

**UNIVERSITE DE NANTES** MENTION TRES HONORABLE

---

**FACULTE DE MEDECINE**

---

Année 2003

N° 813/03

**THESE**

Pour le

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**

Qualification en : Néphrologie

Par

Aurèlie HOUZET

Née le 19/05/1973 à Lille

---

Présentée et soutenue publiquement le 18 avril 2003

---

**SIGNIFICATION CLINIQUE DE LA PRESENCE D'ANTICORPS  
ANTI-HLA APRES TRANSPLANTATION RENALE.**

---

Président : Monsieur le Professeur Jacques DANTAL

Directeur de thèse : Madame le Professeur Maryvonne HOURMANT

BU Santé  
Nantes

## **Résumé :**

L'apparition des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur après transplantation rénale souligne l'importance des mécanismes immunologiques impliqués dans la dysfonction chronique du greffon, première cause de perte de fonction du greffon.

La recherche et l'identification des anticorps anti-HLA a été effectuée de façon transversale chez 1203 patients, greffés entre 1975 et 2001, suivis au CHU de Nantes, en techniques ELISA, lymphocytotoxicité ou cytométrie en flux.

Des anticorps anti-HLA ont été détectés chez 19,9% des patients. Il s'agit d'anticorps dirigés contre les antigènes HLA du greffon pour 3,3% d'entre eux et il s'agit dans tous les cas d'anticorps anti-HLA de classe II, de type DQ ou DR. La présence d'anticorps anti-HLA en post-transplantation semble corrélée à une incidence plus élevée de rejet chronique et de retour en dialyse, et associée à différents paramètres biologiques comme la majoration de la protéinurie ou une altération de la fonction rénale. Parmi les facteurs prédictifs d'apparition des anticorps en post-transplantation, on retient surtout l'immunisation avant transplantation, et les grossesses après transplantation. Les épisodes de rejet aigu sont plus fréquents chez les patients ayant développé des anticorps anti-HLA, bien que non significatifs. Les infections à CMV ne sont pas statistiquement différentes entre les 3 groupes.

La présence d'anticorps anti-HLA en post-transplantation, et en particulier des anticorps spécifiques du donneur, est donc, bien que peu fréquente, un facteur de mauvais pronostic pour la survie du greffon.

**Mots-clés :** Anticorps anti-HLA  
Transplantation rénale  
Rejet Chronique  
Immunisation  
Survie du greffon.

# SOMMAIRE

Liste des Abréviations	4
<b>INTRODUCTION</b>	<b>5</b>
Avant-propos	8
<b>I- Système HLA et transplantation rénale</b>	<b>8</b>
A/ Définition et fonction du système HLA	8
B/ Structure et rôle des molécules HLA	9
1- HLA de classe I	
2- HLA de classe II	
C/ Détermination du groupe HLA	10
D/ Compatibilité HLA en transplantation	10
<b>II- Immunisation anti-HLA,</b>	<b>11</b>
A/ Circonstances d'immunisation	11
B/ Méthodes de dosage des anticorps anti-HLA	12
1- Microlymphocytotoxicité dépendante du complément (LCT)	
2- Méthode ELISA	
3- Cytométrie en flux	
4- Comparaison entre les 3 techniques	
C/ Mode d'action des anticorps anti-HLA: Physiopathologie	16
<b>III- Immunité humorale et survie du greffon</b>	<b>17</b>
<b>IV- Préimmunisation anti HLA et rejet: Importance du Crossmatch</b>	<b>18</b>
A- Anticorps et rejet hyper aigu	18
B- Rejet vasculaire aigu	18
C- Crossmatch lymphocytaire	19
D- Implications du crossmatch	20
<b>V- Anticorps anti-HLA et rejet chronique</b>	<b>20</b>
A- Diversité des mécanismes impliqués dans la néphropathie chronique d'allogreffe	21
1- Mécanismes non immunologiques	
2- Mécanismes immunologiques	
3- Physiopathologie des lésions du rejet chronique	
B/ Arguments expérimentaux en faveur de l'implication de l'immunité humorale dans le rejet chronique	23
C/ Rejet chronique et anticorps anti-HLA: revue de la littérature	23
D/ Histologie du rejet chronique	25
<b>VI- Immunité humorale et histologie: intérêt du C4d</b>	<b>26</b>
A/ Physiopathologie	26
B/ Signification des dépôts de C4d dans les biopsies de greffons rénaux	27
<b>VII- Objectifs de l'étude</b>	<b>28</b>
<b>Matériel et Méthodes</b>	<b>29</b>
<b>I- Patients</b>	<b>30</b>
A/ Critères d'inclusion	30

B/ Suivi au long cours	30
C/ Traitements immunosuppresseurs	31
1- Traitements d'induction	
2- Traitements d'entretien	
3- Evolution des protocoles de traitement	
4- Traitement des rejets aigus	
<b>II- matériel</b>	<b>34</b>
A/ Recherche des anticorps anti-HLA	34
1- Technique de micro-lymphocytotoxicité	
2- Technique ELISA	
3- Cytométrie en flux	
4- Stratégie actuelle de dépistage des anticorps anti-HLA dans le suivi des patients transplantés à Nantes	
B/ Groupage HLA du donneur et du receveur: Les techniques	36
C/ Le crossmatch et ses règles à Nantes	
D/ Les biopsies rénales	37
<b>III- Méthodes</b>	<b>39</b>
A/ Base de données	39
B/ Etude statistique	39
1- Variables qualitatives	
2- Variables quantitatives	
3- Analyse de survie	
C/ Description des paramètres étudiés	40
1- Paramètres prégreffe lié au receveur	
2- Paramètres nonimmunologiques liés au greffon	
3- Paramètres immunologiques	
4- Traitements	
5- Evenements post-transplantation	
6- Suivi post-transplantation	
7- Survie du greffon et du patient	
8- Paramètres histologiques	
<b>Résultats</b>	<b>44</b>
<hr/>	
<b>I- Description de la population étudiée</b>	<b>45</b>
<b>II- Patients ayant développé des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur</b>	<b>46</b>
A/ Fréquence des anticorps spécifiques du donneur dans la population étudiée, spécificité des anticorps	46
B/ Caractéristiques démographiques	47
C/ Caractéristiques immunologiques	48
1- Immunisation prégreffe	
2- Compatibilité du greffon	
D/ Traitements immunosuppresseurs	49
1- Traitement d'induction	
2- Traitement d'entretien	
3- Traitement en cours au moment de la détection des anticorps	
E/ Evenements post-greffe	51
F/ Evaluation des paramètres cliniques et biologiques au moment de l'apparition des anticorps	52
1-Protéinurie	
2-Créatinine	
3- Cas des patients pour lesquels les anticorps sont apparus pendant l'étude	
G/ Histologie et étude de la fixation du C4d	58
H/ Survie du greffon	60

I/ Recherche de facteurs pronostiques d'une évolution défavorable de la greffe chez ces patients	60
<b>III- Comparaison du groupe de patients avec des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur avec les patients n'ayant pas développé d'anticorps ou ayant développé des anticorps non spécifiques</b>	<b>63</b>
A/ Date de greffe	63
B/ Caractéristiques démographiques	64
1- Age et Sexe du receveur	
2- Antécédents de grossesse avant transplantation chez les femmes	
3- Nombre moyen de transfusions sanguines avant la greffe	
4- Groupe sanguin du receveur	
5- Etiologie de l'insuffisance rénale	
6- Numéro de greffe rénale	
7- Nature du donneur et type de greffe	
8- Age du donneur	
9- Groupe sanguin du donneur	
10- Ischémie froide	
11- Retard au démarrage du greffon	
C/ Caractéristiques immunologiques	69
1- Immunisation prégreffe	
2-Compatibilité HLA receveur-greffon	
3- Crossmatch	
D/ Caractéristiques thérapeutiques	71
E/ Suivi Evolutif	72
1- Episodes de rejet aigu	
2- Infections à CMV	
3- Grossesses	
4- Rejet chronique	
F/ Evaluation de la fonction du greffon	74
1- Protéinurie	
2- Fonction rénale	
<b>IV- Etude de la survie des greffons</b>	<b>80</b>
A/ Etude comparative de la survie des greffons dans les 3 groupes	80
B/ Etude comparative de la survie des patients greffés	82
<b>DISCUSSION</b>	<b>83</b>
<hr/>	
<b>ANNEXES</b>	<b>95</b>
<b>Annexe 1:</b> Classification de Banff	96
<b>Annexe 2:</b> Définition sérologique des classes HLA I et II, déséquilibre de liaison DQ-DR	99
<b>Annexe 3:</b> Tableaux récapitulatifs des caractéristiques des patients présentant des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur	101
<b>Annexe 4:</b> Illustration: Immunofluorescence indirecte: marquage au C4d	104
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>106</b>
<hr/>	

## Liste des Abréviations

Ac	: Anticorps
Aza	: Azathioprine
CMH	: Complexe Majeur d'histocompatibilité
CS	: Corticostéroïdes
CsA	: Ciclosporine A
DCG	: Dysfonction chronique du greffon
DS	: Déviation standard
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FK 506	: Tacrolimus
GEM	: Glomerulonéphrite extra-membraneuse
GNA	: Glomérulonéphrite aiguë
GNC	: Glomerulonéphrite chronique
HLA	: Human leucocyte antigen
HSF	: Hyalinose segmentaire et focale
Ig	: Immunoglobuline
IL2	: Interleukine 2
LCT	: Lymphocytotoxicité Complément Dépendante
Max	: maximum
Min	: minimum
MMF	: Mycophénolate Mofetil
NS	: Non Significatif ( $p > 0,05$ )
NTA	: Néphropathie tubulaire aiguë
NTC	: Néphropathie tubulaire chronique
NTI	: Néphrite tubulo-interstitielle
PBR	: ponction Biopsie Rénale
PCR	: Polymerase Chain reaction
PKR	: Polykystose rénale
PRA	: Panel Reactive Antibody
R(IL2)	: Récepteur à l'interleukine 2
RC	: Rejet chronique
SAL	: Serum anti-lymphocytaire
SHU	: Syndrome hémolytique et urémique

BU Santé  
Nantes

# **Introduction**

## Avant-propos

En 2001, l'incidence de l'insuffisance rénale terminale a été estimée à 120 cas par an et par million d'habitants par l'Etablissement Français des Greffes (EFG). Parmi ces patients, 35% sont en attente de transplantation rénale (soit 42.2 nouveaux inscrits sur la liste de transplantation par an et par million d'habitant).

La survie des patients transplantés est supérieure à celle des patients dialysés en attente de greffe (1), c'est pourquoi la transplantation rénale est actuellement considérée comme le traitement de choix de l'insuffisance rénale terminale. De plus, la qualité de vie des patients transplantés semble meilleure que celle des patients en dialyse (2).

Cependant, les greffons ne sont pas en nombre suffisant pour permettre une transplantation rapide des patients en attente de greffe et la durée moyenne d'attente d'un greffon est de 15,4 mois en France. Viennent se rajouter sur les listes d'attente, les patients déjà greffés pour lesquels une perte progressive de la fonction du greffon nécessite une nouvelle transplantation. Tout cela conduit donc à une augmentation régulière du nombre de patients en attente de greffe rénale (+ 8,8% en 2001) (3).

L'utilisation de la ciclosporine dans les années 1980 a permis une amélioration spectaculaire de la survie des greffons à 1 an en diminuant la fréquence des rejets aigus. Cependant, la survie à long terme n'a pas autant bénéficié de ces avancées thérapeutiques (4 ; 5) même si la durée moyenne de survie d'un greffon rénal cadavérique est passée de 7 à 13 ans entre 1988 et 1996 (6 ; 7), parallèlement à une amélioration de la prise en charge globale des patients, notamment sur le plan cardiovasculaire et infectieux, permettant également une diminution de la mortalité des malades transplantés.

Si l'on exclut les décès des patients transplantés (première cause de perte de greffon) et les récurrences de la néphropathie initiale, la néphropathie chronique d'allogreffe est la principale cause de retour en dialyse chez les patients transplantés depuis plus d'un an (8).

Les mécanismes qui conduisent à cette dysfonction chronique du greffon sont multiples et impliquent à la fois des processus immunologiques (rejet chronique) et non immunologiques. L'allo-immunisation, responsable des rejets (aigus ou chroniques) fait appel à des mécanismes à la fois cellulaires et humoraux. L'impact de l'immunité humorale a été minimisé durant plusieurs décennies au profit des théories cellulaires. Cependant, l'efficacité des protocoles d'immunosuppression actuels sur la réponse immunitaire à médiation cellulaire en particulier, et le développement des techniques de détection des anticorps anti-HLA ont souligné le rôle de l'immunité humorale et en particulier des anticorps anti-HLA dans les mécanismes de rejet.

Ce travail a pour objectif d'étudier l'importance de l'immunisation anti-HLA après transplantation, et tout particulièrement l'immunisation dirigée spécifiquement contre les antigènes du donneur.

Nous expliquerons dans l'introduction l'importance du système HLA et l'immunisation contre ce système, en détaillant les techniques d'identification des anticorps. Nous verrons ensuite le retentissement de ces anticorps sur la survie du greffon, et leur implication dans les différents mécanismes de rejet, en insistant sur leur rôle dans le rejet chronique, objet de l'étude.

## I- Systeme HLA et transplantation rénale

### *A/ Définition et Fonction du Système HLA*

Le système HLA (Human Leucocyte Antigen), encore appelé complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) a été mis en évidence par sa capacité à induire une forte réponse immunitaire allogénique, en particulier au cours des transplantations (9 ; 10). Cette propriété est liée à l'importance du polymorphisme de ces molécules entre les individus, concentré au niveau de zones dites hypervariables (site de présentation de l'antigène). En effet, on dénombre à l'heure actuelle plusieurs centaines d'allèles pour certains de ces gènes (à titre d'exemple, en 2001, 414 allèles pour le HLA B étaient connus (11).

La fonction essentielle de ces molécules est de présenter des peptides antigéniques aux lymphocytes T du « soi » (notion de « restriction allogénique »), qui les identifient comme protéine du « soi » ou étrangère (« non soi»). Ce système permet donc de préserver l'intégrité de l'individu, notamment vis-à-vis des agents infectieux, c'est la base de l'immunité.

En transplantation, ce système représente l'obstacle essentiel puisque les cellules transplantées sont reconnues comme étrangères à l'organisme (à moins d'une greffe totalement compatible en HLA, extrêmement rare) et sont donc la cible d'une réaction immunitaire visant à les éliminer.

Le rejet d'allogreffe est donc la conséquence d'une réponse allo-immune dirigée contre des antigènes du non soi (alloantigènes), dont les mieux connus sont les antigènes HLA du greffon.

## ***B/ Structure et rôle des molécules HLA***

Les molécules HLA peuvent être distinguées en 2 classes principales, différenciées par leurs propriétés biochimiques, les cellules où elles sont exprimées, et leur fonction dans la réponse immunitaire. L'ensemble de ces gènes est localisé sur le bras court du chromosome 6.

### 1- HLA de classe I

Ces protéines sont différenciées en 3 sous-groupes A, B, et Cw. Ce sont des glycoprotéines composées d'une chaîne lourde  $\alpha$  associée à une chaîne constante, la  $\beta$ 2 microglobuline, toutes deux exprimées sur la membrane de la presque totalité des cellules nucléées de l'organisme, et en particulier sur les lymphocytes B et les monocytes-macrophages qui en expriment des quantités importantes. Elles présentent des peptides endo-cellulaires aux lymphocytes T CD8+ (12).

Concernant l'immunogénicité de ces molécules HLA, on différencie des épitopes « privés » (spécifiques d'une molécule HLA) des épitopes publics (présents sur un grand nombre de molécules HLA). Un même anticorps peut donc reconnaître plusieurs molécules HLA différentes, c'est le principe des CREG (Cross reactive group)

### 2- HLA de classe II

3 groupes peuvent également être différenciés : il s'agit des groupes DR, le plus exprimé, DQ et DP, moins représentés.

Comme les molécules HLA de classe I, les molécules HLA de classe II sont des glycoprotéines membranaires, composées de deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Par contre, leur expression est restreinte aux cellules de l'immunité c'est-à-dire aux lymphocytes B, aux lymphocytes T activés, et aux cellules présentatrices d'antigènes comme les monocytes-macrophages, et les cellules endothéliales activées. Elles présentent des peptides exogènes, issus de protéines extracellulaires endocytosées, aux lymphocytes T CD4+.

## ***C/ Détermination du groupe HLA***

Les antigènes HLA les plus importants en transplantation à l'heure actuelle sont les antigènes HLA A et B (classe I) et les antigènes HLA DR, et plus récemment DQ (classe II). Le choix des organes dépend donc de leur identification et de la compatibilité avec le receveur.

La détermination du groupage HLA est réalisée à partir de cellules de sang périphérique.

La méthode de typage traditionnelle est sérologique, c'est-à-dire qu'elle utilise des anticorps de patients hyperimmunisés envers des antigènes identifiés (ou des anticorps anti-HLA monoclonaux), qui sont mis en contact avec les lymphocytes du donneur à typer (selon le même principe que la recherche d'anticorps anti-HLA en lymphocytotoxicité, cf. infra), c'est toujours la méthode utilisée pour l'identification du groupage HLA de classe I.

Plus récemment, les techniques de biologie moléculaire (PCR SSO/SSP) ont permis de déterminer avec une plus grande précision les séquences exactes des différents allèles HLA, mettant en évidence des polymorphismes non détectés par la méthode sérologique.

## ***D/ Compatibilité HLA en transplantation***

Les progrès réalisés concernant les stratégies d'immunosuppression ont permis d'autoriser des greffes non compatibles (non HLA identique), particulièrement importantes pour les transplantations d'organes vitaux tels que le cœur, les poumons ou le foie. Cependant, la demi-vie des greffons syngéniques reste plus élevée que celle des greffons ne partageant qu'un haplotype avec le receveur ou à fortiori des greffons incompatibles (13).

Néanmoins, en transplantation rénale, pour les greffons d'origine cadavérique, l'intérêt du matching est débattu (14). Ainsi, une étude réalisée aux USA a montré que le bénéfice de la réduction du temps d'ischémie froide était plus important que celui de la bonne compatibilité qui allonge d'autant la durée d'ischémie froide (15). A l'inverse, certaines

études (dont une réalisée au Royaume Uni) montrent le bénéfice du matching HLA sur la survie du greffon, et en particulier l'impact de la compatibilité DR sur la survie du greffon (16). D'autres études ont montré l'importance des CREG (Cross REactive Group) dans le choix d'attribution des greffons. Sijpkens et al (17) mettent ainsi en évidence une meilleure survie des greffons en cas de matching pour les CREG, bien que le bénéfice induit par le matching de ces groupes soit sous-tendu par le matching AB (18).

En règle générale, la compatibilité HLA n'est pas une priorité en France, pour les patients non immunisés en attente d'une première greffe rénale. En cas de patient hyper-immunisé, l'obtention d'une identité A,B,DR est alors une priorité à l'échelon national.

## **II- Immunisation anti-HLA**

### ***A- Circonstances d'immunisation***

L'immunisation anti-HLA correspond à la présence d'anticorps anti-HLA dans le sérum du receveur. Elle est la conséquence d'un contact avec des cellules allogéniques, comme les transfusions, les grossesses et les transplantations d'organes ou les greffes cellulaires antérieures.

Les transfusions étaient la principale source d'immunisation anti-HLA avant l'apparition de l'Erythropoïétine et des concentrés globulaires déleucocytés. L'immunisation au cours de la grossesse est dirigée contre les antigènes du père, et augmente avec le nombre de grossesses. De même, l'immunisation augmente parallèlement au nombre de greffes antérieures, et nombre des patients en attente de re-transplantation sont dit « hyper-immunisés », c'est-à-dire qu'ils présentent des anticorps anti-HLA dirigés contre plus de 80% des cellules du panel de détection utilisé, ce qui réduit les chances de greffons compatibles et allonge les délais de transplantation (3).

Les anticorps anti-HLA sont le plus souvent de type IgG, ce qui permet de les différencier des auto-anticorps développés dans le cadre de maladies auto-immunes qui sont le plus souvent des IgM (bien qu'il existe des auto-anticorps de type IgG, notamment dans le lupus).

La recherche de cette immunisation contre les antigènes HLA est réalisée lors de l'inscription sur les listes de greffe, et contrôlée régulièrement jusqu'à la transplantation. Elle est également effectuée par la plupart des centres en cas d'évènements potentiellement immunisants. La fréquence du suivi en post-transplantation est variable selon les centres.

En l'absence d'immunisation contre les antigènes HLA du receveur, le contrôle ultime de la compatibilité du receveur avec le donneur sera effectué avec le crossmatch (cf. infra).

## ***B- Méthodes de dosage des anticorps anti-HLA***

### **1- microlymphocytotoxicité dépendante du complément (LCT)**

Il s'agit de la méthode la plus ancienne et toujours la plus classiquement utilisée pour le dépistage et l'identification des anticorps anti-HLA. Il s'agit d'une adaptation de la technique décrite initialement par Terasaki et McClelland en 1964 (19), basée sur la capacité d'un anticorps à lyser sa cible en présence de complément.

Le principe de cette technique est de mettre en contact le sérum du malade à tester avec un panel de cellules typées en HLA, pendant 30 minutes à 22°C. En présence d'anticorps spécifiques dirigés contre ces molécules HLA, les anticorps se fixent sur les lymphocytes, qui sont lysés après incubation pendant 60 minutes avec du complément de lapin. Un colorant vital permet d'établir un pourcentage de lyse cellulaire dans chaque puits. Cette technique peut-être sensibilisée par l'utilisation d'un anticorps anti-IgG humain. La lyse cellulaire est comparée à un contrôle négatif (sérum d'hommes de groupe AB, n'ayant jamais été transfusés), et à un contrôle positif (mélange de sérums de plusieurs patients hyper-immunisés).

Les cellules utilisées sont des lymphocytes T qui, au repos, n'expriment que des molécules de classe I, et des lymphocytes B (exprimant à la fois les molécules HLA de classe I et de classe II). La recherche d'anticorps anti-HLA de classe II sur les lymphocytes B se fait après déplétion en anticorps anti-classe I, le plus souvent sur un pool de plaquettes. Les lymphocytes T et B sont sélectionnés pour respecter les fréquences respectives des différents antigènes parmi les donneurs potentiels.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules du panel lysées : %PRA (Panel Reactive Antibody) et l'identification de la spécificité des anticorps pour le HLA est déterminée par un logiciel informatique (qui analyse les analogies entre les molécules HLA des lymphocytes des puits lysés). Le dépistage est dit positif lorsque la lyse concerne plus de 10% du panel. C'est donc la largeur de l'immunisation et non pas l'intensité qui est mesurée par ce test.

La caractéristique de cette méthode est de se limiter à la détection des sous types d'immunoglobulines qui fixent le complément, c'est-à-dire les IgG1, les IgG3 et les IgM, donc aux anticorps cytotoxiques, présumés responsables de l'action sur le greffon, ce qui est son gros avantage.

Les principales limites de cette technique sont représentées par sa faible sensibilité. De plus, les réactions faussement positives sont fréquentes et peuvent être secondaires à la fixation d'auto-anticorps ou de complexes immuns. Cet inconvénient peut être contourné par un traitement par DTT (dithiotreitol), qui permet d'inactiver les IgM (majorité des auto-anticorps). Cependant, dans certaines pathologies auto-immunes comme le lupus érythémateux disséminé on peut trouver des IgG, la recherche d'une réactivité sur cellules autologues peut permettre d'identifier ces auto-anticorps. Ceci se fait néanmoins au prix de nombreuses manipulations qui rendent la technique fastidieuse et coûteuse en moyens humains et cellulaires. D'autre part, l'appréciation de l'allo-immunisation par cette technique est plus qualitative (résultat rendu en pourcentage du panel lysé) que quantitative, à moins de réaliser plusieurs dilutions pour apprécier l'intensité de la réaction. De plus, ce test n'est pas spécifique des molécules HLA et peut détecter tous les anticorps dirigés contre les

lymphocytes testés. Enfin, le résultat du test dépend de l'activité du complément et de l'évaluation de la lyse par l'observateur, ce le rend peu reproductible entre différents centres.

## **2- Méthode ELISA**

La première publication concernant cette technique a été réalisée par Kao et al en 1993 (20) et témoignait alors d'une grande sensibilité et spécificité, comparativement à la technique de lymphocytotoxicité.

Son principe est de mettre en contact des antigènes HLA purifiés à partir de différentes lignées cellulaires puis fixés sur une plaque avec le sérum du patient. La présence d'anticorps spécifiques contre les antigènes HLA fixés sur les plaques entraîne la formation de complexes antigènes-anticorps, révélés par un anticorps anti-humain (anticorps secondaire), couplé à une enzyme (phosphatase alcaline) permettant une lecture par une réaction colorimétrique après ajout du substrat. Cette technique peut être utilisée en détection (« screening ») ou en identification des anticorps anti-HLA.

Elle permet un gain de temps important pour le typage des anticorps anti-HLA de classe II en éliminant l'étape longue et fastidieuse d'adsorption des anticorps anti-HLA de classe I sur pool plaquettaire). Elle est également moins coûteuse. De plus elle est spécifique des molécules HLA et peut différencier les différents isotypes des anticorps selon l'anticorps secondaire utilisé. Enfin, elle permet d'éviter l'utilisation de cellules vivantes.

Elle ne préjuge cependant en rien du caractère cytotoxique des anticorps détectés.

## **3- Cytométrie en flux**

Plus récemment, une méthode de détection et d'identification des anticorps anti-HLA en cytométrie en flux, a été développée selon la technique décrite en 1996 par Sumitran-Karuppan et Moller en 1996 (21) et adaptée à la méthode d'identification des anticorps décrite par Pei (22).

Cette technique utilise un mélange de préparations différentes de microparticules (2-4  $\mu\text{m}$  de diamètre), recouvertes d'antigènes HLA de classe I et/ou de classe II, purifiés à partir de différentes lignées cellulaires. Il existe des kits de billes spécifiques des antigènes HLA de classe I ou des antigènes HLA de classe II qui ont l'avantage de ne présenter aucune réaction croisée avec les antigènes de l'autre classe. Les anticorps anti-HLA présents dans le sérum testé réagissent spécifiquement avec les molécules HLA présentes à la surface des billes, puis sont révélées par un anticorps secondaire anti-Ig humain fluorescent. La lecture se fait grâce à un cytomètre de flux. En présence d'anticorps anti-HLA de la classe recherchée dans le sérum étudié, on peut voir un déplacement du canal de fluorescence par rapport au sérum de contrôle qui reste négatif. L'identification des antigènes HLA cibles est rendue possible par la fluorescence des billes dans différentes longueurs d'onde en fonction de leur spécificité HLA.

Comme la technique ELISA, ce test est spécifique des molécules HLA et il peut potentiellement détecter tous les isotypes d'anticorps en fonction de l'anticorps secondaire utilisé, ce qui augmente la spécificité du test (pas de détection des auto-anticorps IgM) et ne nécessite pas l'utilisation de cellules vivantes, mais elle ne renseigne pas sur le caractère cytotoxique des anticorps.

#### **4- Comparaison entre les 3 techniques**

Ces deux dernières méthodes sont réputées plus sensibles, plus spécifiques, et plus reproductibles que la lymphocytotoxicité. La majorité des études montrent une concordance satisfaisante entre la technique ELISA et la technique de LCT (23 ; 24), bien qu'une étude ait mis en évidence des faux négatifs en technique PRA-STA (25).

Il a également été montré une meilleure corrélation entre la détection des anticorps anti-HLA et l'évolution clinique, en ELISA par rapport à la lymphocytotoxicité, et en particulier dans l'étude de Monteiro et al en 1997 (26), sur une étude rétrospective des sérums pré-greffe ou post-greffe (27).

### ***C- Mode d'action des anticorps anti-HLA : Physiopathologie***

En premier lieu, les immunoglobulines de surface des lymphocytes B vont permettre à ces cellules de présenter des antigènes solubles aux lymphocytes T CD4.

Plus classiquement, ces anticorps dirigés contre les antigènes du greffon peuvent être directement cytotoxiques et induire la lyse cellulaire après fixation sur l'antigène et activation du complément. Leur fixation sur ces cellules va aussi permettre l'action des cellules de l'inflammation non spécifiques de l'antigène.

Ces anticorps peuvent également activer les cellules endothéliales, qui acquièrent alors un phénotype dit activé, avec notamment des propriétés procoagulantes, aboutissant à des thromboses (particulièrement importantes dans le rejet hyper-aigu). De plus, les cellules endothéliales activées vont exprimer différentes molécules d'adhésion, qui vont permettre le recrutement des différentes cellules du système immunitaire dans le greffon.

Enfin, ces anticorps peuvent servir de vecteurs à différentes cytokines telles que le TGF $\beta$ , et ainsi moduler la réponse immunitaire locale et les processus locaux de remodelage tissulaire. Enfin, il est difficile de dissocier l'action des anticorps de celle des lymphocytes B, qui vont produire différentes cytokines capables de moduler la réponse inflammatoire et les processus de réparation cellulaire (pour revue, 28).

Les anticorps anti-HLA peuvent donc, par des mécanismes variés, participer activement aux lésions de rejet, ou amplifier la réaction immunitaire de type cellulaire.

Bien que la majorité des anticorps soient des IgG, certaines études ont montré l'implication d'autres isotypes comme les IgM ou les IgA. Ces derniers pourraient avoir un rôle protecteur contre les lésions dues aux autres isotypes (29).

### **III- Immunité humorale et survie du greffon.**

La première publication montrant le rôle délétère des anticorps sur la survie du greffon remonte à 1970 (30).

Opelz et al (31) ont montré plus tard en 1983 que l'existence d'une immunisation anti-HLA avant la transplantation est un facteur influençant de manière défavorable la survie du greffon. Diverses études plus récentes ont confirmé le mauvais pronostic de cette immunisation avant greffe sur la survie du greffon. En particulier, dans l'étude menée par Katznelson et al (32), les survies du greffon à 1 an, 3 ans et 5 ans, étaient inférieures chez les patients présentant un taux d'immunisation supérieur à 50% en pré-greffe (respectivement 74%, 40% et 27%) par rapport aux patients non immunisés (respectivement de 96%, 91% et 85%), données confirmées par d'autres travaux (33). Un travail réalisé par Süsal et Opelz n'a montré d'impact de l'immunisation pré-greffe sur la survie du greffon qu'en cas d'association des anticorps anti-HLA contre les molécules de classe I et les molécules de classe II (34).

La cinétique d'apparition des anticorps a également été étudiée par plusieurs études. Il semble que la positivité des anticorps anti-HLA dans le suivi post-transplantation chez un patient négatif avant la greffe soit un facteur de mauvais pronostic sur la survie du greffon. Martin et al en 1987 (35) confirmaient cette notion en mettant en évidence une diminution de survie à 1 an en cas d'apparition d'anticorps anti-HLA en post-transplantation (48% vs 81%). De même, Suciu-Foca et al ont pu établir que la demi-vie des greffons est significativement inférieure en cas d'apparition de novo d'anticorps anti-HLA dans une série de 107 patients (36).

## **IV- Pré-immunisation anti-HLA et rejet : importance du crossmatch**

### ***A- Anticorps et rejet hyper-aigu***

C'est en 1969, que Patel et Terasaki (37) ont montré pour la première fois que la présence d'anticorps préformés dirigés contre le HLA du donneur exposait au risque de rejet hyperaigu vasculaire.

Il s'agit en effet d'un rejet qui survient très précocément après l'anastomose vasculaire, et dont les conséquences macroscopiques peuvent être visibles avant la fin de l'intervention.

Le mécanisme en est une activation des cellules endothéliales (premières cellules du donneur exposées), par des anticorps anti-HLA préformés, conduisant à des phénomènes de thrombose diffuse qui entraînent la perte irrémédiable du greffon. Néanmoins, cette entité n'est pas spécifique des anticorps anti-HLA et peut se voir en cas d'incompatibilité ABO. Ce phénomène est devenu exceptionnel depuis la réalisation systématique des tests de compatibilité croisée (crossmatch) avant chaque greffe.

### ***B- Rejet vasculaire aigu***

Encore appelé rejet hyperaigu retardé, le rejet vasculaire aigu est une entité proche du rejet hyper-aigu et met probablement en jeu les mêmes mécanismes immunologiques. Il survient le plus souvent dans les trois premiers mois de la greffe.

L'étude histologique montre une prédominance des lésions vasculaires associant thromboses et nécroses des artérioles et capillaires glomérulaires, avec un infiltrat cellulaire modéré au niveau de l'interstitium.

Les anticorps sont les acteurs principaux du rejet vasculaire aigu et la positivation du crossmatch avec les cellules du donneur fait d'ailleurs partie intégrante du diagnostic (38). Les cibles antigéniques peuvent être des antigènes HLA de classe I (39), de classe II (40) ou des molécules non HLA (41). Le traitement de ces rejets vasculaires est d'ailleurs ciblé sur la composante humorale et comporte des échanges plasmatiques.

Il est à noter que les nouvelles techniques de crossmatch lymphocytaire, notamment en cytométrie de flux, ont permis de diminuer la fréquence des rejets vasculaires en post-transplantation. Il est donc possible qu'une partie de ces rejets vasculaires soit secondaire à la présence d'anticorps en pré-greffe à des taux faibles, non détectés par la méthode de lymphocytotoxicité.

### ***C- Crossmatch lymphocytaire***

Le choix du receveur pour un greffon potentiel est déterminé en fonction du groupe HLA, mais surtout en fonction des antécédents d'immunisation du receveur, en particulier lorsque la spécificité des anticorps anti-HLA a été identifiée au cours de la période pré-greffe. Cependant, l'absence d'immunisation du receveur contre le donneur *in vitro* est systématiquement vérifiée au cours du crossmatch. Le taux sérique des anticorps pouvant varier avec le temps, ce test est réalisé avec le sérum le plus récent du receveur potentiel (idéalement le sérum du jour), et les sérums dit « historiques » (sérums positifs au cours du suivi pré-greffe).

Ce test est classiquement réalisé en méthode de cytotoxicité dépendante du complément. Brièvement, il met en contact des lymphocytes du donneur (Lymphocytes totaux, Lymphocytes T (isolés par l'anti-CD3) et Lymphocytes B (caractérisés par le CD19) isolés à partir des ganglions ou de la rate du donneur), et le sérum du receveur, en présence de complément. Ce test peut être sensibilisé par adjonction d'anti-globuline humaine. En cas de positivité du crossmatch, en l'absence de spécificité connue contre les antigènes HLA du

donneur au cours du suivi, la réalisation du crossmatch avec DTT ou sur des cellules autologues permet de préciser la présence ou non d'auto-anticorps, non délétères.

Le résultat de ce test est rendu sous forme d'une échelle de croix évaluant l'intensité de la lyse cellulaire. Ainsi, + correspond à un résultat douteux, tandis que ++++ correspond à un crossmatch très positif.

Le développement de nouvelles techniques de crossmatch par cytométrie en flux a permis une augmentation de la sensibilité de ce test qui se traduit dans certains travaux par une augmentation de la survie des greffons. La positivité de ce type de crossmatch semble en effet plus prédictive de la survenue de rejet que la technique de LCT (42).

#### ***D/ Implications du crossmatch***

La positivité du crossmatch T, imputable à des anticorps anti HLA de classe I a été communément associée à une plus forte incidence de rejet (43), c'est donc une contre-indication à la greffe pour tous les centres de transplantation, même s'il a été montré qu'une positivité historique avec un crossmatch T du jour négatif n'était pas forcément délétère (44).

La prise en compte d'un crossmatch B varie selon les équipes du fait de résultats discordants dans la littérature. Certains dont Mahoney et al ont montré un impact défavorable d'une positivité du crossmatch sur la survie du greffon (45), tandis que d'autres ont montré qu'il pouvait être associé à une meilleure survie dans certaines situations (46).

### **V- Anticorps anti-HLA et rejet chronique**

Le terme de rejet chronique est usuellement employé pour désigner la perte progressive de fonction du greffon. En raison de la participation de mécanismes non immunologique, le terme de *néphropathie chronique d'allogreffe* a été proposé pour remplacer celui de rejet chronique, qui doit être réservé aux processus immunologiques impliqués dans la perte

progressive de fonction du greffon, et en particulier, de ces mécanismes liés aux allo-antigènes (47).

### ***A/ Diversité des mécanismes impliqués dans la néphropathie chronique d'allogreffe***

Les différents mécanismes peuvent être différenciés en fonction de leur caractère immunologique ou non (48).

#### **1- Mécanismes non immunologiques**

Ils associent des facteurs liés au donneur, comme l'âge (probablement lié à la réduction néphronique (49)), et la durée d'ischémie froide, comme en témoigne la meilleure survie des donneurs vivants (50).

Concernant les facteurs liés au receveur, il s'agit d'évènements survenant essentiellement en post-transplantation et qui ne sont pas spécifiques à la transplantation rénale. C'est le cas des facteurs hémodynamiques comme l'hypertension et l'hyperpression glomérulaire qui en découle (51 ; 52 ; 53), et de l'hypertriglycéridémie qui apparaît être un facteur indépendant d'allogreffe (55). Les épisodes de pyélonéphrite aiguë du greffon au cours des 3 premiers mois sont aussi un facteur de mauvais pronostic (56). Enfin, On peut citer la néphrotoxicité de certains immunosuppresseurs, et en particulier de la ciclosporine A (pour revue, 57 ; 58), qui outre sa toxicité directe sur le rein, a également une action hémodynamique (HTA) et métabolique (dyslipémie).

#### **2- Mécanismes immunologiques**

Ils peuvent être distingués en deux types en fonction de leur spécificité pour les allo-antigènes du greffon. En effet, les greffons syngéniques ne développent pas (ou très tardivement) de lésions histologiques de néphropathie chronique d'allogreffe, ce qui témoigne de l'importance des mécanismes immunologiques, et en particulier de ceux mettant en jeu les alloantigènes HLA du greffon. Ainsi, la fréquence de la néphropathie chronique est inversement proportionnelle au degré de matching des reins (59).

### *a) facteurs non spécifiques de l'allo-antigène*

Parmi les facteurs immunologiques non spécifiques, les lésions d'ischémie-reperfusion ont un fort impact sur la survie du greffon; elles entraînent la libération de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (comme l'IFN $\gamma$ , l'IL2, et le TGF $\beta$ ), et favorisant l'expression des molécules HLA. Ce processus va donc augmenter l'immunogénicité du greffon et ainsi amplifier la réponse immunitaire (60 ; 61). Ces lésions se traduisent cliniquement par un retard au démarrage du greffon dont la durée semble être proportionnelle aux lésions de néphropathie chronique (50 ; 62). Les infections à CMV qui constituent une complication classique de la période post-opératoire, semblent également favoriser le développement de la dysfonction chronique du greffon (pour revue 63 ; 64). L'importance de l'alloimmunisation a été détaillée plus haut.

### *b) Facteurs spécifiques de l'allo-antigène*

La probabilité de survenue d'un rejet chronique est corrélée dans certaines études, au nombre d'épisodes de rejet aigu (65 ; 66 ; 67 ; 68). Certains auteurs rapportent une signification particulière des rejets aigus de survenue tardive dans la survenue du « rejet chronique » (69). Toutefois, pour dans certains travaux, l'impact des rejets aigus sur la survie du greffon n'existe qu'en cas de lésions irréversibles (pas d'impact des rejets aigus en cas de guérison avec restitution *ad integrum* de l'architecture rénale) (70).

L'insuffisance d'immunosuppression a été également décrite comme un facteur de risque (modéré) de perte tardive du greffon (dose de CsA à 1 an post-transplantation inférieure à 5mg/kg/j) (68).

### 3- Physiopathologie des lésions du rejet chronique.

Il semble donc que la néphropathie chronique d'allogreffe soit le résultat du processus de réparation excessif secondaire aux lésions cellulaires immunologiques ou non

immunologiques induites par la transplantation, entraînant des modifications architecturales (notamment une fibrose) et fonctionnelles du rein. Différents types cellulaires impliqués dans ces processus (leucocytes, les cellules endothéliales, les myofibroblastes et les fibres musculaires lisses). Le TGF $\beta$  (Tumor Growth Factor  $\beta$ ) est particulièrement impliqué par ses propriétés pro-fibrosantes. D'autres médiateurs tels que les LDL, les radicaux libres et divers peptides vaso-actifs peuvent être également impliqués (pour revue, 71).

On comprend donc l'importance du nombre d'épisodes inflammatoires et en particulier du nombre des rejets aigus dans la genèse de ces lésions. De plus, ces différents événements sont susceptibles d'exposer des antigènes cryptiques ou de majorer la présentation de différents antigènes tissulaires (72) et donc d'amplifier le processus immunologique.

### ***B/ arguments expérimentaux en faveur de l'implication de l'immunité humorale dans le rejet chronique***

Les modèles expérimentaux du rejet chronique chez l'animal, ont pu montrer l'importance des lymphocytes B dans cette pathologie. En effet, la délétion en chaîne  $\mu$  des immunoglobulines prévient l'apparition des lésions vasculaires chez le greffon (pour revue Paul, 28). Certaines études ont montré également montré une infiltration des transplants rénaux atteints de « rejet chronique » par des plasmocytes.

D'autre part, plusieurs études ont montré in vitro le rôle des anticorps anti-HLA de classe I dans l'activation et la prolifération des cellules endothéliales et des cellules du muscle lisse, évoquant la participation de ces anticorps dans les lésions de rejet vasculaire chronique (73 ; 74).

### ***C/ Rejet chronique et anticorps anti-HLA: revue de la littérature***

Différentes études témoignent de l'implication des anticorps dans le rejet chronique.

Tout d'abord, la survenue d'épisodes de rejet aigu et un pic d'immunisation supérieur à 25% sont des facteurs associés au rejet chronique et témoignent de l'importance des phénomènes

immunologiques humoraux (67). La présence d'anticorps anti-HLA en pré-greffe a été également montrée comme un facteur pronostique de survenue d'un rejet chronique dans une analyse rétrospective des crossmatch négatifs en LCT, en cytométrie en flux (42).

Différentes études ont montré que les patients ayant développé un rejet chronique, possèdent des anticorps anti-HLA. Ainsi, Harmer et al montraient en 1995, que 95% des patients ayant rejeté leur greffon ont des anticorps anti-HLA détectables en cytométrie en flux (75). De même, dans une série de 139 patients en première transplantation, 100% des patients atteints de rejets chroniques confirmés histologiquement, avaient des anticorps anti-HLA de classe I et 89% avaient des anticorps anti-HLA de classe II (76). De plus, Worthington et al ont montré en 2001 que parmi les patients non immunisés avant la greffe ayant développé des anticorps anti-HLA en post-transplantation, la perte du greffon survient chez 92% d'entre eux contre 11% des patients n'ayant pas développé d'anticorps (77).

L'apparition des anticorps durant la greffe alors qu'il n'existait pas d'anticorps avant transplantation serait particulièrement associée au développement du rejet chronique. Inversement, l'absence d'anticorps permet dans 88% des cas de prédire l'absence de rejet chronique (78).

L'imputabilité de ces anticorps dans le rejet chronique est devenue plus claire avec les études qui montrent que les anticorps pré-existent aux signes cliniques (HTA) et biologiques (élévation de la protéinurie et de la créatininémie) du rejet (79).

Quelques études ont étudié spécifiquement les anticorps anti-HLA spécifiques du donneur. Ainsi, leur apparition post-greffe est corrélée avec le développement de rejet chronique (36 ; 41 ; 80 ; 81).

En ce qui concerne la cible de ces anticorps anti-HLA, différentes études ont examiné plus spécifiquement l'impact des anticorps anti-HLA de classe II. Ainsi, l'apparition de novo de ces anticorps (en cytométrie de flux) est un facteur prédictif de rejet chronique (80 ;82) indépendamment des épisodes de rejet aigu (83). De même, pour Davenport et al (79), la perte de fonction du greffon secondaire à un rejet chronique est plus fréquente chez les patients qui

développent des anticorps anti-B cytotoxiques (44%) vs 8% pour les patients sans anticorps ( $p < 0,01$ ), en l'absence de différence significative de traitement, de compatibilité HLA, de transfusion sanguine ou de rejets aigus.

### ***D / Histologie du rejet chronique***

Depuis 1991, la communauté scientifique a tenté de standardiser l'interprétation histologique des biopsies de transplant afin d'obtenir des résultats homogènes et une meilleure reproductibilité pour les études multicentriques. Ainsi, une première classification a été établie en 1991, se concentrant initialement davantage sur les lésions de rejet aigu. Les versions plus récentes de cette classification (notamment la classification de Banff 1997, Annexe 1, (84)) ont revu les critères du « rejet chronique », avec une meilleure prise en compte des lésions vasculaires et glomérulaires (auparavant sous-estimées au détriment des lésions tubulo-interstitielles).

Face aux signes cliniques de néphropathie chronique du greffon qui ne préjugent pas du caractère immunologique des lésions, l'étude histologique est le seul moyen de faire le diagnostic de rejet chronique

Cependant, la plupart des lésions décrites au cours de la néphropathie chronique d'allogreffe ne sont pas spécifiques. On peut ainsi voir une infiltration interstitielle par des cellules mononuclées, une fibrose interstitielle ou une atrophie tubulaire, des lésions vasculaires non spécifiques. Au niveau interstitiel, on peut voir des lésions de collapsus des capillaires glomérulaires, une hypertrophie glomérulaire avec expansion de la matrice mésangiale ou une glomérulosclérose focale. Ces lésions ne permettent pas d'affirmer le diagnostic de rejet chronique.

Par contre, d'autres lésions sont très évocatrices de rejet chronique (85), comme les lésions vasculaires constituées d'une hyperplasie de la média (prolifération myofibroblastique) et d'une fibrose intimale concentrique (endartérite fibro-proliférative), des artères interlobulaires et arquées. Ces lésions conduisent à une obstruction progressive de la lumière vasculaire et à une ischémie glomérulaire d'aval. Ces lésions sont d'autant plus évocatrices de rejet vasculaire chronique qu'elles sont inflammatoires avec présence de cellules dans les parois vasculaires. Au niveau du glomérule, la glomérulopathie d'allogreffe est spécifique du rejet chronique. Elle se caractérise par un aspect typique en double contour, visible sur les coupes en imprégnation argentique (aspect proche de celui des glomérulopathies membranoprolifératives), décrit pour la première fois par Hamburger et al (86).

## **VI- Immunité humorale et Histologie : intérêt du C4d**

La recherche en immunofluorescence de dépôt de C4d semble être un bon indicateur histologique de la présence d'anticorps anti-HLA spécifiques du donneur, et témoigne de l'importance des processus humoraux dans le développement du rejet aigu ou chronique (87)

### ***A/ Physiopathologie***

C4 est le composant du complément le plus abondant après C3 dans l'organisme. Après fixation de l'anticorps à l'antigène, le C4 est clivé par le C1 activé, en C4a et C4b. Le groupement thio-ester du C4b se fixe alors de manière covalente aux protéines de voisinage qui contiennent des dérivés amines ou hydroxyles (comme les protéines ou les sucres). Ce C4b lié est inactivé par protéolyse en C4d (peptide de 44,5kD) qui reste lié de manière covalente sur le site d'activation du complément. C'est donc un marqueur durable de l'activation de la voie classique du complément, contrairement aux immunoglobulines qui peuvent disparaître de la surface de la cellule par clivage ou endocytose (88).

Cependant, si la valeur diagnostique et pronostique du C4d semble être communément admise pour le rejet aigu, sa signification dans le rejet chronique reste controversée (94). Néanmoins, le marquage par C4d pourrait être un outil diagnostique important pour différencier le rejet chronique des pathologies chroniques non immunes, et en particulier pour préciser la nature humorale ou cellulaire de ce rejet.

## **VII- Objectifs de l'étude.**

Dans cette étude transversale, nous avons voulu, dans un premier temps préciser la fréquence et la signification de l'apparition des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur chez les receveurs d'une transplantation rénale et essayer de déterminer si la présence de ces anticorps pouvait être un marqueur de rejet chronique. Dans un deuxième temps, nous avons recherché des facteurs prédisposant à l'apparition de ces anticorps, en les comparant aux patients sans anticorps, d'une part, ou avec les patients porteurs d'anticorps non spécifiques du greffon d'autre part.

# **Matériel et Méthodes**

## **I- Patients**

### ***A/ Critères d'inclusion***

Depuis 1998, les patients suivis dans le service de néphrologie du CHU de Nantes, ont bénéficié, dans le cadre du suivi annuel, d'un dépistage d'anticorps anti-HLA et de leur identification selon les techniques décrites ci-dessus.

Nous avons étudié au cours de cette étude tous les patients ayant bénéficié au moins une fois d'une recherche d'anticorps anti-HLA dans le cadre de ce suivi annuel entre 1998 et 2002, à l'exception des patients ayant perdu leur greffon ou étant décédés durant la première année de greffe qui ont été exclus de l'étude, afin d'exclure les échecs liés aux problèmes chirurgicaux ou aux rejets aigus. L'inclusion des patients a donc été effectuée sur un mode transversal.

Nous n'avons pris en compte que les résultats obtenus durant la période de fonction du greffon, sans tenir compte des anticorps apparus après retour en dialyse ou transplantectomie compte tenu de la diminution de l'immunosuppression. I

### ***B/ Suivi au long cours***

Après la période initiale, nécessitant un suivi rapproché, les patients bénéficient d'un suivi en consultation au CHU de Nantes. La fréquence de ce suivi dépend de l'ancienneté de la greffe, de la fonction rénale et des pathologies intercurrentes, et ce suivi est souvent réalisé en alternance avec les néphrologues des hôpitaux généraux proches du domicile du patient. Cependant, tout patient bénéficie au minimum d'une visite annuelle au CHU, où un bilan clinique comprenant pouls, tension artérielle, poids et examen clinique, et un bilan biologique comportant notamment un ionogramme sanguin, une numération formule sanguine, un dosage des immunosuppresseurs (FK 506 ou ciclosporine), une protéinurie des 24 heures et un

ionogramme urinaire sont réalisés. La recherche des anticorps anti-HLA a été réalisée de façon systématique depuis 1998 dans le cadre de ce bilan annuel.

## ***C/ Traitement Immunosuppresseur***

### 1- Les traitements d'induction utilisés sont :

- sérum anti lymphocytaire (SAL) de lapin (Thymoglobuline®, Pasteur et Mérieux, sérums et vaccins, France) ou plus rarement SAL de cheval (Lymphoglobuline®, Sangstat Imtix Lyon) en cas d'emploi antérieur de SAL de lapin, à la posologie de 1,25 mg/kg/j pendant 10 à 14 jours dès J0, par voie intra-veineuse.
- Anticorps monoclonaux anti-récepteurs de l'interleukine 2 (IL2) (Basiliximab :Simulect®, Novartis, daclizumab : Zenapax® Roche ou 33B3.1)
- Anticorps monoclonaux anti-CD3 (Orthoclone OKT3®, Cilag, France)
- Anticorps anti-LFA1

### 2- Les traitements d'entretien utilisés sont :

- Inhibiteurs de la synthèse des purines
  - o Azathioprine (Aza, Imurel®, GlaxoSmithKline) à la dose de 2 mg/kg/j adaptée à la tolérance hématologique (leucopénie)
  - o Mycophénolate mofetil (MMF : Cellcept®, Roche ) à la dose initiale de 2 grammes par jour, utilisé prioritairement depuis 1996. la posologie est ensuite adaptée en fonction de la tolérance digestive (diarrhée) et hématologique (leucopénie)
- Corticostéroïdes (CS) à la posologie de 1 mg/kg/j, dont le schéma de décroissance et la date d'arrêt sont variables.

- Inhibiteurs des calcineurines, introduits soit quelques jours après la greffe, classiquement lorsque la créatinine est inférieure à 300 $\mu$ mol en cas de traitement d'induction, soit d'emblée en l'absence d'induction.
  - Ciclosporine A (CsA), Sandimmun® (Novartis) ou Néoral® (Novartis) , dont la posologie est adaptée en fonction des taux sanguins (objectif entre 100 et 250 ng/ml en fonction du délai par rapport à la greffe)
  - Tacrolimus (FK506) : Prograf® (Fujisawa) est débuté à la posologie de 0,1 mg/kg/j, selon les mêmes conditions que la CsA, et adaptée en fonction des taux sanguins (objectif entre 6 et 12 ng/ml)
  - Sirolimus : Rapamune® (Wyeth-Lederle), débuté dès J0, par une dose de charge (6 mg) puis une dose d'entretien (habituellement 2 mg/j) permettant d'obtenir des taux sanguins entre 4 et 12 ng/ml).

3- L'évolution des protocoles de traitement utilisés dans le service de néphrologie du CHU de Nantes depuis 1970 peut se résumer brièvement ainsi :

- Entre 1970 et 1981, le traitement immunosuppresseur associait des corticoïdes et de l'azathioprine (Aza).
- De 1970 à 1981 : Corticoïdes (2 mg/kg/j) et Aza (2 mg/kg/j)
- De 1981 à 1982 : SAL en induction et corticoïdes et Aza en entretien
- De septembre 1982 à 1984 : traitement d'induction par SAL, avec Aza et Corticoïdes en entretien, puis introduction de la CsA à 3 mois, progressivement laissée en monothérapie.
- A partir de janvier 1985 : SAL avec Aza et Corticoïdes, mais relais précoce par CsA à J10-J14 laissé en monothérapie.
- A partir d'avril 1988 : SAL avec Aza et corticoïdes initialement, même relais par CsA vers J10, mais le traitement au long cours comprend la CsA et l'Aza.
- En 1996, le MMF remplace l'Aza
- A partir de cette date, différents protocoles définissent le traitement en fonction de l'immunisation pré-greffe, le nombre de greffe antérieures, la durée d'ischémie froide.

- le tacrolimus (FK506) est utilisé dès Avril 1998, en alternative à la ciclosporine, selon les protocoles

- le basiliximab est utilisé en routine à partir de septembre 1999, comme traitement d'induction, en alternance avec le SAL selon les modalités des protocoles.

-Les protocoles actuels appliqués dans le service de néphrologie du CHU de Nantes sont :

Pour une première transplantation, avec un taux d'immunisation inférieur à 25% du panel et une durée d'ischémie froide inférieure à 36 heures : association d'un traitement d'induction par dacliximab, et MMF, corticoïdes puis FK506 (J10).

En cas d'immunisation supérieure à 25% du panel, ou durée d'ischémie froide supérieure à 36 heures, le traitement associé du SAL pendant 10 jours, associé à du MMF et des corticoïdes, et introduction de la CsA entre J7 et J14.

Pour les deuxièmes et troisièmes transplantations, le traitement associé SAL pendant 10 jours associé à MMF et corticoïdes puis FK 506 (J10)

#### 4- Le traitement des épisodes de rejet aigu sont :

##### ○ *Pour les rejets cellulaires :*

- Les rejets aigus de grade I (classification de Banff, cf annexe 1) sont traités par bolus de corticoïdes (intra-veineux pendant 5 jours à la posologie initiale de 5 mg/kg/j pendant 2 jours, 4 mg/kg/j pendant 1 j, 3mg/kg/j pendant 1 jour, puis 2 mg/kg/j pendant 1 jour puis relais per os à la dose de 1mg/kg/j, et décroissance de 10 mg/semaine)

- Les rejets aigus de grade II ou III (ou les rejets de grade I en cas de corticorésistance), sont traités par SAL (1,25 mg/kg/j) ou OKT3 (5 mg/jour) pendant 7 jours

##### ○ *Pour les rejets vasculaires :*

- plasmaphèreses (5 échanges minimum)

- OKT3 (5 mg/jour pendant 7 jours)

L'adaptation du traitement d'entretien a été réalisée en fonction des critères cliniques et biologiques d'évolution de la greffe et des dosages sanguins régulièrement réalisés.

La découverte des anticorps anti-HLA n'a pas conduit à des changements de stratégie thérapeutique ni à un renforcement du traitement immunosuppresseur en cours.

## **II- Matériel**

### ***A/ Recherche des anticorps anti-HLA***

La recherche des anticorps anti-HLA est réalisée systématiquement dans le bilan pré-transplantation afin d'établir le statut immunologique du candidat à la greffe et d'optimiser la sélection du greffon compatible. Une recherche trimestrielle jusqu'à la transplantation permet d'actualiser ces données. Cette recherche est également effectuée systématiquement 3 et 4 semaines après tout évènements immunisants tels que les transfusions sanguines.

En post-transplantation, outre leur recherche annuelle, un dépistage est réalisé après chaque évènement susceptible d'induire une immunisation, comme c'est le cas des transfusions sanguines ou des grossesses. Elle est également réalisée après la transplantectomie en cas de perte du greffon et retour en dialyse.

Cette recherche est effectuée par le laboratoire HLA du centre de transfusion sanguine de Nantes qui dispose de tous les outils techniques nécessaire.

Les techniques ayant été précisées plus haut, nous ne détaillerons ici que les particularités des méthodes liées à notre centre.

#### **1- Technique de microlymphocytotoxicité (LCT)**

Le panel de lymphocytes T et de lymphocytes B est issu de 36 donneurs sains et phénotypés en HLA A, B, DR et DQ. Ces lymphocytes T et B du panel ont été sélectionnés pour respecter les fréquences respectives des différents antigènes dans la population dont sera issue le donneur d'organe.

Les lymphocytes T sont purifiés à partir du sang total par lyse des autres types cellulaires (Lymphokwik T), et les lymphocytes B sont purifiés par adsorption sur des billes recouvertes d'un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène commun aux molécules HLA de classe II (DR, DQ, DP). Après incubation du sérum et des lymphocytes pendant 30 minutes, le complément de lapin est ajouté aux différents puits et laissé en contact pendant 1 heure. Un colorant vital à base d'éosine est ajouté permettant d'identifier les cellules lysées

## **2- technique ELISA**

La recherche d'anticorps anti-HLA par ELISA au CTS de Nantes utilise le kit Lambda Antigen Tray (LAT-M), One Lambda, USA. Cette technique utilise des antigènes HLA purifiés à partir de plaquettes et de lignées cellulaires transformées par EBV (56 antigènes HLA de classe I (A, B et Cw et 25 antigènes HLA de classe II (DR et DQ) sont représentés séparément).

Cette méthode est utilisée au CTS de Nantes depuis 1999 pour le dépistage qualitatif des anticorps anti-HLA de classe II et de classe I de type IgG. En cas de positivité, la quantification se fait par les techniques de lymphocytotoxicité (pour les anticorps anti classe I) ou par technique de cytométrie en flux (pour les anticorps anti HLA de classe II depuis 2002). L'identification des anticorps par technique ELISA ne se fait qu'exceptionnellement à Nantes, dans un cadre expérimental.

## **3- Cytométrie en flux : (LUMINEX)**

Dans notre étude, cette technique n'est actuellement pas utilisée en dépistage mais en technique d'identification des anticorps anti-HLA de classe II en cas de recherche positive des HLA de classe II en ELISA. Le kit de détection LABScreen (one lambda, USA) utilisé détecte est spécifique des IgG anti-HLA de classe II.

#### **4- Stratégie actuelle de dépistage des anticorps anti-HLA dans le suivi des patients transplantés à Nantes :**

Avant 1999, la détection et l'identification des anticorps anti-HLA se faisaient selon la méthode de lymphocytotoxicité à la fois pour les anticorps de classe I et les anticorps de classe II.

Depuis 1999, le dépistage des sérums se fait en technique ELISA (LAT-M) sur deux kits séparés pour les anticorps anti-HLA de classe I et les anticorps anti-HLA de classe II.

L'identification des anticorps est ensuite réalisée par lymphocytotoxicité pour les anticorps de classe I. L'identification des spécificités des anticorps anti-HLA de classe II était également réalisée en LCT jusqu'en 2002. Depuis cette date, l'identification des anticorps anti-HLA de classe II est effectuée en routine par technique LUMINEX en cytométrie de flux.

Néanmoins, les patients pour lesquels un taux élevé d'anticorps est connu bénéficient d'emblée des techniques d'identification sans screening préalable en ELISA.

L'étude comparative des différentes techniques d'identification des spécificités HLA est actuellement en cours. Pour certains patients, alors que le dépistage des anticorps anti-HLA est positif, aucune spécificité de ces anticorps n'a été retrouvée.

#### ***B/ le groupage HLA du donneur et du receveur : les techniques***

En technique de routine, le groupage HLA du receveur est effectuée par la méthode sérologique en ce qui concerne le HLA de classe I (A et B) et en biologie moléculaire pour le HLA de classe II (DQ et DR). En cas de difficulté d'interprétation, du HLA de classe I en méthode sérologique, une analyse en biologie moléculaire est effectuée.

Le typage HLA du donneur est par contre effectué par méthode sérologique, plus rapide.

Le typage DQ du donneur n'a pas toujours été réalisé en situation d'urgence. Dans ce cas, l'identification du DQ du donneur s'est basée sur les déséquilibres de liaison entre les allèles DQ et DR, et en tenant compte des sous groupes d'allèles HLA (cf. Annexe 2).

### ***C/ Le crossmatch et ses règles à Nantes***

La réalisation du crossmatch est la dernière étape avant la transplantation ; elle vérifie l'absence d'immunisation du receveur contre le donneur présumé compatible au vu du typage HLA et de l'historique de l'immunisation anti-HLA dans le but d'éviter les rejets hyper-aigus et aigus. Malgré l'amélioration des techniques de dépistage et d'identification des anticorps anti-HLA, cette étape reste obligatoire.

Dans la cadre de la transplantation rénale au CHU de Nantes, un crossmatch T (c'est-à-dire une immunisation contre les anticorps anti-HLA de classe I) positif avec le sérum du jour constitue une contre-indication absolue à la transplantation, tandis que sa positivité avec un sérum historique est autorisée dans les premières greffes.

Un crossmatch B positif sur un sérum historique est autorisé dans les premières et les deuxièmes greffes même si il est du à des anticorps anti-classe II identifiés. Il est par contre interdit si il est du à des anticorps anti-class I. Une positivité du crossmatch B avec le sérum du jour est interdit si il est du à des anti-classe I ou des anti-classe II.

### ***D/ Les biopsies rénales***

Les biopsies de greffons ne sont pas réalisées de manière systématique dans notre centre. En période post-opératoire précoce, elles ne sont réalisées qu'en cas de délai de la reprise de fonction du greffon. Les indications de ponction biopsie rénale sont essentiellement la

dégradation de la fonction rénale, l'apparition d'une protéinurie ou d'une hématurie, en l'absence de cause évidente urologique ou infectieuse.

Elles sont réalisées dans des conditions d'asepsie rigoureuse, sous anesthésie locale, sous contrôle échographique si le greffon est difficilement palpable, avec une aiguille de 16 ou 18G montée sur pistolet automatique (Biopty Gun® ou Monoty Bard®)

Le plus souvent, deux fragments sont prélevés, permettant une étude en microscopie optique (Fixation dans liquide Carnoy) et une étude en immunofluorescence (prélèvement congelé) si nécessaire.

Après les étapes d'inclusion, de coupe et de coloration (4 colorations sont effectuées de façon systématique : Hématoxyline-Eosine-Safran, Trichrome de Masson, acide périodique de Schiff, et coloration argentique selon la technique de Jones), les lames sont lues par des anatomopathologistes expérimentés en histologie rénale et plus particulièrement des greffons. Les lésions glomérulaires, tubulaires, interstitielles et vasculaires sont exprimées sur un mode qualitatif et quantitatif selon la classification de Banff (cf. annexe 1).

La recherche de C4d a été réalisée à posteriori sur des prélèvements congelés, chez les patients présentant des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur, ayant bénéficié d'une biopsie de transplant après l'identification des anticorps ou dans les deux ans précédant la découverte des anticorps.

Il s'agit d'une technique d'immunofluorescence indirecte, utilisant l'anticorps IgG de souris anti-C4d (Biogenesis, England). Ce marquage est réalisé sur des coupes de rein congelées de 4µm (cryostat) et fixées à l'acétone, après blocage des biotines endogènes. L'anticorps primaire (C4d) est utilisé à la concentration de 1/100<sup>e</sup> et incubé pendant 30 minutes sur les lames. L'anticorps secondaire (IgG anti-souris biotinylé) est alors déposé, après rinçage, et incubé pendant 30 mn, avant d'être révélé par de la streptavidine conjuguée au FITC (1/50<sup>e</sup>) pendant 30 minutes. Après rinçage, les lames sont montées en Permafluor, puis sont lues au microscope à fluorescence.

### III- Méthodes

#### ***A/ base de données***

Le service de néphrologie du CHU de Nantes dispose d'une base de données, créée à l'initiative du Docteur Magali Giral et de Pascal Daguin, sur l'ensemble des greffés suivis à Nantes depuis 25 ans. Cette base de donnée regroupe les principales données cliniques, biologiques et thérapeutiques de chaque patient. Cette base de données bénéficie en outre d'un outil statistique, régulièrement utilisé pour la réalisation d'études cliniques.

Le recueil des données et la saisie sont réalisés par des assistants de recherche clinique indépendants. La qualité du recueil des données administratives est régulièrement vérifiée depuis 1990.

#### ***B/ Etude statistique***

L'analyse statistique a été réalisée essentiellement en mode univarié, grâce aux différents tests statistiques décrits ci-dessous (analyse de variance à un facteur, chi-deux, étude du rapport de vraisemblance, test de Fisher exact). Un modèle de régression logistique a été construit afin de déterminer l'influence individuelle de certains paramètres sur le risque de rejet chronique ou de retour en dialyse.

##### **1- variables qualitatives**

La comparaison des variables qualitatives a été réalisée par test de Chi 2, lorsque les effectifs théoriques étaient supérieurs à 5.

Lorsque ces effectifs théoriques étaient inférieurs à 5, les comparaisons ont été effectuées en utilisant le rapport de vraisemblance (analyse globale pour les 3 groupes).

En cas de significativité du test de chi-deux global, la comparaison des variables groupe à groupe a été réalisée par test de chi-deux ou test de Fisher exact selon la taille de l'effectif théorique.

## 2- Variables quantitatives

L'étude statistique a été réalisée par analyse de variance à 1 facteur (ANOVA).

## 3- Analyses de survie

Les analyses de survie ont été réalisées en utilisant la méthode de Kaplan-Meier. La survie du greffon a été calculée à partir de la date de transplantation jusqu'à la date de retour en dialyse, la date de décès, ou la date de fin d'étude. La survie globale a été calculée à partir de la date de transplantation jusqu'à la date de décès.

L'analyse comparative de la survie entre les 3 groupes a été réalisée par le test du logrank.

## ***C/ Description des paramètres étudiés***

Les différentes variables étudiées ont été extraites de la base de données DIVAT précédemment décrite.

### 1- Paramètres prégreffe liés au receveur

- *Age (à la date de la greffe) et sexe du receveur*
- *Numéro de greffe (1 ou plus)*
- *maladie initiale (deux groupes ont été différenciés en fonction de la nature immunologique ou non de la maladie initiale)*
- *nombre de grossesses antérieures à la transplantation.*

## 2- Paramètres non immunologiques liés au greffon

- *age et sexe du donneur*
- *nature du donneur* : la plupart des greffons sont issus de donneurs décédés, mais les greffes de donneurs vivants ont été incluses
- *type de greffe* : soit rein seul soit rein pancréas
- *Durée d'ischémie froide* (en minutes), qui représente la durée séparant le clampage des vaisseaux rénaux au moment du prélèvement, du déclampage après anastomose chez le receveur.
- nombre de dialyses post-greffe nécessaires témoignant du retard au démarrage du greffon.
- Présence ou non d'un retard *au démarrage du greffon*

## • 3- Paramètres immunologiques

- *Taux d'immunisation anti-HLA*
  - pic historique d'Ac anti-T (classe I), exprimé en pourcentage de cellules du panel (taux maximal d'immunisation dans le suivi prétransplantation)
  - pic historique d'Ac anti-B (classe II), exprimé en pourcentage de cellules du panel
- *Compatibilité HLA*
  - Nombre total de compatibilités A/B/DR
  - Nombre de compatibilités A
  - Nombre de compatibilités B
  - Nombre de compatibilités DR
- *résultats du crossmatch prégreffe* :
  - *crossmatch B* (positif ou négatif)
  - *crossmatch T* (positif ou négatif)

#### 4- Traitements

- *Nature du traitement immunosuppresseur :*
  - traitement d'induction :
    - néant
    - sérum anti-lymphocytaire
    - anti-récepteur de l'IL2
    - autres (anti-CD3 :OKT3, anti-LFA1...)
  - traitement de fond
    - inhibiteurs des calcineurines
    - mycophénolate mofetil
    - azathioprine
    - corticoïdes
    - sirolimus

#### 5- Evènements post-transplantation :

- *rejet aigu* authentifié histologiquement, présence et nombre d'épisodes
- *infection à CMV* (présence ou absence d'infection à CMV dans le suivi post-greffe)
- *grossesses* après transplantation (présence ou absence de grossesse)

#### 6- Suivi post-transplantation

Les paramètres suivants du suivi des patients a été pris en compte aux temps de greffe suivants : 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96 120 et 180 mois, et a été comparé entre les différents groupes.

Pour les patients ayant des anticorps spécifiques du donneur, les valeurs moyennes de ces paramètres ont été étudiées au moment de la découverte des anticorps.

- *Clairance de la créatinine*

Celle-ci est exprimée selon la formule de Cockroft (95):

Clairance de la créatinine =  $F \times (140 - \text{age}) \times \text{poids} / (0,814 \times \text{créatinémie en } \mu\text{mol/l})$

(Où  $F = 1,23$  pour les hommes et  $F = 1,04$  pour les femmes)

- *Protéinurie* (en gramme par 24 heures) recueillie sur les urines de 24 heures.

- *Tension Artérielle Moyenne (TAM)*

$TAM = TAD + [(TAS - TAD)/3]$  où TAD= tension artérielle diastolique

TAS= tension artérielle systolique

### 7- survie du greffon et du patient

- *retour en dialyse*

traduit la perte de fonction du greffon

résultat exprimé en mois par rapport à la greffe

- *décès du patient*

résultat exprimé en mois par rapport à la greffe

### 8- paramètres histologiques

- *Rejet chronique authentifié histologiquement* au cours de l'évolution de la greffe.

# Résultats

## I- Description de la population étudiée.

Conformément aux critères décrits précédemment, 1203 patients ont bénéficié d'au moins une recherche d'anticorps anti-HLA (plus d'un an après la greffe) entre 1998 et 2002 ont ainsi pu être inclus dans cette étude.

Cette population se caractérise comme suit :

- 682 hommes (soit 56,7%) pour 521 femmes (43,3%),
- âge moyen de 42,69 ans (+/- 13,9 ans) s'étalant de 6 ans à 75 ans.
- Première transplantation dans 993 cas (82,5%) contre 210 « retransplantations » (17,5%).
- 1103 greffes (91,7%) sont issues de donneurs cadavériques et 100 organes sont issus de donneurs vivants (8,3%).
- Il s'agit de greffes de rein isolées (1084 patients soit 90,1%) ou combinées avec une greffe de pancréas (119 patients)
- La période de greffe s'étend d'août 1973 à décembre 2001.

Ces patients ont été répartis en différents groupes en fonction de leur statut pour les anticorps anti-HLA en post-transplantation et de leur spécificité pour le donneur.

Ainsi :

- 964 patients n'ont pas présenté d'anticorps anti-HLA en post-transplantation (que ce soit en LCT ou en technique de dépistage ELISA).
- 239 patients ont présenté des anticorps anti-HLA dont:
  - 40 patients possédaient des anticorps anti-HLA spécifiques du greffon,
  - 69 patients avec des anticorps anti-HLA de spécificité connue mais non spécifique du donneur.

- 130 patients pour lesquels la spécificité des anticorps anti-HLA n'a pas été identifiée.

Ces patients ont été regroupés en 3 groupes :

- 40 patients possédant des anticorps spécifiques du donneur
- 964 patients n'ayant pas développé d'anticorps dans leur suivi post-transplantation
- 199 patients porteurs d'anticorps non spécifiques du greffon (les patients pour lesquels les spécificités sont connues ou non connues ont été regroupés).

Nous avons dans un premier temps étudié spécifiquement les caractéristiques des patients pour lesquels des anticorps spécifiques du donneur ont été identifiés, puis nous avons comparé les trois populations à la recherche de facteurs prédictifs d'apparition de ces anticorps, et de conséquences sur le devenir du greffon.

## **II- Patients ayant développé des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur.**

Les caractéristiques démographiques, les événements post-transplantations et les paramètres cliniques et biologiques au moment de la détection des anticorps ont été résumés dans différents tableaux de l'annexe 3.

### ***A/ fréquence des anticorps spécifiques du donneur dans la population étudiée, spécificité des anticorps***

La présence d'anticorps anti-HLA spécifiques du greffon a été authentifiée chez 40 des 1203 patients inclus dans cette étude, soit chez 3,3% des patients ayant bénéficié de la recherche d'anticorps anti-HLA dans le suivi post-greffe.

La délai moyen d'apparition des anticorps est de l'ordre de 9 ans après la transplantation (entre 1 an et 22 ans post-greffe).

Il s'agit dans tous les cas d'anticorps dirigés contre les antigènes HLA de classe II du donneur. 50% de ces patients ont développé des anticorps anti-DR, 62,5% ont développé des anticorps anti-DQ, et 20 % d'entre eux ont développé des anticorps envers plusieurs antigènes DQ et/ou DR.

Il n'a été retrouvé aucune spécificité anti-HLA de classe I parmi les patients de l'étude.

Ces anticorps ont été détectés en technique de lymphocytotoxicité pour 22 des patients (soit 55%) et en cytométrie en flux pour les 18 autres patients (45%).

Chez 3 de ces patients, les sérums ont été traités par les deux techniques, concordantes dans la détection d'anticorps dirigés contre le donneur. Le plus souvent, un sérum a été traité par une seule technique (selon le protocole à cette date).

8 patients ont bénéficié durant le suivi (sur différents sérums), d'une identification positive des anticorps anti-HLA par les deux techniques.

Pour 11 patients, des taux d'immunisation supérieurs à 10% avaient déjà été retrouvés sur les sérums précédents, mais sans identification retrouvée.

## ***B/ caractéristiques démographiques***

Cette population présente les caractéristiques suivantes :

- l'âge moyen est de 36,9 ans +/- 12,41 (de 13 à 69 ans).
- 57,5% de femmes et 42,5% d'hommes
- 50% des femmes de ce groupe ont des antécédents de grossesse.
- Il s'agit pour 75% des patients de la première greffe rénale, pour 22,5% d'entre eux la deuxième et la troisième pour 1 seul des patients soit 2,5%.

- 2 patients (soit 5%) ont bénéficié d'une greffe de donneur vivant,
- 2 patients ont bénéficié d'une greffe combinée rein-pancréas.
- La maladie initiale est considérée comme de nature immunologique, dans 25% des cas (c'est-à-dire : Hyperplasie segmentaire et focale (HSF), néphropathie à IgA ou purpura rhumatoïde, atteinte rénale s'intégrant dans le cadre d'un lupus érythémateux disséminé, d'un syndrome hémolytique et urémique, ou d'une atteinte liée à un myélome (amylose)). Les autres causes sont non immunologiques ou inconnues et comprennent essentiellement la polykystose rénale, la néphropathie diabétique, les uropathies malformatives (ou de reflux) ainsi que les néphrites tubulo-interstitielles aiguës ou chroniques non étiquetées.
- L'âge moyen du donneur était de 33,3 ans (de 1 à 58 ans).
- La durée d'ischémie froide était en moyenne de 25,5 heures
- le nombre de dialyse post-greffe traduisant le retard au démarrage du greffon était en moyenne de 1,1.

On note qu'un des patients a reçu une greffe combinée cœur-rein et a déjà reçu un transplant hépatique pour une maladie de Steinert.

## ***C/ Caractéristiques immunologiques***

### **1- immunisation prégreffe**

La moyenne du pic d'immunisation anti T était de 24,3% (DS +/- 34,4).

77% de ces patients possédaient un taux significatif d'anticorps anti-HLA avant transplantation.

33% répondaient aux critères d'hyper-immunisation anti-T (pic supérieur à 80%)

La moyenne du pic d'immunisation anti B était de 47,2% (DS +/- 36,2).

70% des patients possédaient des anticorps anti-HLA de classe II avant transplantation.

30% étaient hyper-immunisés avec des anticorps anti-B supérieurs à 80%.

## 2- Compatibilité du greffon

Le nombre de compatibilités était en moyenne de 2,18 sur les 6 allèles A, B, DR. Il est intéressant de noter qu'aucun de ces patients n'a eu de greffe totalement compatible.

	Moyenne	Valeurs Max-Min	Ecart-Type
Nombre d'identités A-B-DR	2,18	0-5	1,26
Nombre d'identité A	0,79	0-2	0,65
Nombre d'identité B	0,67	0-2	0,61
Nombre d'identité DR	0,72	0-2	0,55

	0	1	2	3	4	5	6
Nombre de Compatibilités (%)	5,1	30,7	25,6	23,2	10,3	5,1	0
Compatibilité A (%)	33,3	53,9	12,8				
Compatibilité B (%)	41	51,3	7,7				
Compatibilité DR (%)	33,3	61,6	5,1				

## ***D/ Traitements immunosuppresseurs***

45% des patients de ce groupe ont bénéficié d'un traitement d'induction par SAL de lapin, associé à de l'Imurel et des corticoïdes, relayé par du Sandimmun.

### 1- Traitement d'induction

- 88,2 % des patients ont bénéficié d'un traitement d'induction, réparti comme suit :

- SAL : 70,6%
  - Anti-récepteurs de l'IL2 : 5,9%
  - Autres : 11,7% (dont anti-LFA1 : 8,8%)
- 11,8 % des patients n'ont pas eu de traitement d'induction et ont donc bénéficié dès le début de la greffe d'un traitement dit d'entretien.

## **2- Traitement d'entretien**

Le traitement institué chez la plupart des patients au moment de la greffe comportait un inhibiteur des calcineurines, un inhibiteur de la synthèse des purines, et des corticoïdes.

- 94% des patients ont bénéficié d'un traitement d'entretien par inhibiteurs des calcineurines
  - 91,2% par Ciclosporine A
    - 77% sous forme de Sandimmun®
    - 23 % sous forme de Néoral®,
  - 2,9% par Tacrolimus (Prograf®).
- 94% des patients ont été traités par inhibiteurs de la synthèse des purines
  - Azathioprine (70%).
  - Mycophénolate Mofétil (24%)
- 100% des patients ont bénéficié d'une corticothérapie à la période initiale de la greffe.
- Aucun patient n'a été mis sous sirolimus

## **3- Traitement en cours au moment de la détection des anticorps.**

Le traitement d'entretien a pu être modifié au cours de l'évolution de la greffe, ainsi, au moment de la détection des anticorps :

- 4 patients bénéficiaient d'une monothérapie (corticothérapie pour 2 d'entre eux, Prograf et Sandimmun pour les deux autres).
- 92% bénéficiaient d'un traitement par inhibiteurs des calcineurines (54% sous Ciclosporine A et 38% sous Tacrolimus).
- 77% était sous traitement par Cellcept (33%) ou Imurel (44%).
- 1 patient bénéficiait d'un traitement par rapamycine en association avec du tacrolimus.
- 38% bénéficiaient encore d'une corticothérapie.

## ***E/ Evènements post-greffe***

- **Rejets aigus**

13 patients (32,5%) ont développé un rejet aigu dans les suites de la transplantation. La médiane d'apparition du premier rejet était de 2 mois (survenue de 15 jours à 4 ans). Deux de ces patients ont présenté un deuxième rejet aigu dans les suites (à 3 et 24 mois).

10 de ces rejets ont été traités par bolus de corticoïdes, les 3 autres ont bénéficié d'un traitement par sérum anti-lymphocytaire ou OKT3.

Un rejet vasculaire a été authentifié pour un des patients (patient 25).

- **Infections à CMV**

9 patients (22,5%) ont présenté une infection à CMV en post-transplantation, traitée ou non par Gancyclovir. Toutes ces infections sont survenues dans les trois premiers mois de la greffe.

- **Grossesses**

5 femmes (soit 12,5% de l'effectif de ce groupe ou 21,7% des femmes) ont développé une grossesse dans les suites de leur greffe (4 grossesses menées à terme et un avortement).

La médiane de survenue de la grossesse était de 24 mois après la transplantation (minimum de 4 mois post-greffe pour l'interruption de grossesse à 10 ans après transplantation).

Dans 4 cas, la grossesse précédait l'apparition des anticorps (en moyenne 124 mois avant l'apparition des anticorps avec des valeurs allant de 46 à 216 mois). Dans 1 cas, la grossesse était postérieure (48 mois) à l'apparition des anticorps.

- **transfusions sanguines**

7 patients (17,5%) ont nécessité la transfusion de culots globulaires en raison d'une anémie sévère.

Les transfusions ont eu lieu en moyenne 69 mois avant l'apparition des anticorps, mais la médiane d'apparition est de 12 mois après les transfusions.

- **allègement ou interruption de la thérapeutique immunosuppressive**

3 patients (7,5%) ont interrompu leur traitement immunosuppresseur durant le suivi.

Pour un des patients, il s'agissait d'un arrêt thérapeutique en raison du développement d'une pathologie lymphomateuse (Maladie de Hodgkin), justifiant l'arrêt des médicaments immunosuppresseurs sauf les corticoïdes.

En ce qui concerne les deux autres patients, il s'agissait d'une mauvaise observance thérapeutique, objectivée par des taux plasmatiques d'inhibiteurs des calcineurines nuls ou quasi nuls à un moment donné du suivi.

Un de ces patients a présenté un rejet aigu tardif dans les suites de l'arrêt de ce traitement (20 mois après la greffe), traité par corticothérapie, ayant nécessité quelques séances d'hémodialyse.

## ***F/ Evaluation des paramètres cliniques et biologiques au moment de l'apparition des anticorps***

### 1- protéinurie

La protéinurie moyenne au moment de l'apparition des anticorps était de 1,62 g/24h (de 0 à 20 g /24 heures). La médiane, plus informative en raison de la diversité des valeurs était de 0,63 g /24 heures.

On note que 26 des 40 patients ont présenté au cours de la période d'observation, une protéinurie confirmée (à deux reprises) supérieure à 0,5g / 24 heures. Pour 19 d'entre eux, elle était supérieure à 1 g/ 24 heures, et elle était de volume néphrotique pour 9 d'entre eux.

### 1- créatinine

La créatininémie moyenne était de 203  $\mu\text{mol/l}$  (de 70 à 587  $\mu\text{mol/l}$ ) au moment de la découverte des anticorps, avec une médiane à 156  $\mu\text{mol/l}$ .

### 2- Cas des patients pour lesquels les anticorps sont apparus pendant l'étude

Parmi les 40 patients identifiés comme porteurs d'anticorps anti-HLA spécifiques du donneur, 9 d'entre eux se sont positivés durant la période d'étude (c'est-à-dire que la recherche d'anticorps était négative sur les sérums antérieurs). Il s'agit des patients 2, 6, 8, 19, 20, 27, 30, 37 et 40. La cinétique des paramètres biologiques et cliniques a été observée chez ces patients depuis le début de la transplantation, et en particulier durant la période d'observation de l'étude. L'évolution de ces paramètres a été résumée dans les figures 1, 2 et 3.

Chez 4 patients, on note l'apparition ou la majoration de la protéinurie (2, 6, 37 et 40) justifiant dans ces cas la mise en route d'un traitement anti-protéinurique par IEC et/ou ARAII.

Une dégradation de la fonction rénale est observée pour les patients 6 et 40, bien que la diminution de la clairance de la créatinine selon Cockcroft soit antérieure à l'identification des anticorps pour le patient 6.

Une majoration des chiffres de Pression Artérielle est clairement objectivée pour le patient 40 mais ce paramètre est difficile à apprécier devant la variabilité des chiffres tensionnels entre

deux consultations. Les patients **6, 27, 37 et 40** ont néanmoins bénéficié de l'instauration ou de la majoration d'un traitement anti-hypertenseur.

La synthèse de l'évolution clinique et biologique a été réalisée pour chaque patient dans les figures ci-jointes (Figure 1a, 1b et 1c).

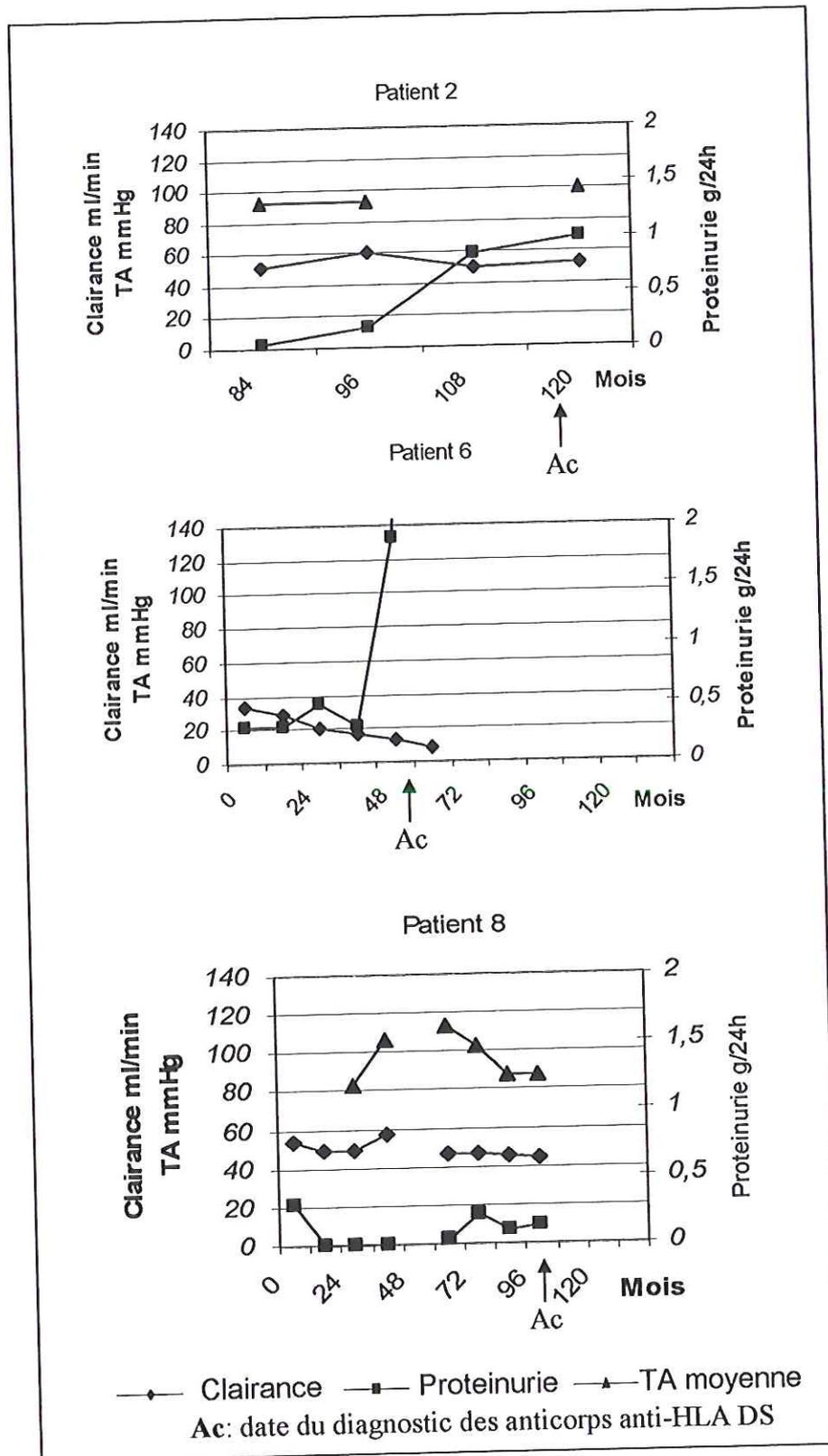


Figure 1a : Histogrammes représentant l'évolution des paramètres cliniques et biologiques en fonction de la date de découverte des anticorps spécifiques du donneur (patients 2,6,8)

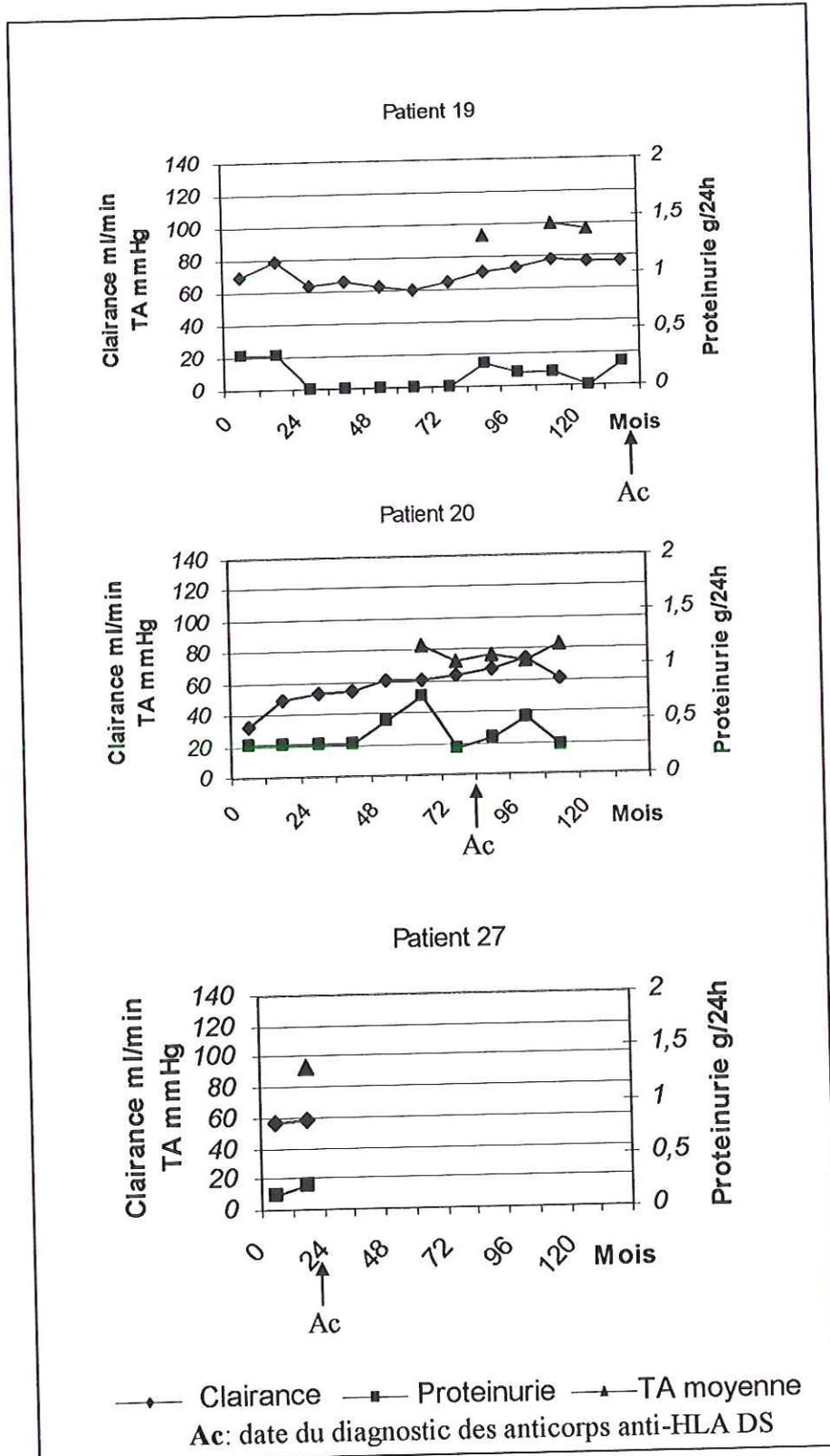


Figure 1b : Histogrammes représentant l'évolution des paramètres cliniques et biologiques en fonction de la date de découverte des anticorps spécifiques du donneur (patients 19, 20, 27)

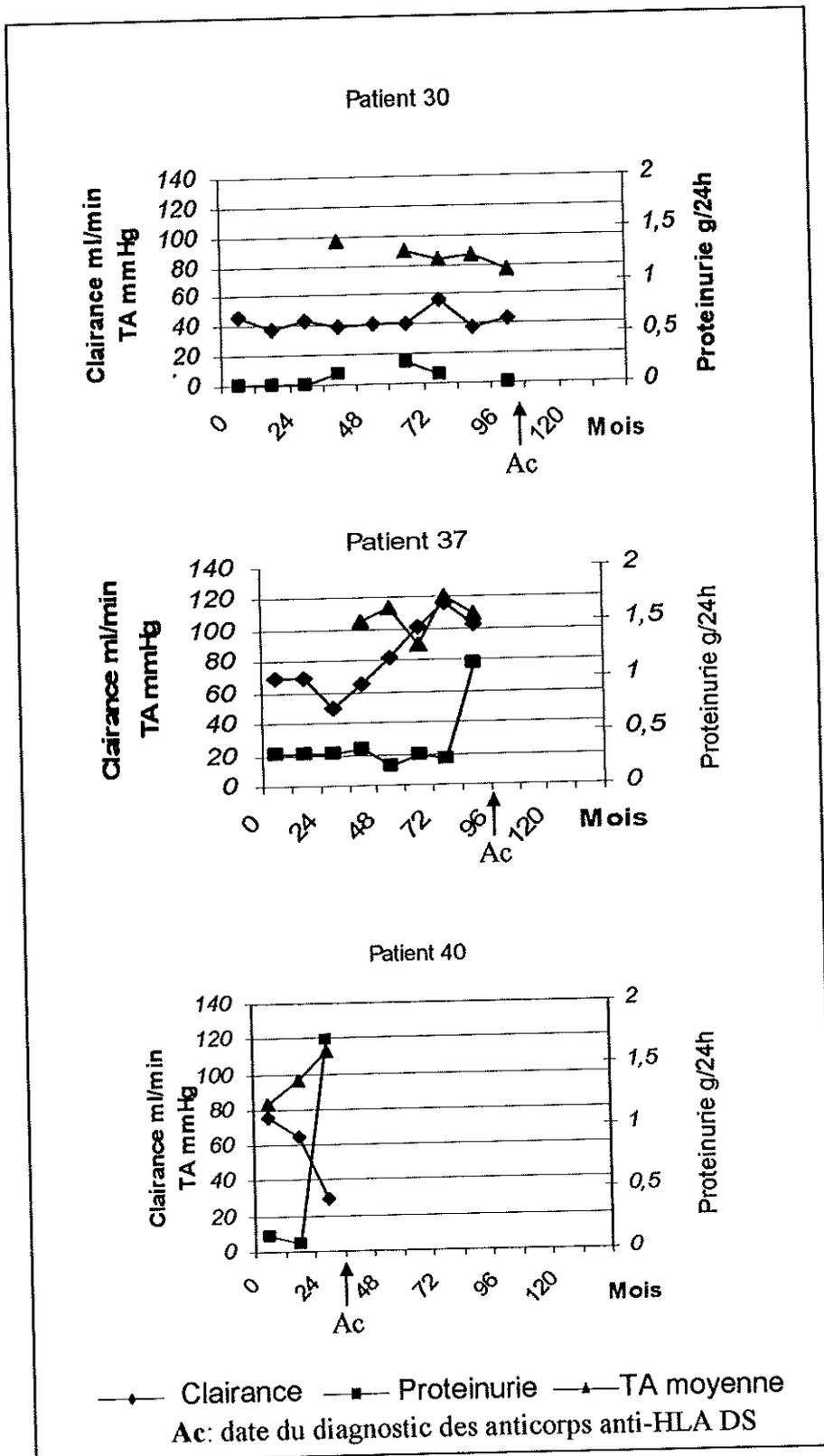


Figure 1c : Histogrammes représentant l'évolution des paramètres cliniques et biologiques en fonction de la date de découverte des anticorps spécifiques du donneur (patients 30, 37, 40)

## ***G/ Histologie et étude de la fixation du C4d***

11 patients (soit 32,5 % des patients) ont bénéficié durant leur suivi d'une biopsie de greffon, réalisée en raison d'une majoration de la protéinurie ou d'une dégradation de la fonction rénale. Pour un des patients (patient 5), deux biopsies rénales ont été réalisées (pour une, 2 ans avant la détection des anticorps et l'autre coïncidant avec le moment de détection des anticorps).

3 des biopsies ont été réalisées 1 ou 2 ans avant l'apparition des anticorps, 6 biopsies ont été réalisées au moment de l'identification des anticorps, et 3 biopsies ont été réalisées 4 à 12 mois après le diagnostic.

Les résultats de ces biopsies ont été exprimés dans le tableau 1 (page suivante).

A part 4 prélèvements (insuffisants pour établir un diagnostic de certitude), tous les patients biopsiés présentaient une glomérulopathie d'allogreffe certifiée ou vraisemblable authentifiant le rejet vasculaire chronique. Quatre patients présentaient des dépôts d'IgA (2 récurrences et 2 néphropathies de novo).

L'étude de la fixation de C4d s'est révélée positive pour toutes les biopsies ayant montré des signes de rejet chronique en microscopie optique (Annexe 4)

Parmi les biopsies des deux patients présentant une récurrence de leur néphropathie à IgA sans association formelle à des lésions de rejet chronique, une présentait une fixation diffuse de C4d, alors que l'autre ne montrait pas de dépôt. La biopsie de ce premier patient a été réalisée peu de temps avant son retour en dialyse.

Concernant le patient ayant bénéficié de 2 biopsies, on constate que la fixation de C4d est apparue en présence des anticorps alors que le prélèvement antérieur était négatif pour ce marquage.

patients	date d'apparition des Ac (mois)	date de PBR (mois)	délai de PBR par rapport à l'apparition des Ac (mois)	Motif de réalisation de la PBR	Microscopie optique	C4d	Glomérulopathie autre
1	96	96	0	Dégradation de la fonction rénale	? (Néphrite chronique)	++ (diffus)	récidive IgA
2	120	120	0	Protéinurie	? (Néphrite chronique)	-	récidive IgA
5	60	36	-24	Protéinurie	? (Néphrite chronique)	-	
	60	60	0	Protéinurie ++	Glomérulopathie d'allogreffe (rejet vasculaire chronique)	++ (diffus)	
6	60	72	12	Protéinurie	Rejet vasculaire chronique + Glomérulopathie d'allogreffe	+ (focal)	
9	24	24	0	Dégradation de la fonction rénale	Rejet aigu (Ib), prélèvement insuffisant	ininterprétable	
17	120	122	0	Protéinurie	Glomérulopathie d'allogreffe (rejet vasculaire chronique)	+ (focal)	
23	240	244	4	Dégradation de la fonction rénale + protéinurie	Rejet vasculaire chronique + Glomérulopathie d'allogreffe	+++ (diffus)	+ IgA
30	108	96	-12	Dégradation de la fonction rénale	Glomérulopathie d'allogreffe vraisemblable	++ (diffus)	
31	36	44	8	Dégradation de la fonction rénale + protéinurie	Rejet vasculaire chronique + Glomérulopathie d'allogreffe?	++ (très focal)	
32	120	108	-12	Protéinurie	Glomérulopathie d'allogreffe vraisemblable	++ (diffus)	Glomérulonéphrite à IgA de novo
40	36	36	0	Dégradation de la fonction rénale + Protéinurie	Glomérulopathie d'allogreffe (rejet vasculaire chronique)	++ (focal)	

Tableau 1 : Histologie des biopsies rénales réalisées chez les patients ayant développé des anticorps spécifiques du donneur.

## ***H/ Survie du greffon***

Pour 11 patients, soit 27,5% de l'effectif, la perte progressive de fonction du greffon a nécessité la reprise de l'épuration extra-rénale durant la période d'observation de l'étude. La médiane de survie du greffon était pour ces patients de 96 mois (moyenne de 101 mois), avec une durée de vie allant de 3 ans à 21 ans.

Un patient de ce groupe est décédé après le retour en dialyse. La cause retenue de cet échec était dans tous les cas le rejet chronique.

Chez ces patients, les anticorps anti-HLA ont été dépistés en moyenne 8,8 mois avant l'épuration extra-rénale (de 0 à 18 mois).

Il n'y a pas de différence de répartition significative entre les anti-DR ou les anti-DQ entre les patients ayant perdu leur greffon vs ceux qui ne l'ont pas perdu.

## ***I/ Recherche de facteurs pronostiques d'une évolution défavorable de la greffe chez ces patients.***

Parmi les 40 greffés étudiés ayant des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur, nous avons isolé un groupe de 15 patients qui ont :

- Soit perdu leur greffon durant la période d'observation, et ont nécessité le recours à l'épuration extra-rénale (11 patients)
- Soit détérioré leur fonction rénale durant la période d'observation, avec diminution de la clairance de la créatinine de plus de 30% (4 patients : 9, 24, 26, 40)

Nous avons comparé ce groupe de patients avec les 25 autres greffés possédant également des anticorps spécifiques du donneur, mais présentant une fonction rénale stable, à la recherche de facteurs de mauvais pronostic.

	Ac anti-HLA spécifiques du donneur d'évolution défavorable	Ac anti-HLA d'évolution stable
age du receveur (moyenne, +/- écart type et valeurs minimales et maximales)	35,5 +/- 12,3 (13-54)	37,8 +/- 12,4 (16-69)
Groupe sanguin A (%age de patients)	26,60%	52%
Patients ayant bénéficié d'un nombre de dialyse post-greffe $\geq 1$	6,60%	36%
Maladie initiale auto-immune (nombre de patients)	20%	8%
1e greffe (nombre de patients)	80%	68%
age du donneur (moyenne, +/- écart type et valeurs minimales et maximales)	32,42 +/- 10,3 (14-58)	33,2 +/- 15,7 (1-56)
Ischémie froide (moyenne en mn)	1537	1479
greffes rein+pancréas	6,60% (1)	6,60 (1)
greffes de donneurs vivants	6,60% (1)	4% (1)
Nombre moyen d'identités A/B/DR	2	2
nombre d'identités DR =0	40%	28%
nombre d'identités DR =2	0%	8%
nombre d'identités A =0	33%	32%
nombre d'identités A =2	13%	12%
nombre d'identités B =0	46%	36%
nombre d'identités B =2	13%	4%
Traitement d'induction:	83%	77%
-SAL	66,60%	70%
Traitement d'entretien:		
-inhibiteurs des calcineurines	83%	100%
-Imurel ou Cellcept	100%	95%
-Corticoides	100%	100%
Rejet aigu	53,3%	20%
Infection à CMV	6,60%	32%
Grossesses en post-transplantation	0%	20%
Transfusions sanguines post- transplantation	26%	12%
Date de mise en évidence des anticorps	51,6 mois	49,6 mois

Il est intéressant de noter que la fréquence du rejet aigu, est 2,5 fois plus élevée parmi les patients ayant une évolution défavorable de même que la fréquence des transfusions est plus

élevée parmi ces patient .même si ce n'est pas significatif compte tenu des petits effectifs. Les maladies immunologiques semblent également plus fréquentes dans ce groupe.

Par contre, les grossesses ou les infections à CMV sont plus nombreuses parmi les patients ayant une évolution favorable de leur greffon.

La date de détection de ces anticorps n'est pas différente entre les 2 groupes.

Parmi les paramètres étudiés (cf. tableau ci-dessus), on ne met en évidence aucune différence significative entre les deux groupes, susceptible d'expliquer le mauvais pronostic du greffon du premier groupe par rapport au second.

Néanmoins, 60% des patients ayant développé des anticorps spécifiques du donneur, n'ont pas eu une évolution simple en raison de la survenue de différents évènements connus pour leur immunogénicité, comme des transfusions sanguines, les infections à CMV, les grossesses, ou de la survenue d'un (ou plusieurs rejets aigus) ou de l'interruption du traitement immunosuppresseur. Dans le groupe des patients dont le greffon évolue de façon défavorable, 12 ont eu l'évolution compliquée de ces évènements soit 80%.

De plus, on note que parmi les 15 malades ayant une évolution défavorable de la fonction rénale, 13 d'entre eux ont bénéficié d'un test positif en lymphocytotoxicité durant l'évolution, (un patient n'a pas été testé en LCT et un autre était négatif). Parmi les 25 patients de l'autre groupe, 11 patients étaient positifs en LCT.

### III- Comparaison du groupe de patients présentant des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur avec les patients n'ayant pas développé d'anticorps ou ayant développé des anticorps non spécifiques

Nous avons recherché des différences de répartition des différents paramètres étudiés entre les trois différents groupes : le groupe de patients possédant des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur, le groupe de patients n'ayant jamais présenté d'anticorps anti-HLA et les patients présentant des anticorps anti-HLA non spécifiques du greffon, à la recherche de facteurs prédictifs à l'apparition des anticorps anti-HLA chez les patients greffés, spécifiques ou non , et de leur implication sur la survie des greffons.

#### A/ Dates de greffe

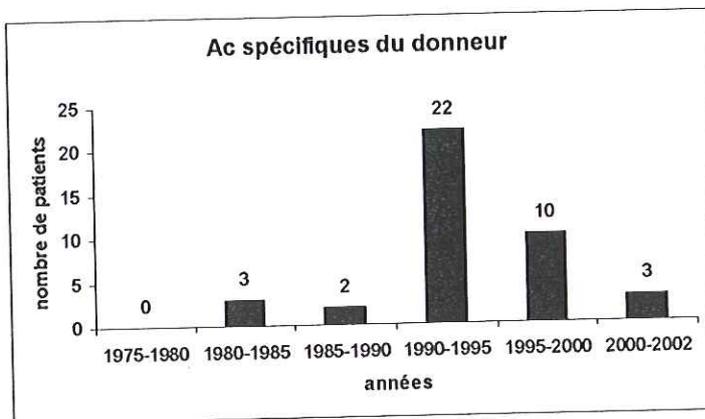
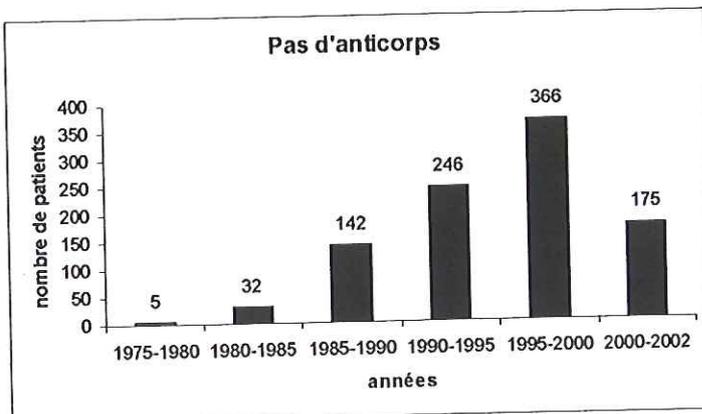
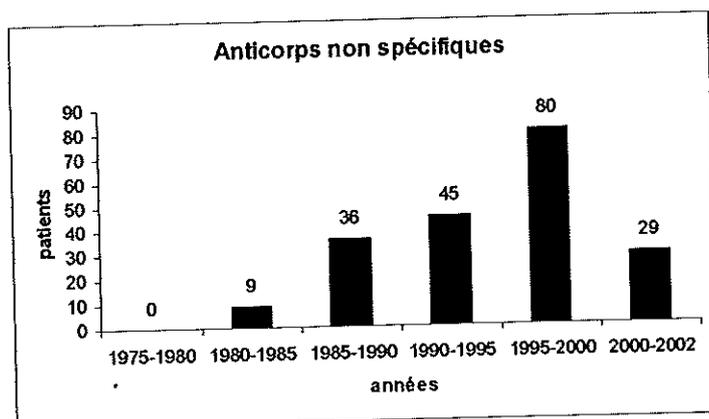


Figure 2 : répartition des dates de greffe en fonction du statut du patient pour les anticorps anti- HLA.





Les dates de greffes ne sont pas réparties de manière identique entre les 3 groupes. En effet, 67,5% des patients ayant développé des anticorps spécifiques du donneur ont été greffés avant 1995, contre 44% pour les patients sans anticorps et 45% des patients présentant des anticorps non spécifiques du greffon (figure 2).

## **B/ Caractéristiques démographiques**

### **1- Age et sexe du receveur :**

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>Age</b>				
moyenne (+/- écart-type)	36,9 (+/- 12,6)	42,9 (+/-14)	42,6 (+/- 13,3)	p<0,05
Min-Max	13-69	6-73	12-75	

<b>Sexe</b>				
%age hommes	42,5	58,1	52,8	NS
%age femmes	57,5	41,9	47,2	

Il existe une différence significative d'âge entre les 3 groupes de patients. Les patients présentant des anticorps spécifiques du greffon ont la plus faible moyenne d'âge (il n'y a pas de différence si on exclut les 3 patients qui ont interrompu leur traitement, puisque la moyenne d'âge est alors de 36,8 ans).

Par contre, la répartition entre hommes et femmes n'est pas significativement différente.

## 2- Antécédents de grossesses avant transplantation chez les femmes

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
plus d'une grossesse	50%	70%	68,5%	NS
<b>Nombre de grossesses</b>				
Moyenne (+/- DS)	1,3 (+/-1,6)	1,9 (+/- 1,9)	2,35 (+/- 2,54)	p<0,05
Max-Min	0-4	0-9	0-10	
Nombre de patientes connues	20	388	89	

Le nombre de femmes ayant eu des grossesses avant transplantation n'est pas significativement différent entre les groupes, mais le nombre moyen de grossesses est le plus élevé chez les femmes qui développent des anticorps non spécifiques du greffon (2,35 grossesses), et le plus faible chez les patientes qui développent des anticorps spécifiques (1,3 grossesses).

## 3- Nombre moyen de transfusions sanguines avant la greffe

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>Nombre de Transfusions pré-greffe</b>				
moyenne (+/- écart-type)	5,8 (+/-6,9)	3,9 (+/- 6)	8,2 (+/- 10,2)	p<0,001
Min-Max	0-31	0-70	0-67	
Nombre de patients connus	36	922	194	

Les patients qui ont des anticorps en post-greffe sont ceux qui ont été le plus transfusés avant la transplantation (moyenne de 5,8 et 8,2 transfusions avant transplantation pour les patients développant des anticorps spécifiques du donneur ou non spécifiques du donneur contre 3,9 transfusions pour les malades sans anticorps), p<0,001.

#### 4- Groupe sanguin du receveur

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>Groupe sanguin du receveur</b>				
groupe A	48,70%	45,30%	46,70%	NS
groupe O	35,90%	41,70%	40%	NS
groupe B	10,30%	9,40%	8,70%	NS
groupe AB	5,10%	3,60%	3,80%	NS
Nombre de patients connus	39	947	195	

Il n'y a pas de répartition significativement différente entre les 3 groupes en ce qui concerne le groupe sanguin.

#### 5- Etiologie de l'insuffisance rénale

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>maladie immunologique</b>	21%	22%	25%	NS
Nombre de patients connus	38	925	190	

On ne note pas de différence statistique entre les différents groupes, en fonction du caractère immunologique ou non de la maladie initiale

#### 6- Numéro de greffe rénale

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>%age de première greffe</b>	74,4%	88,7%	52,3%	p<0,001
Nombre de patients connus	39	948	195	

La proportion de « retransplantation » est la plus élevée (52,3% seulement de première greffe rénale dans ce groupe) chez les patients qui présente des anticorps anti-HLA non spécifiques (p<0,001).

**7- nature du donneur et type de greffe**

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
Rein pancréas	5%	11,2%	4%	p<0,005
Rein seul	95%	88,8%	96%	
Nombre de patients connus	40	963	199	
Donneur cadavérique	95%	93%	95%	NS
Donneur vivant	5%	7%	5%	
Nombre de patients connus	39	946	195	

Il y a significativement moins de greffe rein-pancréas chez les patients développant des anticorps spécifiques ou non, que chez les patients ne présentant pas d'anticorps.

La proportion de donneurs cadavériques ou vivants est la même dans les 3 groupes.

**8- Age du donneur**

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
Age du donneur moyenne (+/- écart-type)	33,3 (+/- 13,8)	36,7 (+/-15,2)	37,4 (+/- 14)	NS
Min-Max	1-58	3-74	1-66	
Nombre de patients connus	39	945	195	

L'âge du donneur est identique dans les 3 groupes.

**9- Groupe sanguin du donneur**

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>Groupe sanguin du Donneur</b>				
groupe A	46,2%	44,9%	44,6%	NS
groupe O	38,5%	43,0%	47,2%	NS
groupe B	10,3%	9,2%	6,2%	NS
groupe AB	5,1%	2,9%	2,1%	NS
Nombre de patients connus	39	944	195	

La répartition des groupes sanguins des donneurs est statistiquement équivalente dans les 3 groupes.

### 10- ischémie froide

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>Ischémie froide (mn)</b>				
moyenne (+/- écart-type)	1530 (+/- 743)	1520 (+/- 739)	1654 (+/- 689)	NS
Min-Max	73-2626	49-3240	48-3202	
Nombre de patients connus	38	932	194	

Le temps d'ischémie froide n'est pas statistiquement différent entre les 3 groupes.

### 11- Retard au démarrage du greffon

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>reprise de fonction du greffon</b>				
moyenne (+/- écart-type)	6,3 (+/- 9,6)	6,1 (+/- 6,7)	6,7 (+/- 6,1)	NS
Min-Max	1-50	1-56	1-40	
<b>nombre de dialyses post-greffe</b>				
moyenne (+/- écart-type)	1,1 (+/- 2,8)	1 (+/- 1,9)	1,1 (+/- 1,6)	NS
Min-Max	0-15	0-14	0-10	
Nombre de patients connus	33	898	183	

Il n'y a pas de différence significative entre les différents groupes concernant la reprise de fonction du greffon et le nombre de dialyse en post-greffe.

## C/ caractéristiques Immunologiques

### 1- immunisation pré-greffe

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>Pic moyen anti-T historique</b>				
moyenne (+/- écart-type)	24,3 (+/- 34,8)	7,8 (+/-19,7)	31,4 (+/- 36,7)	p<0,001
Min-Max	0-96	0-100	0-100	
Nombre de patients connus	18	253	127	

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>Pic moyen anti-B historique</b>				
moyenne (+/- écart-type)	36,3 (+/-39)	8,1 (+/- 17,6)	44,7 (+/- 35)	p<0,001
Min-Max	0-94	0-100	0-100	
Nombre de patients connus	10	176	85	

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>Immunisation T ou B supérieure à 80%</b>	22,50%	3,20%	32,70%	p<0,001
Nombre de patients connus	20	346	127	

Ces paramètres ont été inclus récemment dans la base de données, et ne sont donc pas renseignés pour un grand nombre de patients, la comparaison doit donc être très prudente. Néanmoins, l'intensité moyenne du pic d'immunisation historique anti-B et anti-T est significativement plus élevée chez les patients présentant des anticorps par rapport aux patients ne développant pas d'anticorps en post-greffe. Parmi les patients développant des anticorps, la préimmunisation est plus importante dans le groupe des anticorps non spécifiques du donneur.

Le nombre d'hyperimmunisés avant transplantation est significativement plus important (32,7%) chez les patients porteurs d'anticorps anti-HLA non spécifiques dans la période post-transplantation, que chez les patients développant des anticorps spécifiques du donneur (22,5%) et à fortiori que chez les patients sans anticorps durant la greffe (3,2%).

## 2- compatibilités HLA receveur-greffon

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>nombre de compatibilité A</b>				
moyenne (+/- écart-type)	0,79 (+/-0,65)	0,85 (+/- 0,67)	1,07 (+/- 0,74)	p<0,001
Min-Max	0-2	0-2	0-2	
Nombre de patients connus	26	652	148	

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>nombre de compatibilité B</b>				
moyenne (+/- écart-type)	0,66 (+/-0,62)	0,63 (+/- 0,66)	0,86 (+/- 0,71)	p<0,001
Min-Max	0-2	0-2	0-2	
Nombre de patients connus	23	505	131	

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>nombre de compatibilité DR</b>				
moyenne (+/- écart-type)	0,71 (+/-0,55)	0,85 (+/-0,66)	1,16 (+/- 0,71)	p<0,001
Min-Max	0-2	0-2	0-2	
Nombre de patients connus	26	657	160	

La compatibilité entre le receveur et le greffon est meilleure dans le groupe ayant des anticorps non spécifiques par rapport aux autres groupes (p<0,001).

## 3- crossmatch

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>Crossmatch T historique positif</b>	6,30%	2,70%	7,70%	p<0,05
Nombre de patients connus	32	776	155	
<b>Crossmatch T dernier sérum positif</b>	3%	0,10%	1,10%	p<0,05
Nombre de patients connus	33	848	176	
<b>Crossmatch B historique positif</b>	32,30%	11%	30,30%	p<0,001
Nombre de patients connus	31	765	155	
<b>Crossmatch B dernier sérum positif</b>	12,50%	5,40%	16,50%	p<0,001
Nombre de patients connus	32	837	171	

La positivité du crossmatch T historique est significativement différente entre les 3 groupes (positif dans 6,3 à 7,7 % des greffes dans les groupes des patients avec des anticorps dans le suivi post-greffe, contre 2,7% des greffes sans anticorps), de même que le crossmatch T du

jour. Les résultats vont dans le même sens de manière encore plus significative pour le crossmatch B ( $p < 0,001$ ).

Ni l'intensité du crossmatch (+ ou ++++), ni la présence de DTT ne sont précisées dans la base de données, ce qui explique le haut pourcentage de patients dit greffés avec un crossmatch positif.

### D/ Caractéristiques Thérapeutiques

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
Traitement d'induction	88,2%	82,9%	90,3%	$p < 0,05$
SAL	70,6%	53,0%	73,3%	$p < 0,001$
Anti-R(IL2)	5,9%	13,6%	5,1%	$p = 0,001$
Nombre de patients connus	34	932	195	

Traitement initial selon le protocole du moment				
Imurel	70,6%	48,3%	48,2%	$p < 0,05$
Cellcept	23,5%	42,0%	45,9%	NS
Imurel ou Cellcept	94,1%	90,0%	93,3%	NS
Ciclosporine A	91,20%	87%	72,40%	$p < 0,001$
FK 506	2,90%	8,20%	22,70%	$p < 0,001$
CsA ou FK 506	94,10%	95,70%	95,30%	NS
Sirolimus	0%	1,20%	1,60%	NS
Nombre de patients connus	40	950	198	

Plus de patients porteurs d'anticorps ont bénéficié d'un traitement d'induction que les patients du groupe sans anticorps. De plus, comparativement au groupe sans anticorps, plus de patients ont bénéficié du traitement par SAL et moins ont bénéficié d'un traitement par anti-récepteur de l'IL2.

En ce qui concerne le traitement immunosuppresseur initial, la proportion de patients ayant bénéficié d'un traitement par inhibiteurs des calcineurines et par inhibiteurs de la synthèse des purines statistiquement similaire.

Par contre, le nombre de traitements par Imurel versus le Cellcept et de ciclosporine versus le FK 506 était plus important chez les patients ayant développé des anticorps spécifiques du donneur, mais l'ancienneté de la greffe doit être prise en compte.

Traitement d'entretien	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
Imurel	67,5%	51,5%	50,3%	NS
Cellcept	40,0%	50,9%	56,8%	NS
Inhibiteurs des calcineurines	92,50%	97,50%	96,50%	NS
Sirolimus	0%	1,60%	6,50%	P=0,001
nombre de patients connus	40	964	199	

En ce qui concerne le traitement immunosuppresseur d'entretien, les différences entre les traitements diminuent entre les 3 groupes en ce qui concerne l'Imurel ou le Cellcept, ce qui témoigne du passage d'un certain nombre de patients pour lesquels l'Imurel a été arrêté au profit du Cellcept. Néanmoins, la proportion de patients sous Imurel reste la plus élevée dans le groupe des patients ayant des anticorps spécifiques du donneur.

## E/ Suivi Evolutif

### 1- épisodes de rejet aigu

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
patients ayant présenté au moins 1 rejet aigu	32,5%	20,7%	21,1%	NS
nombre moyen de rejet				
moyenne (+/- écart-type)	0,4 (+/- 0,67)	0,26 (+/- 0,56)	0,25 (+/- 0,53)	NS
Min-Max	0-3	0-3	0-2	
Nombre de patients connus	40	964	199	

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>Nombre de rejets aigus chez les patients ayant présenté au moins 1 rejet</b>				
moyenne (+/- écart-type)	1,23 (+/- 0,6)	1,25 (+/- 0,5)	1,21 (+/- 0,41)	NS
Min-Max	1-3	1-3	1-2	
Nombre de patients connus	40	964	199	

La fréquence du rejet aigu semble plus élevée chez les patients qui présentent des anticorps spécifiques du donneur (32,5 % contre environ 21% dans les autres groupes), de même que le nombre moyen de rejets. Cependant, ces différences ne sont pas significatives entre les 3 groupes. Pour les patients ayant présenté au moins 1 épisode de rejet, le nombre de rejet est identique dans les 3 groupes.

En ce qui concerne les rejets vasculaires, un patient a été concerné dans le groupe des anticorps spécifiques du donneur, 5 patients dans le groupe sans anticorps, et 6 patients dans le groupe avec des anticorps non spécifiques, données difficilement comparable compte tenu des petits effectifs. Néanmoins, les patients porteurs d'anticorps non spécifiques semblent être prédisposés à ce type de rejet.

## 2- Infection à CMV

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
Au moins 1 épisode d'infection à CMV	22,50% (9)	15,50% (149)	18,60% (37)	NS
Nombre de patients connus	40	964	199	

La fréquence des infections à CMV n'est pas statistiquement différente en fonction des groupes.

### 3- Grossesses

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>grossesses en post-transplantation</b>	21,7% (5)	7,9% (32)	3,1% (3)	p<0,05
Nombre de femmes	23	404	94	

Le nombre de grossesses après transplantation est le plus élevé dans le groupe des patients ayant développé des anticorps spécifiques du donneur (p<0,05)

### 4- Rejet chronique

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>rejet chronique</b>	32,5% (13)	12,3% (20)	17,1% (34)	p<0,001
Nombre de patients connus	40	964	199	

Le diagnostic de rejet chronique chez les patients porteurs d'anticorps anti-HLA spécifiques du donneur est très significativement augmenté chez les patients porteurs d'anticorps anti-HLA spécifiques du greffon. Le risque plus élevé de développer un rejet chronique est indépendant du traitement reçu (p<0,05, en analyse multivariée).

## **F/ Evaluation de la fonction du greffon**

### 1- protéinurie

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>Protéinurie (g/24h)</b>				
<b>12 mois</b>				NS
moyenne (+/- écart-type)	0,5 (+/-1,1)	0,28 (+/- 0,57)	0,32 (+/- 44)	
Min-Max	0-6	0-8,8	0-2,9	
nb de patients	40	964	199	

<b>24 mois</b>				p<0,001
moyenne (+/- écart-type)	0,66 (+/- 1,46)	0,25 (+/-0,49)	0,38 (+/- 0,65)	
Min-Max	0-6	0-6,5	0,4,5	
nb de patients	40	914	191	

<b>60 mois</b>				p=0,001
moyenne (+/- écart-type)	0,63 (+/- 1,02)	0,28 (+/- 0,62)	0,51 (+/- 0,93)	
Min-Max	0-4,6	0-6,7	0-4,8	
nb de patients	34	663	126	

<b>96 mois</b>				p<0,05
moyenne (+/- écart-type)	1,23 (+/- 3,5)	0,43 (+/- 1,2)	0,48 (+/- 0,9)	
Min-Max	0-15,6	0-16,3	0-6,7	
nb de patients	25	433	86	

<b>120 mois</b>				NS
moyenne (+/- écart-type)	0,43 (+/- 0,41)	0,49 (+/- 1,16)	0,58 (+/- 1)	
Min-Max	0-1,32	0-9,90	0-4,5	
nb de patients	17	324	75	

Il n'y a pas de différence significative entre les valeurs précoces (à 1 an) ou tardives (10 ans) de la protéinurie entre les différents groupes de patients. Par contre, à 2 ans, 5 ans et 8 ans, la protéinurie est significativement différente entre les 3 groupes ( $p \leq 0,001$ ,  $p=0,001$  et  $p<0,05$ ). La protéinurie la plus basse correspond au groupe des patients sans anticorps (0,25 et 0,28 et 0,43 g/24h respectivement à 2 ans, 5 ans et 8 ans) alors que la protéinurie la plus élevée correspond aux patients ayant développé des anticorps spécifiques du donneur (0,66 et 0,63 et 1,23 g/24 h).

## 2- fonction rénale

- clairance de la créatinine (selon Cockcroft)

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>Clairance (ml/mn)</b>				
<b>12 mois</b>				
moyenne (+/- écart-type)	54 (+/- 15)	57 (+/- 19)	56 (+/- 21)	NS
Min-Max	19-90	12-138	13-140	
nb de patients	40	964	199	

<b>24 mois</b>				
moyenne (+/- écart-type)	51,6 (+/-14)	57,6 (+/- 19)	55,7 (+/-20)	NS
Min-Max	25-79	9-147	14-149	
nb de patients	40	914	191	

<b>60 mois</b>				
moyenne (+/- écart-type)	49,2 (+/-17,6)	57,12 (+/- 21,1)	52,8 (+/- 19,6)	p<0,05
Min-Max	14-82	12-208	15-118	
nb de patients	34	663	126	

<b>96 mois</b>				
moyenne (+/- écart-type)	53,8 (+/- 25)	57,9 (+/- 22,6)	53,3 21)(+/-	NS
Min-Max	20-131	15-179	8-117	
nb de patients	25	433	86	

<b>120 mois</b>				
moyenne (+/- écart-type)	54 (+/- 18)	57 (+/-22)	54 (+/- 23)	NS
Min-Max	24-97	7-172	8-126	
nb de patients	17	324	75	

- Créatinine sérique

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
<b>Créatinine (µmol/l)</b>				
<b>12 mois</b>				
moyenne (+/- écart-type)	144 (+/- 58)	135 (+/- 50)	137 (+/- 48)	NS
Min-Max	76-400	45-758	60-289	
nb de patients	40	964	199	

<b>24 mois</b>				
moyenne (+/- écart-type)	150 (+/- 51)	137 (+/-49)	141(+/- 48)	NS
Min-Max	77-294	48-505	71-379	
nb de patients	40	914	191	

<b>60 mois</b>				p<0,005
moyenne (+/- écart-type)	166 (+/- 68)	140 (+/- 53)	156 (+/- 60)	
Min-Max	75-369	45-643	78-445	
nb de patients	34	663	126	

<b>96 mois</b>				p<0,05
moyenne (+/- écart-type)	170 (+/- 98)	142 (+/- 56)	160 (+/- 75)	
Min-Max	66-546	49-466	57-574	
nb de patients	25	433	86	

<b>120 mois</b>				NS
moyenne (+/- écart-type)	153 (+/- 76)	152 (+/- 98)	176 (+/-140)	
Min-Max	70-381	57-1158	70-1095	
nb de patients	17	324	75	

Qu'il s'agisse de la créatinine sérique ou de la clairance de la créatinine calculée selon la formule de Cockcroft, la fonction rénale est significativement différente entre les 3 groupes de patients à 5 ans de la greffe. La différence est également significative à 8 ans en ce qui concerne la créatinine.

La clairance de la créatinine est plus basse pour les patients qui ont des anticorps anti-HLA par rapport aux patients sans anticorps, quelle que soit la période observée.

Si on compare les patients ayant développé des anticorps anti-HLA spécifiques ou non en post-transplantation, on remarque que la clairance est plus basse à 2 ans et à 5 ans dans le groupe des patients qui ont des anticorps spécifiques du donneur par rapport au groupe de patients ayant des anticorps non spécifiques. A 8 et 10 ans, il n'y a plus de différences entre ces deux groupes.

Les différences de créatinine sérique sont également significatives entre les 3 groupes de patients à 8 ans.

Il n'y a pas de différence concernant la fonction rénale plus précoce (à 1 et 2 ans) ou plus tardivement à 10 ans.

L'évolution de ces 3 paramètres biologiques (protéinurie, créatinine et clairance de la créatinine) est résumée dans la figure 3 (page suivante).

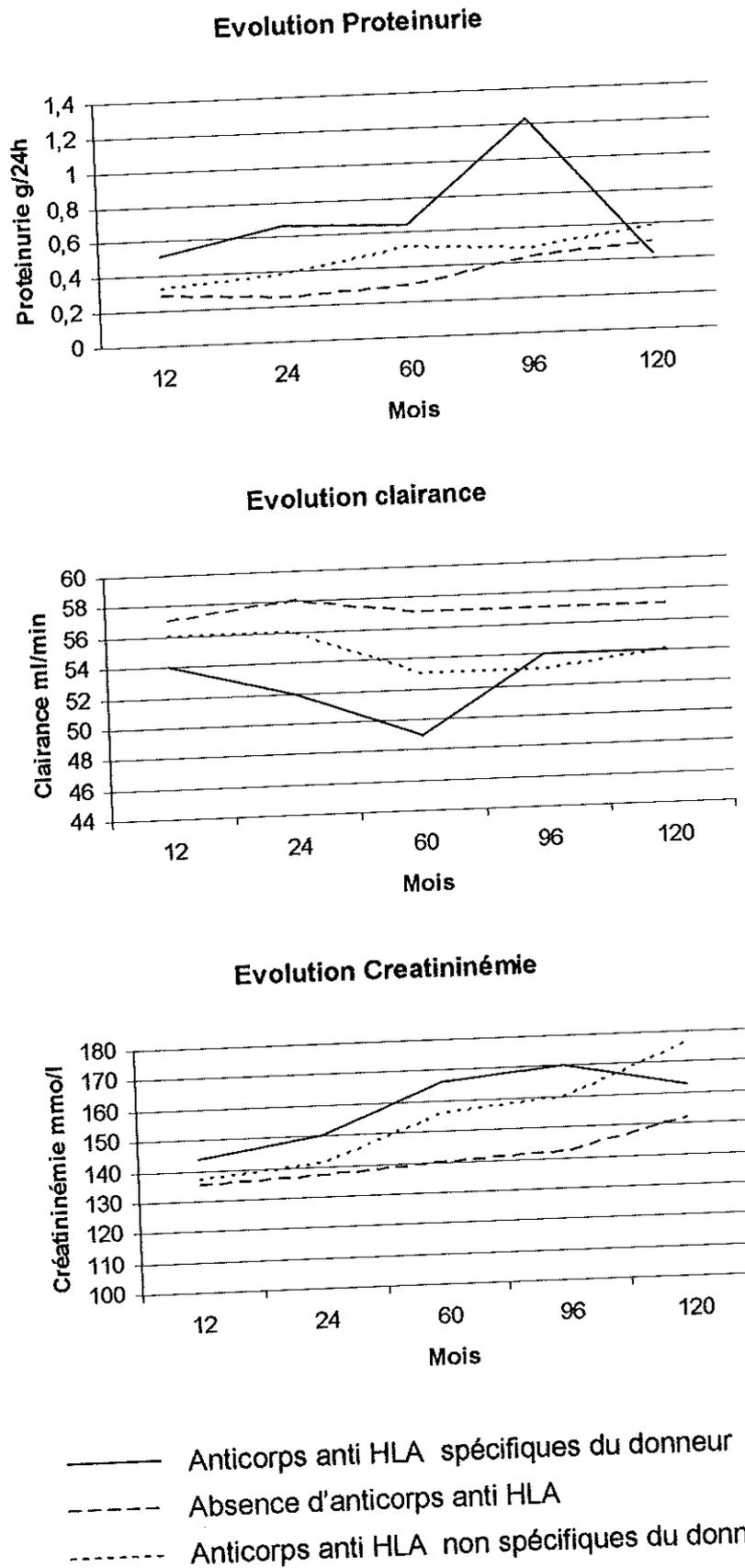


Figure 3 : Comparaison des différents paramètres biologiques entre les différents groupes durant les dix premières années de greffe

## IV- Etude de la survie des greffons

### A / Etude comparative de la survie des greffons dans les 3 groupes

Parmi les 1203 patients de l'étude, l'évolution vers l'insuffisance rénale terminale a nécessité la reprise de l'épuration extra-rénale chez 78 d'entre eux.

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
retour en dialyse	27,5% (11)	4,6% (44)	11,6% (23)	p<0,001

La proportion de patients présentant des anticorps spécifiques du donneur ayant perdu leur greffon plus élevée (27,5%) que les patients porteurs d'anticorps non spécifiques (11,6%) et que les patients sans anticorps (4,6%), de façon significative ( $p<0,001$ ), ce que confirme la courbe de survie.

Les survies ont été comparées après homogénéisation des dates de transplantation (selon des tranches de 5 ans). Ont ainsi été comparés les patients greffés avant 1990, ceux transplantés entre 1990 et 1995, et ceux greffés après 1995, ainsi que l'on peut voir sur les figures 4, 5 et 6.

Les survies ne sont pas significativement différentes entre les 3 groupes pour les patients greffés avant 1990. Par contre, elles sont significativement différentes pour les patients greffés entre 1990 et 1995 ( $p<0,01$ ), et les patients greffés après 1995 ( $p<0,05$ ).

En analyse multivariée, le risque de retour en dialyse est plus important dans les groupes où les patients ont des anticorps, par rapport aux patients sans anticorps, indépendamment des traitements reçus ( $p<.001$ ).

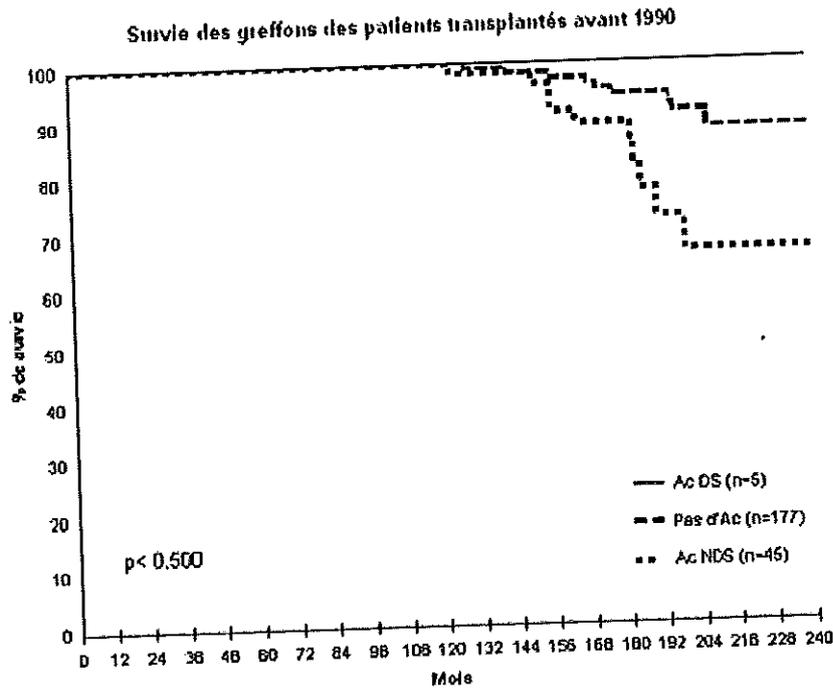


figure 4 : Courbe de survie du greffon pour les patients greffés avant 1990

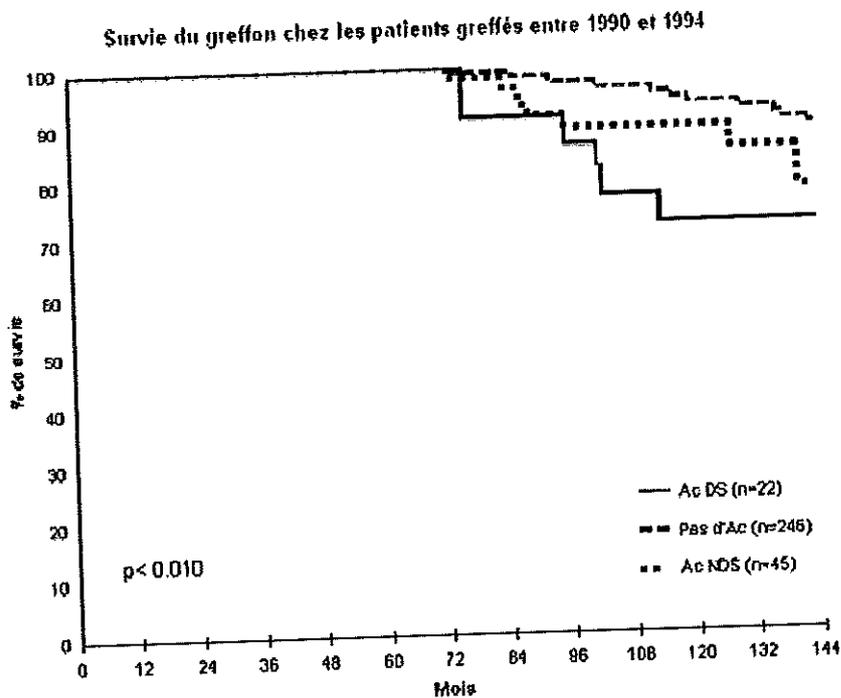


Figure 5 : Courbe de survie des greffons des patients transplantés entre 1990 et 1994

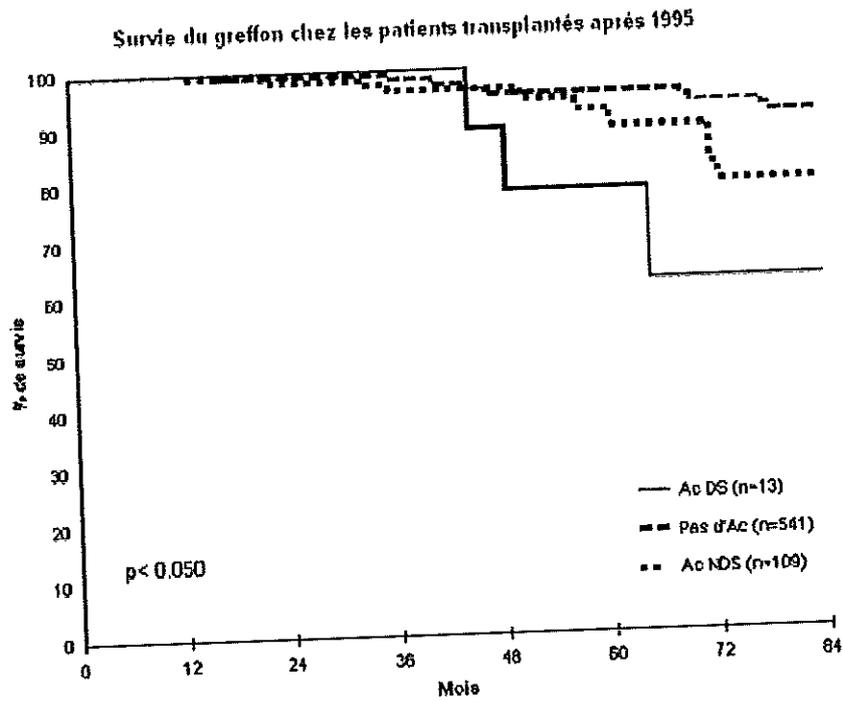


Figure 6 : Survie du greffon chez les patients greffés après 1995

**B/ Etude comparative de la survie des patients greffés**

	Anticorps spécifiques du donneur	pas d'anticorps	Anticorps non spécifiques	p
décès	2,5%	2,1%	2,5%	NS

Il n'y pas de différence significative du nombre de décès selon que les patients présentent ou non des anticorps anti-HLA.

# **Discussion**

La recherche annuelle des anticorps anti-HLA a été instaurée dans le service de transplantation rénale du CHU de Nantes depuis 1998. Tous les patients suivis dans notre centre depuis 1998 ont donc été caractérisés quant à leur statut d'immunisation anti-HLA.

Cette étude nous a ainsi permis d'apprécier la fréquence des anticorps anti-HLA dans notre population de greffés, d'estimer leurs conséquences sur la survie du greffon, et de rechercher des facteurs prédictifs de leur apparition.

Outre l'intérêt statistique que représente le nombre important de patients dépistés, cette étude a bénéficié des avancées technologiques apparues dans les méthodes de détection de ces anticorps, avec l'utilisation des trois techniques d'identification et de détection de ces anticorps disponibles au centre de Transfusion Sanguine de Nantes : la lymphocytotoxicité, la technique ELISA et la cytométrie en flux.

Ce travail a donc tout d'abord permis d'évaluer la fréquence des anticorps anti-HLA parmi les patients greffés suivis entre 1998 et 2001 (quelle que soit la date de transplantation), dont les greffons étaient fonctionnels à 1 an, selon un mode transversal.

Dans notre population de 1203 patients suivis durant cette période, un taux positif d'anticorps anti-HLA a été détecté chez 239 patients soit 19,9% de l'effectif total. Parmi eux, seulement 40 patients ont développé des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur, soit 3,3% des patients, auxquels nous nous sommes particulièrement intéressés.

La faible fréquence des anticorps dirigés contre le greffon a été expliquée pour certains, comme secondaire à l'adsorption des anticorps par le rein, comme en témoignent certaines équipes de recherche ayant mis au point des techniques d'élution d'anticorps (anti-HLA ou dirigés contre d'autres antigènes non HLA) à partir de pièces de transplantectomie rénale. Néanmoins, l'amélioration de la sensibilité des techniques de dépistage (comme l'ELISA à Nantes), rend cette hypothèse peu probable à l'heure actuelle.

Contrairement aux anticorps non spécifiques, les anticorps spécifiques du donneur retrouvés dans ce travail sont, dans tous les cas, des anticorps anti-HLA de classe II. Il s'agissait d'anti-DR dans 50% des cas, d'anticorps anti-DQ dans 62,5% des cas, et 20% avaient à la fois des anti DR et des anti-DQ. Le délai moyen de détection de ces anticorps par rapport à la date de transplantation était de 9 ans.

L'évolution des transplants rénaux chez les patients ayant développé des anticorps spécifiques du greffon semble compliquée d'un nombre deux fois plus élevé de rejets chroniques prouvés histologiquement que chez les autres patients ( $p < 0,001$ ).

Sur le plan de la microscopie optique, il est intéressant de noter que toutes les biopsies interprétables ont montré ou ont fortement suspecté une glomérulopathie d'allogreffe, signe spécifique mais peu fréquent, et souvent de mauvais pronostic pour le greffon. En effet, dans la majorité des cas, le diagnostic de rejet chronique est posé sur l'atteinte vasculaire, beaucoup plus fréquente. Ce facteur de mauvais pronostic est bien concordant avec les signes biologiques qui avaient justifié la biopsie, et l'évolution clinique des patients puisque 6 de ces patients ont nécessité la reprise en dialyse dans les mois qui ont suivi, et que deux d'entre eux ont vu décroître fortement leur débit de filtration glomérulaire.

L'histologie a également permis de confirmer l'origine humorale de ces rejets grâce à la mise en évidence de la fixation de C4d au niveau des capillaires péri-tubulaires, sur toutes les biopsies de greffon qui montraient un rejet chronique chez ces patients, ce qui témoigne de la fixation des anticorps au niveau du greffon.

Cette association d'une glomérulopathie d'allogreffe et des dépôts de C4d est très spécifique du rejet chronique et témoigne de la fixation des anticorps au niveau du rein et donc du rôle de l'immunité humorale dans le rejet chronique (92). La corrélation retrouvée par Mauiyyedi et al, entre la fixation de C4d au niveau des capillaires péri-tubulaires et la présence d'anticorps anti-HLA spécifiques du donneur désigne donc tout particulièrement les anticorps anti-HLA comme les principaux médiateurs de ce "rejet chronique à médiation humorale" (96).

Dans notre étude, la fixation de C4d apparaît en effet sensible et spécifique. En effet, il n'y a pas de faux négatifs et ces dépôts semblent bien corrélés à la cinétique d'apparition des anticorps anti-HLA (les deux seules biopsies négatives correspondaient soit à une néphropathie à IgA, soit à une néphropathie de nature indéterminée, sans anticorps anti-HLA retrouvés).

L'impact de ces anticorps au niveau du rein est également souligné par des marqueurs biologiques tels que la protéinurie qui est plus élevée chez ces patients que dans les autres groupes, de même que la fonction rénale est plus altérée. Ces données expliquent d'ailleurs le plus grand nombre de biopsies rénales effectuées chez ces patients et donc le plus grand nombre de rejets chroniques diagnostiqués histologiquement. Ces modifications biologiques ont pu être constatées et corrélées à l'apparition des anticorps chez 4 des 9 patients pour lesquels la séroconversion pour les anticorps anti-HLA s'est effectuée pendant la durée d'observation.

Ces signes de dysfonction chronique du greffon, se traduisent par une perte de fonction du greffon conduisant au retour en dialyse pour 25% des patients développant des anticorps contre le greffon, contre 11,6% des patients porteurs d'anticorps anti-HLA non spécifiques et 4,6% des patients sans anticorps durant la période d'observation. Ces greffons présentent donc la moins bonne survie parmi ceux étudiés.

Cependant, malgré cet impact clinico-biologique confirmé chez certains patients, 25 des 40 patients ont une évolution clinique tout à fait normale et comparable à celle des greffons des autres groupes au même stade de suivi. Cette évolution n'ayant pas justifié la réalisation d'une biopsie, la présence éventuelle d'un rejet chronique histologique, avec dépôts éventuels de C4d n'est pas connue.

La question donc de l'imputabilité des anticorps dans l'initiation du rejet peut donc être posée. Dix des onze patients retournés en dialyse pendant cette étude, ont été testés pour l'identification des anticorps en lymphocytotoxicité, ce qui témoigne donc du potentiel

cytotoxique que n'affirment pas les autres techniques de dépistage. Christiaans et al ont ainsi montré que le taux de rejet après transplantation était plus important si les anticorps étaient dépistés en LCT plutôt qu'en ELISA (97). De plus, les nouvelles techniques de dépistage en ELISA et d'identification en cytométrie en flux sont très sensibles, et on ne peut exclure qu'il y ait une relation entre le taux d'anticorps et leur pathogénicité sur les tissus. D'autres explications pour expliquer leur caractère non pathogène ont été soulevées. Parmi elles, on peut citer la théorie de l'accommodation. Selon cette théorie, les cellules endothéliales pourraient développer des mécanismes anti-apoptotiques. Ainsi, dans une étude récente, 7 patients, fortement immunisés, ont bénéficié d'un protocole d'immunoabsorption avant la greffe, dans le but d'éliminer les anticorps anti-HLA. Ces anticorps ont ensuite été incubés avec des cellules endothéliales issues de cordon ombilical. Une sur-expression des molécules anti-apoptotiques telles que Bcl-xL était alors mise en évidence dans ces cellules qui deviennent alors réfractaires à la lyse dépendante du complément, lorsque l'on rajoute des anticorps anti-HLA. De la même manière, cette sur-régulation de Bcl-xL était mise en évidence au niveau des biopsies de greffon des malades chez qui les anticorps étaient réapparus durant l'évolution de la transplantation (98). L'implication d'un réseau anti-idiotypique anti-HLA protecteur a également été montrée (36, 99).

Enfin, certaines équipes ont montré un rôle protecteur des anticorps d'isotype IgA, qui pourraient protéger du rejet chronique induit par les IgG (33 ; 29).

On peut enfin se demander si les anticorps sont un facteur suffisant à l'apparition du rejet chronique ou si d'autres facteurs (comme ceux qui, immunologiques ou non, participent à la dysfonction chronique du greffon) ne potentialisent pas leur action. La recherche de facteurs discriminants entre les patients dont l'évolution en dépit de la présence d'anticorps est favorable et ceux qui perdent leur greffon, ne met en évidence qu'un nombre plus élevé de rejets ou de transfusion chez les patients qui perdent leur greffon, mais de façon non significative.

Nous avons recherché des facteurs prédictifs d'apparition des anticorps chez les patients greffés, dans le but d'identifier ces malades à plus haut risque de rejet chronique.

Nous avons donc étudié la répartition de différents paramètres dans les trois populations de patients.

Les patients qui ont développé des anticorps spécifiques du donneur sont en moyenne plus jeunes que dans les autres groupes, ce qui peut en partie être dû à des différences dans la répartition des dates de transplantation (plus anciennes que dans les autres groupes). Néanmoins, d'autres équipes ont aussi montré la plus grande fréquence des sujets jeunes parmi les patients développant ces anticorps (76).

La majorité de ces patients est en cours de première transplantation rénale et la proportion d'hyperimmunisés est plus importante que parmi les patients ne présentant pas d'anticorps. Ces deux conditions (immunisation et première greffe) sont essentiellement retrouvées chez les femmes immunisées par grossesses. Néanmoins, même si le nombre de femmes dans cette population est effectivement plus important que dans les autres groupes, le nombre de grossesses apparaît moins important parmi les femmes de ce groupe, alors qu'elles apparaissent être en nombre équivalent entre les patientes présentant des anticorps non spécifiques et les patientes sans anticorps. Le nombre de transfusions sanguines en pré-greffe supérieur à celui des patients n'ayant pas développé d'anticorps peut toutefois expliquer la plus grande immunisation.

L'intensité de la pré-immunisation est comparable avec les patients présentant des anticorps anti-HLA non spécifiques même si chez ces patients, elle est expliquée par la plus grande proportion de deuxième greffes et de transfusions sanguines avant la greffe parmi ces patients. Les patients qui présentaient des anticorps anti-HLA avant transplantation sont donc à risque de développer des anticorps anti-HLA en post-transplantation, que ces anticorps soient spécifiques du donneur ou non.

Les anticorps non spécifiques du donneur sont souvent retrouvés avant la greffe ; ils disparaissent fréquemment au moment du traitement d'induction en post-transplantation, puis réapparaissent au cours du suivi.

La présence de ces anticorps non spécifiques corrélée à un plus grand risque de rejet chronique. Il est possible que la présence de ces anticorps soit l'expression d'un terrain « fort répondeur » aux stimuli antigéniques, ou d'une immunosuppression insuffisante? De plus, la survie du greffon chez les patients immunisés ou hyperimmunisés, est inférieure à celle des autres patients (100).

Le moindre développement d'anticorps spécifiques du donneur parmi cette population immunisée de façon non spécifique, peut s'expliquer par la meilleure compatibilité HLA entre le donneur et le receveur exigée pour les deuxièmes greffes (minimum de 4 compatibilités requises dans notre centre), et en particulier pour la compatibilité DR à laquelle est étroitement associée la compatibilité DQ en raison des déséquilibres de liaison (101)

Les différences dans les résultats de crossmatch sont difficilement interprétables du fait du manque de précision sur les conditions de positivité dans la base de données.

Les groupes sanguins du donneur et du receveur, l'âge du donneur, la durée d'ischémie froide, ou l'étiologie de la néphropathie initiale ne sont pas différents entre les 3 groupes.

Concernant les paramètres survenant dans la période post-greffe, les infections par CMV en post-transplantation et le nombre d'épisodes de rejet aigu sont plus fréquentes en présence d'anticorps spécifiques du donneur, mais ces différences n'apparaissent pas significatives, probablement en raison du faible effectif de patients de ce groupe. Par contre, les grossesses en post-transplantation sont significativement plus fréquentes chez les femmes qui présentent des anticorps spécifiques du donneur ( $p < 0,05$ ). On note également dans ce groupe, un nombre non négligeable de patients ayant nécessité des transfusions après greffe (5 patients sur 40), bien que Scornik et al ait montré une augmentation de l'immunisation non spécifique lié aux transfusions, mais pas d'effet sur l'apparition d'anticorps spécifiques du donneur en post-transplantation (102). Enfin, on peut souligner que l'apparition des anticorps est probablement secondaire, pour 3 des patients, à l'arrêt ou la diminution de

l'immunosuppression. Le délai de reprise de fonction du greffon lié essentiellement à la durée d'ischémie froide n'est pas différent entre les 3 groupes de patients. Au total, 60% des patients qui développent des anticorps ont des facteurs de risque connus, et souvent cumulés, de développer des anticorps anti-HLA.

En ce qui concerne les traitements, la proportion des patients ayant reçu du SAL est plus importante chez les patients porteurs d'anticorps par rapport aux autres patients qui sont plus nombreux à avoir reçu des anticorps anti-récepteurs de l'IL2, conformément aux protocoles actuels du service qui privilégient les anti-récepteurs de l'IL2 chez les patients en première greffe rénale, sans facteurs de risques (immunisation anti-HLA inférieure à 15%). Les traitements d'entretien utilisés au cours de la greffe ne sont pas significativement différents, même s'ils sont difficilement comparables en raison des modifications durant le suivi de la greffe. Le nombre de patients potentiellement à risque du fait de leur immunisation, dans le groupe des patients avec des anticorps non spécifiques, explique probablement le nombre plus important de ces patients traités par tacrolimus dès le début de la greffe.

Il est important de noter que malgré la grande variabilité des dates de transplantation, qui implique des schémas thérapeutiques différents entre tous les patients, les patients qui ont des anticorps spécifiques ou non des antigènes spécifiques du donneur ont un plus grand risque de développer un rejet chronique et de nécessiter la reprise en dialyse, que les patients sans anticorps, indépendamment de la nature du traitement.

Il serait intéressant de compléter l'analyse des patients dont la spécificité des anticorps anti-HLA n'est pas connue, et de détecter la part des auto-anticorps. La découverte de nouveaux patients présentant des anticorps dirigés contre leur donneur, pourrait permettre de dégager des différences statistiques entre certains paramètres, non significatifs actuellement, en raison du faible effectif des greffés présentant des anticorps spécifiques malgré le recul important de cette étude. Cette perspective peut-être appuyée par le fait que parmi les 40 patients pour lesquels des anticorps anti-HLA anti-donneur ont été identifiés, 11 d'entre eux

avaient antérieurement un dépistage d'anticorps anti-HLA positif sans spécificité identifiée. Ceci confirme bien l'intérêt des prélèvements réguliers.

Dans la littérature, la fréquence des anticorps anti-HLA après transplantation rénale varie selon les études, et dépend du nombre de transplantations antérieures, de la pré-immunisation (102), du délai auquel cette recherche est effectuée par rapport à la transplantation, et de la méthode d'identification des anticorps. L'immunisation non spécifique concerne selon les études 12 à 60% des patients. L'immunisation contre les antigènes spécifiques du donneur déterminée par un crossmatch avec les cellules du donneur varierait de 12 à 30% selon les techniques utilisées (pour revue 100). Cependant, dans la plupart de ces études, la spécificité de ces anticorps pour les antigènes HLA du donneur n'est pas clairement établie.

Cependant, il est désormais admis que la présence des anticorps anti-HLA en post-transplantation est corrélée à augmentation du risque de rejet chronique, et à une moins bonne survie du greffon que les patients sans anticorps (77 ; 103), données que nous retrouvons dans notre étude.

Les anticorps dirigés contre les molécules HLA de classe I semblent être associés à une perte précoce du greffon liée à une fréquence accrue de rejets aigus alors que les anticorps anti-HLA de classe II semblerait avoir un plus grand rôle dans le rejet chronique(104). Les épisodes de rejet semblent être plus fréquent en présence d'anticorps anti-HLA de classe II (par rapport à la présence d'anticorps anti-HLA de classe I isolés), soulignant le rôle pathogène de ces anticorps dans les mécanismes de rejet (105). Pelletier et al, ont montré de même que la détection d'anticorps anti-classe II (en cytométrie de flux) était un facteur de risque indépendant de développement d'un rejet chronique, et indépendamment de la survenue de rejet aigu (83). La présence des anticorps anti-DR a été notamment corrélée à une moins bonne survie du greffon (106), et l'association entre anticorps anti-DQ et rejets aigus ou chroniques, a également été montrée (77 ; 107, 108).

En 2001, Supon et al. montraient que l'incidence des anticorps anti-HLA de classe II (6% des sérums) spécifiques du donneur était plus élevée que celle des anticorps de anti-classe I (1,4% des sérums étudiés), bien qu'elle ne précise pas le nombre de patients développant ces anticorps (263 patients inclus dans l'étude) (109).

Dans une étude récente et proche de la notre, menée par Lee et al, 139 patients ont été suivis dans le cadre d'une première greffe rénale entre 1991 et 1999. L'immunisation anti-HLA concernait 42% des patients étudiés, quel que soit leur statut d'immunisation prégreffe. On notait que les patients immunisés avant greffe continuaient à avoir des anticorps en post-transplantation. Parmi les patients non immunisés, seuls 26% avaient développé des anticorps de novo en post-greffe. L'apparition des anticorps était moindre chez les sujets âgés de plus de 45 ans par rapport aux sujets jeunes, donnée que nous retrouvons dans notre étude. 100% des patients pour lesquels un rejet chronique était diagnostiqué histologiquement, présentaient des anticorps anti-HLA au cours du suivi post-transplantation. Par contre, contrairement à nos résultats, tous ces patients présentaient des anticorps anti-HLA de classe I, et 83% présentaient des anticorps anti-HLA de classe II, cependant, la spécificité de ces anticorps envers les antigènes HLA du donneur n'était pas précisée. On notait également le délai possible entre l'apparition des anticorps et les signes de rejet chronique, puisque les anticorps étaient apparus entre 6 mois et 8 ans avant la perte du greffon (76).

Un des principaux objectifs de la recherche en transplantation, est la compréhension des mécanismes du rejet de manière à optimiser le traitement immunosuppresseur. Ceci passe par le choix du traitement et l'adaptation de son intensité à chaque situation, afin d'éviter les complications liées à une insuffisance de traitement (épisodes de rejet) ou à une immunosuppression trop profonde (complications infectieuses ou néoplasiques). En ce sens, les anticorps anti-HLA s'intègrent comme une mesure de l'activité de l'immunité humorale,

et le monitoring de ces anticorps pourrait permettre d'adapter au mieux l'intensité de l'immunosuppression., d'autant qu'il n'existe pas de tel marqueur d'activité pour l'immunité cellulaire en pratique de routine.

La présence d'anticorps anti- HLA après transplantation est corrélée, dans notre étude à une moins bonne survie du greffon, et à une fréquence accrue de rejets chroniques diagnostiqués (du fait de la présence de signes cliniques). Parmi ces patients, ce sont ceux qui ont développé des anticorps anti-HLA spécifiques du greffon qui ont le taux le plus élevé de retour en dialyse après la première année dans notre étude. Les patients immunisés avant transplantation étant plus à risque de développer des anticorps anti-HLA dans les suites de la transplantation que les patients sans anticorps, la surveillance régulière de l'évolution du taux d'anticorps et l'identification de nouveaux anticorps potentiellement dirigés contre le greffon apparaissent particulièrement importantes, et pourraient dans l'avenir modifier l'attitude thérapeutique.

Peu d'études sont néanmoins disponibles concernant les implications thérapeutiques de la présence de tels anticorps. Teruvath et al, ont étudié l'effet du tacrolimus et du mycophénolate mofetil sur 4 patients ayant développé un rejet chronique prouvé histologiquement, en présence d'anticorps spécifiques du donneur et pour lesquels l'étude en immunofluorescence mettait en évidence des dépôts de C4d (110). Ceci fait suite à d'autres études qui ont étudié l'action du mycophénolate mofetil sur la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes B, objectivée biologiquement par l'hypogammaglobulinémie (111). Notre travail retrouve dans ce sens, une plus faible proportion de patients sous Cellcept parmi les patients développant des anticorps spécifiques du donneur. Par contre, il n'y a pas de différence entre la proportion de patients traités par MMF présentant des anticorps non spécifiques et les patients sans anticorps. Une étude menée par Terasaki en 2002 (communication personnelle), n'a cependant pas retrouvé de bénéfice de ce traitement.

L'existence de patients développant des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur, dont l'évolution du greffon semble superposable à celle des patients sans anticorps incite à prendre en compte l'ensemble des différents facteurs cliniques, biologiques et histologiques pour juger du retentissement des anticorps chez un patient particulier. Le monitoring simultané des signes cliniques, biologiques simples (comme la créatinine, la protéinurie), anticorps anti-HLA et étude des dépôts de C4d dans le greffon pourrait permettre d'identifier les patients à haut risque de rejet chronique et de perte du greffon, justifiant le recours à un traitement plus agressif.

En effet, des traitements visant spécifiquement à déprimer l'immunité humorale, comme les immunoglobulines polyvalentes, sont déjà utilisées dans le traitement des rejets hyperaigus vasculaires, ou en désensibilisation des patients fortement immunisés avant la greffe (112 ; 113, 114), et leur efficacité pourrait être évaluée dans ces "rejets chroniques à médiation humorale".

En conclusion, même si la fréquence des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur est faible parmi les patients transplantés, elle semble être corrélée à une moins bonne survie du greffon liée à l'implication probable des mécanismes humoraux dans la genèse du rejet chronique.

L'étude des patients pour lesquels la survie du greffon ne semble pas altérée par la présence d'anticorps anti-HLA spécifiques serait particulièrement intéressante.

Sur le plan histologique d'abord, il serait intéressant de comparer les biopsies de ces patients avec celles des greffons évoluant de façon défavorable, notamment en ce qui concerne la fréquence de la glomérulopathie d'allogreffe et la fixation de C4d, témoin de leur activité au niveau du greffon ?

De même, sur un plan plus expérimental, l'étude *in vitro* de ces anticorps serait intéressante afin d'apprécier leur pathogénicité et leur implication éventuelle dans les mécanismes d'accommodation. Un panel de cellules endothéliales typées en HLA pourrait être utilisé dans cet objectif.

# **Annexes**

## Annexe 1 : Classification de Banff (1997)

### I- Diagnostic positif de lésions de rejet : rubriques diagnostiques

1 : Normal

2 : Rejet hyperaigu

Il est caractérisé par des lésions vasculaires diffuses avec thromboses et nécrose fibrinoïde des vaisseaux, et une infiltration de polynucléaires. Classiquement d'apparition immédiate (2A), il peut survenir plus tardivement (chez les malades hyper-immunisés notamment) : c'est le rejet hyperaigu retardé (2B)

3 : lésions frontières (border line) ou rejet aigu minime

Ce stade est caractérisé par l'absence d'artériolite intinale, absence de tubulite (t0) ou tubulite minime (t1). L'infiltration mononucléée peut aller jusqu'à 50%.

4 : Rejet aigu

Les 3 grades sont évalués sur la tubulite et l'artériolite :

Grade I: rejet tubulo-interstitiel avec infiltration mononucléée interstitielle et tubulite modérée (Rejet Ia) ou tubulite sévère (rejet Ib)

Grade II: infiltration mononucléée diffuse avec artériolite intinale discrète (v1) (rejet IIa) ou artériolite diffuse ou sévère (v2) (Rejet IIb)

Grade III: rejet vasculaire avec des lésions d'artériolite transmurale (v3) avec nécrose fibrinoïde de la média ou de la paroi

5 : Néphropathie chronique du greffon :

Grade I : Fibrose interstitielle minime et atrophie tubulaire sans (grade Ia) ou avec (grade Ib) lésions spécifiques évoquant un rejet chronique.

Grade II : Fibrose interstitielle modérée et atrophie tubulaire sans (grade IIa) ou avec (grade IIb) lésions spécifiques évoquant un rejet chronique.

Grade III : Fibrose interstitielle sévère avec tubules atrophiques ou invisibles, sans (grade IIIa) ou avec (grade IIIb) lésions spécifiques évoquant un rejet chronique.

6 : autres lésions considérées comme non liées au rejet

## II- Evaluation semi quantitative des lésions de rejet

### Infiltration cellulaire inflammatoire interstitielle « i » :

- i0 : pas d'infiltration cellulaire ou quelques cellules
- i1 : infiltration cellulaire atteignant jusqu'à 25% de l'interstitium
- i2 : infiltration cellulaire atteignant de 26 à 50 de l'interstitium
- i3 : infiltration cellulaire atteignant plus de 50% de l'interstitium

### Tubulite « t » :

- t0 : pas de cellules inflammatoires dans les tubules
- t1 : Foyers de tubulite comportant 1 à 4 lymphocytes par section tubulaire ou pour 10 cellules tubulaires
- t2 : Foyers de tubulite comportant 5 à 10 lymphocytes par section tubulaire ou pour 10 cellules tubulaires
- t3 : Foyers de tubulite comportant plus de 10 lymphocytes par section tubulaire ou pour 10 cellules tubulaires

### Artériolite « v »

- v0 : pas d'atteinte
- v1 : artériolite intimale (ou endothélite) discrète à modérée d'une section vasculaire au moins.
- v2 : artériolite intimale modérée à sévère de plusieurs sections vasculaires
- v3 : artériolite intimale sévère et diffuse ou artériolite transmurale (souvent accompagnée de nécrose tissulaire focale ou d'hémorragies interstitielles)

### Glomérulite « g »

- g0 : pas d'atteinte
- g1 : glomérulite touchant moins de 25% des glomérules
- g2 : glomérulite segmentaire ou globale touchant 25 à 75% des glomérules
- g3 : glomérulite touchant plus de 75% des glomérules

### Dépôts hyalins artériolaires « ah »

- ah0 : pas de dépôts hyalins PAS +
- ah1 : présence discrète à modérée de dépôts hyalins PAS+ dans au moins 1 artériole
- ah2 : présence modérée à importante de dépôts hyalins PAS+ dans plus d'1 artériole
- ah3 : présence importante de dépôts hyalins PAS+ dans plusieurs artérioles.

Fibrose interstitielle « ci »

- ci0 : fibrose intéressant jusqu'à 5% de la corticale
- ci1 : fibrose interstitielle discrète jusqu'à 25% de la corticale
- ci2 : fibrose interstitielle modérée de 26 à 50% de la corticale
- ci3 : fibrose interstitielle sévère intéressant plus de 50% de la corticale

Atrophie tubulaire « ct »

- ct0 : pas d'atrophie tubulaire
- ct1 : atrophie tubulaire touchant moins de 25% de la surface des tubes corticaux
- ct2 : atrophie tubulaire touchant de 26 à 50% de la surface des tubes corticaux
- ct3 : atrophie tubulaire touchant plus de 75% de la surface des tubes corticaux

Elargissement de la matrice mésangiale « mm »

- mm0 : absence d'élargissement de la matrice mésangiale
- mm1 : jusqu'à 25% de glomérules non scléreux atteints
- mm2 : de 26 à 75% de glomérules non scléreux atteints
- mm3 : plus de 75% de glomérules non scléreux atteints

Glomérulopathie d'allogreffe « cg » :

- cg0 : pas de glomérulopathie (doubles contours dans moins de 10% des anses capillaires de glomérules affectés)
- cg1 : doubles contours touchant jusqu'à 25% des anses capillaires de glomérules non scléreux
- cg2 : doubles contours touchant 26 à 75% des anses capillaires de glomérules non scléreux
- cg3 : doubles contours touchant plus de 75% des anses capillaires de glomérules non scléreux.

Endartérite intinale « cv »

- cv0 : pas de lésions vasculaires chroniques
- cv1 : jusqu'à 25% de rétrécissement de lumière vasculaire par épaissement fibreux de l'intima, avec ou sans effraction de la limitante élastique interne ou par la présence de cellules spumeuses ou cellules mononucléées
- cv2 : rétrécissement de la lumière vasculaire de 25 à 50%
- cv3 : plus de 50% de rétrécissement de la lumière vasculaire.

## Annexe 2 : Définition sérologique des antigènes HLA de classe I et II :

HLA-A	HLA-B	assoziert mit / associated with		HLA-Cw	HLA-DR		assoziert mit / associated with	HLA-DQ
		Bw	Cw		DR	DQ		
A 1	B 7	Bw6	Cw 7	Cw 1	DR 1		DQ5 (1)	DQ2
A 2	B 8	Bw6	Cw 7	Cw 2	DR 4	DR53	DQ7+8 (3)	DQ4
A 3	B13	Bw4	Cw 6	Cw 4	DR 7		DQ2, DQ9 (3)	DQ5 (1)
A11	B18	Bw6	Cw 5	Cw 5	DR 8		DQ4, DQ7 (3)	DQ6 (1)
A23 (9)	B27	Bw4	Cw 1, -2, -3	Cw 6	DR 9	DR53	DQ9 (3)	DQ7 (3)
A24 (9)	B35	Bw6	Cw 4	Cw 7	DR10		DQ5 (1)	DQ8 (3)
A25 (10)	B37	Bw4	Cw 6	Cw 8	DR11 (5)	DR52	DQ7 (3)	DQ9 (3)
A26 (10)	B38 (16)	Bw4	Cw 7	Cw 9 (3)	DR12 (5)	DR52	DQ7 (3)	
A29 (19)	B39 (16)	Bw6	Cw 7	Cw10 (3)	DR13 (6)	DR52	DQ6 (1), DQ7 (3)	
A30 (19)	B41	Bw6	Cw17	Cw17	DR14 (6)	DR52	DQ5 (1)	
A31 (19)	B42	Bw6			DR15 (2)	DR51	DQ6 (1)	
A32 (19)	B44 (12)	Bw4	Cw 4, -5		DR16 (2)	DR51	DQ5 (1)	
A33 (19)	B45 (12)	Bw6	Cw 6		DR17 (3)	DR52	DQ2	
A34 (10)	B46	Bw6	Cw 1		DR18 (3)	DR52	DQ4	
A36	B47	Bw4	Cw 6					
A43	B48	Bw6	Cw 8					
A66 (10)	B49 (21)	Bw4						
A68 (28)	B50 (21)	Bw6	Cw 6					
A69 (28)	B51 ( 5)	Bw4	Cw 1					
A74 (19)	B52 ( 5)	Bw4						
A80	B53	Bw4	Cw 4					
	B54 (22)	Bw6	Cw 1					
	B55 (22)	Bw6	Cw 3					
	B56 (22)	Bw6	Cw 1					
	B57 (17)	Bw4	Cw 6					
	B58 (17)	Bw4	Cw 3					
	B59	Bw4	Cw 1					
	B60 (40)	Bw6	Cw 3					
	B61 (40)	Bw6	Cw 2					
	B62 (15)	Bw6	Cw 3					
	B63 (15)	Bw4						
	B64 (14)	Bw6	Cw 8					
	B65 (14)	Bw6	Cw 8					
	B67	Bw6						
	B71 (70)	Bw6	Cw 3					
	B72 (70)	Bw6	Cw 7					
	B73	Bw6						
	B75 (15)	Bw6						
	B76 (15)	Bw6						
	B77 (15)	Bw4						
	B78	Bw6						
	B81	Bw6						



**Annexe 3 : caractéristiques des patients ayant développé des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur.**

Patients	Age du receveur	date de greffe	n° de greffe	type	Maladie initiale
1	35	17/07/1990	1	R	M de berger (IgA)
2	35	01/06/1992	1	R	IgA
3	31	07/12/1994	2	R	GN indéterminée
4	39	16/09/1988	1	R	PKR
5	39	13/07/1996	1	R	lupus
6	53	22/10/1992	1	R	NTI
7	31	11/08/1991	1	R	uropathie malformative
8	50	22/09/1993	2	R	non connue
9	17	13/04/2000	1	R	uropathie obstructive
10	52	11/12/1991	1	R	PKR
11	40	15/07/1995	1	R	PKR
12	46	14/04/1992	1	R	GEM?
13	21	06/04/1992	1	R	uropathie obstructive
14	47	11/07/1998	1	R	atrophie
15	54	07/12/1997	1	R	GEM
16	46	01/06/1994	1	RP	Diabète
17	33	31/10/1992	1	R	HSF
18	69	06/11/1990	1	R	PKR
19	61	05/05/1990	1	R	PKR
20	31	17/03/1992	2	R	non connue
21	40	04/08/1992	1	R	PKR
22	34	01/10/1993	1	R	PKR
23	38	09/10/1980	1	R	GNC
24	32	08/06/1982	1	R	GNA
25	29	28/03/1997	3	R	SHU
26	31	01/09/1990	1	RP	diabète
27	40	27/06/2000	1	C+R	M de Steinert
28	26	13/12/1985	2	R	héréditaire
29	13	03/07/1992	2	R	HSF
30	51	18/04/1993	1	R	PKR
31	33	23/06/1996	2	R	Néphropathie de reflux
32	16	13/03/1992	1	R	SHU
33	49	09/06/1990	1	R	IgA
34	25	17/05/1980	1	R	NTC
35	45	08/11/2001	1	R	NTA
36	30	27/06/1995	2	R	Syndrome d'Alport
37	19	19/04/1994	2	R	dysplasie rénale bilat
38	26	10/07/1998	1	R	amylose AA
39	45	01/06/1996	1	R	uropathie Malformative
40	25	06/12/1999	2	R	Dysplasie rénale+uropathie

R=rein

RP=Rein+ pancréas

C=Coeur

**Annexe 3 : Date de découverte et type des Anticorps. Paramètres cliniques au moment de la découverte des anticorps.**

	date de mise en évidence des Ac	classe	Méthode de détection	protéinurie (g / 24h)	TA (mmHg)	Créatinine Sérique (μmol/l)	Immunosuppression au moment de la découverte
1	96	DR	PRA		170/100	587	Sandimmun, Imurel, CS
2	120	DR	FACS	1,54	141/80	146	Néoral, Cellcept
3	72	DQ	PRA	0,23	135/80	182	Sandimmun, Imurel, CS
4	168	DQ	FACS	0,17	166/83	178	Néoral, Imurel
5	60	DR	FACS	2,56	120/81	317	Prograf, Cellcept
6	60	DQ	PRA	2		337	Sandimmun, Imurel
7	108	DQ	FACS	0,92	130/88	142	Sandimmun, Imurel
8	108	DQ	FACS	0,14	141/87	156	Néoral, CS
9	24	DQ	FACS	1,68	115/50	368	Prograf, Cellcept, CS
10	120	DR	PRA	0,94	100/50	115	Sandimmun, CS
11	84	DQ	FACS	0,5	117/63	148	Néoral, Imurel
12	96	DR/DQ	PRA	1,8		346	Prograf, Cellcept, CS
13	96	DR	PRA	6	134/94	351	Prograf, CS
14	18	DR	PRA	0,14	120/80	121	Néoral, Cellcept
15	36	DQ	PRA	20,12	190/100	442	Prograf, Rapamune
16	72	DQ	PRA	1,84	150/80	236	Prograf, Imurel
17	120	DQ	FACS	0,42	180/103	151	Sandimmun, Imurel
18	132	DQ	PRA	0,11	167/88	74	Sandimmun, Imurel
19	144	DR	FACS	0,21		99	Sandimmun
20	96	DQ	PRA	0,34	107/60	95	Néoral, Imurel
21	96	DR	PRA	0,1	150/80	170	Sandimmun, Imurel
22	240	DR/DQ	PRA	0,12	130/70	150	Prograf, CS
23	240	DQ	PRA	2,61	144/97	136	CS
24	228	DR	PRA	0,38	140/70	96	Imurel, CS
25	180	DR	FACS				Prograf, Cellcept, CS
26	120	DQ	PRA	0,76		165	Prograf, Imurel, CS
27	24	DR	FACS	0,2	130/80	120	Néoral, Cellcept, CS
28	204	DR	FACS	0,1		152	CS
29	96	DR	PRA	1,4	137/86	202	Prograf
30	108	DR	PRA	0,11	120/64	190	Prograf, Cellcept
31	36	DR	PRA	5,6	160/80	168	Prograf, Cellcept, CS
32	120	DR/DQ	FACS	1,07	119/54	70	Prograf, Imurel
33	132	DQ	PRA	1,85	130/72	537	Sandimmun, Cellcept
34	264	DQ	FACS	0,2		234	Imurel, CS
35	12	DQ	FACS	0,28		143	Néoral, Cellcept
36	72	DQ	PRA	0,18	135/85	114	Néoral, Imurel
37	96	DQ	FACS	1,1	147/94	112	Prograf, Imurel
38	48	DQ	FACS	0,15	119/71	156	Néoral, Cellcept
39	48	DR/DQ	PRA	1,92	146/79	70	Sandimmun, Imurel
40	36	DQ	FACS	1,7	141/98	337	Prograf, Cellcept

**Annexe 3 : Evènements post-transplantation, chez les patients présentant des anticorps anti-  
HLA spécifiques du greffon**

	Grossesses	transfusions	CMV	Rejet Aigu	Arret Immunosuppression
1				Oui (1 mois)	
2			Oui		
3	Oui (26 m)			Oui (1 mois)	
4					
5		Oui (48 m)			
6				X3 (2/25/50 mois)	
7					
8				Oui (24 mois)	oui temporairement (28 mois)
9					
10					
11	Oui (5m)				
12				Oui (2 mois)	
13					
14					
15		Oui (post-op)	non traité		
16					
17			non traité		
18					
19					
20	Oui (24 m)		oui	Oui (2 mois)	
21			oui	Oui (2 mois)	
22		Oui (post-op)	oui		
23					
24				Oui (6 mois)	
25		Oui (post-op)	oui	Oui (Vasculaire)	
26				Oui	
27					
28				X2 (1/3 mois)	Oui (Hogkin) (60 mois)
29		Oui (96 m)		Oui (1 mois)	
30					
31				Oui (1 mois)	
32	Oui (120m)				
33		Oui (120 m)			
34		Oui (264 m)			
35					
36					
37	Oui ( 84 m)				
38					
39					oui temporairement (30 mois)
40					

**Annexe 3: Evolution du greffon vers la dialyse, l'altération de la fonction rénale ou protéinurie.**

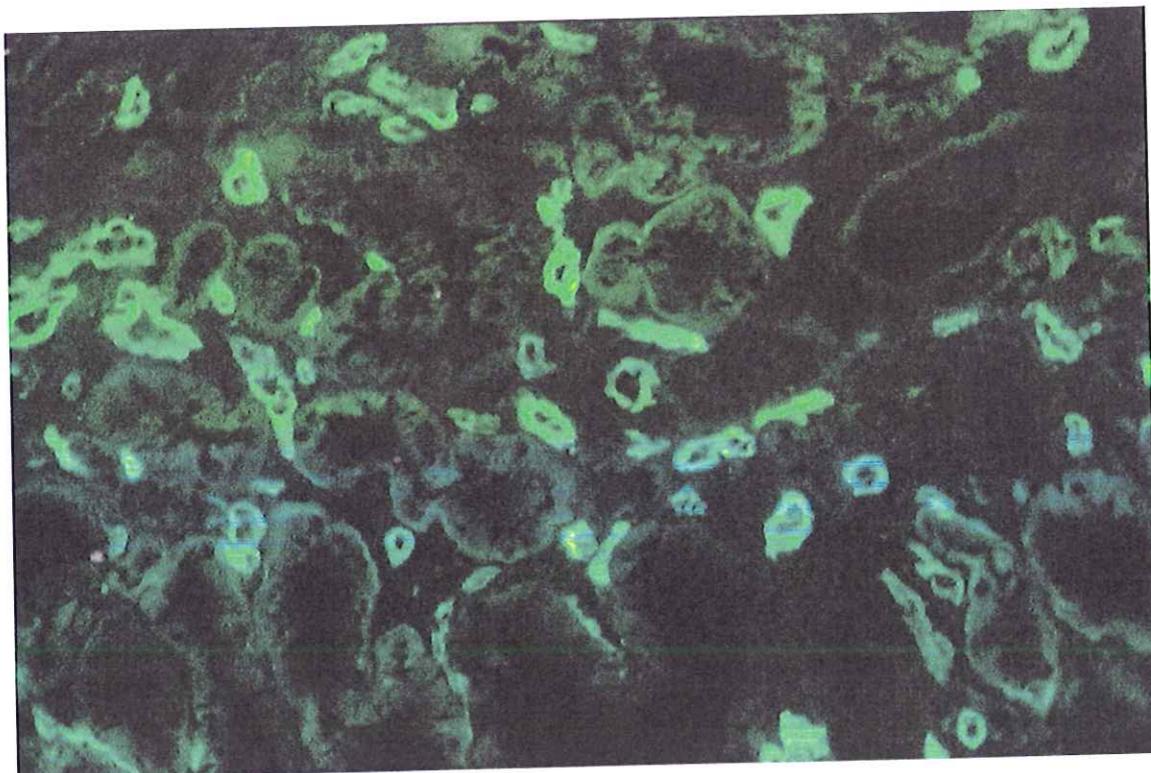
	Retour en dialyse (mois par rapport à le greffe)	Délai de l'EER par rapport à détection des anticorps	Diagnostic de l'échec	Altération de la fonction rénale > 30% (non repris en EER)	Protéinurie (> 0,5 g/ 24 h)
1	100	4	Récidive +/- RC		?
2					xx
3					0
4					x
5	64	4	RC		xxx
6	76	16	RC		xxx
7					x
8					0
9				oui	xx
10					xx
11					0
12	114	18	DCG sans PBR		xxx
13	96	0	DCG sans PBR		xx
14					xx
15	36	0	DCG sans PBR		xxx
16	76	4	DCG sans PBR		xx
17					xx
18					0
19					0
20					x
21					0
22					0
23	252	12	RC		xxx
24				oui	xx
25					x
26				oui	x
27					0
28					0
29	102	6	Récidive +/- RC		xx
30					0
31	45	9	RC		xxx
32					xx
33	144	12	RC		xxx
34					0
35					xx
36					0
37					xxx
38					x
39					xxx
40				oui	?

RC : rejet Chronique  
Protéinurie : 0 : <0,5g/j

DCG : Dysfonction chronique du greffon  
x : 0,5 à 1 g/j    xx : 1 à 3 g/j    xxx : Plus de 3 g/j

Annexe 4 :

Illustration : Immunofluorescence après dépôts de C4d sur une biopsie de transplant rénal.



Patient 1. Immunofluorescence indirecte avec marquage au C4d. Grossissement x200

## **Références bibliographiques**

- 1 Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ et Port FK. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999;341: 1725-1730.
- 2 Dew M. Does transplantation produce quality of life benefits? A quantitative analysis of the literature; *Transplant* 1997; 64:1261-1273
- 3 EFG: Bilan des activités de prélèvement et de greffe en France en 2001.
- 4 Gjertson DW : Survival trends in long term first cadaver-donor kidney transplants. *Clinical transplants* 1991: 225-235
- 5 Terasaki PI, Cecka JM, Cho Y, Cicciarelli J, Cohn M, Gjertson D, Lim E, Mickey MR, Ogura K, Parks S, Takemoto S and Yuge J : Overview, *Clinical Transplants*. 1990: 585-601.
- 6 Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the united states, 1988 to 1996. *N Eng J Med* 2000; 342: 605-606
- 7 Vanrenterghem Y, Peeters J : Impact of cyclosporine on chronic rejection and graft vasculopathy. *Transplant Proc* 1994; 26: 2560-2563.
- 8 Ferguson RM. Aspects of allograft rejection. II: risk factors in renal allograft rejection. *Transplant rev* 1995; 9:121-126
- 9 Dausset J. Iso-leucoanticorps. *Acta Haematol* 1958; 20:156-160
- 10 Van Rood J et Van Leeuwen A. leucocyte grouping. A method and its application. *J Clin Invest* 1963; 42:1382-1393.
- 11 Marsh S, Bodmer J, Albert E, Bodmer W, Bontrop R, Dupont B, Erlich H, Hansen J, Mach B, Mayr W, Parham P, Petersdorf E, Sasazuki T, Schreuder G, Strominger J, Svejgaard A et Terasaki P. Nomenclature for factors of the HLA system, 2000. *Tissue Antigens* 2001; 57:236-283.
- 12 Bignon JD. Système HLA. *Encycl Med Chir (Editions scientifiques et médicales Elsevier, paris), hématologie* 2000, 13-000-M-53, 16p.
- 13 Suthanthiran M et Strom TB. Renal transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 365-376.
- 14 Neylan JF, Sayegh MH, Coffman TM et al: the allocation of cadaver kidneys for transplantation in the United States: consensus and controversy. ASN Transplant Advisory Group. *American Society of Nephrology. J Am Soc Nephrol* 1999; 10:2237-2243.
- 15 Schnitzler MA, Hollenbeak CS, Cohen DS et al. The economic implications of HLA matching in cadaveric renal transplantation. *N Engl J Med* 1999; 341: 1440-1446.
- 16 Morris PJ, Johnson RJ, Fuggle SV, et al. Analysis of factors that affect outcome of primary cadaveric renal transplantation in the UK. HLA Task Force of the Kidney Advisory

Group of the United Kingdom Transplant Support Service Authority (UKTSSA). *Lancet* 1999; 354:1147-1152.

17 Sijpkens YWJ, Doxiadis IIN, De Fijter JW, Mallat MJK, Van Es LA, De Lange P, Zwinderman AH, Westendorp RGJ, Van Kemenade FJ, Bruijn JA, Claas FHJ, and Paul LC. Sharing cross-reactive groups of MHC class I improves long-term graft survival. *Kidney Int* 1999; 56: 1920-1927

18 Wujciak T, Opelz G. Evaluation of HLA matching for CREG antigen in europe. *Transplantation* 1999; 68:1097-1099.

19 Terasaki P et McClelland J. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964; 204:998.

20 Kao K, Scornik J et Small S. Enzyme linked immunoassay for anti-HLA antibodies: an alternative to panel studies by lymphocytotoxicity. *Transplantation* 1993; 55:192-6.

21 Sumitran-Karuppan S et Moller E: The use of magnetic beads coated with soluble HLA class II proteins in antibody screening and for specificity determination of donor-reactive antibodies. *Transplantation* 1996; 61:1539.

22 Pei R, Lee J, Chen T, Rojo S et Terasaki P. Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. *Human Immunol* 1999; 60:1293-1302.

23 Moore S, Ploeger N et DeGoey S. HLA antibody screening: comparison of a solid phase enzyme-linked immuno assay with antiglobulin-augmented lymphocytotoxicity. *Transplantation* 1997; 64: 1617-1620.

24 Harmer A, Heads A et Vaughan R. detection of class I and class II specific antibodies by flow-cytometry and PRA-STAT screening in renal transplant recipients. *Transplantation* 1997; 63: 1828-1832.

25 Pierquin A, Masson D, Toupance O, Tabary T, Bougy F, Bensa J et al. False negative results in HLA antibody detection by Sangstat ELISA: complement dependent cytotoxicity is not yet obsolete. *Transplantation* 1996; 62:1533-1534

26 Monteiro F, Buelow R, Mineiro C, Rodrigues H et Kalil J. Identification of patients at high risk of graft-loss by pre-and post-transplant monitoring of anti-HLA class I IgG antibodies by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Transplantation* 1997; 63:542-546.

27 Kerman R, Susskind B, Kerman D, Lam M, Gerolami K, Williams J, Kalish R, Campbell SM, Katz SM, van Buren CT et Kahan BD. Anti-HLA antibodies detected in post-transplant renal allograft recipient sera correlate with chronic rejection. *Transplant Proc* 1997; 29:1515-1516.

28 Paul LC. Antibodies and chronic organ graft rejection. *Ann Transplant* 1997; 2:46-52.

29 Koka P, Chia D, Terasaki P, Chan H, Chia J, Ozawa M et al. The role of IgA anti-HLA class I antibodies in kidney transplant survival. *Transplantation* 1993; 56:207-211.

- 30 Jeannet M, Pinn VW, Flax MH, Winn HJ et Russel PS. Humoral antibodies in renal transplantation in man. *N Engl J Med* 1970; 282:111-117.
- 31 Opelz G et Lenhard V. Immunological factors influencing renal graft survival. *Annu Rev Med* 1983; 34:133-144
- 32 Katznelson S, Bhaduri S, Cecka JM. Clinical aspects of sensitization. In: Cecka, Terasaki editors. *Clinical transplants*. Los Angeles: UCLA tissue typing laboratory; 1997. p 285-296.
- 33 Kerman R, Susskind B, Buelow R, Regan J, Pouletty P, Williams J, Gerolami K, Kerman D, Katz SM, van Buren CT et Kahan BD. Correlation of ELISA-detected IgG and IgA anti-HLA antibodies in pretransplant sera with renal allograft rejection. *Transplantation* 1996; 62:201-205.
- 34 Süsal C et Opelz G. Kidney graft failure and presensitization against HLA class I and II antigens. *Transplantation* 2002; 73:1269-1273.
- 35 Martin S, Dyer P, Mallick N, Gokal R, Harris R and Johnson R. Posttransplant antidonor lymphocytotoxic antibody production in relation to graft outcome. *Transplantation* 1987; 44: 50-53.
- 36 Suciú- Foca N, Reed E, D'Agati V, Ho E, Cohen D, Benvenisty A, McCabe R, Brensilver J, King D et Hardy M. Soluble HLA antigens, anti-HLA antibodies, and anti-idiotypic antibodies in the circulation of renal transplant recipients. *Transplantation* 1991; 51: 593-601.
- 37 Patel R et Terasaki P. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969; 280:735-739.
- 38 Piazza A, Adorno D, Poggi E, Borrelli L, Buonomo O, Pisani F, Valeri M, Torlone N, Camplone C, Monaco P, Fraboni D et Casciani C. Flow cytometry crossmatch: a sensitive technique for assessment of acute rejection in renal transplantation. *Transplant Proc* 1998; 30:1769-1771.
- 39 Trpkov c, Campbell P, Pazderka F, Cockfiel S, Solez K et Halloran P. Pathologic features of acute renal allograft rejection associated with donor specific antibody, analysis using the Banff grading schema. *Transplantation* 1996; 1586-1592.
- 40 Scornik JC, Lefort W, Cicciarelli J, Brunson M, Bogaard T, Howard R et al. Hyperacute and acute kidney graft rejection due to antibodies against B cells. *Transplantation* 1992; 54:61-64
- 41 Al Hussein K, Talbot D, Proud G, Taylor R et Shenton B. the clinical significance of post-transplantation non HLA antibodies in renal transplantation. *Transplant Int* 1995; 8:214-220.
- 42 Abou El Fettouh H, Cook DJ, Bishay E, Flechner S, Goldfarb D, Modlin C, Dennis V et Novick AC. Association between a positive flow cytometric crossmatch and the development of chronic rejection in primary renal transplantation. *Urology* 2000; 56:369-372.

- 43 Ten Hoor G, Coopmans M et Allebes W. Specificity and Ig class of preformed alloantibodies causing a positive crossmatch in renal transplantation. The implication for graft survival. *Transplantation* 1993; 56:298-304.
- 44 Cardella C, Falk J, Halloran P, Robinette M, Arbus G et Bear R. renal transplantation in patients with a positive crossmatch on non current sera: long-term follow-up. *Transplant Proc* 1985; 17:626-627.
- 45 MahoneyR, Tranto S et Edwards E. B-cell crossmatching and kidney allograft outcome in 9031 United states Transplant recipients. *Human Immunol* 2002; 63:324-335.
- 46 Hourmant M, Bignon JD, Cesbron A et Souillou JP. Effect of positive crossmatch against donor B lymphocytes in kidney transplantation: a prospective one-center study. In *clinical transplants*. Terasaki ed UCLA: Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, p301.
- 47 Ponticelli C. Progression of renal damage in chronic rejection. *Kidney Int* 2000; 57 (Sup 75): S62-S70.
- 48 Kreis H et Ponticelli C. Causes of late renal allograft loss: chronic allograft dysfunction, death and other factors. *Transplantation* 2001; 71 (Sup 11)SS5-SS9.
- 49 Terasaki PI, Gjertson DW, Cecka JM, Takemoto S, Cho YW : Significance of the donor age effect on kidney transplant. *Clin Transpl* 1997; 11:366-372.
- 50 Shoskes D, Cecka M : deleterious effect of delayed graft function in cadaveric renal transplant recipients independent of acute rejection. *Transplantation* 1998;55: 1697-1701.
- 51 Opelz G, Wujciak T, Ritz E, collaborative transplant Study: Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure.*Kidney Int* 1998; 53, 217- 222.
- 52 Paul LC. Chronic renal transplant loss. *Kidney Int* 1995; 47: 1491-1499.
- 53 Paul LC. Glomerular hypertension – an underappreciated aspect of chronic rejection. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 213-229
- 55 Massy ZA, Guijarro C, Wiederkehr MR, Ma JZ and Kasiske BL. Chronic allograft rejection: Immunologic and non immunologic risk factors. *Kidney Int* 1996; 49:518-524.
- 56 Giral M, Pascuariello G, Karam G, Hourmant M, Cantarovitch D, Blancho G, Coupel S, Josien R, Daguin P, Mechineau S, Souillou JP. Acute graft pyelonephritis and long-term kidneyallograft outcome. *Kidney Int* 2002; 61(5): 1880-1886.
- 57 Campistol JM and Grinyo JM. Exploring treatment options in renal transplantation: the problem of chronic allograft dysfunction and drug related nephrotoxicity.*Transplantation* 2001; 11 (suppl 71): SS42-SS51.
- 58 Kahan BD. Potential therapeutic interventions to avoid or treat chronic allograft dysfunction. *Transplantation* 2001; 11 (suppl 71): SS52-SS57.

- 59 Takemoto S, Terasaki P, Cecka JM, Cho Y et Gjertson DW. Survival of nationally shared , HLA matched Kidney transplants from cadaveric donors. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. *N Engl J Med* 1992; 327:834-839.
- 60 Hourmant M. Syndrome d'ischémie-reperfusion rénale. *Néphrologie* 1999 ; 20(7) : 371-375.
- 61 Bryan CF, Luger AM, Martinez J, Muruve N, Nelson P, Pierce G, Ross G, Shield C, Warady B, Aeder M, Helling T. Cold ischemia time : an independant predictor of increased HLA class I antibody production after rejection of a primary cadaveric renal allograft. *Transplantation* 2001 ; 71 :875-879.
- 62 Troppmann C, Gillingham KJ, Gruessner RWG, Dunn DL, Payne WD, Najarian JS and Matas AJ. Delayed graft function in the absence of rejection has no long term impact. *Transplantation* 1996; 61: 1331-1337.
- 63 Söderberg-Naucler C. Viral Infections and their impact on chronic renal allograft dysfunction. *Transplantation* 2001; 71 (Sup 11): SS24-SS30.
- 64 Möller E, Söderberg-Naucler C, Sumitran-Karuppan S. Role of alloimmunity in clinical transplantation. *Rev Immunogenetics* 1999; 1:309-322.
- 65 Van Saase JL, Van der Woude FJ, Thorogood J , Hollander AAMJ, Van Es LA, Weening JJ, Van Bockel HJ, and Bruijn JA. The relation between acute vascular and interstitial renal allograft rejection and subsequent chronic rejection. *Transplantation* 1995; 59: 1280-1285.
- 66 Gulanikar AC, MacDonald AS, Sungurtekin U, Belitsky P. The incidence and impact of early rejection episodes on graft outcome in recipients of first kidney transplants. *Transplantation* 1992; 53:323-323
- 67 Almond PS, Matas A, Gillingham KJ, Dunn DL, Payne WD, Gores P, Gruessner R, Najarian JS : Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 1993; 55: 752-757
- 68 Matas A. Chronic rejection in renal transplant recipients – Risk factors and correlates. *Clin Transplantation* 1994; 8:332-335
- 69 Massy ZA, Guijarro C and Kasiske BL. Clinical predictors of chronic renal allograft rejection. *Kidney Int* 1995; 48 suppl. 52: S85-S88.
- 70 Vereerstraeten P, Abramowicz D, De pauw L and Kinnaert P. Absence of deleterious effect on long term kidney graft survival of rejection episodes with complete functional recovery. *Transplantation* 1997; 63: 1739-1743.
- 71 Fellström B. Non immune risk factors for chronic renal allograft dysfunction. *Transplantation* 2001; 71(sup 11): SS10-SS16.
- 72 Paul LC. Current knowledge of the pathogenesis of chronic allograft dysfunction. *Transplant Proc* 1999; 31:1793-1795.

- 73 Bian H, Harris P, Mulder A et Reed E. Anti-HLA antibody ligation to HLA class I molecules expressed by endothelial cells stimulates tyrosine phosphorylation, inositol phosphate generation and proliferation. *Hum Immunol* 1997; 53:90-97.
- 74 Bian H et Reed E. Alloantibody-mediated class I signal transduction in endothelial cells and smooth muscle cells: enhancement by IFN-gamma and TNF alpha. *J Immunol* 1999; 163:1010-1018.
- 75 Harmer A, Koffman C, Heads A et Vaughan R. Sensitization to HLA antigens occurs in 95% of primary renal transplant rejections. *Transplant Proc* 1995; 1:666-667
- 76 Lee PC, Terasaki P, Takemoto S, Lee PH, Hung CJ, Chen YL, Tsai A et lei HY. All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation* 2002; 74:1192-1194.
- 77 Worthington J, Martin S, Dyer P et Johnson R. An association between posttransplant antibody production and renal transplant rejection. *Transplant Proc* 2001; 475-476.
- 78 Buchler M, Al Najjar A, Guerraoui A, Valentin JF, Boulanger MD, Sheroben R, Lataste A, Nivet H et Lebranchu Y. post-transplant anti-HLA antibodies : risk factor for chronic rejection ? *Transplant Proc* 1995; 27:2478-2479.
- 79 Davenport A, Younie ME, Parsons JEM, Klouda PT. Development of cytotoxic antibodies following renal allograft transplantation is associated with reduced graft survival due to chronic vascular rejection. *Nephrol Dial transplant* 1994; 9: 1315-1319
- 80 Abe m, Kawai T, Futatsuyama K et al. Postopérative production of anti-donor antibody and chronic rejection in renal transplantation. *Transplantation* 1997; 63: 1616-1619.
- 81 Kerman R, Orosz C et Lorber M. Clinical relevance of anti-HLA antibodies pre and post-transplant. *Am J Med Sci* 1997; 313:275-278.
- 82 Müller-Steinhardt M, Fricke L, Kirchner H, Hoyer J and Klüter H. Monitoring of anti-HLA class I and II antibodies by flow cytometry in patients after first cadaveric kidney transplantation. *Clin Transplant* 2000; 14: 85-89.
- 83 Pelletier RP, Hennessy PK, Adams PW, VanBuskirk AM, Ferguson RM and Orosz CG. Clinical significance of MHC-reactive alloantibodies that develop after kidney or kidney-pancreas transplantation. *Am J Transplant* 2002; 2:134-141.
- 84 Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib RB, Castro M-C, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachtenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Häyry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad A, Marcussen N, Mihatsch MJ, Nadasdy T, Nickerson P, Olsen TS, Papaditriou JC, Randhawa PS, Rayer DC, Roberts I, Rose S, Rush D, Salinas-Madrigal L, Salomon DR, Sund S, Taskinen E, Trpkov K, Yamaguchi Y : The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney int* 1999 ; 55 : 713-723.
- 85 Paul LC. Chronic allograft nephropathy: an update. *Kidney Int* 1999; 56:783-793.

- 86 Hamburger J, Crosnier J, Dormont JA : observations in patients with a well tolerated homotransplanted kidney. *Ann NY Acad Sci* 1964; 120: 558- 577.
- 87 Watschinger B et Pascual M. Capillary C4d deposition as a marker of humoral Immunity in renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:2420-2423.
- 88 Collins A, Schneeberger E, Pascual M, Saidman S, Williams W, Tolckoff-Rubin N, Cosimi A et Colvin B. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection:diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:2208-2214.
- 89 Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G et al. Capillary déposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int* 1993; 43 (6): 1333-1338
- 90 Lederer SR, Kluth-Pepper B, Schneeberger H, Albert E, Land W et Feucht H. Impact of humoral alloreactivity early after transplantation on the long-term survival of renal allografts. *Kidney Int* 2001; 59:334-341.
- 91 Mauiyyedi S, Crespo M, Collins AB, Schneeberger E, Pascual MA, Saidman S et al. Acute humoral rejection in kidney transplantation: II morphology, immunopathology and pathologic classification. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:779-787.
- 92 Regele H, Bohmig G, Habicht A, Gollowitzer D, Schillinger M, Rockenschaub S, Watschinger B, Kerjaschki D et Exner M. Capillary deposition of complement split-product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:2371-2380.
- 93 Bohmig G, Exner M, Habicht A, Schillinger M, Lang U, Kletzmayer J, SaemannM, Horl W, Watschinger B et Regele H. Capillary C4d deposition in kidney allografts: a specific marker of alloantibody-dependent graft injury. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:1091-1099.
- 94 Nিকেleit V, Zeiler M, Gudat F, thiel G et Mihatsch M. detection of the complement degradation product C4d in renal allografts: diagnostic and therapeutic implications. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:242-251.
- 95 Cockroft D et Gault M. Prediction of creatinine clearance from plasma creatinine: comparison of five formulae. *Nephron* 1976; 16:31-41.
- 96 Mauiyyedi S, Della Pelle P, Saidman S, Collins A, Pascual M, Tolckoff-Rubin N, Williams W, Cosimi A, Schneeberger E et Colvin R. Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 2002; 12:574-582.
- 97 Christiaans M, Nieman F, Van Hoof J et Van den Berg Loonen. Detection of HLA class I and II antibodies by ELISA and complement dependant cytotoxicity before and after transplantation 2000; 69: 917-927.

- 98 Salama A, Delikouras A, Pusey C, Cook H, Bhangal G, Lechler R et Dorling A. Transplant accomodation in highly sensitized patients: a potential role for Bcl-xL and alloantibody. *Am J transplant* 2001; 1:260-269.
- 99 Reed E, Cohen DJ, Barr ML, Ho E, Marboe CC, Rose EA, Hardy M et Suci-Foca N. Effect of anti-HLA and anti-idiotypic antibodies on the long-term survival of heart and kidney allografts. *Transplant proc* 1992; 24:2494-2495.
- 100 McKenna R, Takemoto S et Terasaki P. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation* 2000; 69:319- 326.
- 101 Coupel C, Giral-Classe M, Karam G, Morcet JF, Dantal J, Cantarovitch D, Blancho G, Bignon JD, Daguin P, Soullillou JP et Hourmant M. Ten-year survival of second kidney transplants: impact of immunological factors and renal function at 12 months (Kidney, sous presse).
- 102 Scornik JC, Salomon D, Lim P, Howard R et Pfaff W. Post-transplant antidonor antibodies and graft rejection. *Transplantation* 1989; 47:287-290.
- 103 Kerman RH, Katz SM, Van Buren CT, Ruth J, McKissick E, Rasmussen S et Kahan BD. Posttransplant Immune monitoring of anti-HLA antibody. *Transplant Proc* 2001; 33:402.
- 104 Sumitran-Holgersson Suchitra. HLA specific allo-antibodies and renal graft outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:897-904.
- 105 Piazza A, Poggi E, Borelli L, Servetti S, Monaco P, Buonomo O, Valeri M, Torlone N, Adorno D et Casciani C. Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: post-transplant analysis using flow cytometric analysis. *Transplantation* 2001; 71: 1106-1112.
- 106 Feucht H, Opelz G. The humoral immune response towards HLA class II detremnants in renal transplantation 1996 *Kidney Int* ; 50: 1464-1475
- 107 Iniotaki-Theodoraki A, Douramani P, Boletis J, Papassavas A, Theodoropoulou H, Kostakis A and Stavropoulos-Giokas C. Immune reactivity toward HLA class II determinants in renal transpalntation. *Transplant proc* 2001; 33:461-464.
- 108 Schonemann C, Groth J, Leverenz S et May G. HLA class I and class II antibodies. *Transplantation* 1998; 65:1519-1523.
- 109 Supon P, Constantino D, Hao P, Cagle L, Hahn A, Conti D et Freed B. Prevalence of donor specific anti-HLA antibodies during episodes of renal allograft rejection. *Transplantation* 2001; 71:577-579.
- 110 Theruvath TP, Saidman S, Mauiyyedi S, Delmonico F, Williams W, Rubin N, Collins AB, Colvin R, Cosimi AB, Pascual M. Control of antidonor antibody production with tacrolimus and mycophenolate mofetil in renal allografts recipients with chronic rejection. *Transplantation* 2001; 72:77-83.

111 Smith K, Isbel N, Catton M, Leydon J, Becker G, et Walker G. Suppression of the humoral response by mycophenolate mofetil. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 160-164.

112 Peraldi MN, Akposso K, Haymann JP, Flahaut A, Marlin C, Rondeau E et Sraer JD. Long term benefit of intravenous immunoglobulins in cadaveric kidney retransplantation. *Transplantation* 1996; 62:1670-1672.

113 Montgomery R, Zachary A, Racusen L, Lefell M, King K, Burdick J, Maley W et Ratner L. Plasmapheresis and intravenous immune globulin provides affective rescue therapy for refractory humoral rejection and allows kidneys to be successfully transplanted into cross-match-positive recipients. *Transplantation* 2000; 70: 887-895.

114 Jordan S, Quartel A, Czer L, Admon D, Chen G, Fishbein M, Schwieger J, Steiner R, Davis C et Tyan D. Posttransplant therapy using high dose human immunoglobulin (intravenous gammaglobulin) to control acute humoral rejection in renal and cardiac allografts recipients and potential mechanism of action. *transplantation* 1998; 66:800-805.

NOM : HOUZET

PRENOM : Aurélie

**Titre de la thèse :**

**Signification clinique de la présence d'anticorps anti-HLA après transplantation rénale.**

**Résumé**

---

L'apparition des anticorps anti-HLA spécifiques du donneur après transplantation rénale souligne l'importance des mécanismes immunologiques impliqués dans la dysfonction chronique du greffon, première cause de perte de fonction du greffon.

La recherche et l'identification des anticorps anti-HLA a été effectuée de façon transversale chez 1203 patients, greffés entre 1975 et 2001, suivis au CHU de Nantes, en techniques ELISA, lymphocytotoxicité ou cytométrie en flux.

Des anticorps anti-HLA ont été détectés chez 19,9% des patients. Il s'agit d'anticorps dirigés contre les antigènes HLA du greffon pour 3,3% d'entre eux et il s'agit dans tous les cas d'anticorps anti-HLA de classe II, de type DQ ou DR. La présence d'anticorps anti-HLA en post-transplantation semble corrélée à une incidence plus élevée de rejet chronique et de retour en dialyse, et associée à différents paramètres biologiques comme la majoration de la protéinurie ou une altération de la fonction rénale. Parmi les facteurs prédictifs d'apparition des anticorps en post-transplantation, on retient surtout l'immunisation avant transplantation, et les grossesses après transplantation. Les épisodes de rejet aigu sont plus fréquents chez les patients ayant développé des anticorps anti-HLA, bien que non significatifs. Les infections à CMV ne sont pas statistiquement différentes entre les 3 groupes.

La présence d'anticorps anti-HLA en post-transplantation, et en particulier des anticorps spécifiques du donneur, est donc, bien que peu fréquente, un facteur de mauvais pronostic pour la survie du greffon.

---

**Mots-clés :**

Anticorps anti-HLA  
Transplantation rénale  
Rejet Chronique  
Immunisation  
Survie du greffon.