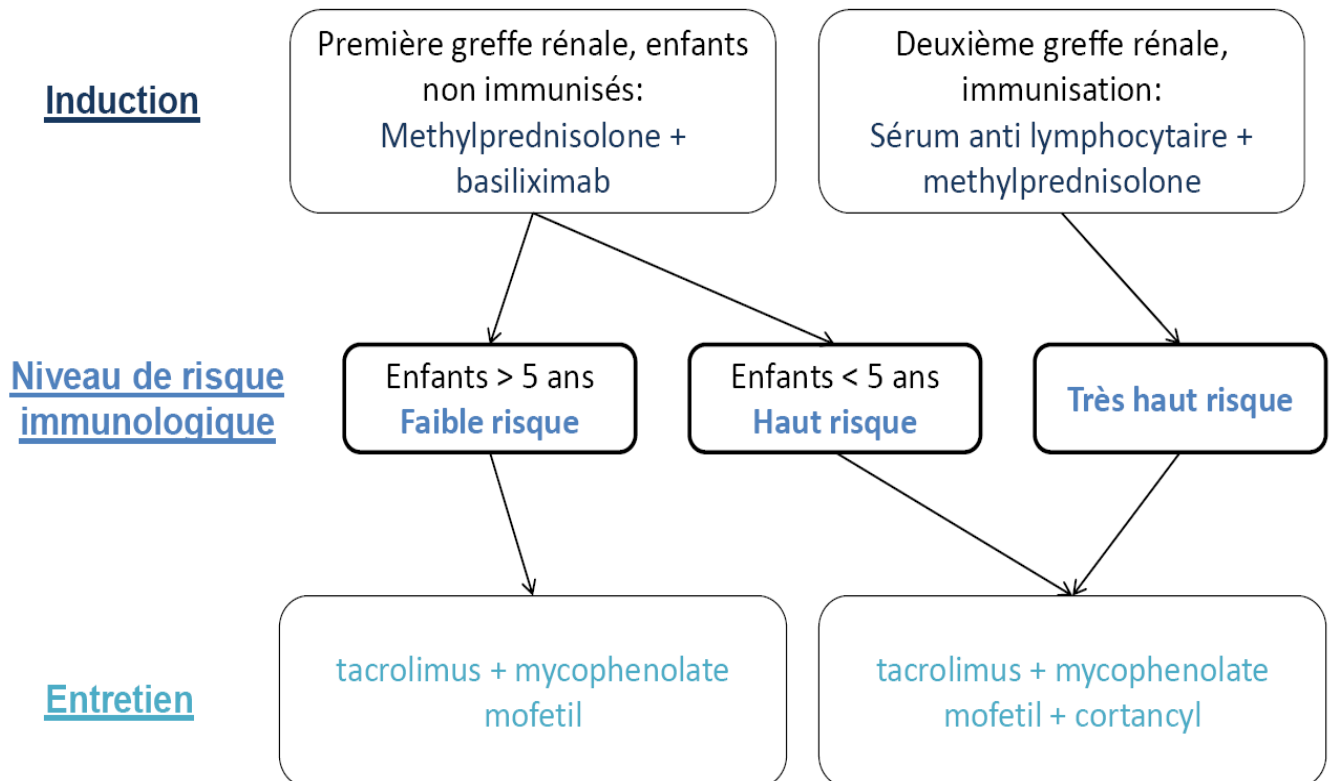
Le traitement d'entretien consiste pour tous les enfants en du mycophenolate mofetil ($600\text{mg}/\text{m}^2$ 2 fois par jour les 15 premiers jours, puis $300\text{mg}/\text{m}^2$ 2 fois par jour), associé à du tacrolimus (adapté aux taux résiduels, avec un objectif initialement autour de 8-10).

Nous utilisons un protocole d'épargne en corticoïdes adapté au risque immunologique : les enfants à haut et très haut risque immunologique reçoivent une corticothérapie au long cours par prednisone après la transplantation ($60\text{mg}/\text{m}^2$ à J1, puis $40\text{mg}/\text{m}^2/\text{j}$ de J2 à J7, puis $30\text{mg}/\text{m}^2/\text{j}$ de J8 à J14, $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{j}$ de J15 à J28, $10\text{mg}/\text{m}^2/\text{j}$ de J28 à 42 et enfin $5\text{mg}/\text{m}^2/\text{j}$ au long cours). Les corticoïdes peuvent être arrêtés secondairement, au cas par cas, en fonction du risque immunologique, le plus souvent après 5 ans. Pour les enfants à faible risque, le traitement d'entretien ne comprend pas de corticoïdes.

Le débit de filtration glomérulaire est estimé par la formule de Schwartz chez les enfants, et par l'équation MDRD après la puberté (30,31).

Des biopsies systématiques de greffon précoces sont réalisées depuis avril 2009. Elles étaient initialement réalisées à 6 mois de la transplantation, puis depuis début 2010, elles sont réalisées à 3 mois. Les lésions histologiques sont interprétées selon les critères de Banff 2007 (20).

Protocole d'immunosuppression



ANNEXE 2 : Synthèse des résultats et perspectives

Synthèse des résultats

Entre le 01/04/2009 et le 31/05/2012, 28 enfants ont reçu une transplantation rénale au CHU de Nantes. Ces greffes étaient préemptives pour 13 enfants (46%). Il s'agissait d'une seconde transplantation pour 4 enfants, 3 d'entre eux étaient hyperimmunisés (Taux de Greffons Incompatibles TGI > 85%). L'âge médian des receveurs au moment de la transplantation était de 9 ans [2.7 ; 14]. La majorité des greffons provenaient de donneurs décédés (82%). La durée d'ischémie froide médiane était de 14h [9.7 ; 16.4]. Quatorze enfants n'avaient pas de corticoïdes en traitement d'entretien (50%).

Six enfants ont eu une biopsie pour suspicion de rejet dans les 3 premiers mois suivant la greffe. Ces 6 biopsies étaient normales. Vingt six biopsies systématiques ont été réalisées (4 à 6 mois post transplantation, et les autres à 3 mois). Aucune de ces biopsies ne retrouvait de lésions de rejet répondant aux critères de Banff 2007. Cependant, un enfant dans le groupe sans corticoïdes présentait des lésions de FI/AT grade 1 avec un infiltrat inflammatoire important (ti1) que nous avons considérées et traitées comme un rejet cellulaire par bolus de solumedrol et corticothérapie orale au long cours. Un autre enfant, sous corticoïdes, présentait des lésions de rejet borderline, associées à une FI/AT grade 1 sur la biopsie. Son immunosuppression habituelle a été renforcée, avec augmentation des objectifs de tacrolémie résiduelle. Les biopsies de contrôle de ces 2 enfants retrouvaient des lésions de FI/AT grade 1 isolées. Cinq autres enfants présentaient des lésions de FI/AT isolées, trois d'entre eux ne recevaient pas de corticoïdes. La seule différence significative retrouvée concernant les caractéristiques au moment de la greffe entre les enfants avec biopsies normales et ceux présentant des lésions de FI/AT était l'âge du donneur, plus élevé pour les enfants présentant des lésions de FI/AT (20 ans [16; 42] vs 15 ans [10; 16], $p=0.03$). Il n'y avait pas de différence significative de débit de filtration glomérulaire à 7 jours et un an, mais le débit de filtration glomérulaire à 3 mois était plus élevé chez les enfants avec des lésions de FI/AT (92 vs 60 ml/min/1.73m²; $p<0.01$).

Il n'y a pas eu de complication sévère des biopsies de greffon. Il n'y a pas eu de complication tumorale post transplantation, mais 9 enfants ont présenté des complications infectieuses avec nécessité de diminuer l'immunosuppression.

La survie des enfants et des greffons à un an était de 100%. Le débit de filtration glomérulaire médian estimé était stable et satisfaisant à un an, à 82 ml/min/1.73m² ([71.7; 95]).

Conclusions et perspectives

Nous présentons les résultats de biopsies systématiques et de l'évolution à un an de 28 enfants ayant reçu une transplantation rénale avec un protocole d'épargne en corticoïdes adapté à leur risque immunologique. L'évolution des patients à un an était satisfaisante avec un taux de survie des patients et des greffons de 100%. Il n'y a eu aucun rejet clinique, et le taux de rejet borderline et infra clinique dans notre cohorte (7%) était inférieur au taux rapporté dans la littérature (7-30%) en dépit du fait que la moitié de nos patients avait un traitement d'entretien sans corticoïdes (7,15,16,32). Le taux de lésions de FI/AT à un an était comparable à celui décrit dans la littérature (25% vs 25-30%)(9,16,29). Notre protocole d'immunosuppression avec épargne en corticoïdes semble donc être sûr et efficace. Notre étude est limitée par le faible nombre de patients et l'absence d'évaluation du devenir à moyen et long terme. De même, les caractéristiques initiales des patients et leur risque immunologique déterminant le fait de recevoir ou non des corticoïdes, nous n'avons pu évaluer que le devenir global de notre cohorte d'enfants et le comparer aux données disponibles de la littérature. Cette étude n'avait pas pour objectif d'évaluer l'effet des corticoïdes sur les lésions histologique et le pronostic rénal.

Nous avons retrouvé peu de lésions de rejet infra-cliniques sur les biopsies systématiques, ce qui questionne sur l'intérêt de les poursuivre. Cependant les données de la littérature à ce sujet apportent des arguments convaincants pour cette stratégie de suivi, notamment l'étude prospective et randomisée de Kanzelmeyer et al, retrouvant un bénéfice à 3.5 ans sur la survie et la fonction rénale chez les enfants ayant bénéficié de biopsies systématiques (7,8,29). Ceci est renforcé dans notre étude par le fait que les biopsies réalisées pour suspicion clinique de rejet étaient normales, et que les 7 biopsies anormales (FI/AT, et les 2 rejets) ont été réalisées chez des enfants n'ayant aucun signe clinique ou biologique faisant suspecter un rejet. La créatinine est un marqueur tardif et peu sensible de rejet chez l'enfant (23,26). De plus, ces biopsies, même si elles mettaient en évidence peu de lésions, nous ont permis d'adapter notre prise en charge des patients : vigilance renforcée chez les patients avec biopsies anormales, diminution plus sereine de l'immunosuppression en cas de complications infectieuses chez les autres.

Il serait intéressant de valider ce protocole d'immunosuppression sur une plus large cohorte multicentrique et d'évaluer le devenir à long terme des patients.

ANNEXE 3 : Classification de Banff 2007 : lésions histologiques

Score d'infiltrat mononucléé interstitiel : i i0 : <10% du parenchyme i1 : 10 à 25% de parenchyme inflammatoire i2 : 25 à 50% de parenchyme inflammatoire i3 : >50% de parenchyme inflammatoire
Score de tubulite : t t0 : pas de lymphocytes dans les tubes t1 : plusieurs foyers de tubes avec 1 à 4 lymphocytes par section tubulaire t2 : plusieurs foyers de tubes avec 5 à 10 lymphocytes par section tubulaire t3 : plusieurs foyers de tubes avec > 10 lymphocytes par section tubulaire
Score de glomérulite : g g0 : pas de glomérulite g1 : glomérulite < 25% des glomérules g2 : glomérulite entre 25 et 50% des glomérules g3 : glomérulite > 75% des glomérules
Score de l'artérite intinale : v v0 : pas d'artérite v1 : artérite légère à modérée au niveau d'au moins une section artérielle v2 : artérite intinale sévère avec obstruction > 25% de la lumière v3 : artérite transmurale et/ou nécrose fibrinoïde de la media
Score de capillarite péritubulaire : cpt cpt0 : < 3 éléments par section capillaire ou < 10% de capillaires avec >3 éléments cpt1 : 3 à 4 cellules par section capillaire cpt2 : 5 à 10 cellules par section capillaire cpt3 : > 10 cellules par section capillaire
Score de fibrose interstitielle : ci ci0 : < 5% de la surface corticale ci1 : fibrose légère représentant 6 à 25% de surface corticale ci2 : fibrose modérée représentant 26 à 50% de surface corticale ci3 : fibrose sévère représentant > 50% de surface corticale
Score d'atrophie tubulaire : ct ct0 : pas d'atrophie ct1 : < 25% de tubes atrophiques dans la corticale ct2 : 26 à 50% de tubes atrophiques dans la corticale ct3 : > 50% de tubes atrophiques dans la corticale
Score de la glomerulopathie d'allogreffe : cg cg0 : pas de glomerulopathie cg1 : < 25% de doubles contours du glomérule le plus atteint cg2 : de 26 à 50% de doubles contours du glomérule le plus atteint cg3 : > 50% de doubles contours du glomérule le plus atteint
Score d'endartérite fibreuse : cv cv0 : pas d'endartérite fibreuse cv1 : endartérite fibreuse réduisant la lumière < 25% cv2 : endartérite fibreuse réduisant la lumière de 26 à 50% cv3 : endartérite fibreuse réduisant la lumière de > 50%

Interprétation des lésions selon la classification de Banff 2007

1. Normal
2. Lésions à médiation humorale <i>Dépôts de C4d sans lésion histologique de rejet actif</i> <i>Rejet humoral aigu</i> Grade 1 : inflammation minime, nécrose tubulaire aiguë et C4d Grade 2 : capillarite et/ou glomérulite et/ou thromboses et C4d Grade 3 : artérite transmurale (v3) et C4d <i>Rejet humoral chronique actif</i> Glomérulopathie d'allogreffe et/ou feuilletage de la paroi des capillaires péri-tubulaires et/ou FI/AT et C4d
3. Lésions borderline Suspicion de rejet aigu à médiation cellulaire Infiltrat interstitiel absent ou léger (<i2) avec tubulite quelle que soit l'intensité (t1,t2,t3), et absence d'artérite intima
4. Rejet à médiation cellulaire T <i>Rejet aigu cellulaire T</i> Grade IA : Inflammation significative (i2) et tubulite modérée (t2) Grade IB : inflammation significative (i2 ou i3) et tubulite marquée (t3) Grade IIA : artérite intima légère ou modérée (v1) Grade IIB : artérite intima sévère (v2) Grade III : artérite transmurale et/ou nécrose fibrinoïde et inflammation (v3) <i>Rejet chronique actif cellulaire T</i> Vasculopathie chronique d'allogreffe et inflammation
5. Fibrose interstitielle et atrophie tubulaire (FI/AT) sans orientation étiologique Grade I : fibrose et atrophie faible à modérée (ci1, ct1) Grade II : fibrose et atrophie modérée (ci2, ct2) Grade III : fibrose et atrophie sévère (ci3, ct3)
6. Autres : lésions non liées au rejet

ANNEXE 4 : formules d'estimation du débit de filtration glomérulaire
(ml/min/1.73m²)

Formule de Schwartz 2009 : $36,5 \times \text{taille (cm)} / \text{créatinine } (\mu\text{mol/L})$ (30)

Equation MDRD : $186 \times (\text{créatinine } (\mu\text{mol/l}) \times 0,0113)^{-1,154} \times \text{âge}^{-0,203} \times 0.742$ pour les femmes (31)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Allain-Launay E, Roussey-Kesler G. [Chronic kidney insufficiency in children]. *Presse Med.* 2011 Nov;40(11):1028–36.
2. Harambat J, Van Stralen KJ, Kim JJ, Tizard EJ. Epidemiology of chronic kidney disease in children. *Pediatr. Nephrol.* 2012 Mar;27(3):363–73.
3. Harambat J, Hogan J, Macher M-A, Couchoud C, Registre du REIN. [ESRD in children and adolescents]. *Nephrol. Ther.* 2013 Sep;9 Suppl 1:S167–179.
4. Rees L. Long-term outcome after renal transplantation in childhood. *Pediatr. Nephrol.* 2009 Mar;24(3):475–84.
5. Shroff R, Ledermann S. Long-term outcome of chronic dialysis in children. *Pediatr. Nephrol.* 2009 Mar;24(3):463–74.
6. Naesens M, Kambham N, Concepcion W, Salvatierra O Jr, Sarwal M. The evolution of nonimmune histological injury and its clinical relevance in adult-sized kidney grafts in pediatric recipients. *Am. J. Transplant.* 2007 Nov;7(11):2504–14.
7. Dart AB, Schall A, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Birk PE. Patterns of chronic injury in pediatric renal allografts. *Transplantation.* 2010 Feb 15;89(3):334–40.
8. Birk PE, Stannard KM, Konrad HB, Blydt-Hansen TD, Ogborn MR, Cheang MS, et al. Surveillance biopsies are superior to functional studies for the diagnosis of acute and chronic renal allograft pathology in children. *Pediatr Transplant.* 2004 Feb;8(1):29–38.
9. Moreso F, Carrera M, Goma M, Hueso M, Sellares J, Martorell J, et al. Early subclinical rejection as a risk factor for late chronic humoral rejection. *Transplantation.* 2012 Jan 15;93(1):41–6.
10. 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.* 2004 Jul 27;78(2):242–9.
11. Choi BS, Shin MJ, Shin SJ, Kim YS, Choi YJ, Kim Y-S, et al. Clinical significance of an early protocol biopsy in living-donor renal transplantation: ten-year experience at a single center. *Am. J. Transplant.* 2005 Jun;5(6):1354–60.
12. Thierry A, Thervet E, Vuiblet V, Goujon J-M, Machet M-C, Noel L-H, et al. Long-term impact of subclinical inflammation diagnosed by protocol biopsy one year after renal transplantation. *Am. J. Transplant.* 2011 Oct;11(10):2153–61.
13. Veenstra DL, Best JH, Hornberger J, Sullivan SD, Hricik DE. Incidence and long-term cost of steroid-related side effects after renal transplantation. *Am. J. Kidney Dis.* 1999 May;33(5):829–39.
14. Roussey-Kesler G, Decramer S. [Outcomes of pediatric renal transplantation in France]. *Nephrol. Ther.* 2011 Dec;7(7):611–7.
15. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, Gloor JM, et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am. J. Transplant.* 2009 Mar;9(3):527–35.

16. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL-S, O'Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 2003 Dec 11;349(24):2326–33.
17. Naesens M, Kuypers DRJ, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009 Feb;4(2):481–508.
18. Kambham N, Nagarajan S, Shah S, Li L, Salvatierra O, Sarwal MM. A novel, semiquantitative, clinically correlated calcineurin inhibitor toxicity score for renal allograft biopsies. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007 Jan;2(1):135–42.
19. Flechner SM, Kobashigawa J, Klintmalm G. Calcineurin inhibitor-sparing regimens in solid organ transplantation: focus on improving renal function and nephrotoxicity. *Clin Transplant.* 2008 Feb;22(1):1–15.
20. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, et al. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ("CAN"). *Am. J. Transplant.* 2007 Mar;7(3):518–26.
21. Einecke G, Sis B, Reeve J, Mengel M, Campbell PM, Hidalgo LG, et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am. J. Transplant.* 2009 Nov;9(11):2520–31.
22. Loupy A, Hill GS, Nochy D, Legendre C. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am. J. Transplant.* 2010 Apr;10(4):952; author reply 953.
23. Birk PE. Surveillance biopsies in children post-kidney transplant. *Pediatr. Nephrol.* 2012 May;27(5):753–60.
24. Ettenger RB. Age and the immune response in pediatric renal transplantation. *Eur. J. Pediatr.* 1992;151 Suppl 1:S7–8.
25. Scornik JC, Pfaff WW, Howard RJ, Fennell RS 3rd, Ramos E, Peterson JC, et al. Increased antibody responsiveness to blood transfusions in pediatric patients. *Transplantation.* 1994 Dec 27;58(12):1361–5.
26. Bunchman TE, Fryd DS, Sibley RK, Mauer SM. Manifestations of renal allograft rejection in small children receiving adult kidneys. *Pediatr. Nephrol.* 1990 May;4(3):255–8.
27. Schwarz A, Mengel M, Gwinner W, Radermacher J, Hiss M, Kreipe H, et al. Risk factors for chronic allograft nephropathy after renal transplantation: a protocol biopsy study. *Kidney Int.* 2005 Jan;67(1):341–8.
28. Moreso F, Ibernón M, Gomà M, Carrera M, Fulladosa X, Hueso M, et al. Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as a risk factor for late graft loss. *Am. J. Transplant.* 2006 Apr;6(4):747–52.
29. Kanzelmeyer NK, Ahlenstiel T, Drube J, Froede K, Kreuzer M, Broecker V, et al. Protocol biopsy-driven interventions after pediatric renal transplantation. *Pediatr Transplant.* 2010 Dec;14(8):1012–8.
30. Schwartz GJ, Muñoz A, Schneider MF, Mak RH, Kaskel F, Warady BA, et al. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009 Mar;20(3):629–37.

31. Froissart M, Rossert J, Jacquot C, Paillard M, Houillier P. Predictive performance of the modification of diet in renal disease and Cockcroft-Gault equations for estimating renal function. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005 Mar;16(3):763–73.
32. Heilman RL, Devarapalli Y, Chakkera HA, Mekeel KL, Moss AA, Mulligan DC, et al. Impact of subclinical inflammation on the development of interstitial fibrosis and tubular atrophy in kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 2010 Mar;10(3):563–70.

Titre de Thèse : Biopsies de greffon systématiques en transplantation rénale pédiatrique : intérêt pour l'adaptation de l'immunosuppression

RESUME

Introduction : Les biopsies de greffon systématiques retrouvent des lésions de rejet infra-clinique ou de fibrose interstitielle et d'atrophie tubulaire (FI/AT) chez 25 à 40% des enfants. Diminuer les effets indésirables de l'immunosuppression (fréquents avec les corticoïdes), sans augmenter le risque de rejet est un enjeu majeur en transplantation rénale pédiatrique.

Matériels et Méthodes : Tous les enfants de moins de 18 ans ayant reçu une transplantation rénale au CHU de Nantes entre le 01/04/2009 et le 31/05/2012 ont été inclus. L'immunosuppression comprenait une induction (anticorps et solumedrol), et un traitement d'entretien par tacrolimus et mycophenolate mofetil. Les corticoïdes étaient administrés aux patients à risque immunologique important : enfants de moins de 5 ans, ou deuxième greffe rénale. Des biopsies de greffon systématiques étaient réalisées, à 3 ou 6 mois post transplantation, et interprétées selon les critères de Banff 2007.

Résultats : 28 enfants ont été inclus. Quatorze d'entre eux (50%) avaient un traitement immunosuppresseur d'entretien sans corticoïdes. Des lésions de FI/AT étaient retrouvées chez 7 enfants (4 étaient sans corticoïdes). Elles étaient associées à des lésions de rejet borderline chez un enfant sous corticoïdes (renforcement de l'immunosuppression habituelle). Un autre enfant, ne recevant pas de corticoïdes présentait des lésions de FI/AT avec un infiltrat inflammatoire important, considérées comme des lésions de rejet infra-cliniques et traitées par bolus de solumedrol. A un an, le débit médian de filtration glomérulaire estimé était de 82 ml/min/1.73m², et la survie des greffons et des patients étaient de 100%.

Conclusion : Le taux de rejet et de FI/TA n'était pas majoré dans notre cohorte où la moitié des enfants recevaient un protocole d'immunosuppression sans corticoïdes. Ces résultats encourageants doivent être validés sur une plus large cohorte, avec un suivi à long terme.

MOTS-CLES

Grefe rénale, Enfants, Epargne en corticoïdes, biopsies systématiques, rejet infra-clinique