

**UNIVERSITE DE NANTES**

---

**FACULTE DE MEDECINE**

---

Année : 2018

N° 2018-224

**THESE**

pour le

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

Néphrologie

par

Sabine LE BOT

née le 22 mai 1989 à Saint Denis de la Réunion

---

Présentée et soutenue publiquement le 20 décembre 2018

---

**Corrélation entre les phénotypes lymphocytaires sanguins périphériques  
et le diagnostic histologique de la biopsie de greffon  
chez le patient transplanté rénal.**

---

Président : Madame le Professeur Magali GIRAL

Directeur de thèse : Docteur Sophie Brouard

## Remerciements

A mes directrices de thèse et présidente du jury,

**A Madame le Professeur Magali GIRAL,**

Merci pour ce sujet si riche réunissant médecine et recherche en immunologie, merci de ta confiance, de ton aide et de ta gentillesse, tout au long de cette thèse et au quotidien dans le service de transplantation.

**A Madame le Docteur Sophie Brouard,**

Merci d'avoir été ma directrice de mémoire il y a 3 ans en Master 2 et maintenant ma directrice de thèse de médecine, tu m'as beaucoup appris toujours dans la bonne humeur, et les réunions très stimulantes dans ton bureau ont confirmé mon goût pour l'immunologie et la recherche translationnelle

Aux membres du jury,

**A Madame le Professeur Maryvonne HOURMANT,**

Merci pour votre accueil si chaleureux dans votre service, votre soutien, vos projets passionnants et vos conseils éclairés

**A Monsieur le Docteur Renaud Snanoudj,**

Merci de me faire l'honneur de venir juger mon travail

**A Madame le Docteur Karine Renaudin Autain,**

Merci de votre expertise histologique, pour cette thèse et au quotidien, ainsi que pour le travail (gargantuesque ;) ) de relecture que vous avez effectué !

Aux personnes sans qui ce travail n'aurait pu se concrétiser :

**A Monsieur le Docteur Florent Delbos,**

Merci de ton aide et pour le foisonnement de projets toujours pertinents

**A Monsieur Thomas Goronflot et Madame Clarisse Kerleau,**

Merci pour votre travail, vos explications biostatistiques, votre disponibilité et pour les nombreux tests statistiques réalisés au cours de cette thèse !

**A Madame le Docteur Marie Rimbart,**

Merci d'avoir permis la réalisation des phénotypes lymphocytaires dans le laboratoire d'immunologie du CHU de Nantes

**A tous les médecins du service de Néphrologie du CHU de Nantes,**

Merci pour votre enseignement précieux, pour les débats néphrologiques et autres, et l'ambiance colorée que vous insufflez au service et qui rend si agréable et stimulant d'y travailler.

**A mes chefs de cliniques** qui m'ont encadrée et appris depuis le début de l'internat, Lise-Marie, Awena, Marion, Caroline, Vianney, Clément Agnès, Simon, Lucile. Merci pour vos enseignements, votre présence toujours bien dosée, votre bonne humeur et bien-sûr les CV du vendredi soir

**A mes co-internes et amis de master 2** dont David, Sophie, Marie, Lola, Delphine, Aurélie, Raphaël, Mélanie, Alice, Claire Charles Clémence Thibault ... et tous ceux qui ont fait rimer médecine et néphrologie avec amitié

**A mes amis Brestois et Nantais**, merci pour toutes ces belles années, en particulier Sophie, Fanny, Marine, Fabien, Thomas, Alexandre, Paul, Marguerite, Cécile, François, et surtout, merci de me supporter au jeu.

A mes vieilles amies qui malgré les années, les kilomètres et les phobies de téléphone sont toujours là, Lise Tiffanie Véronique et Camille

A Sophie Marine et Camille qui ont une place toute particulière

A Anne, Habib, Hanaa et Alexis, Naël et Géraldine, Tad et Mimi merci de votre soutien dans les nombreuses années de révisions sur la terrasse de Trezmalaouen

A mon père, pour son exemplarité et avoir été le premier à me parler de greffe (de pommes), à ma mère pour le soleil qu'elle apporte, à mes frères Julien et Alan, et Sophie pour leur présence ; Mersi bras deoc'h pour ce bouillon de culture qui ne peut qu'aiguiser la curiosité

Marwan, tu es un soutien indéfectible, entre autres qualités. Je ne peux que répondre... merci, pour la vie.

<b>I.</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>10</b>
1.	<u>RAPPELS DE NOTIONS IMMUNOLOGIQUES EN TRANSPLANTATION RENALE</u> .....	10
1.1.	LE SYSTEME HLA OU COMPLEXE MAJEUR D’HISTOCOMPATIBILITE .....	11
1.2.	LYMPHOCYTES T.....	13
1.2.1.	<i>Ontogénèse des lymphocytes T</i> .....	13
1.2.2.	<i>Activation lymphocytaire T</i> .....	15
1.2.3.	<i>Les lymphocytes T CD4+</i> .....	17
1.2.5.	<i>Les lymphocytes T cytotoxiques CD8 +</i> .....	21
1.3.	LYMPHOCYTES B ET ANTICORPS ANTI HLA DONNEUR .....	23
1.3.1.	<i>Ontogénèse des lymphocytes B</i> .....	23
1.3.2.	<i>Fonctions des LB et anticorps anti –HLA</i> .....	25
1.3.3.	<i>Détection des anticorps anti HLA</i> .....	26
	<i>Lymphocytotoxicité dépendante du complément ( LCT )</i> .....	26
	<i>Cross match en cytométrie de flux</i> .....	26
	<i>Tests ELISA</i> .....	27
	<i>Luminex®</i> .....	27
1.4.	LES CELLULES NK.....	28
1.5.	IMPACT DE L’IMMUNOSUPPRESSION .....	29
	<i>Traitement d’induction</i> .....	29
	<i>Traitement d’entretien</i> .....	30
2.	<u>L’ANALYSE HISTOLOGIQUE DU GREFFON RENAL</u> .....	32
2.1.	CLASSIFICATION DE BANFF .....	32
2.2.	HISTOLOGIE DES REJETS CELLULAIRES .....	35
2.3.	HISTOLOGIE DES REJETS HUMORAUX .....	37
2.4.	FIBROSE INTERSTITIELLE ET LESIONS INFLAMMATOIRES .....	37
2.5.	INDICATION DE LA REALISATION DES BIOPSIES DE GREFFON RENAL .....	38
2.6.	RECHERCHE DE BIOMARQUEURS.....	39
3.	<u>PHENOTYPES LYMPHOCYTAIRES ET TRANSPLANTATION RENALE</u> .....	40
3.1.	LE RATIO CD4/CD8.....	42
3.2.	LYMPHOCYTES T REGULATEURS.....	42
3.3.	LYMPHOCYTES CYTOTOXIQUES CD8+CD28- .....	43
3.4.	LYMPHOCYTES B.....	44
3.5.	CELLULES NK.....	45
<b>II.</b>	<b>PRESENTATION DE L’ETUDE ET METHODES</b> .....	<b>45</b>
1.	POPULATION DE L’ETUDE.....	46
2.	REALISATION ET ANALYSE DES BIOPSIES DES GREFFONS RENAUX .....	46
3.	DETECTION ET IDENTIFICATION D’UNE IMMUNISATION ANTI HLA PRE ET POST GREFFE. ....	47
4.	DETERMINATION DE L’IMMUNOPHENOTYPAGE LYMPHOCYTAIRE DU SANG CIRCULANT AU MOMENT DE LA BIOPSIE .....	48
5.	PARAMETRES DEMOGRAPHIQUES ET COVARIABLES ETUDIEES .....	50
6.	ANALYSE STATISTIQUES .....	50
<b>III.</b>	<b>RESULTATS</b> .....	<b>52</b>
1.	CARACTERISTIQUES DEMOGRAPHIQUES .....	52
2.	DESCRIPTIONS DES DIAGNOSTICS HISTOLOGIQUES DES BIOPSIES RENALES .....	55
3.	CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET BIOLOGIQUES EN FONCTION DES LESIONS HISTOLOGIQUES .....	59
4.	DESCRIPTION DES PHENOTYPES LYMPHOCYTAIRES T CD4+ ET CD8+ EN FONCTION DES LESIONS HISTOLOGIQUES .....	61
5.	ANALYSE DES PHENOTYPES SANGUINS LYMPHOCYTAIRES EN FONCTION DES DIFFERENTS DIAGNOSTICS HISTOLOGIQUES .....	63
6.	ANALYSE DE SURVIE DES GREFFONS EN FONCTION DES DIFFERENTS DIAGNOSTICS HISTOLOGIQUES .....	66

7.	RESULTATS COMPLEMENTAIRES .....	67
7.1.	ANALYSES DES VARIABLES ASSOCIEES AU POURCENTAGE DE LT CD8+CD28- - CIRCULANTS .....	68
7.2.	EVOLUTION NATURELLE ET PRISE EN CHARGE DES SUSPICIONS DE REJETS HUMORAUX.....	69
7.3.	ANALYSE COMPLEMENTAIRE DES LYMPHOCYTES B ET DES CELLULES NK.....	71
<b>IV.</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>74</b>
1.	CORRELATION ENTRE LES LYMPHOCYTES T CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> SANGUINS CIRCULANTS ET L'HISTOLOGIE DE LA BIOPSIE DE GREFFON RENAL .....	74
2.	ABSENCE DE CORRELATION ENTRE LES LT REGULATEURS CIRCULANTS ET L'HISTOLOGIE DE LA BIOPSIE DE GREFFON.....	75
3.	DONNEES DEMOGRAPHIQUES ET HISTOLOGIQUES DE NOTRE COHORTE .....	76
4.	EVALUATION DES PARAMETRES ASSOCIES A L'AUGMENTATION DES LT CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup> CIRCULANTS .....	77
5.	DESCRIPTION DES PHENOTYPES LYMPHOCYTAIRES A 3 MOIS ET A 12 MOIS DE GREFFE .....	78
6.	LIMITES DE L'ETUDE.....	78
7.	PERSPECTIVES .....	79
<b>V.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>81</b>

○

**Table des Figures :**

Figure 1 Structure moléculaire des antigènes HLA de classe I et II. ....	12
Figure 2 Structure schématique des récepteurs spécifiques de l'antigène des lymphocytes T .....	14
Figure 3. Schématisation des 3 signaux nécessaires à l'activation des lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigène. D'après Halloran <sup>19</sup> .....	16
Figure 4. Polarisation du LT CD+ naïf en fonction de l'environnement cytokinique vers les différentes sous-populations lymphocytaires. D'après Liu .....	18
Figure 5 Mécanismes d'action inhibiteur des Treg . Adapté de Schmitt et William.....	21
Figure 6. Structure schématique des récepteurs spécifiques de l'antigène des lymphocytes B.....	24
Figure 7. Analyse en cytométrie de flux sur sang total des lymphocytes T cytotoxiques (A) et des LT régulateurs (B) Les pourcentages sont exprimés par rapport à l'ensemble des lymphocytes CD3+.....	49
Figure 8 Flow Chart .....	52
Figure 9. Patients transplantés rein ou rein-pancréas à Nantes entre 2008 et 2016. A. Nombre de transplantations et d'inclusions par année B. Pourcentage d'inclusions par année.....	53
Figure 10. Diagnostics histologiques des 1640 biopsies, toutes indications de biopsies confondues. A. Distribution des 9 catégories diagnostiques. B. Distribution des catégories histologiques en fonction de l'intervalle de temps post transplantation .....	55
Figure 11.. Comparaison des lésions élémentaires histologiques des 9 catégories diagnostiques. ....	57
Figure 12. Distribution des lésions élémentaires de chaque catégorie histologique .....	58
Figure 13. Description des phénotypes lymphocytaires T en fonction des 9 catégories histologiques. ....	61
Figure 14. Etude de corrélation entre la fréquence des lymphocytes T CD8+CD28- du sang périphérique et le diagnostic histologique concomitant des greffons. Analyse multivariée en régression logistique.....	64
Figure 15. Corrélation multivariée entre la fréquence des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+CD127-du sang périphérique et le diagnostic histologique concomitant des greffons.....	66
Figure 16. Etude de survie à 10 de la transplantation en fonction du diagnostic histologique. ....	67
Figure 17. Evolution naturelle du diagnostic histologique de suspicion de rejet humoral. ....	70
Figure 18. Comparaison des taux circulants de lymphocytes CD4+, CD8+ , Treg, CD8+CD28-, LB et cellules NK à 3 mois.....	71

## Table des Tableaux:

Tableau I. Exemple de schémas thérapeutiques d'immunosuppression .....	30
Tableau II Evolution de la classification de Banff. ....	32
Tableau III. Lésions élémentaires de la classification de Banff.....	34
Tableau IV. Classification de Banff .....	36
Tableau V. Revue de la littérature des études des phénotypes sanguins associés à l'histologie et au devenir des greffons rénaux. ....	41
Tableau VI. Références des clones et des fluorochromes.....	49
Tableau VII. Caractéristiques démographiques des 1097 patients.....	54
Tableau VIII. Description des 1640 biopsies.....	56
Tableau IX. Caractéristiques démographiques de la population en fonction du diagnostique histologique.....	60
Tableau X. Descriptions des phénotypes lymphocytaires T en fonction des lésions histologiques. ....	62
Tableau XI. Comparaison en analyse univariée des sous-populations lymphocytaires	61
Tableau XII. Résultats des régressions logistiques des histologies.....	65
Tableau XIII. Analyse multivariée avec régression linéaire multiples des variables clinico biologiques associées au pourcentage de LT CD8+CD28- sanguins. ....	69
Tableau XIV. Comparaison des patients avec suspicion de rejet humoral en fonction de la prise en charge médicale	69
Tableau XV.Valeurs absolues des sous-populations lymphocytaire à 3 mois et à 12 mois de la transplantation	72
Tableau XVI. Analyse multivariée avec régression linéaire multiples des variables clinico biologique associées au phénotype lymphocytaire sanguin à 3 mois et à 12 mois.....	73

## Listes des abréviations

**ABMR** : Antibody Mediated Rejection

**ACAD** : activated T cells autonomous cell death

**AICD** : activation induced cell death

**ADCC** : cytotoxicité médiée par les anticorps

**Akt** : Protein kinase B

**AP-1** : protéine activatrice 1

**Bcl-xL** : B-cell lymphoma-extra large

**Bcl -2** : B-cell lymphoma 2

**BCR** B cell Receptor

**BKv** : BK virus

**Breg** : LB régulateurs

**CCL3** : Chemokine C-C motif ligand 3

**CCR7** : C-C chemokine receptor type 7

**CD** Cluster of differentiation

**CNI** : Inhibiteurs des calcineurines

**CMF** : Cytométrie en flux

**CMH** Complexe Majeur d'Histocompatibilité

**CPA** Cellules présentatrices d'antigènes

**CsA** : ciclosporine A

**DFG** : Débit de filtration glomérulaire

**DSA** : Donor specific antibody

**Fadd** : Fas-Associated protein with Death Domain

**Fas L** : Fas Ligand

**Fc** : fragment constant des immunoglobulines

**FcγRIII** : récepteur Fc ou CD16

**FIAT** : Fibrose Inflammatoire Atrophie Tubulaire

**FIAT-i** : Fibrose Inflammatoire Atrophie Tubulaire avec infiltrat inflammatoire

**FoxP3** : forkhead box P3

**HLA** Human leucocyte antigens

**Ig** : Immunoglobulines

**IL** : Interleukines

**INF-γ** : Interféron gamma

**KIR** : killer cell immunoglobulin-like receptors

**MAP Kinase** : Mitogen-Activated Protein Kinases  
**mTor** : mechanistic target of rapamycin  
**MFI** Mean Fluorescence Intensity  
**MMF** : Mycophenolate Mofetil  
**NFAT** : Nuclear factor of activated T-cells  
**NFκB** : nuclear factor-kappa B  
**NK** Natural Killers  
**PI3K** : phosphatidylinositol 3-kinase  
**LB** Lymphocytes B  
**LCT** : Lymphocytotoxicité dépendante du complément  
**LT** : Lymphocytes T  
**LT CD8+ CM** LT CD8 mémoires centraux  
**LT CD8+ EM** : LT CD8 mémoires effecteurs  
**RAG** : Recombination activating gene  
**RORγt** : RAR-related orphan receptor gamma  
**SAB** : Single Antigen bead  
**TCR** T cell Receptor  
**TCMR** T cell Mediated Rejection  
**TEMRA** : Terminally differentiated effector memory  
**Tfh** : T cell follicular helper  
**TGFβ** : Tumor Growth factor beta  
**TH** : Lymphocyte T Helper  
**TLR** : Toll Like Receptor  
**TNF** : Tumor Necrosis factor  
**TRADD** : TNFR1-associated death domain protein  
**Treg** : Lymphocytes T régulateurs  
**pTreg** : Lymphocytes T régulateurs périphériques  
**tTreg** : Lymphocytes T régulateurs thymiques  
**TSDR** Treg specific demethylated region

## I. Introduction

Malgré une grande diversité de maladies néphrologiques, le stade ultime de l'atteinte rénale est commun à toutes entraînant une incapacité fonctionnelle de l'organe, et le décès en l'absence de traitement de suppléance. L'insuffisance rénale terminale est définie par un débit de filtration glomérulaire (DFG) inférieur à 15mL/min. En 2016 en France, l'incidence de l'insuffisance rénale terminale était de 11029 patients et la prévalence de 84683 patients, dont 38178 (46%) étaient porteurs d'un greffon rénal (données issues du registre REIN).

La transplantation rénale est considérée comme étant la prise en charge optimale des patients en insuffisance rénale terminale. Les progrès réalisés depuis la première transplantation en 1952, ont permis d'améliorer la survie et la qualité de vie des patients, quel que soit l'âge du receveur<sup>1,2</sup>, comparativement aux patients sous dialyse. Actuellement la survie médiane du greffon rénal est de 13,8 années. Malgré un succès croissant des résultats de la transplantation dans la première année de greffe<sup>3,4</sup>, la perte chronique des greffons sur le long terme reste inchangée. Si la survie à 1 an est de 92% des greffons contre 86% en 1986-1995, la survie de greffe à 10 ans stagne, seuls 63% des greffons sont fonctionnels à ce délai<sup>5</sup>. Les principales étiologies de perte de greffon à long terme sont le rejet humoral chronique<sup>4</sup> et l'apparition de lésions non immunologiques<sup>6</sup>. Il n'existe actuellement pas de traitement efficace contre ces atteintes tardives, qui une fois présentes dégradent progressivement la fonction du greffon jusqu'à l'échec de greffe signifié par un retour en dialyse ou une nouvelle transplantation. Il est donc primordial de prévenir l'apparition ou l'aggravation de ces lésions pour améliorer le pronostic à long terme des greffons et des patients.

Les recherches épidémiologiques de données de cohorte et translationnelles réalisées grâce à la mise à disposition de collections d'échantillons biologiques ainsi que l'étude anatomo-pathologique des biopsies de greffons font partie de l'arsenal actuel indispensable pour tenter de répondre à cette problématique. Dans la première partie de la thèse nous ferons un rappel de l'immunologie de la transplantation et de la mise à jour récente de la classification des diagnostics histologiques des biopsies de greffons ainsi qu'une analyse succincte de la littérature sur les associations potentielles des phénotypes lymphocytaires circulants avec les diagnostics histologiques des biopsies et le devenir des greffons. Dans la seconde partie nous présenterons le travail de recherche qui fait l'objet de cette thèse.

### 1. Rappels de notions immunologiques en transplantation rénale

Les progrès dans le domaine de la transplantation sont possibles grâce à l'amélioration des connaissances sur le système immunitaire. La transplantation est un évènement inédit au cours duquel

un organe étranger est introduit dans le corps du receveur. Nous présentons ici les principaux acteurs du système immunitaire adaptatif impliqués dans les rejets de transplants.

### 1.1. Le système HLA ou Complexe Majeur d'Histocompatibilité

Le système HLA (Human Leucocytes Antigens) ou Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) est un ensemble de gènes localisés sur le chromosome 6, codant pour des protéines exprimées à la surface de toutes les cellules du corps humain. Ces protéines ont pour rôle de présenter les antigènes aux lymphocytes T et NK afin d'initier la réponse immunitaire adaptée.

Le système HLA est polygénique, et divisé en 3 classes<sup>7</sup> : les gènes HLA de classe I codent les molécules HLA-A HLA-B et HLA-Cw (HLA classique, ainsi que les HLA non classiques HLA-E HLA-G et HLA-F), les gènes HLA de classe II codent les molécules HLA-DR, HLADQ et HLA-DP (et non classiques HLA-DM et HLA-DO). Les gènes de la classe III ne sont pas impliqués dans la présentation de l'antigène mais codent des molécules inflammatoires comme certaines protéines du complément et le  $TNF\alpha$ . La transmission génétique du système HLA est très conservée, avec un déséquilibre de liaison : les gènes de classe I et II sont transmis « en bloc » appelés haplotypes. Il n'existe que de rares cas de recombinaison.

Les molécules HLA de classe-I sont formées d'une chaîne alpha codée par un gène de la classe I, reliée de manière covalente à une chaîne invariante b2microglobuline (Figure 1). La chaîne alpha est constituée de 3 domaines : les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  forment la poche de liaison peptidique, le domaine  $\alpha 3$  est conservé et permet la liaison au CD8 des lymphocytes T. Les molécules HLA de classe II sont formées de deux chaînes : alpha et beta, chaque chaîne étant codée par un gène du système HLA classe II. Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont constituées de deux domaines, les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  forment la poche peptidique, le domaine  $\beta 2$  se lie au CD4 des lymphocytes.

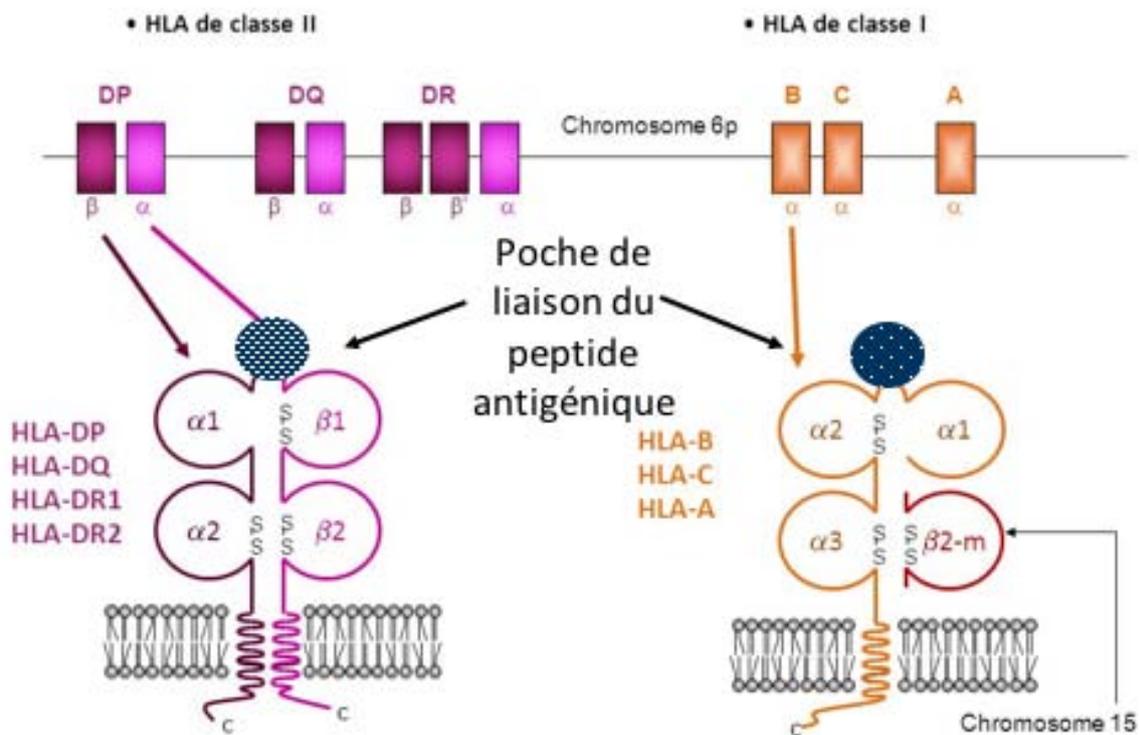


Figure 1 Structure moléculaire des antigènes HLA de classe I et II. Schéma Kuby Immunology: International Edition Paperback – International Edition, 2013

Les molécules de classe I sont exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées avec des niveaux d'expression variable : forte expression à la surface des lymphocytes T et B (1% de leurs protéines membranaires soit  $5 \cdot 10^5$  molécules de CMH I par lymphocyte) et à la surface des cellules endothéliales et épithéliales ; à l'inverse les hépatocytes ne les expriment que faiblement. Les molécules HLA de classe I présentent les antigènes du Soi du turn-over protéique normal, ainsi que les antigènes viraux en cas d'infection ou les antigènes tumoraux<sup>7</sup>. Les molécules de classe I sont reconnues par les LT CD8+ cytotoxiques et par les récepteurs KIR des cellules NK, permettant la lyse de la cellule en cas de présentation d'un antigène anormal.

Les molécules de classe II ne sont exprimées que sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), et sous certaines conditions, par les cellules endothéliales, épithéliales et les fibroblastes. Les molécules HLA de classe II présentent les antigènes exogènes qui ont été préalablement phagocytés ou endocytés. Les molécules de classe II sont reconnues par les LT CD4 helper.

Le système HLA est codominant : les 2 allèles de chaque gène sont exprimés. Il y a donc 6 protéines HLA de classe I différentes exprimées sur la cellule en cas d'hétérozygotie, et 12 molécules HLA de classe II.

Le système HLA est polymorphique<sup>8</sup> : il existe plus de 2313 molécules HLA-A, 3011 HLA-B, 1985 HLA-C, 1412 chaîne beta DR, 595 chaîne beta DQ 32 chaîne alpha DQ. Seule la chaîne alpha DR est presque identique chez tous les individus : il n'en existe que 7 allèles codant pour 2 protéines différentes. Ce polymorphisme s'exprime principalement au niveau de la poche de liaison peptidique, et conditionne la manière dont les antigènes sont présentés au système immunitaire. Ainsi selon les variants alléliques, la molécule HLA présentera un épitope différent ce qui peut avoir pour conséquence de moduler la réponse immunitaire en activant différents clones lymphocytaires. Le génotype HLA influence ainsi la réponse aux infections et l'apparition de certaines maladies auto-immunes<sup>9,10</sup>

En transplantation d'organe la similarité des antigènes HLA entre donneur et receveur appelée histocompatibilité est importante pour le devenir de la greffe : moins il y a de mismatches antigéniques HLA, meilleure sera la survie du greffon<sup>11</sup>. Les molécules HLA reconnues comme étrangères entraînent la production d'anticorps par les lymphocytes spécifiques. L'histocompatibilité au niveau moléculaire, avec la prise en compte de la conformation tridimensionnelle des séquences d'acide aminés pour chaque molécule HLA (ou eplets) permet une analyse plus précise de la compatibilité donneur/receveur<sup>12</sup>. Le génotypage HLA du receveur pourrait aussi avoir une influence sur le devenir de la greffe. Le locus A36 a été retrouvé comme un sur-risque de 36% de développer des anticorps anti-HLA, tandis que les locus DR1, DR4, DR7; B44 et B45 et A1, A2 entraînent une diminution de 9% de ce risque<sup>13</sup>. Une autre étude portant sur 172 231 patients transplantés de rein, cœur pancréas, poumons entre 1987 et 2010 retrouve une diminution de l'incidence de lymphomes B diffus à grandes cellules lorsqu'il existe moins de 1 mismatch HLA ABDR<sup>14</sup> ainsi que chez les patients exprimant le locus DR13, alors que le locus B38 est associé à une augmentation de cette incidence .

## 1.2. Lymphocytes T

### 1.2.1. Ontogénèse des lymphocytes T

A la sortie de la moelle osseuse, les progéniteurs lymphocytaires exprimant la molécule CCR9, CD45RA fort et CD34+ faible migrent vers le thymus. La maturation des lymphocytes T permet d'aboutir à l'expression membranaire des molécules CD4 ou CD8 ainsi qu'au réarrangement des gènes codant pour les chaînes du récepteur des lymphocytes T (TCR).

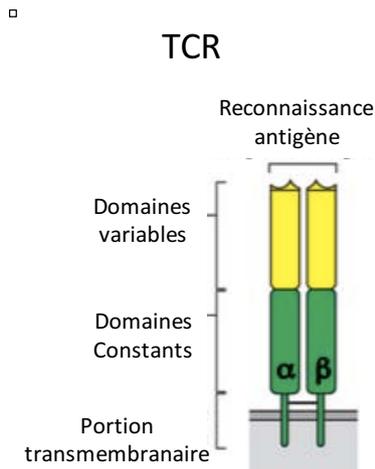


Figure 2 Structure schématique des récepteurs spécifiques de l'antigène des lymphocytes T

Le TCR est un hétérodimère composé de deux chaînes (Figure 2), chacune ayant un domaine variable et un domaine constant. La majorité des LT exprime un TCR formé d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  (TCR  $\alpha\beta$ ), certains lymphocytes expriment un TCR  $\gamma\delta$  prédominant au stade fœtal, puis au niveau des muqueuses, reconnaissant différents antigènes non protéiques. Afin d'assurer un répertoire de reconnaissance exhaustif (évalué à  $10^{14}$  clones) les gènes codant pour les domaines variables des chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  subissent des recombinaisons de leurs segments (appelés V, D et J) par les enzymes RAG. Seuls les LT ayant un TCR reconnaissant de manière optimale les molécules HLA du Soi sont conservés. Des mécanismes de sélections positive et négative entraînent l'apoptose des LT auto-réactifs et des LT dont le TCR n'est pas optimal pour la reconnaissance d'un antigène.

La maturation des lymphocytes T se déroule en 3 stades :

- Au stade 1 les thymocytes « double-négatifs » n'expriment pas les marqueurs CD4 et CD8, et subissent un réarrangement des gènes V, D et J codant la chaîne  $\beta$  du TCR. Les lymphocytes double-négatifs expriment un pré-TCR formé par une chaîne pré- $\alpha$  et de la chaîne  $\beta$  fonctionnelle. Seuls les lymphocytes exprimant un pré-TCR vont être engagés vers le stade 2.
- Au stade 2 les thymocytes sont double-positifs exprimant le CD4 et le CD8. Le réarrangement des gènes codant la chaîne  $\alpha$  a lieu, permettant l'expression d'un TCR. C'est à ce stade qu'ont lieu les sélections positive et négative.

**La sélection positive** se déroule dans le cortex thymique et entraîne une restriction au CMH : seuls les thymocytes dont le TCR reconnaît de manière optimale les molécules du CMH exprimées par les cellules de l'épithélium thymique seront sélectionnés. La sélection positive entraîne une restriction d'expression des molécules CD4 ou CD8 : les thymocytes reconnaissant la portion invariante  $\alpha 3$  des molécules du CMH de classe I vont s'engager vers l'expression du CD8 grâce à l'induction du facteur de transcription Runx3<sup>15</sup>. Les thymocytes reconnaissant la portion  $\beta 2$  invariante des molécules du CMH de type II vont activer le facteur de transcription GATA-3 et n'exprimeront plus que le CD4. La sélection

positive entraîne la sélection d'un spectre d'affinité très large de lymphocytes, y compris de lymphocytes portant des TCR auto-réactifs.

**La sélection négative**, ou tolérance centrale élimine les clones auto-réactifs reconnaissant les peptides du Soi présentés par les CMH des cellules épithéliales thymiques de la zone médullaire. Le facteur de transcription AIRE permet aux cellules épithéliales thymiques médullaires d'exprimer toutes les protéines du corps afin d'assurer la tolérance périphérique ; les cellules dendritiques thymiques phagocytent ces cellules épithéliales afin d'optimiser la présentation des peptides endogènes par le CMH II pour la reconnaissance par les thymocytes CD4+. Certains thymocytes reconnaissant les peptides du Soi avec une forte affinité expriment le facteur de transcription foxP3 et deviennent des LT régulateurs naturels (nTreg) participant à la tolérance périphérique. 95% des thymocytes double-positif meurent par apoptose soit en raison d'un TCR auto-réactif soit d'un TCR ne liant pas le CMH ou avec une trop faible affinité.

- Le stade 3 de thymocyte simple positif : les thymocytes n'expriment que le CD4 ou le CD8. L'expression de CCR7 et de SIP-1 leur permet de sortir du thymus dans la circulation générale et de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires jusqu'à la rencontre avec leur antigène spécifique.

A l'homéostasie la valeur médiane du ratio CD4/CD8 est entre 1,5 et 2. Le ratio CD4/CD8 est supérieur à 1 car les précurseurs des CD8 ont une susceptibilité supérieure à l'apoptose intra-thymique, mais auront ensuite une demi-vie plus longue que les CD4 en périphérie<sup>16</sup>. L'inversion de ce ratio est marqueur d'une activation chronique du système immunitaire, et notamment retrouvé lors des mécanismes de sénescence du système immunitaire. Des études ont établi qu'un ratio CD4/CD8 inversé était un facteur de risque de mortalité chez les patients nonagénaires<sup>17</sup>. Dans le contexte de l'immuno-sénescence il semble que cette inversion soit en rapport avec une augmentation des CD8+ CMV spécifiques.

### 1.2.2.Activation lymphocytaire T

Lors de la transplantation d'organe, il coexiste trois voies de reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T qui vont aboutir à leur activation : les voies directe, semi-indirecte et indirecte<sup>18</sup>. La voie directe est impliquée dans les premières semaines : les cellules dendritiques du donneur présentes dans le greffon activent les LT du receveur en leur présentant les peptides allogéniques via leurs molécules HLA I et II. Les LT mémoires activés ont des TCR variés polyclonaux mais de moindre affinité. Cette voie est particulièrement impliquée dans les rejets aigus. La voie indirecte de présentation des antigènes du donneur par les cellules du receveur s'installe plus progressivement, mais permet l'activation de LT naïfs puis mémoires aux TCR oligoclonaux plus affins et responsables des rejets chroniques. Enfin une voie semi-directe a été décrite, où les CPA du receveur acquièrent les molécules

HLA de classe et II du donneur soit par contact cellulaire avec les cellules endothéliales du greffon ou les CPA du donneur, soit par capture d'exosomes contenant des molécules HLA.

L'ischémie-reperfusion obligatoire lors de la transplantation favorise un état pro-inflammatoire. L'hypoxie puis la toxicité des radicaux libres et des ions superoxydes entraînent la nécrose cellulaire, l'expression des signaux dangers DAMPS activent via les TLR les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques circulent entre les tissus (le greffon rénal) et les ganglions afin de présenter l'antigène aux lymphocytes T naïfs.

Trois signaux sont nécessaires à l'activation des LT naïfs pour proliférer et initier une réponse effectrice (Figure 3).

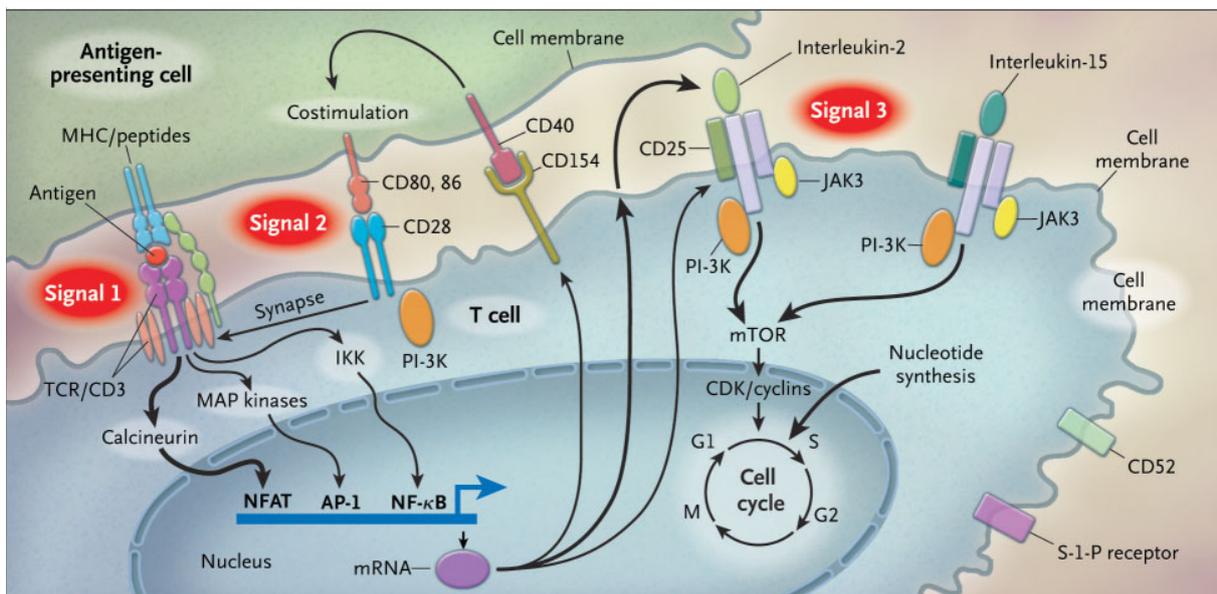


Figure 3. Schématisation des 3 signaux nécessaires à l'activation des lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigène. D'après Halloran<sup>19</sup>

Le premier signal relève de la reconnaissance par le TCR du complexe peptide-HLA porté par une cellule présentatrice d'antigène (CPA). L'intensité de ce signal est régulée par l'affinité du TCR pour le complexe CMH-peptide, la durée d'exposition de l'antigène au lymphocyte T, et la densité d'antigènes présentés à la surface des CPA. Le signal est transmis par trois voies de signalisation : la voie des MAP kinases, qui active le facteur de transcription AP-1, la voie des calcineurines qui active le facteur de transcription NFAT et la voie de la protéine kinase C qui active le facteur NF-κB. Ce 1<sup>e</sup> signal aboutit à l'expression de molécules de surface de costimulation, à l'expression de la chaîne α du récepteur IL-2 et à la sécrétion d'IL-2.

Le deuxième signal est porté par l'interaction entre les molécules de co-stimulation (CD80/86) à la surface des CPA et la molécule CD28 à la surface des lymphocytes T. Le degré d'expression de ces molécules permet de moduler l'activation lymphocytaire T. En l'absence de ce co-signal positif, le

lymphocyte T reconnaissant son couple peptide-CMH qui lui est spécifique restera anergique. L'engagement du récepteur CD28 induit une augmentation de l'expression de molécules anti-apoptotiques (comme Bcl-xL et Bcl2) et d'IL-2, ce qui permet la survie des lymphocytes activés. En fin de réaction inflammatoire, les LT activés expriment des molécules de co-signal inhibiteur tel que le CTLA4 qui se lie aux molécules CD80/86 avec une affinité supérieure à CD28, permettant l'arrêt de la prolifération des lymphocytes et l'anergie ou inactivation fonctionnelle du lymphocyte T, favorisant la tolérance périphérique.

Le troisième signal est médié par les cytokines, notamment IL-2 qui potentialise les premier et second signaux. La nature des cytokines présentes dans l'environnement oriente la réponse T effectrice en différentes sous-populations lymphocytaires (cytokines polarisantes).

### 1.2.3. Les lymphocytes T CD4+

Le rôle principal des LT CD4+, ou lymphocytes T Helper (Th) est la production de cytokines impliquées dans la génération et la régulation de la réponse immunitaire adaptative. En fonction de l'environnement cytokinique sécrété par les CPA ou les lymphocytes voisins, le LT CD4+ se polarise vers une sous-population particulière. Les sous-populations sont caractérisées par un facteur de transcription qui régule la sécrétion de cytokines effectrices, déterminant la fonction du LTh (Figure 4)

:

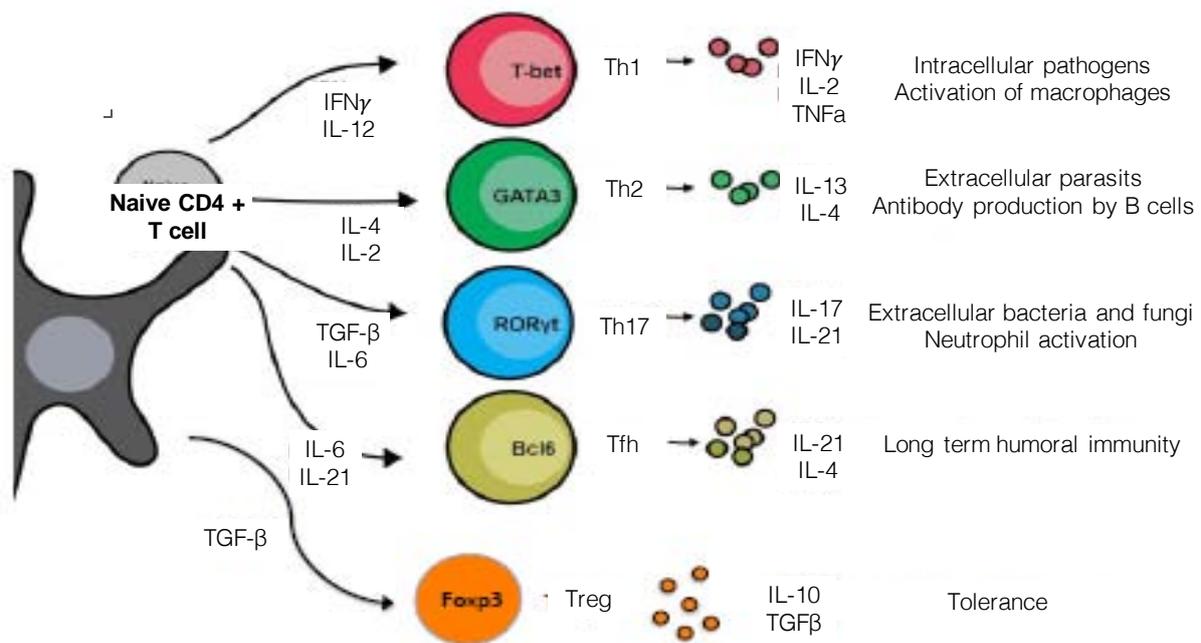


Figure 4. Polarisation du LT CD4+ naïf en fonction de l'environnement cytokinique vers les différentes sous-populations lymphocytaires. D'après Liu

- Les cytokines polarisantes IL-12, IL-18 et INF- $\gamma$  induisent la différenciation du LT CD4+ naïf en LTh1, caractérisé par l'expression du facteur de transcription T-bet et la production d'interféron gamma et de TNF. Le rôle des Th1 est d'augmenter l'activation des lymphocytes CD8+ cytotoxiques.
- L'IL-4 induit la différenciation en lymphocyte Th2 caractérisé par l'expression du facteur de transcription GATA3 et et la production d'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-10, de l'IL-13, participant à l'activation des LB et des éosinophiles afin de lutter contre les pathogènes extracellulaires, et favorise la commutation isotypique des immunoglobulines vers les IgE.
- En présence des cytokines IL-6 et TGF $\beta$ , les LT CD4+ naïfs se différencient en LTh17 qui expriment le facteur de transcription ROR $\gamma$ t et produisent de l'IL-17 ainsi que de l'IL-21 et l'IL-22. Les Th17 induisent le recrutement de polynucléaires neutrophiles mais aussi induisent des signaux inflammatoires à de nombreux type cellulaires, le récepteur à l'IL-17 étant exprimé notamment sur les cellules épithéliales, endothéliales et les fibroblastes. En transplantation rénale, les Th17 sont retrouvés dans l'infiltrat lymphocytaire des rejets chroniques, les TH17 étant moins sensibles aux anti-calcineurines qui les Th1(17)<sup>20</sup>.
- En présence d'IL-21 et d'IL-6, les LT CD4 naïfs se différencient en LTh folliculaires (Tfh), qui jouent un rôle majeur dans la maturation lymphocytaire B au sein des centres germinatifs (CG) des organes lymphoïdes secondaires. Les Tfh sécrètent de l'IL-21 qui entraîne la sélection des lymphocytes B CD19+IgD+CD27- avec une forte affinité pour l'antigène, permettant la

différenciation des LB et la génération d'anticorps matures et affins. Les Tfh jouent un rôle dans la taille des CG et régulent l'entrée des LB au sein de ces GC en fonction de leur affinité. La majorité des Tfh sont au sein des organes lymphoïdes secondaires, mais des Tfh CD4+ CD45RA-CXCR5+ sont retrouvés dans la circulation périphériques<sup>21</sup>.

- Enfin, il existe une sous-population de LT CD4+ ayant une activité anti-inflammatoire régulatrice, caractérisée par l'expression du facteur de transcription foxp3 : les LT régulateurs (Treg).

#### 1.2.4. Lymphocytes T régulateurs CD4+ CD25+ CD127- :

Les LT régulateurs (Treg) constituent 5 à 10% des LT CD4+ circulants<sup>22</sup>. Les Treg exercent des fonctions immunorégulatrices une fois le pathogène éliminé afin de limiter l'emballement de l'inflammation. De nombreuses maladies auto immunes sont caractérisées par un défaut de LT régulateurs<sup>23</sup>. Les Treg ont également un rôle dans le développement de la tolérance vis à vis des allo-antigènes<sup>24</sup>. Les Treg circulants peuvent avoir deux origines<sup>25</sup> :

- Les Treg thymiques (tTreg) : Ces tTreg ont un TCR reconnaissant avec une affinité importante les antigènes du Soi présentés par les molécules CMH II des cellules épithéliales thymiques et acquièrent l'expression du foxP3 lors de la sélection thymique. Une fois sortis du thymus, Les tTreg exerceront leur activité inhibitrice envers les lymphocytes T effecteurs auto-immuns. Leur fonction régulatrice reste stable quel que soit l'environnement cytokinique.
- Les Treg périphériques (pTreg) sont des LT CD4+ qui acquièrent des capacités régulatrices avec la transcription du Foxp3 suite à un environnement cytokinique particulier (notamment la présence de TGF $\beta$  et d'IL-2) ou lors d'une exposition chronique à de faibles doses d'antigènes associées à une co-stimulation de faible intensité<sup>26</sup>. Ceci témoigne de la plasticité entre les différentes sous populations de lymphocytes T CD4+. Les pTreg n'ont pas un phénotype régulateur stable, et peuvent perdre l'expression du foxP3. Les pTreg sont donc spécifiques des antigènes du non-Soi et participent aux mécanismes de tolérance périphérique. Ils sont physiologiquement présents dans les zones en contact étroit avec les antigènes étrangers, comme les muqueuses<sup>27</sup>.

Les Treg sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription foxP3, qui est nécessaire à leurs fonctions immunorégulatrices. Il a été précisé plus récemment que la déméthylation du promoteur du gène foxP3 (ou TSDR pour Treg specific demethylated region) permettait de reconnaître les Treg aux capacités suppressives plus importantes<sup>28</sup>.

Les Treg peuvent aussi être définis par l'expression de marqueurs membranaires<sup>25</sup>:

- une forte expression du CD25 (sous unité  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 ) mais cette molécule est non

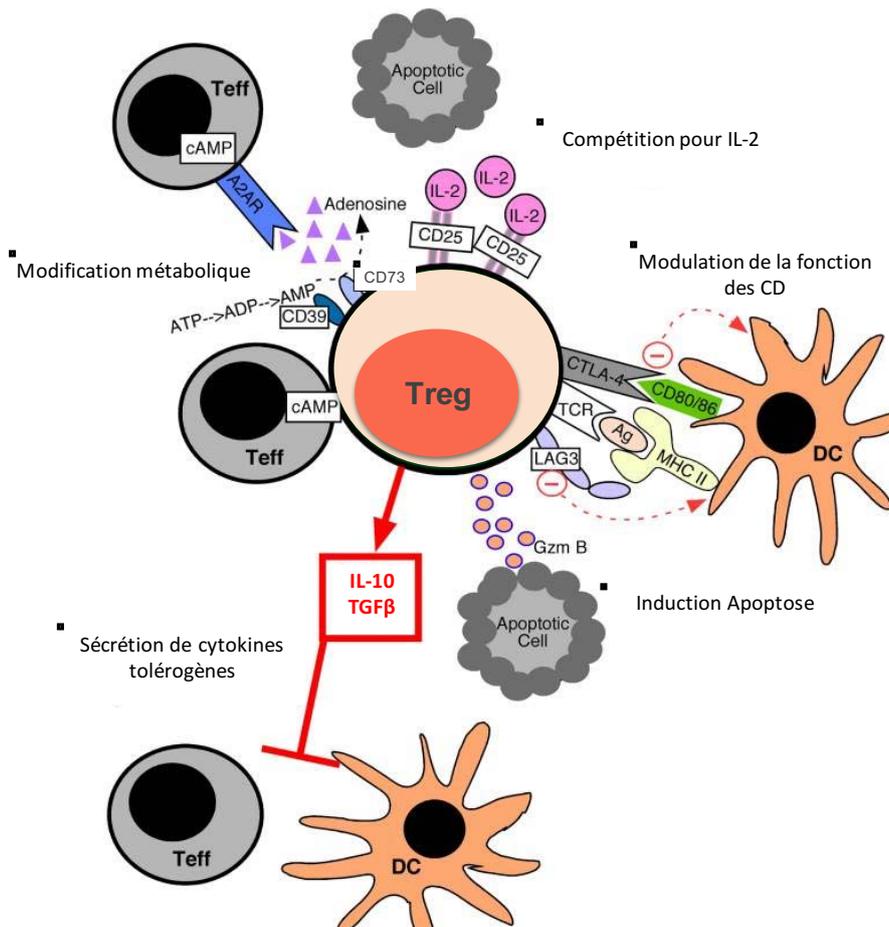
spécifique aux Treg , son expression peut être induite sur les LT CD4 effecteurs après activation sans que ceux-ci n'acquiescent de capacités immunorégulatrices

- l'absence d'expression du CD127 (récepteur de l'IL-7)<sup>29</sup>. Les LT régulateurs sont donc dépendants de la présence d'IL-2 dans leur environnement, contrairement aux LT effecteurs qui portent le CD127 et peuvent donc utiliser l'IL-7 pour maintenir une activation.

D'autres marqueurs phénotypiques ont été décrits comme le CD39 ou le CD153<sup>30</sup>. Les Treg exprimant ces marqueurs ont de plus importantes capacités suppressives. Il n'existe pas de marqueurs de membrane permettant de différencier les tTreg des pTreg. Le facteur de transcription Helios a été évoqué comme marqueur spécifique des tTreg mais ces résultats sont débattus<sup>31</sup>. Il semble par contre exister une différence épigénétique : les tTreg présentent une déméthylation plus importante des promoteurs du foxp3 (TSDR), signant une plus grande stabilité dans le phénotype régulateur<sup>32</sup>. Certaines molécules de surfaces permettent de distinguer le stade d'activation des Treg, différenciant les Treg naïfs CD25+CD127-CD45RA+ des Treg mémoires CD25+CD127-CD45RA<sup>-33</sup>, ayant les plus fortes capacités suppressives.

Les Treg ont plusieurs mécanismes d'action inhibiteur (Figure 5)<sup>27</sup>:

Figure 5 Mécanismes d'action inhibiteur des Treg . Adapté de Schmitt et William



- Sécrétion de cytokines inhibitrices  $TGF\beta^{34}$  et  $IL-10$  pro tolérogènes<sup>35</sup>.
- Compétition pour l'IL-2, privant les LT effecteurs de l'IL-2 nécessaire à leur survie
- Induction de l'apoptose par sécrétion de granzymes
- Modulation de la fonction des cellules dendritiques via le CTLA4 membranaire, qui induit une diminution de l'expression des molécules de co-stimulation CD80-CD86 à la surface des cellules dendritiques.
- Dégradation de l'ATP extracellulaire en adénosine par les molécules CD39 et CD73, induisant un environnement pro tolérogénique.

#### 1.2.5. Les lymphocytes T cytotoxiques CD8 +

A la sortie du thymus les LT CD8+ naïfs migrent comme les LT CD4+ vers les organes lymphoïdes secondaires afin de rencontrer leurs antigènes spécifiques présentés par les cellules dendritiques. L'activation des LT CD8+ naïfs engage 3 signaux : l'interaction du TCR - couple CMH I – peptide, les molécules de co-stimulation (le CD28 est exprimé de façon constitutive par les LT naïfs contrairement au CD40L qui ne sera exprimé qu'après activation) et la présence de cytokines activatrices. Les LT CD4+ permettent d'augmenter l'activation des LTCD8+ : les CD4+ entraînent une augmentation du nombre

de molécules CMH I sur les cellules dendritiques, et sécrètent des cytokines favorisant l'action cytotoxiques : IL-12 et IFN- $\gamma$ .

#### *Activité cytotoxique des LT CD8+ activés*

Une fois activé le LT CD8+ migre dans les tissus et élimine les cellules cibles exprimant le complexe CMH I-peptide dont il est spécifique par deux mécanismes de cytotoxicité distincts:

**La voie de perforine/granzyme** : Une synapse immunologique se met en place suite à la reconnaissance de la cellule cible : le cytosquelette du LT CD8+ se réorganise et permet la genèse d'un pôle sécrétoire. Les granules lytiques contiennent des enzymes protéolytiques, notamment de la perforine et du granzyme B.

- La perforine permet l'entrée du granzyme B dans le cytosol de la cellule cible : la perforine forme des pores de façon transitoire sur la membrane cellulaire, et surtout permet au Granzyme B entré par endocytose via son récepteur membranaire le mannose-6-phosphate présent sur les cellules cibles<sup>36</sup>, de sortir de sa vacuole
- Le granzyme B est une sérine protéase qui induit l'apoptose par deux voies : la première implique l'activation des caspases (caspases 8 et 3) et dépend de la présence de calcium ; la deuxième active l'apoptose mitochondriale par la voie BID qui induit une perméabilisation mitochondriale et le relargage du cytochrome-c. Le cytochrome-c conduit à la formation de l'apoptosome qui active ensuite la cascade des caspases par la caspase 9, puis 3 et 7<sup>37</sup>

**La voie Fas/FasL** : L'activation des LT CD8+ induit l'expression de Fas Ligand à leur surface membranaire, permettant une liaison aux récepteur Fas exprimés par les cellules cibles. Cette liaison entraîne la formation d'un complexe DISC (*death inducing signaling complex*) qui permet le recrutement des protéines adaptatrices FADD et TRADD. Leur interaction résulte en l'activation de la voie des caspases 8 et 10 et induit l'apoptose des cellules cibles directement ou par relargage de cytochrome-c par la mitochondrie. L'expression de FasL à la surface des LT CD8+ est dépendante du signal délivré *via* le TCR. Contrairement aux enzymes protéolytiques, la molécule FasL n'est pas stockée, sa synthèse n'est optimale que quelques heures après le signal TCR, sa mise en place est plus tardive par rapport à la voie de perforine/granzyme.

D'autre part, les LT CD8+ produisent aussi différentes cytokines après activation, principalement de l'IFN- $\gamma$ , du TNF- $\alpha$ , l'IL-2, CCL3. Ceci entraîne une augmentation de l'expression des molécules HLA sur les CPA et sur les cellules cibles et le recrutement d'autres cellules inflammatoires.

### *Formation des LT CD8+ mémoires*

Après élimination du pathogène, 90 à 95% des LT CD8+ effecteurs entrent en apoptose. Deux mécanismes de mort cellulaire interviennent : l'AICD (activation induced cell death) et l'ACAD (activated T cells autonomous cell death). L'AICD est induite par la voie TRAIL qui active la voie des caspases, cette mort est dépendante du signal TCR et de l'IL-2. L'ACAD est indépendante de l'activation du TCR, et se met en place lorsque la stimulation antigénique diminue. Elle implique l'expression de molécules pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 qui sont régulées principalement par deux cytokines : l'IL7 et l'IL-15<sup>38</sup>. Les LT CD8+ mémoires reçoivent des signaux de survie par ces deux cytokines ce qui permet d'inhiber l'apoptose. Le récepteur de l'IL-7 est composé du CD127 (IL-7R $\alpha$ ) qui est exprimé par les LT naïfs et les LT mémoires. Cependant, l'expression du CD127 est rapidement perdue lors de l'activation. Des travaux suggèrent que la présence précoce ou la réexpression de CD127 permet d'identifier les LT effectrices qui vont générer les LT mémoires<sup>39</sup>. Les 5 à 10% des cellules survivantes se différencient en cellules mémoires. Il existe plusieurs sous-populations de LTCD8+ mémoires, caractérisables par leurs molécules de surface et leur localisation :

- les LT CD8 mémoires centraux (CM) sont CCR7+ CD28+ CD127+ CD45RA-perforine – granzyme B - et sont présents dans les ganglions lymphatiques.
- les LT CD8 mémoires effecteurs (EM) sont CCR7- CD28+/- CD127+/- CD45RA-perforine + granzyme B + et sont présents en périphérie
- les TEMRA ou Terminally differentiated effector memory sont CCR7- CD28- CD127- CD45RA+ perforine + granzyme B +.

Les LT CD8+ EM sont dans un état de différenciation plus avancé avec une acquisition plus rapide des fonctions effectrices après stimulation antigénique que les LT CD8+ MC, mais les EM ont des capacités prolifératives plus faibles que les CM et la longueur de leurs télomères est plus réduite que les LT CD8+ CM<sup>40</sup>. La répartition des différents types des cellules T varie au cours de la vie, à la naissance la majorité des cellules T sont naïves puis suite aux infections rencontrées les cellules T s'activent, prolifèrent et des cellules mémoires sont sélectionnées. Les cellules mémoires atteignent un plateau vers l'âge de 30 ans pour rester stables jusqu'à l'âge de 65-70 ans où débute l'immuno-sénescence. Les cellules mémoires circulantes représentent une minorité (2 à 2,5%) des cellules T mémoires de l'organisme qui sont majoritairement retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires et dans les tissus<sup>41</sup>

### 1.3. Lymphocytes B et anticorps anti HLA donneur

#### 1.3.1. Ontogenèse des lymphocytes B

Les lymphocytes B représentent 5 à 15% des lymphocytes circulants<sup>42</sup>. Les différents stades de développement du LB sont identifiables grâce à leurs molécules de surfaces<sup>43</sup>. Avant d'acquérir un

récepteur spécifique d'un antigène et non réactif aux antigènes du Soi, le LB passe par plusieurs stades de développement. Le récepteur des LB est une immunoglobuline de surface constituée de deux chaînes lourdes liées à deux chaînes légères (Figure 6).

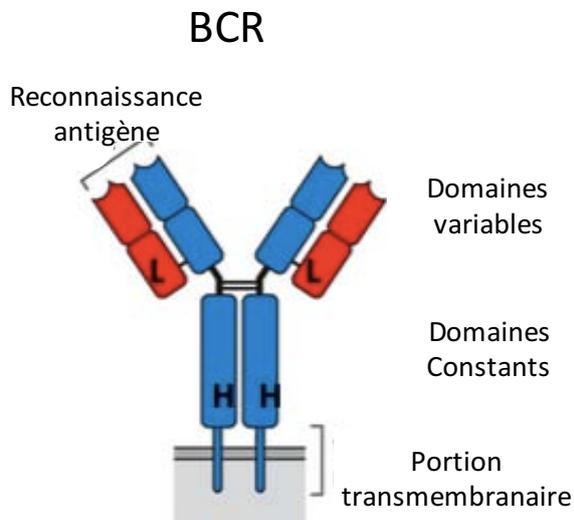


Figure 6. Structure schématique des récepteurs spécifiques de l'antigène des lymphocytes B

Chacune des chaînes comprend un domaine variable avec le site de fixation de l'antigène, et un domaine constant (1 domaine pour la chaîne légère, 3 domaines constants pour la chaîne lourde). La recombinaison VDJ à l'origine de l'hypervariabilité du BCR est comparable à celle des TCR. Dans la moelle osseuse, le progéniteur commun devient Pré Pro B après acquisition du marqueur de surface CD45R, puis Pro B lors de la recombinaison VDJ des chaînes lourdes avec expression d'un pré-BCR. Le marqueur de surface CD19 est exprimé à partir de ce stade. Au stade Pré B a lieu le réarrangement de la chaîne légère, aboutissant à l'expression d'un BCR IgM sur les LB immatures. Le LB immature est soumis aux checkpoints de la tolérance centrale dans la moelle osseuse : les LB présentant un BCR auto-réactif peuvent être détruits par apoptose lors de la délétion clonale, ou subir un phénomène d'édition avec un réarrangement de la chaîne légère du BCR par réactivation des enzymes RAG1/2 afin d'obtenir un BCR non autoréactif, ou rester anergiques<sup>44</sup>. Le LB immature rejoint la circulation sanguine devient LB transitionnel CD19+CD20+CD24hiCD38hi<sup>45</sup> et migre jusqu'à la rate (2% des LB circulants). Une nouvelle sélection négative par délétion aboutit à l'apoptose des LB autoréactifs. Le LB naïf CD24-CD38- migre ensuite vers les organes lymphoïdes secondaires. 60% des LB circulants sont des LB naïfs. Le LB naïf rencontre son antigène spécifique dans les organes lymphoïdes secondaires, et devient LB folliculaire : ils prolifèrent au contact des cellules dendritiques folliculaires et des Tfh et se différencient au sein d'un centre germinatif. Lors de l'hypermutation somatique les régions variables des chaînes lourdes et légères subissent des mutations multiples ce qui permet d'aboutir à un BCR et des anticorps ayant une affinité augmentée pour l'antigène<sup>46</sup>. La présence des LT CD4+ follicular helper (Tfh) est indispensable, ils délivrent les signaux de survie aux LB spécifiques de l'antigène et orientent par leur

sécrétion cytokinique, notamment IL-21, la commutation isotypique. La commutation isotypique concerne la partie constante des immunoglobulines, et permet aux plasmocytes de sécréter l'isotype adapté pour répondre à la réaction immunitaire : IgA IgD IgE ou IgG. Les lymphocytes folliculaires peuvent se différencier en LB mémoires à longue durée de vie CD24+ CD38- CD27+ IgD+/- (40% des LB circulants) ou en plasmablastes CD38+ CD24- et plasmocytes, sécréteurs d'anticorps spécifiques de l'antigène (<1% des LB circulants). La différenciation vers des lymphocytes B mémoires ou vers les plasmocytes est sous la dépendance de facteurs de transcription : le maintien de Pax-5 oriente vers les LB mémoires tandis que l'inactivation de Pax-5 de BCL-6 et de BLIMP1 aboutit à la différenciation en plasmocytes.

### 1.3.2. Fonctions des LB et anticorps anti –HLA

La sécrétion d'anticorps par les plasmocytes est l'un des rôles fondamentaux des LB. Les fonctions effectrices des anticorps sont triples : 1/ l'opsonisation : les anticorps se fixent sur les pathogènes extracellulaires lorsqu'ils reconnaissent leur épitope spécifique. La partie constante (Fc) de l'immunoglobuline est reconnue par les récepteurs Fc présents sur les macrophages, qui phagocytent ainsi la cellule cible. 2/ L'ADCC ou cytotoxicité médiée par les anticorps : la partie Fc de l'anticorps fixé à son antigène sur la cellule cible est reconnue par le récepteur FcγRIII ou CD16 présent sur les cellules NK, ce qui active les fonctions cytotoxiques du NK. 3/ L'activation du complément : le fragment Fc des IgG1, IgG3 et des IgM se fixent à C1q et enclenchent l'activation de la voie classique du complément, aboutissant à la lyse de la cellule cible. Ces deux dernières fonctions ont un rôle fondamental dans les rejets humoraux en transplantation. Les LB reconnaissant les molécules HLA du donneur comme peptides étrangers sont activés, prolifèrent et se différencient en plasmocytes sécrétant des anticorps spécifiques du donneur (DSA)<sup>47</sup>. Les DSA entraînent une lyse des cellules endothéliales du greffon par activation de la voie du complément ou par cytotoxicité induite par les anticorps (ADCC) en activant notamment les cellules NK. Lorsque les patients sont immunisés avant la transplantation, c'est à dire qu'ils ont rencontré des antigènes HLA étrangers au cours de précédentes transplantations, de grossesses, ou de transfusions, et ont donc des LB mémoires présents au sein des organes lymphoïdes secondaires, les DSA peuvent être présents avant la transplantation. Ces DSA pré-formés sont détectés dans le sérum par les techniques de Luminex décrites précédemment.

Les LB sont également des cellules présentatrices d'antigènes, apprêtant les peptides antigéniques grâce à leurs CMH II et les présentant aux lymphocytes T CD4+<sup>48</sup>. Les LB comme les cellules dendritiques portent les signaux nécessaires à l'activation des LT CD80 et CD86. Les LB sécrètent de nombreuses cytokines selon l'environnement inflammatoire. En présence de LTh1, les LB peuvent sécréter de l'interleukine IL-12, IL-2, et de l'interféron  $\gamma$  ; en présence de Th2, le LB sécrète de l'IL-4,

l'IL-6 et l'IL-1. Réciproquement, la sécrétion en cytokines du LB peut orienter la polarisation des LT naïfs vers un profil Th1 ou Th2 <sup>49</sup>.

Enfin il a été décrit récemment que les lymphocytes B pouvaient présenter des fonctions régulatrices (Breg). Il existe plusieurs sous-populations de Breg capables de sécréter après activation par le CD40L des cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10 et le TGFβ <sup>50</sup> et ainsi bloquer la différenciation des LT. Une des sous-populations de Breg les plus décrites sont les LB transitionnels CD38hiCD24hi <sup>51</sup>. Les Breg ont été décrits dans de nombreuses maladies auto-immunes et infectieuses <sup>52, 53</sup> et ont un rôle prépondérant en transplantation rénale, qui sera développé dans la 3<sup>ème</sup> partie de cette introduction.

### 1.3.3. Détection des anticorps anti HLA

La détection des anticorps anti-HLA a considérablement progressé ces dernières années. Nous allons brièvement exposer par ordre chronologique les différentes techniques utilisées.

#### Lymphocytotoxicité dépendante du complément ( LCT )

La LCT consiste à mettre le sérum du patient en contact avec des lymphocytes B et T allogéniques dont le phénotype HLA est connu, en présence de complément. En cas de présence d'anticorps anti HLA, les anticorps se fixent aux molécules HLA des lymphocytes et activent le complément. Le pourcentage de cellules lysées est évalué par l'adjonction d'un colorant vital. Une lyse supérieure à 20% correspond à un test positif. Les IgM qui peuvent être présents dans le sérum sont considérés comme auto-anticorps, l'ajout de dithiotreitol (DTT) permet de lyser les ponts disulfures des IgM empêchant ainsi l'activation du complément par les IgM et ne conserve que la cytotoxicité liée aux IgG. La LCT a révolutionné la transplantation en évitant les rejets hyper aigus par la réalisation du crossmatch <sup>54</sup>. Le cross match en LCT est toujours réalisé aujourd'hui et contre-indique la greffe en cas de positivité, en dehors de certains protocoles de désensibilisation pour les patients hyper-immunisés <sup>55</sup>. La LCT était également utilisée pour évaluer le degré d'immunisation des patients avant la greffe, en définissant un PRA (Panel reactive Antibody) exprimé en pourcentage de lymphocytes lysé d'un panel représentatif de la répartition des phénotypes HLA dans la population. Le PRA a été supplanté par les nouvelles techniques de détection des anticorps permettant une définition plus précise de l'immunisation.

#### Cross match en cytométrie de flux

La cytométrie de flux permet de détecter et de caractériser des cellules préalablement incubées avec des anticorps couplés à des fluorochromes spécifiques ciblant les molécules d'intérêt. Les cellules passent devant un faisceau laser qui compte et détecte les fluorochromes fixés. Dans le cadre du cross

match en cytométrie de flux, le sérum du receveur est mis en contact avec les lymphocytes du donneur. Des anticorps conjugués à des fluorochromes sont ajoutés au milieu : anticorps anti CD3 afin de détecter les lymphocytes T et anti CD19 afin de détecter les lymphocytes B. Des anticorps anti-IgG et anti-IgM sont ajoutés au milieu afin de typer les isotypes des anticorps fixés aux lymphocytes ayant reconnu les molécules HLA. Les patients transplantés avec un crossmatch en cytométrie de flux (CMF) positif et un crossmatch LCT négatif ont un plus grand risque de rejet aigu humoral que les patients avec DSA et crossmatch CMF négatif<sup>56</sup>

#### Tests ELISA

La technique ELISA est un test de phase solide, utilisant des molécules HLA adsorbées sur des puits en polystyrènes<sup>57</sup>. Le sérum du patient est déposé dans les puits. Les anticorps IgG anti-HLA présentes dans le sérum se lient aux antigènes fixés au fond des puits dont elles sont spécifiques, et sont révélées par un anticorps secondaire anti-IgG humaine couplé à une enzyme. L'ajout du substrat entraîne une réaction colorée et signe la positivité du test, analysé par un lecteur de densité optique. Les tests de phases solides (ELISA et Luminex que nous allons décrire ensuite) peuvent être réalisés en dépistage (mélange de molécules HLA en provenance de plusieurs cellules dans chacun des puits) et Single Antigen (un seul antigène HLA par puits). La technique ELISA n'est plus utilisée en histocompatibilité depuis l'avènement des techniques Luminex

#### Luminex®

La technique Luminex est également un test de phase solide. Au lieu d'être déposé dans des puits comme en ELISA, le sérum du patient est incubé avec des antigènes HLA purifiés fixés sur des microsphères qui sont caractérisées par un mélange de deux fluorochromes. Un anticorps secondaire anti-IgG humaine couplé au fluorochrome phycoérythrine est ajouté au milieu. Les billes sont ensuite passées dans un cytomètre qui permet de distinguer les billes en fonction de leur fluorescence propre puis à l'aide d'un deuxième laser de déterminer une valeur de fluorescence liée à la présence d'anticorps anti-HLA fixés par l'anticorps anti-IgG humaines couplé à la phycoérythrine<sup>58</sup>. Le mélange des 2 fluorochromes des microsphères permet de définir une centaine de numéros de billes différents. Il existe des tests de dépistages comprenant un mélange de billes recouvertes de molécules HLA de classe I et II et des tests en single antigen où chaque bille est recouverte d'une seule molécule HLA. Le Test Luminex n'est pas quantitatif, mais l'intensité de fluorescence de la phycoérythrine exprimée en MFI (ou Mean Fluorescence Intensity) permet d'estimer l'intensité de l'immunisation anti HLA. En pré greffe, les seuils MFI de positivité sont variables selon les laboratoires. L'Agence de Biomédecine considère qu'une MFI inférieure à 500 est négative<sup>59</sup>. La majorité des centres considère qu'une MFI supérieure à 2000 entraîne un risque immunologique important et contre-indique la transplantation

avec un greffon porteur des molécules HLA concernées. Il semble que la présence d'anticorps anti-HLA à des seuils jusque 3000 de MFI puissent être tolérés sous réserve d'un cross match LCT négatif, notamment pour augmenter les chances d'accès à la transplantation des patients hyperimmunisés (ayant plus de 85% de donneurs incompatibles)<sup>60</sup>. Après la transplantation, l'apparition d'anticorps anti HLA spécifique du donneur avec des MFI > 6000 est associée à une moins bonne survie de greffon (34% de survie à 8 ans contre 63% chez les patients avec DSA pré formés)<sup>61</sup>

#### 1.4. Les cellules NK

Les cellules Natural Killers représentent 5 à 10% des lymphocytes circulants. Elles proviennent du progéniteur commun lymphoïde mais contrairement aux LB et aux LT elles ne sont pas soumises au réarrangement des gènes des récepteurs, et n'ont donc pas de récepteur spécifique à l'antigène. Les cellules NK font partie du système immunitaire inné et constituent la première ligne de défense contre les pathogènes intracellulaires, contrôlant la réplication du pathogène pendant les 7 jours nécessaires à la différenciation des LT CD8 en lymphocytes cytotoxiques fonctionnels. L'activité des NK est stimulée par l'IFN $\alpha$  et l'IL-12. Les NK produisent de l'IFN $\gamma$  qui augmente les capacités de phagocytose des macrophages. Les cellules NK sont reconnaissables par l'expression du CD56, dont l'intensité d'expression varie selon l'activité : les NK exprimant fortement le CD56 ont un rôle principal de production de cytokines, les NK exprimant faiblement le CD56 ont un rôle de cytotoxicité. Deux mécanismes distincts entraînent les fonctions cytotoxiques des NK.

Le premier mécanisme implique la reconnaissance des molécules HLA de classe I par les récepteurs KIR (inhibiteurs) ou activateurs (comme NKG2D ou NKp46). Les récepteurs KIR appartiennent à la famille des immunoglobulines. Ces récepteurs inhibent l'activité cytotoxique du NK lorsqu'ils reconnaissent une molécule CMH de classe I du Soi sur la cellule cible. Contrairement aux récepteurs présents sur les LT et LB, les récepteurs de K ne sont pas soumis à l'exclusion allélique, et peuvent donc exprimer plusieurs récepteurs KIR. A l'inverse en cas de présence anormale de molécules de CMH-I non associées à la  $\beta$ 2-microglobuline (lorsque la cellule est en situation de stress (infection, lésions de l'ADN), les récepteurs activateurs comme les NKG2D ou NKp46 induisent l'activité cytotoxique du NK et la lyse de la cellule cible. Les fonctions cytotoxiques des NK sont comparables à celles des CD8+ cytotoxiques : sécrétion de granzyme-perforine et cytotoxicité par contact cellulaire via l'expression de Fas-FasL. Le deuxième mode d'action des NK fait intervenir le récepteur CD16 ou Fc $\gamma$ RIII. Ce récepteur reconnaît la portion Fc des immunoglobulines fixées sur leurs cibles antigéniques. Les cellules NK induisent alors la lyse de la cellule cible par un mécanisme appelé ADCC ou cytotoxicité médiée par les anticorps.

### 1.5. Impact de l'immunosuppression

La stratégie thérapeutique immunosuppressive utilisée actuellement cible principalement le compartiment lymphocytaire T, ce qui a permis une diminution drastique des rejets cellulaires aigus au cours des dernières décennies.

#### Traitement d'induction

La majorité des équipes réalise un traitement d'induction au cours de la période péri-opératoire afin de réaliser une profonde immunosuppression au moment où les cellules du donneur sont les plus immunogènes, notamment à cause des mécanismes d'ischémie -reperfusion. Deux stratégies thérapeutiques sont actuellement recommandées en transplantation rénale<sup>62, 63</sup> selon les recommandations KDIGO 2017<sup>64</sup>.

- Le traitement d'induction non déplétant

Le basiliximab est un anticorps monoclonal chimérique murin/humain dirigé contre la chaîne alpha du récepteur de l'interleukine-2 (ou CD25). Le CD25 est exprimé par les cellules T effectrices venant d'être activées, et de manière constitutionnelle par les nTreg. En empêchant la liaison de l'IL-2, le basiliximab empêche la prolifération des lymphocytes T activés impliqués dans le rejet d'allogreffe, mais diminue également le nombre de nTreg. Ce traitement est recommandé principalement en première ligne dans les greffes à faible risque immunologique, chez les patients non immunisés.

- Le traitement d'induction déplétant lymphocytaire

La thymoglobuline est une préparation polyclonale réalisée à partir d'immunoglobulines de lapins immunisés contre des thymocytes humains, ciblant ainsi les multiples antigènes présentés par les thymocytes. Les lymphocytes sont détruits par apoptose. La déplétion induite sur les LT CD4+ and CD8+ dure plusieurs mois, les LT CD8+ T recouvrant plus rapidement et de manière plus complète leur niveau antérieur. L'induction par ATG diminue le nombre de Treg mais moins que le nombre de LT effecteurs CD8+, entraînant donc un ratio Treg/Teff favorable à la tolérance du greffon. De plus, la reconstitution des Treg est plus rapide ce qui contribue à ce ratio favorable<sup>65</sup>. L'impact immunologique de l'ATG serait non seulement lié à la déplétion lymphocytaire mais aussi à la relative préservation des Treg<sup>66</sup>. La thymoglobuline est principalement recommandée chez les patients à fort risque immunologique. Il est toutefois notable que les recommandations de traitements d'induction ne sont pas drastiquement suivies par les centres transplantateurs et leur indication est laissée à la discrétion des néphrologues dans le contexte des habitudes des centres et adaptée selon les profils de patients, leur âge, leur risque de reprise retardée des greffons ou leurs risques infectieux par exemple.

## Traitement d'entretien

Un traitement d'entretien est instauré dès les premiers jours de la transplantation, qui sera poursuivi à vie. Le schéma habituel est composé d'une association de deux ou trois immunosuppresseurs (Tableau I)<sup>67</sup>.

Tableau I. Exemple de schémas thérapeutiques d'immunosuppression (Adapté des Clinical Guidelines for Kidney Transplantation AMB 2018)<sup>67</sup>

Faible risque immunologique chez le receveur	Risque immunologique intermédiaire	Fort risque immunologique	Donneur à risque (risque de reprise retardée de fonction)
<b>Pré opératoire</b>			
Basiliximab 20mg IV J0 Possibilité de ne pas réaliser d'induction chez les patients HLA compatibles	Basiliximab 20mg IV J0	Anti Thymocyte Globuline 1,5mg/kg	Anti Thymocyte Globuline 1 à 1,5mg/kg
Methylprednisolone 125mg IV	Methylprednisolone 125mg IV	Methylprednisolone 125mg IV	Methylprednisolone de 125 à 500 mg IV
<b>Post opératoire</b>			
Basiliximab 20mg IV J4 Possibilité de ne pas réaliser d'induction chez les patients HLA compatibles	Basiliximab 20mg IV J4	Anti Thymocyte Globuline : dose totale = 6-7,5mg/kg	Anti Thymocyte globuline : dose totale = 3-4mg/kg
Arrêt rapide des corticoïdes : Methylprednisolone 40mg IV à J1. En cas de DFG, la prednisone permet d'utiliser des taux plus faibles de CNI	Ne pas réaliser d'arrêt rapide des corticoïdes	Ne pas réaliser d'arrêt rapide des corticoïdes	Arrêt des corticoïdes possibles en cas de récupération d'une fonction de greffon
	Corticoïdes : prednisone débutée à 0,7mg/kg/j avec décroissance jusque 0,3mg/kg/j à 1 mois	Corticoïdes : prednisone débutée à 0,7mg/kg/j avec décroissance jusque 0,3mg/kg/j à 1 mois	
Tacrolimus en post opératoire immédiat 0,075mg/kg/12h Objectif résiduel 8-12 mcg/mL En l'absence de prise per os possible, Tacrolimus IV en /4 la dose	Tacrolimus en post opératoire immédiat 0,075mg/kg/12h Objectif résiduel 8-12 mcg/mL En l'absence de prise per os possible, Tacrolimus IV en /4 la dose	Tacrolimus en post opératoire en relais de l'ATG 0,075mg/kg/12h Objectif résiduel 8-12 mcg/mL En l'absence de prise per os possible, Tacrolimus IV en /4 la dose	Débuter le Tacrolimus lorsque la fonction rénale s'est stabilisée 0,075mg/kg/12h Objectif résiduel 8-12 mcg/mL En l'absence de prise per os possible, Tacrolimus IV en /4 la dose
Mycophenolate mofetil 1 gramme / 12 heures	Mycophenolate mofetil 1 gramme / 12 heures	Mycophenolate mofetil 1 gramme / 12 heures	Mycophenolate mofetil de 500 mg à 1 gramme / 12 heures

- Les anti-calcineurines :

Les inhibiteurs de la calcineurine, le tacrolimus (FK506) et la cyclosporine A (CsA), sont les immunosuppresseurs les plus utilisés. La calcineurine est une phosphatase déphosphorylant le facteur de transcription cytosolique NFAT (nuclear factor of activated T cells) qui entraîne la transcription de gènes pro-inflammatoires, notamment l'IL-2. La déphosphorylation est indispensable à la translocation au noyau. Les anti-calcineurines bloquent ainsi la synthèse de l'IL-2, nécessaire à la prolifération, la survie et à la maturation des LT. Alors que la fonction exercée par l'IL-2 sur les LT effecteurs conventionnels peut être substituée par d'autres cytokines (comme IL-7) l'IL-2 est indispensable au développement et à la fonction des Treg. Ainsi les CNI ont un impact négatif sur les Treg en inhibant directement leur activation et en inhibant la génération de pTreg, et indirectement en limitant la production d'IL-2 par les LT conventionnels. A l'inverse la prise de CNI ne semblent pas avoir d'impact sur l'expression du CD28 sur les LT CD8+<sup>68</sup> De plus les CNI ont une néphrotoxicité intrinsèque et un impact hémodynamique sur la microcirculation rénale, entraînant une vasoconstriction des artères afférentes. Des protocoles cliniques visant à limiter l'utilisation des CNI montrent une meilleure restauration des Treg en l'absence de CNI, néanmoins il y a une augmentation

du nombre de rejets. Ces molécules affectent directement les voies d'activation et de prolifération des lymphocytes T, mais ont aussi un impact indirect sur les lymphocytes B, en inhibant la co-stimulation des LB par les LT CD4+.<sup>69</sup>

- Les antiprolifératifs :

L'acide mycophélonique (Myfortic) et le Mycophenolate Mofetil (MMF) sa pré-droque, exercent des capacités immunosuppressives en inhibant la synthèse de novo des purines par blocage de l'enzyme IMPDH (inosine monophosphate dehydrogenase). Les LB et LT sont dépendants de la synthèse de novo des purines pour leur prolifération<sup>70</sup>. Le MMF permet une conservation du taux et de la fonction des Treg et ne modifie pas la sous population CD8+CD28-<sup>68</sup>

- Les corticoïdes

Les stéroïdes entraînent une multitude d'effets anti-inflammatoires. Une fois liés à leurs récepteurs cytosoliques, les stéroïdes transloquent dans le noyau où ils inhibent la transcription de NFκB empêchant la transcription de gènes codant des cytokines pro-inflammatoires. Les glucocorticoïdes peuvent aussi se lier au TCR, diminuant le 1<sup>er</sup> signal d'activation. Les corticoïdes extracellulaires ont aussi une action anti-inflammatoire en limitant l'interaction entre les LT et les CPA, en diminuant le rolling leucocytaire et l'adhésion des LT, limitant ainsi leur migration. Lors des rejets de greffe, l'utilisation de méthylprednisolone modifie la composition des LT en favorisant les Treg. Les stéroïdes sont capables d'induire des pTreg en permettant l'expression de GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper), qui facilite l'expression de TGF-β et de FOXP3

- Les inhibiteurs de mTOR

Les mTORi agissent en inhibant la serine/threonine kinase mTOR par inhibition de phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et Akt. Les complexes mTOR sont impliqués dans la différenciation des sous populations CD4+ et orientent la différenciation des LT CD8+ effecteur vers les CD8 mémoire. Ainsi, le traitement par rapamycine inhibe les LT CD8+ effecteurs. Les patients sous mTORi en transplantation rénale ont un taux de Treg 4 fois supérieur aux patients traités par ciclosporine. Le relais d'un traitement par CNI vers un traitement par rapamycine entraîne une augmentation des Treg périphériques pendant plusieurs mois. Cependant cette augmentation des Treg n'est pas associée à une amélioration clinique, il existe une discrète amélioration de débit de filtration glomérulaire par levée de l'impact hémodynamique des CNI, mais pas de diminution du nombre de rejet, de la survie greffon, ou de l'incidence de cancers.

- Autres immunothérapies

La protéine recombinante CTLA4-Ig ou Belatacept est autorisée dans le cadre de la transplantation rénale depuis 2011. Le Belatacept se lie aux molécules CD80 et CD86 à la surface des LT bloquant ainsi le 2<sup>ème</sup> signal. Le suivi à long terme des patients traités par Belatacept retrouve une meilleure fonction

de greffon à 5 ans par rapport aux patients traités par ciclosporine<sup>71,72,73</sup>. Le blocage de la costimulation LT-LB inhibe la formation des LB mémoires, et la production d'anti HLA spécifiques du donneur<sup>74</sup>. Bien que les patients traités par Belatacept présentent une meilleure survie de greffe, il existe un risque de rejets aigus supérieur à celui des patients traités par CNI<sup>75</sup>.

Le Rituximab est un anticorps anti-CD20 qui entraîne une déplétion des LB mémoires, naïfs, transitionnels qui expriment le CD20 mais qui n'a pas d'effet sur les plasmocytes CD20<sup>-76</sup>. Ce traitement est utilisé dans certains protocoles de désensibilisation<sup>77</sup>, et dans le traitement des rejets humoraux aigus<sup>73</sup>.

2. L'analyse histologique du greffon rénal : pierre angulaire du pronostic de la greffe.

### 2.1. Classification de Banff

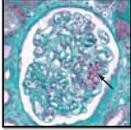
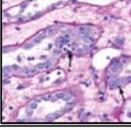
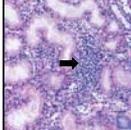
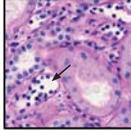
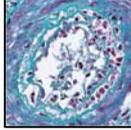
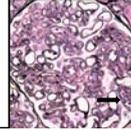
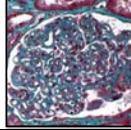
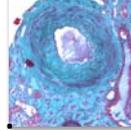
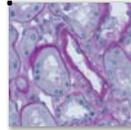
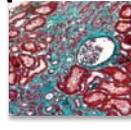
Le diagnostic de l'atteinte du greffon rénal est posé par l'analyse histologique de la biopsie. Afin d'homogénéiser les diagnostics de rejet de greffe et de limiter la subjectivité inhérente à l'interprétation histologique, un comité d'anatomopathologistes et de néphrologues a élaboré en 1991 la classification de Banff<sup>78</sup>. La classification de Banff propose une description semi-quantitative, côtée de 0 à 3, des lésions élémentaires aiguës (avec infiltrat inflammatoire) et chroniques (séquellaires) de la biopsie (Tableau II). La classification a évolué au fur et à mesure d'une meilleure compréhension des mécanismes de rejets de greffon (Tableau II). La détection de C4d (produit de dégradation de la cascade du complément) en immunohistochimie ou immunofluorescence a été ajoutée à la classification de Banff en 2007. Ce dépôt signe l'activation de la voie classique du complément par les anticorps anti-greffon, principalement les anticorps anti-HLA du donneur ou DSA. La dernière classification de Banff 2017 intègre le « diagnostic moléculaire » ou l'analyse du transcriptome dans la biopsie pour orienter les diagnostics histologiques de rejet cellulaire ou humoral<sup>79</sup>.

Tableau II Evolution de la classification de Banff. D'après Hara<sup>78</sup>

Score	Classification de Banff									
	1993	1997	2003	2005	2007	2009	2011	2013	2015	2017
i	0-3									
t	0-3									
v	0-3									
g	0-3									
ptc	-	-	0-3							
ti	-	-	-	-	0-3					
i-IFTA	-	-	-	-	-	-	-	-	0-3	TCMR
C4d	-	-	-	-	0-3			C4d - ABMR		
cg	0-3									
mm		0-3								
ah	0-3									
aah	-	-	-	-	0-3					
cv	0-3									
ci	0-3									
cv	0-3									
ct	0-3									
<b>Biomolecular assesment</b>								ABMR		

L'association des différentes lésions élémentaires permet de poser le diagnostic de l'atteinte du greffon (Tableau III) : biopsie normale, rejet cellulaire, humoral, fibrose interstitielle et atrophie tubulaire, lésions borderlines, ou d'autres atteintes non immunologiques (toxicité des immunosuppresseurs, néphropathie virale ou bactérienne, reflux). L'amélioration du score de Banff a permis de préciser les lésions chroniques en éliminant la terminologie de « néphropathie chronique d'allogreffe » depuis 2007. Cette entité recouvrait les rejets humoraux et cellulaires chroniques aussi bien que les lésions non allo immunes, de toxicité des anti calcineurines ou des atteintes virales.

**Tableau III. Lésions élémentaires de la classification de Banff**

Lésion élémentaire	Définition	Score	Exemple
<b>Lésions aiguës</b>			
Score g ou glomérulite	Occlusion de la lumière d'au moins un capillaire glomérulaires par des éléments mononucléés ou par des cellules endothéliales turgescentes, le score est établi en fonction du pourcentage de glomérules atteints.	g0 : absence g1 : 1-25% de glomérules occlus g2 : 25-75% g3 : plus de 75% de glomérules occlus.	
Score t ou tubulite	Tubulite lymphocytaire établie par le nombre de cellules inflammatoires par section tubulaire	t0 : absence t1 : 1 à 4 lymphocytes par section tubulaire t2 : 5 à 10 lymphocytes par section tubulaire t3 : > 10 lymphocytes ou > 2 foyers de destruction de la membrane basale tubulaire	
Score i ou infiltrat interstitiel	Présence d'un infiltrat inflammatoire au niveau du cortex rénal dehors des zones de fibrose, du cortex sous-capsulaire et de l'adventice des gros vaisseaux.	i0 : <10% de la surface du cortex atteinte i1 : de 10 à 25% i2 : de 26 à 50% i3 : > 50%	
Score cpt ou capillarite péritubulaire	Nombre de cellules inflammatoires présentes dans la lumière des capillaires péritubulaires (Les capillaires coupés longitudinalement ne sont pas étudiés)	cpt0 : moins de 3 éléments par capillaire cpt1 : 3 à 4 éléments par capillaire cpt2 : 5 à 10 éléments par capillaire cpt3 : plus de 10 éléments par capillaire	
Score v ou endothélite	Obstruction vasculaire et extension de l'inflammation aux différentes tuniques du vaisseau	v0 : absence v1 : obstruction ≤ 25% v2 : obstruction > 25% v3 : inflammation transmurale de la paroi vasculaire ou nécrose fibrinoïde de la média	
Score ti ou inflammation totale	Présence d'un infiltrat inflammatoire en prenant en compte l'intégralité de la surface du cortex rénal	ti0 : <10% de la surface du cortex atteinte ti1 : de 10 à 25% ti2 : de 26 à 50% ti3 : > 50%	
<b>Lésions chroniques</b>			
Score cg glomérulopathie d'allogreffe	Présence de dédoublement de la membrane basale glomérulaire	cg0 : absence cg1a : absence en microscopie optique, mais doubles contours visibles en microscopie électronique sur au moins 3 capillaires associés à une turgescence des cellules endothéliales cg1b : DC sur au moins une anse cg2 : 26 à 50% des anses capillaires présentent des DC dans le glomérule le plus atteint cg3 : > 50% des anses capillaires	
Score mm hyperplasie mésangiale	Épaississement au moins modéré des tiges mésangiales défini par un épaississement large de + de 2 noyaux de cellules mésangiales dans 2 tiges.	mm0 : absence mm1 : < 25% des glomérules atteints mm2 : de 26 à 50% mm3 : > 50%	
Score cv endarterite fibreuse	épaississement fibro-intimal des artères,	cv0 : absence cv1 : obstruction de 25% de la lumière cv2 : obstruction de 26 à 50% cv3 : obstruction de plus de 50%	
Score ah hyalinose artériolaire	dépôts hyalins artériolaires PAS+, grades en fonction du nombre d'artérioles atteintes et du caractère circonférentiel ou non des dépôts.	ah0 : absence de dépôt hyalin ah1 : hyalinose non circonférentielle sur 1 artère ah2 : hyalinose non circonférentielle sur au moins 2 artères ah3 : Hyalinose circonférentielle	
Score ci fibrose interstitielle		ci0 : Fibrose interstitielle <5% de la surface corticale ci1 : Présence de fibrose sur 6 à 25% de la surface corticale ci2 : de 26 à 50% de la surface corticale ci3 : >50% de de la surface corticale	
Score ct atrophie tubulaire		ct0 : Absence de tube atrophique ct1 : < 25% de tubes atrophiques ct2 : de 26 à 50% de tubes atrophiques ct3 : >50% de tubes atrophiques	

## 2.2. Histologie des rejets cellulaires

Le rejet cellulaire aigu ( ou TCMR dans la classification de Banff T cell mediated rejection), fréquent avant l'utilisation des anti-calcineurines, concerne aujourd'hui 10% des biopsies à 12 mois de la transplantation<sup>80</sup>. Les lésions cellulaires sont définies par la présence de lymphocytes au sein des tubules rénaux ( $t \geq 2$ ) associée à un infiltrat lymphocytaire dans l'interstitium ( $i \geq 2$ ), et par une atteinte des cellules endothéliales (endartérite,  $v > 0$ ). L'infiltrat est principalement constitué de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques<sup>81</sup>.

Le traitement des rejets cellulaires est basé sur la réalisation de bolus de corticoïdes et le maintien d'une immunosuppression d'entretien suffisante, en général une trithérapie comprenant un inhibiteur de calcineurine, un anti-metaboliques et des corticoïdes. Le pronostic du rejet aigu cellulaire traité précocement est relativement bon, avec une récupération de la fonction du greffon<sup>82</sup>.

Lorsque la tubulite et l'infiltrat interstitiel sont moins importants ( $t > 0$  and  $i \leq 1$  or  $t1$  and  $i \geq 2$ ) et sans atteinte vasculaire ( $v0$ ), l'histologie retenue est dite « suspicious » TCMR ou borderline. Les lésions borderlines sont retrouvées sur environ 5% des biopsies de surveillance à 1 an de la transplantation<sup>80</sup>. Leur prise en charge thérapeutique est débattue<sup>83</sup>, mais la plupart des équipes recommandent de les traiter comme un rejet cellulaire actif par bolus de corticoïdes si elles s'accompagnent d'une dégradation de fonction rénale. Un essai randomisé national (l'étude I4BIS, investigateur principal O Thauvat, promoteur CHU Lyon) est actuellement en cours qui devrait permettre de répondre à la question de la nécessité ou pas de traiter des lésions borderlines sans dégradation de fonction rénale. La définition du rejet cellulaire chronique actif a récemment évolué. Jusqu'en 2017 seules les lésions vasculaires chroniques d'endartérite fibreuse (cv) étaient considérées comme liées à un rejet cellulaire chronique. La classification de Banff 2017 s'est enrichie des grades IA et IB de rejet cellulaire chronique actif, définis par la présence d'un infiltrat inflammatoire modéré à sévère au sein des zones de fibrose associé à une tubulite modérée à sévère ( $i\text{-IFTA} \geq 2 + t \geq 2 + ti \geq 2$ ). Les lésions vasculaires cv définissent le grade II du rejet chronique. Néanmoins, la présence d'infiltrat inflammatoire est une lésion peu spécifique, la classification de Banff souligne que cet infiltrat n'est à considérer comme rejet cellulaire qu'en l'absence de signes cliniques et biologiques évoquant une autre étiologie, notamment la présence de DSA orientant vers un rejet humoral chronique, ou une charge virale BKv orientant vers une néphropathie virale. Il n'existe pas de traitement immunosuppresseur permettant d'améliorer les lésions chroniques, mais un traitement immunosuppresseur intensif peut être maintenu afin de limiter la progression des lésions.

Tableau IV. Classification de Banff (d'après Roufosse)<sup>79</sup>

Catégorie 1 : Biopsie Normale ou modifications non significatives	
Catégorie 2 : Rejet médié par les anticorps	
Groupes de critères diagnostics	
<p><b>C4d fixation sans signes de rejet</b></p> <p>C4d &gt; 1 en IF ou &gt; 0 en IHC + t0, v0, absence d'endartérite fibreuse ni infiltration mononucléaire, absence de critères d'activité (groupe 1) absence de critère de chronicité (groupe 4) absence d'augmentation des transcripts associés au rejet humoral</p> <p><b>Rejet humoral Actif : associe les 3 items suivants</b></p> <p>Absence de critère de chronicité ( groupe 4) + Au moins un critères d'activité ( Groupe 1) + Au moins un critère d'interaction Ac-tissus (groupe 2) + DSA ou équivalent ( groupe 3)</p> <p><b>Rejet humoral Chronic Actif : associe les 3 items suivants</b></p> <p>Au moins un critère de chronicité ( groupe 4) + Au moins un critère d'interaction Ac-tissus (groupe 2) + DSA ou équivalent ( groupe 3)</p> <p><b>Rejet humoral Chronic</b></p> <p>Présence de double contours de la MG ou de lamélisation membrane des capillaires péri-tubulaires en l'absence de critère pour une interaction récente anticorps-tissu (critères du groupe 2) mais avec des éléments pour un diagnostic précédent de RHA ou de RHCA ou de DSA.</p>	<p><b>Groupe 1 : critères d'activité du rejet humoral</b></p> <p>→ g &gt; 0 en l'absence de GN ou ptc &gt; 0 en l'absence de lésions TCMR ou borderline → v &gt; 0 → Microangiopathie thrombotique sans autre étiologie → Nécrose tubulaire aigue sans autre étiologie</p> <p><b>Groupe 2 : Interaction anticorps - tissu</b></p> <p>→ C4d &gt; 1 en IF ou &gt; 0 en IHC → Inflammation de la microvascularisation modérée ( g+ptc&gt;1) en l'absence de récidence ou de GN de novo, de lésions BL, de TCMR aigu. En cas de lésions BL, de TCMR, d'infection, g&gt;1 nécessaire → Augmentation des transcripts validés comme associés au rejet humoral en biologie moléculaire</p> <p><b>Groupe 3 : DSA ou équivalent</b></p> <p>→ DSA (anti-HLA ou autre spécificité) → C4d &gt;1 en IF ou &gt; 0 en IHC → Augmentation des transcripts validés comme associés au rejet humoral en biologie moléculaire</p> <p><b>Groupe 4 : Paramètres histologique de rejet chronique humoral</b></p> <p>→ cg&gt;0 (en MO ou ME) en dehors des biopsies avec atteinte de MAT chronique → 7 couches dans un capillaire peri tubulaire ou &gt; 5 couches dans 2 capillaires en ME → Fibrose intimale cv&gt;0 en l'absence d'autres étiologies , (infiltrats leucocytaires sous intimaux en faveur en l'absence d'antécédent de TCMR mais non requis pour le diagnostic)</p>
<p><b>Catégorie 3 Lésions borderline</b></p> <p>t &gt; 0 + i ≤ 1 ou t1 + i ≥ 2</p>	
<p><b>Catégorie 4 : Rejet médié par les lymphocytes T</b></p> <p><b>Rejet cellulaire Aigu</b></p> <p>TCMR Aigu grade I      Grade IA i ≥ 2+ t2                                     Grade IB i ≥ 2+ t3</p> <p>TCMR Aigu grade II     Grade IIA v1 quelque soit les scores i / t                                     Grade IIB v2</p> <p>TCMR Aigu grade III    Grade III v3</p> <p><b>Rejet Chronique médié par les lymphocytes T</b></p> <p>TCMR chronique actif grade I      Grade IA ti ≥ 2 +i-IFTA ≥ 2 +t2   Eliminer les autres étiologies pouvant être associée à la FIAT inflammatoire</p> <p>TCMR chronique actif grade I      Grade IB ti ≥ 2 + i-IFTA ≥ 2 + t3   Eliminer les autres étiologies pouvant être associée à la FIAT inflammatoire</p> <p>TCMR chronique actif grade II     Artériopathie chronique d'allogreffe cv&gt;0</p>	
<p><b>Catégorie 5 : Fibrose Inflammatoire et Atrophie tubulaire</b></p> <p>Grade I                   ci 1 ou ct 1 Grade II                  ci 2 ou ct2 Grade III                 ci 3 ou ct3</p>	
<p><b>Catégorie 6 : Autres lésions</b></p> <p>Récidive de la maladie initiale Glomérulonéphrite de novo Néphropathie au BKvirus Reflux Pyélonéphrite Nécrose tubulaire aigue Toxicités des anticalcineurines Lymphoprolifération</p>	

### 2.3. Histologie des rejets humoraux

Depuis 2013 la fixation de C4d, qui marque l'activation de la voie classique par les anticorps sur les cellules du greffon, n'est plus indispensable au diagnostic de rejet médié par les anticorps<sup>84</sup>. La présence de DSA, associée à une inflammation majeure de la microcirculation attestant de l'interaction entre les anticorps et l'endothélium (g+ptc  $\geq 2$  et v $\geq 1$  si C4d négatif, ou g+ptc  $\geq 1$  et v  $\geq 1$  si C4d positif), permet le diagnostic de rejet humoral ou ABMR pour antibodies mediated rejection dans la dernière classification de Banff 2017.

Le traitement des rejets humoraux est basé sur l'élimination des anticorps anti-donneur par des échanges plasmatiques et la perfusion d'immunoglobulines intra veineuse, parfois associé au Rituximab afin de limiter un rebond de production d'anticorps<sup>85</sup>.

La classification Banff 2013 a amélioré la sensibilité et la spécificité du diagnostic de rejet humoral<sup>86</sup>. Les biopsies ne présentant pas les 3 items nécessaires au diagnostic de rejet humoral sont regroupées sous le terme de «suspicion de rejet humoral», par exemple en présence d'une importante inflammation de la microcirculation sans que des DSA soient retrouvés. Cette terminologie a disparu de la dernière classification de Banff où ne sont considérés que les AMR « actifs » ou « chroniques actifs » (Tableau IV). Leur prise en charge ne se fait qu'au cas par cas, la recherche d'anticorps dirigés contre d'autres antigènes du donneur comme la Vimentine ou l'angiotensine n'est pas réalisée en routine mais recommandée dans cette situation, car pouvant expliquer l'agression de l'endothélium du greffon en l'absence de DSA. Les lésions de rejet humoral chronique actif sont définies par la présence de DSA associée à une atteinte histologique chronique glomérulaire et vasculaire. La composante vasculaire chronique est ainsi partagée avec le rejet cellulaire chronique. La prévalence des rejets mixtes humoraux et cellulaires varient entre 6 et 92% selon les études<sup>87</sup>. Le rejet humoral chronique est l'étiologie principale de la perte de greffon au long terme<sup>88</sup>, aucune thérapeutique n'ayant fait la preuve de son efficacité.

### 2.4. Fibrose interstitielle et lésions inflammatoires

La fibrose interstitielle et l'atrophie tubulaire (FIAT) représentent 12% des pertes de greffon à 10 ans de suivi<sup>6</sup>. Ces lésions signifient que le parenchyme de greffon rénal n'est plus fonctionnel. 22% des biopsies systématiques à 1 an de greffe sont porteuses de FIAT. Les lésions de FIAT sont secondaires à des atteintes multiples, elles peuvent être la conséquence des rejets humoraux<sup>89</sup> et cellulaires, ainsi que de causes non immunes comme le reflux, les pyélonéphrites, les infections virales. Il n'existe actuellement pas de traitement curatif de la fibrose, les actions thérapeutiques ne peuvent être que préventives : limiter la survenue de rejets et favoriser l'observance des patients aux traitements

immunosuppresseurs, adapter constamment l'immunosuppression pour limiter les néphropathies virales et la toxicité des CNI.

La FIAT inflammatoire peut être une conséquence d'une alloimmunité cellulaire T<sup>90</sup> : L'équipe de Nankivell a montré sur 362 patients que le i-score précède l'apparition de fibrose inflammatoire. La conférence de Banff de 2017 souligne le continuum entre les lésions inflammatoires interstitielles et le rejet chronique cellulaire<sup>91</sup>. Cependant la présence d'un infiltrat inflammatoire est aspécifique et donc d'interprétation délicate. Les lésions de FIAT inflammatoires sont rencontrées dans plusieurs atteintes non immunologiques : néphropathie à BK virus, pyélonéphrite, reflux<sup>92</sup>. La classification de Banff inclut la présence de FIAT-i dans la définition de rejet cellulaire T chronique actif (TCMR) sous réserve d'une atteinte d'au moins 25% du cortex total ( $\geq$  FIATi 2) associée à une tubulite afin de limiter les sur-diagnosics de TCMR. Il est souligné l'importance des données cliniques afin de poser le diagnostic histologique de TCMR : il faut s'assurer de l'absence de DSA qui orienterait vers un rejet humoral<sup>89</sup>, et d'une charge virale BKv négative afin d'exclure une néphropathie virale. Il n'est actuellement pas possible en routine de différencier une inflammation liée à un rejet d'une inflammation non spécifique.

Les pronostics des FIAT inflammatoires sont aussi divers : Cosio a retrouvé une disparition de l'infiltrat inflammatoire dans 48% des cas de FIAT -inflammatoire chez 207 patients<sup>93</sup>. Néanmoins les greffons présentant une FIAT-i sévère à 1 an post transplantation ont un risque de perte de greffon à 3 et 5 ans significativement supérieur par rapport aux biopsies normales. Cette différence n'existe pas pour les patients avec une FIAT-i modérée<sup>94</sup>.

## 2.5. Indication de la réalisation des biopsies de greffon rénal

### – Biopsie pour cause

Les biopsies de greffon sont réalisées en cas de suspicion de rejet à n'importe quel délai post transplantation. Ces situations regroupent la dégradation de la fonction du greffon avec une augmentation de la créatininémie, l'apparition ou la majoration d'une protéinurie, ou encore l'apparition d'anticorps anti-greffon faisant craindre un rejet humoral. Si la biopsie confirme le rejet, cellulaire ou humoral, le traitement adéquat est mis en place. En dehors des lésions de rejets où le traitement est consensuel, la prise en charge est réalisée au cas par cas : certaines lésions borderline ou de suspicions de rejet humoral sont traitées comme des rejets à part entière, d'autres optimiseront le traitement d'entretien, ou encore une abstention thérapeutique mais en rapprochant la surveillance biologique.

## – Biopsies de surveillance

Les biopsies de surveillance sont réalisées dans de nombreux centres à 3 mois et 12 mois après la transplantation. Elles ont pour but de déceler des signes histologiques de rejet cellulaire ou humoral alors que la fonction du greffon est conservée et ainsi d'adapter le traitement immunosuppresseur avant que les lésions histologiques ne soient irréversibles. Les rejets humoraux infra-cliniques sont définis par la présence d'anticorps anti greffon et de lésions histologiques du rejet humoral (glomérulite, capillarite péritubulaire, endothélite, parfois dépôts de C4d) associés à une fonction de greffon normale. En l'absence de traitement ces rejets tout comme les rejets humoraux aigus, évoluent vers le rejet humoral chronique associant glomérulopathie d'allogreffe, lésions d'artériosclérose et de FIAT, qui entraînent l'apparition d'une protéinurie et le déclin de la fonction rénale<sup>95</sup>. Bien qu'invasives les biopsies ne se compliquent que très rarement (< 0,5% de complications)<sup>96</sup>, cependant la réalisation de biopsies de surveillance est débattue. En effet de nombreuses biopsies présentent des lésions pour lesquelles il n'existe pas de prise en charge thérapeutique consensuelle : les lésions borderlines, de FIAT inflammatoire, de suspicion de rejet humoral (inflammation de la microcirculation en l'absence de DSA)<sup>80,97</sup>. Par exemple il n'existe pas de consensus sur la prise en charge des biopsies FIAT et FIAT-i 1, qui sont pourtant les résultats les plus fréquents des biopsies de surveillance : 20% des biopsies de surveillance à 1an sont FIATi-1 vs 11% de FIATi-2 et 3<sup>94</sup>. Une étude observationnelle multicentrique a ainsi démontré qu'il n'existe pas de différence de survie de greffon entre les centres réalisant ou non une biopsie de surveillance à 1 an de la transplantation<sup>98</sup>.

## 2.6. Recherche de biomarqueurs

L'analyse histologique de la biopsie rénale est le gold standard diagnostique des atteintes du greffon, mais présente plusieurs limites. Certaines lésions histologiques sont peu spécifiques comme les FIAT inflammatoires, les suspicions de rejets et les lésions borderlines, trouver un paramètre biologique permettant de différencier les lésions d'origine allo-immune des lésions non immunologiques serait une aide à la prise en charge des patients. La recherche de biomarqueurs est un champ de recherche majeur<sup>99,100</sup>. L'analyse de l'ensemble des gènes exprimés par les cellules du greffon (ou transcriptome) permet par exemple de détecter plus précocement les rejets cellulaires<sup>101</sup>, de reclassifier des lésions indifférenciées<sup>102</sup> et des lésions borderline<sup>103</sup>. La survenue de FIAT à 1 an semble pouvoir être prédite par l'analyse de 13 gènes sur les biopsies de surveillance à 3 mois de greffe<sup>104</sup>. Le transcriptome des cellules circulantes périphériques est aussi un reflet de l'activité immunologique intra greffon. L'équipe de Murphy a retrouvé une signature transcriptomique sanguine associée à la présence d'un rejet infra-clinique à la biopsie rénale<sup>99</sup>. Néanmoins des études multicentriques de validation sont nécessaires

avant de pouvoir sursoir la réalisation d'une biopsie de greffon pour diagnostiquer un rejet. En 2015 la classification de Banff a tenu compte de ces avancées de la biologie moléculaire en incluant dans la définition du rejet humoral la présence de transcrits ENDAT (endothelial-associated transcripts) au sein de la biopsie de greffon<sup>105</sup>. Cependant les techniques de biologie moléculaire sont actuellement coûteuses, et les centres de Transplantation ne réalisent pas ces analyses en pratique clinique. Ces inconvénients ne sont pas retrouvés pour les techniques de cytométrie de flux, qui permette d'analyser en routine les phénotypes lymphocytaires.

### 3. Phénotypes lymphocytaires et transplantation rénale

Les lymphocytes circulants sanguins ne représentent que 2-3% de l'ensemble des lymphocytes<sup>106</sup>, mais leur analyse peut être un reflet de l'activité immunologique ayant lieu dans le greffon<sup>107</sup> et ont l'avantage d'être d'accès simple par rapport à la biopsie (Tableau V)

**Tableau V. Revue de la littérature des études des phénotypes sanguins (LT régulateurs, LT cytotoxiques, LB , cellules NK) associés à l'histologie et au devenir des greffons rénaux.**

Phénotypes lymphocytaires circulants	TCMR	Effectif	Référence	ABMR	Effectif	Référence	TOL	Références et effectif
Treg		↘ Treg foxp3+CD25+ chez rejets chroniques vs stables (10 cell/uL vs 25) délai = 7,3 ans post transplantation			n=22	Braudeau 111	↗ CD4+CD25+CD127-foxP3+ chez les patients tolérants (2cell/uL vs 1 chez les patients avec rejet chronique) ↗ Treg foxP3 déméthylés	115
		↘ mTreg chez patients TCMR vs stable (6% des CD4 vs 11%) délai = 3 mois post transplantation	McRae 112				↗ CD4+CD25+foxP3+ chez les TOL vs CAN (25cell/uL vs 10 cell/uL) délai post transplantation 1 4ans TOL , 8 ans CAN	Moraes 147
CD8+CD28-		↘ de l'expression du CD28 sur les LT CD8+ chez les patients avec rejet chronique ↗ % CD8+CD28- chez les rejets chroniques par rapport aux patients stables et aux p délai post transplantation : 7 ans			n =38	Baeten 68		
					n = 40	Korecka-Polak 166		
		↗ TEMRA CD45+CCR7-CD27-CD28- chez les patients avec restriction du TCR, associé: délai post transplantation : 9 ans	n =131	Yap 125	Analyse transcriptomique de biopsie rénale transcripts liés à l'IFNg (CXCL1, CXCL9, CXCL10; CC Délai post transplantation = de 3 jours à 35 ans	n = 703	Venner 144	
LB		↘ rejets chez les patients ay >3% de LB transitionnels CD19+C pas de différence pour la survie étude prospective de J0 à J365	n = 73	Shabir 139	nombre de CD19+ identique chez stz ↗ % CD19+ chez cABMR ( 10% ↗ % LB mémoire IgD-CD27+ (16,9% ↘ LB transitionnel CD19+CD24hiCD38hi délai 8 ans post transplantation	n= 44	Nouel 130	↗ LB totaux CD19+ (8% vs 5% stable) 220cell/uL vs 50 stable) Délai post transplantation :délai : 14 ans
							↗ % LB transitionnels CD20+CD24hiCD38hi chez TOL vs stables (4,3% vs 1,5%) et des LB chez CAN Délai post transplantation :délai : 11 ans	Pallier 136 137
							↘ plasmocytes CD20-CD38+CD138+110 (0,5% vs 1,2%) Breg sécréteur de granzyme B (6cell/uL vs 2) Délai post transplantation :délai : 10 ans	n= 18 Chesneau 141
NK	Analyse transcriptomique de cellules mononucléi surexpression de gènes NK et LT : IFNG, CD96 Délai post transplantation : de 3jours à 35 ans	n = 703	Venner 144	Analyse transcriptomique de biopsie rénale surexpression des gènes NK CD16 impliqués dans l Délai post transplantation : de 3jours à 35 ans	n = 703	Venner 144	Nombre de cellules NK CD3-CD56dim (100cell/mm3) : ider mais profil d'activation défectueux chez TOL : ↘ Nkp46 , : Diminution des capacités cytotoxiques : ↘ perforine ↘ granzyme Délai post transplantation stable : 2 ans , TOL: 19 ans	n = 37 Dugast 143
Autres caractéristiques		CD4/CD8<1 associé à un répertoire TCR oligoclonal et aux rejets délai post transplantation : stables & rejets 9 ans, TOL : 17ans			n = 229	Miqueu 108		
				Tfh CD4+CXCR5+IL21+ circulants à 3 mois : 3cell/mm3 mais présence d'infiltrat Tfh dans le greffon Délai post transplantation : 99 jours	n= 5	De Grav 165	↘ % Tfh circulants CD45RACCR5+ (2,5% vs 5,0% stables) Délai post transplantation stables : 6,8 ans TOL: 20 ans	n = 22 Chenouard 21

### 3.1. Le ratio CD4/CD8

Miqueu et al ont montré qu'une diminution du ratio CD4/CD8<sup>108</sup> est associée à des lésions histologiques de rejet d'allogreffe. Ils ont également étudié le répertoire TCR dans une population de transplantés rénaux avec une fonction de greffon stable, et retrouvé une grande hétérogénéité : certains ont un répertoire TCR non impacté, d'autres sélectionné oligoclonal. Les patients dont le répertoire TCR Vb est dévié sont ceux qui présenteront le plus de rejet, et sont également ceux avec un rapport CD4/CD8 inversé. Ces analyses réalisées à partir de prélèvements sanguins périphériques sont confirmées au niveau du phénotype lymphocytaire intra greffon : l'étude en single cell de la biopsie de greffon réalisée par Muczynski confirme ce ratio CD8/CD4 >1,2 associé au rejet, et ce même avant que les lésions histologiques ne soient visibles<sup>109</sup>.

### 3.2. Lymphocytes T régulateurs

L'augmentation du nombre de Treg dans le greffon rénal est associé à une augmentation des Treg en périphérie<sup>110</sup>. Malgré leur rôle anti inflammatoire bien établi, les résultats des études en transplantation sur les Treg infiltrants le greffon ou circulants en périphérie, sont hétérogènes.

Les patients présentant un rejet chronique ont un taux plus bas de Treg que les patients avec une fonction de greffon stable<sup>111,112</sup> et l'analyse génomique retrouve un taux élevé de foxp3 et d'autres gènes associés aux capacités régulatrices des Treg chez les patients stables<sup>113</sup>. A l'extrême, les patients présentant une tolérance opérationnelle, définie par une fonction de greffon stable (créatininémie <130µmol et protéinurie <1gramme/jour)<sup>114</sup> en l'absence de traitement immunosuppresseur, présentent un taux supérieur de Treg circulants<sup>115</sup>.

Cependant, les patients avec un rejet aigu cellulaire ont un infiltrat de Treg au sein du greffon supérieur aux patients avec toxicité des CNI ou aux patients avec un rejet humoral<sup>116</sup>. Un fort infiltrat de LT CD4+foxp3+ serait même au cours des rejets aigus cellulaires un facteur de mauvais pronostic sur la survie de greffe<sup>116</sup>. Les cellules épithéliales tubulaires rénales (RTEC) sont considérées comme pouvant jouer un rôle dans le processus de tolérance du greffon, les tubules présentant un important infiltrat foxP3+<sup>116</sup>. Les RTEC sécrètent du TGFβ qui est un inducteur majeur des Treg. Cette faculté à produire du TGFβ peut expliquer la dualité des résultats des études corrélatant les Treg au devenir du greffon, le TGFβ étant un facteur pro-fibrogène majeur, qui permet d'augmenter le nombre de Treg mais favorise également des lésions fibrosantes. De même le taux de FoxP3 mesuré dans les urines après un rejet aigu pourrait prédire l'échec de greffe dans les 6 mois<sup>117</sup>. Enfin d'après les travaux d'Ashton-Chess l'expression de FoxP3 dans le sang périphérique et dans le greffon ne permet pas de distinguer les

patients en rejet des patients stables<sup>118</sup>. Différentes analyses peuvent expliquer ces résultats en apparence contradictoires<sup>119</sup>. Une augmentation des Treg favorise un état anti-inflammatoire, mais leur afflux dans le greffon signifie également qu'une réaction inflammatoire importante a lieu. Le ratio de Treg/ LT effecteurs a été utilisé pour prendre en compte ce dualisme : Grimbert et al ont montré que l'on peut distinguer une histologie borderline d'un rejet aigu en analysant le ratio FoxP3/granzyme B au sein du greffon rénal<sup>120</sup>. Une autre explication serait que l'infiltrat de Treg présent lors des pronostics défavorables n'aurait pas les capacités régulatrices optimales. La mesure des zones méthylées du promoteur de Fox p3 permet de reconnaître plus précisément les capacités régulatrices des Treg. Ainsi Bestard a démontré que parmi les patients avec un rejet chronique, ceux ayant un infiltrat de Treg ayant des zones de foxp3 méthylées ont un meilleur pronostic à 5 ans<sup>121</sup>. De même, les patients présentant une tolérance opérationnelle ont un plus fort pourcentage de Treg mémoires avec foxP3 méthylé que les patients avec une fonction de greffon stable sous immunosuppresseurs et les patients présentant un rejet chronique.<sup>115</sup>

### 3.3. Lymphocytes cytotoxiques CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>

En cas de stimulation antigénique chronique, les LT CD8<sup>+</sup> différenciés oligoclonaux s'accumulent<sup>122</sup>. Ces lymphocytes différenciés sont caractérisés par la perte de l'expression du CD28. Ces cellules se rapprochent des TEM et TEMRA, ayant d'importantes capacités cytotoxiques. Traitanon a démontré que les LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> ont des capacités cytotoxiques supérieures aux CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, exprimant plus de CD107a (marqueurs de la dégranulation de perforine et de granzyme B)<sup>123</sup>. En revanche plusieurs études in vitro semblaient retrouver des capacités de prolifération diminuées en présence de cellules B alloréactives, comparativement aux cellules CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>. En réalité il semble qu'en ajoutant dans le milieu de l'IL-15, les LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> gardent de très bonnes capacités de prolifération. Elles sont retrouvées dans des maladies auto-immunes, comme la glomérulonéphrite lupique<sup>124</sup>. En transplantation rénale, un travail mené en 2006 par notre équipe retrouvait une augmentation du taux des LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> cytotoxiques chez les patients en rejet chronique, ce qui a été confirmé plus récemment en s'intéressant à la population de TEMRA<sup>125</sup>. L'étude de Yap portant sur 131 patients transplantés rénaux retrouve chez 45 patients une restriction du répertoire TCRVb associée à une augmentation du nombre de TEMRA CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup> et corrélée à une augmentation des capacités de production d'IFN- $\gamma$  et de TNF $\alpha$ . La présence d'IL-15 dans le cadre de la transplantation rénale avec stimulation allogénique pourrait expliquer la prolifération des LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>. Ceci est cohérent avec les résultats de plusieurs études montrant une sur-production d'IL-15 par les cellules tubulaires, lors des mécanismes d'ischémie-reperfusion, aboutissant à une tubulite<sup>126</sup>. Il est intéressant de souligner que l'IL-15 est aussi connue pour délivrer un signal de prolifération aux NK.

Le taux CD8+CD28<sup>-</sup> semble être indépendant du traitement immunosuppresseur de maintenance classique inhibiteurs des calcineurines, mTor inhibiteur, MMF, corticoïdes<sup>127</sup> mais pourrait expliquer l'augmentation des rejets sous Belatacept<sup>128 129</sup>

### 3.4. Lymphocytes B

La composition des sous-populations lymphocytaires B est différente en fonction du devenir de greffe. Les patients avec un rejet humoral chronique présenteraient une augmentation de LB mémoires CD19+IgD-CD27<sup>+</sup> circulants<sup>130</sup>. La détection par technique Luminex des anticorps anti-HLA du donneur dans le sérum des patients transplantés est utilisée en routine clinique. Les DSA entraînent une inflammation de la microcirculation soit par activation du complément, soit pas ADCC, responsables de rejets humoraux infra-cliniques, aigus et chroniques. L'agression de l'endothélium est un processus continu<sup>131</sup>, mais l'isotype des DSA pourrait avoir une influence sur l'expression du rejet humoral : les IgG3 sont retrouvés principalement lors d'ABMR aigu tandis que les DSA IgG4 prédominent dans les rejets chroniques<sup>132</sup>. Le rejet humoral aigu est accessible à des thérapeutiques dont le but est la clairance des anticorps : plasmaphérèse, immunoglobulines, Rituximab, qui permettent l'arrêt de l'agression endothéliale. Les lésions du rejet chronique sont actuellement irréversibles, les thérapeutiques inhibant la production d'anticorps n'améliorant pas les lésions ni le pronostic. Cependant l'absence de DSA dans le sérum n'exclut pas la présence de LB mémoires, notamment chez des patients immunisés en attente d'une nouvelle transplantation<sup>133</sup>, et qui sous l'effet d'une nouvelle stimulation antigénique peuvent proliférer et se différencier en plasmocytes. Des techniques de détection de ces cellules sont en développement, comme les ELISPOT B<sup>134</sup> ou l'utilisation de tétramère HLA

Alors que les LB sont responsables du rejet humoral chronique qui est la majeure cause de perte du greffon, ils sont aussi indispensables à l'établissement d'une tolérance opérationnelle. Les analyses transcriptomiques valident une signature B chez les patients tolérants<sup>135</sup>, et ces patients présentent un nombre de LB totaux CD19<sup>+</sup> supérieur aux patients sous immunosuppresseurs avec une fonction stable et ceux présentant un rejet chronique<sup>136</sup>. Pour expliquer cette augmentation du nombre de lymphocytes B chez ces patients présentant pourtant une plus faible immunisation anti donneur, Chesneau et al ont analysé les capacités de différenciation de ces LB. Ils ont démontré que l'augmentation du nombre de LB CD19<sup>+</sup> est liée à une augmentation du nombre de LB transitionnels CD20<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> et des LB naïfs CD20<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup>CD24<sup>low</sup>, associées à une diminution des plasmocytes CD20<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup><sup>137</sup>. Ces LB transitionnels sécrètent de l'IL-10 aux propriétés anti inflammatoires<sup>138</sup>. Ces résultats sont concordants avec ceux de Shabir où une diminution du nombre de rejets est observée chez les patients présentant une fréquence plus élevée de LB transitionnels

CD19+CD24hiCD38hi<sup>139</sup>. A l'inverse un taux diminué de LB transitionnels sécrétant de l'IL-10 est associé au développement des rejets humoraux<sup>140</sup>. Cette altération de la différenciation des LB en plasmocytes chez les patients tolérants peut s'expliquer par un déficit des TFH. L'analyse des lymphocytes Tfh circulants chez les patients tolérants retrouve en effet une diminution des capacités fonctionnels des Tfh, produisant moins d'IL-21 et incapables d'induire la production d'IgG par les LB naïfs<sup>21</sup>. A l'opposé, les patients avec une fonction de greffon stable mais un taux de Tfh élevé à un an de la transplantation sont à risque de développer des DSA de novo au cours du suivi. Une autre sous population de LB régulateurs a été découverte chez les patients tolérants, caractérisée par leur sécrétion de granzyme B<sup>141</sup> et qui exerceraient leur activité régulatrice en inhibant la prolifération des LT effecteurs par un mécanisme contact dépendant.

### 3.5. Cellules NK

A l'instar des lymphocytes B, les cellules NK sont impliquées à la fois dans les rejets cellulaires et humoraux et dans la tolérance opérationnelle<sup>142</sup>. Comme nous l'avons précédemment décrit, les capacités cytotoxiques des NK dépendent de plusieurs récepteurs. Les cellules d'un donneur non-matché pour le système HLA de classe I sont reconnues comme étrangères par les récepteurs activateurs des NK et qui induisent la lyse de la cellule cible<sup>143</sup>. L'analyse transcriptomique de biopsies avec rejet humoral démontre le rôle majeure des cellules NK dans le rejet humoral, retrouvant une nette sur expression des gènes NK impliqués dans l'ADCC<sup>144</sup>. A contrario, les patients tolérants ont une fréquence de NK normal CD3-CD56dim (environ 9% des cellules mononuclées circulantes) mais un profil d'activation défectueux avec une diminution de l'expression de NKp46 et du CD16<sup>145</sup>, ainsi qu'une production d'IFN $\gamma$  diminuée.

Notre étude a porté sur la corrélation entre le diagnostic histologique de la biopsie rénale et les phénotypes lymphocytaires circulants analysé en cytométrie de flux, technique utilisée en routine clinique.

#### II. Présentation de l'étude et méthodes

Sur la base des observations et de l'analyse de la littérature que nous venons de faire en introduction, nous avons émis l'hypothèse que l'analyse d'un petit nombre de sous-populations lymphocytaires présentes dans le sang périphérique et réalisées en routine au moment de chaque biopsie pourrait aider à étayer le diagnostic histologique de certaines biopsies aux lésions peu spécifiques.

Pour répondre à cette hypothèse de travail, nous avons répertorié depuis 2008 à l'ITUN 1097 patients pour lesquels un phénotype lymphocytaire des sous-populations suivantes : LT CD4+, LT CD8+, Treg CD4+CD25+CD127-, T cytotoxiques CD8+CD28-, lymphocytes B CD19+, et cellules NK CD56+ a été

réalisé en routine dans le cadre d'une recherche non interventionnelle le jour de leur biopsie de greffe. Nous avons en parallèle recueillis prospectivement les données cliniques de ces patients annuellement dans la base de données DIVAT ([www.divat.fr](http://www.divat.fr)) et actualisé les diagnostics histologiques selon la dernière classification de Banff 2017.

Dans ce travail de thèse, nous ferons dans une première partie une description démographique de cette population et des lésions histologiques rencontrées.

Dans une seconde partie, nous chercherons à montrer s'il existe une corrélation entre des phénotypes lymphocytaires du sang circulant et des diagnostics histologiques au même moment sur la biopsie des greffons.

Finalement, nous essaierons de montrer qu'il est possible d'enrichir les diagnostics histologiques par l'apport des phénotypes lymphocytaires du sang circulant pour mieux orienter la prise en charge thérapeutique des patients et répondre ainsi à notre hypothèse de départ.

## 1. Population de l'étude

Notre objectif principal était de montrer s'il existe une relation entre des sous-populations lymphocytaires T du sang périphérique et le diagnostic histologique observé au même temps sur la biopsie des greffons chez tous les patients incidents de l'ITUN entre juin 2008 et décembre 2016. Les patients étaient inclus le jour de la biopsie, qu'elle qu'en soit l'indication : biopsies de surveillance à 3 ou 12 mois ou biopsies pour cause. Tous les patients avaient signé le consentement pour la biopsie et pour la biocollection DIVAT (DC 2012-1555). Nous avons exclu les patients non transplantés à l'ITUN, mineurs ou en cas de biopsie non contributive (moins de 7 glomérules ou absence d'artère de moyen calibre). Les paramètres cliniques et biologiques ont été extraits de la base DIVAT des patients transplantés rénaux ([www.divat.fr](http://www.divat.fr), CNIL décision DR-2025-087, 15 février, 2015).

## 2. Réalisation et analyse des Biopsies des greffons rénaux

Les biopsies de greffons rénaux étaient réalisées dans le cadre des soins courants. Les biopsies dites «pour cause» regroupaient les indications suivantes : 1) dégradation de la fonction rénale et/ou protéinurie et/ou 2) apparition d'une immunisation anti HLA spécifique du donneur (DSA). Les biopsies étaient réalisées sous écho-guidage, avec un pistolet et une aiguille de 16 gauges. Deux prélèvements étaient réalisés : l'un fixé dans le Carnoy pour l'étude en microscopie optique (avec colorations hématoxyline-éosine-safran, Periodic Acid Schiff, trichrome de Masson et coloration argentique). L'autre prélèvement était congelé pour l'étude en immunofluorescence (IF) indirecte des dépôts de C4d (anticorps C4d (anticorps murin monoclonal anti-C4d humain (1/100<sup>ème</sup>) Quidel, San Diego, CA, USA) classé en négatif (absence de fixation ou fixation minimale <10% des capillaires) ou positif (fixation

focale (10 à 50 %) ou diffuse >50% des capillaires) pour l'analyse statistique. Les biopsies non contributives avec moins de 7 glomérules ou sans artère de moyen calibre ont été exclues. Les premiers patients inclus remontant à 2008 et pour tenir compte des évolutions périodiques de la classification de Banff, toutes les biopsies ont été classées rétrospectivement selon les recommandations de la classification BANFF 2015 par l'anatomopathologiste spécialiste de la greffe rénale du CHU de Nantes le Dr Karine Renaudin à partir des scores et des conclusions établis lors de l'interprétation initiale des lames par les pathologistes locaux. Nous avons arbitrairement défini 9 grandes catégories diagnostiques :

- Biopsie normale (Normal) : aucune lésion significative en microscopie optique ni dépôt de C4d en IF
- Biopsie subnormale (SubN) : absence de lésions significatives en microscopie optique mais présence de dépôts isolés de C4d en IF sans DSA, ou présence de DSA sans C4d en IF.
- Fibrose interstitielle et atrophie tubulaire (IFTA) : présence exclusive de fibrose interstitielle et d'atrophie tubulaire, sans diagnostic histologique associé
- FIAT inflammatoire (i-IFTA) : présence exclusive d'infiltrat inflammatoire au sein des zones de fibrose ( $c_i \geq 1 + t_i \geq 1 + i \geq 0 + t \geq 0$ ) sans autre lésion histologique associée
- Rejet cellulaire (TCMR) : regroupe les rejets cellulaires aigus ou chroniques actifs
- Rejet humoral (AMR) : regroupe les rejets humoraux aigus ou chroniques actifs et les rejets mixtes (associant des lésions cellulaires aux lésions médiées par les anticorps)
- Suspicion de rejet humoral (suspicious AMR) : défini par une atteinte sévère de la microcirculation ( $g + cpt$ ) avec ou sans dépôt de C4d, mais en l'absence de DSA et quelque soit le cg
- Lésions borderline : selon la définition Banff (Tableau IV)
- Autres diagnostics : regroupe les récurrences de la maladie initiale, les glomérulonéphrites de novo, les néphropathies à BKv, les pyélonéphrites ou les lésions isolées de type : les nécroses tubulaires aiguës, les micro-angiopathies thrombotiques les nécroses corticales.

### 3. Détection et identification d'une immunisation anti HLA pré et post greffe.

La détection des anticorps anti-HLA a été réalisée par différentes techniques en fonction de l'année de transplantation : lymphocytotoxicité entre 1985 and 2000, techniques ELISA entre 1992 et 2004 et depuis 2006 par la technologie Luminex (LABScan 100; Luminex, Austin). Pour le Luminex® deux types de réactifs ont été utilisés. Les réactifs de dépistage pour le screening des anticorps (LABScreen mixed, One lambda Inc.) et les réactifs de Single Antigen pour l'identification spécifique des anticorps anti-HLA (LABScreen single antigen beads, One Lambda Inc.). Pour notre

étude, nous avons considéré qu'un patient avait une immunisation positive dite « du jour » si les résultats de la recherche d'une immunisation anti-HLA, quelle que soit la technique, était positif dans les 6 mois précédant la transplantation. La recherche d'anticorps anti-HLA après la transplantation était réalisée à 3 mois, 12 mois puis à chaque anniversaire de la greffe et en cas de dysfonction du greffon, soit par dépistage Luminex soit par Single Antigen en cas de dépistage positif ou de suivi du DSA. Au moment des biopsies la recherche d'une immunisation anti HLA était systématiquement réalisée en SAB pour répondre aux critères de classification diagnostiques de Banff. Le seuil de positivité de fluorescence est fixé à 2000 de MFI avant la transplantation et 1000 de MFI après la transplantation.

#### 4. Détermination de l'Immunophénotypage lymphocytaire du sang circulant au moment de la biopsie

Un échantillon sanguin de 4mL sur tube EDTA était prélevé le jour de la biopsie de greffon, et analysé dans la journée sur la plateforme CIMNA du laboratoire d'immunologie du CHU de Nantes. Les immunophénotypages des lymphocytes T CD4+, CD8+, Treg CD4+CD25<sup>high</sup>CD127- et cytotoxiques CD8+CD28- ont été réalisés pour l'ensemble des patients dès 2008. A partir de 2014 les analyses des lymphocytes B CD19+ et des cellules NK CD56-16+ ont été ajoutées. Les valeurs absolues et les pourcentages des lymphocytes T CD4, TCD8, B et NK étaient obtenus avec les mélanges d'anticorps Multitest™CD45/CD3/CD8/CD4 ou Multitest™CD45/CD3/CD19/CD16-56 dans des tubes BD Trucount™. Après une incubation à température ambiante de 50µL de sang EDTA et 20µL de mélange d'anticorps pendant 15 mn, puis une étape de 15 mn de lyse, les tubes étaient passés sur un cytomètre CANTO II BD Biosciences dans le logiciel CANTO CLINIQUE™. La présence de billes fluorescentes de quantité déterminée dans les tubes BD Trucount™ permettait de calculer la valeur absolue de chaque sous-population de lymphocytes. Pour les lymphocytes Treg et les LT CD8+CD28-, 50µL de sang total était prélevé et incubé avec les anticorps (les références des clones et des fluorochromes sont regroupées dans le Tableau VI) pendant 15 minutes à température ambiante puis une lyse était effectuée pendant 15 minutes à température ambiante. Les prélèvements étaient ensuite lavés avec du PBS, centrifugés 4 minutes à 1800 rpm et le surnageant était retiré. L'acquisition, l'enregistrement et l'analyse étaient réalisés sur un cytomètre CANTO II BD Biosciences avec le logiciel DIVA (BD Biosciences) et le logiciel Flow JO . (Figure 7). Les pourcentages des LT CD4, LT CD8, Treg et des LT CD8CD28 étaient rapportés à la valeur absolue des lymphocytes CD3+.

Tableau VI. Références des clones et des fluorochromes utilisés pour l'immunophénotypage des LT CD4+ et CD8+.

anticorps Treg	CLONE / isotype	fournisseur	référence	Quantité
CD45-PerCp	2D1 / IgG1	Becton Dickinson	345809	5
CD3-FITC	SK7 / IgG1	Becton Dickinson	345763	5
CD4-APC	13b8.2 / IgG1	Beckman Coulter	IM2468	5
CD25-PECy7	2a3 / IgG1	Becton Dickinson	335824	2.5
CD127 PE	R34.34 / IgG1	Beckman Coulter	IM1980U	5

anticorps Tsup	isotype	fournisseur	référence	Quantité
CD45-PerCp	2D1 / IgG1	Becton Dickinson	345809	5
CD3-FITC	SK7 / IgG1	Becton Dickinson	345763	5
CD28-APC	CD28.2 / IgG1	Becton Dickinson	559770	10
CD8 PE	B9.11 / IgG1	Beckman Coulter	A07757	5

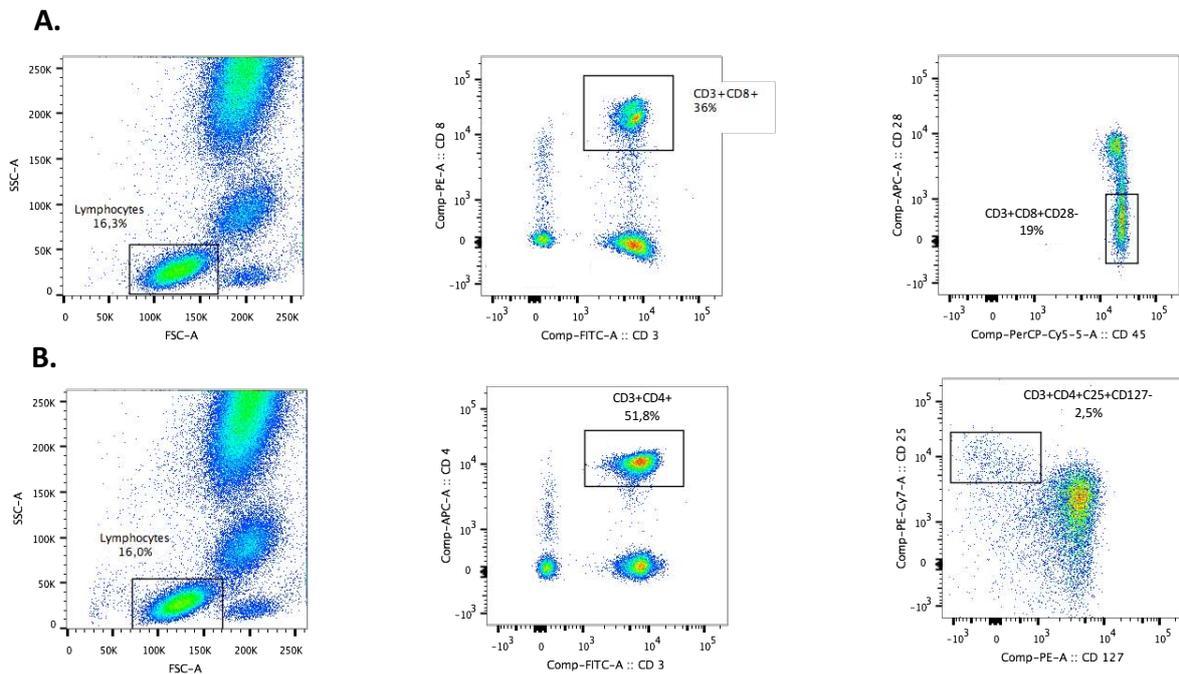


Figure 7. Analyse en cytométrie de flux sur sang total des lymphocytes T cytotoxiques (A) et des LT régulateurs (B) Les pourcentages sont exprimés par rapport à l'ensemble des lymphocytes CD3+

## 5. Paramètres démographiques et covariables étudiées

Nous avons extrait les paramètres cliniques et biologiques de la base donnée DIVAT, et l'historique de l'immunisation anti-HLA du logiciel FUSION de l'EFS. Les variables suivantes ont été analysées :

- relatives au receveur : âge, genre, IMC, maladie initiale, délai de dialyse, rang de transplantation, antécédents de diabète et cardiovasculaire, immunisation anti-HLA du jour de la transplantation
- relatives au donneur : âge, genre, catégories de donneur (vivant, décédé, à critères élargis : plus de 60 ans ou plus de 50 ans avec antécédent d'hypertension artérielle, décès par accident vasculaire cérébral, créatinine supérieure à 132  $\mu\text{mol/L}$  ; décès par arrêt cardiaque)
- relatives à la transplantation : ischémie froide, compatibilité HLA et CMV, traitement immunosuppresseur d'induction et d'entretien, complications post transplantation : infections urinaires, infection à BK virus (virémie ou néphropathie), néoplasie, apparition de DSA de novo.

## 6. Analyse statistiques

Nous avons dans un premier temps réalisé la description de la cohorte des 1097 patients chez qui ont été réalisées 1640 biopsies, selon les 9 groupes histologiques. Pour les 450 patients ayant bénéficié de plus d'une biopsie, nous n'avons considéré les résultats histologiques que d'une seule biopsie par patient pour éviter les surajustements statistiques et l'absence d'indépendance entre chaque biopsie chez un même individu en respectant l'algorithme suivant : les biopsies dites « pour cause » prévalaient sur les biopsies de surveillance à 12 mois, qui prévalaient les biopsies de surveillance à 3 mois. Les variables quantitatives étaient exprimées en moyenne et l'écart-type ou en médiane, et les variables qualitatives étaient exprimées en fréquence de chaque modalité. Le nombre de données manquantes était précisé pour chaque variable. Les 9 catégories histologiques ont été comparé par l'analyse des variances par ANOVA pour les variables quantitatives et par le test de Fisher pour les variables qualitatives.

Nous avons ensuite étudié l'association entre les différents phénotypes sanguins d'intérêt et les 9 groupes histologiques. D'abord de manière univariée, avec une représentation graphique de la distribution des phénotypes sanguins lymphocytaires selon le diagnostic histologique et la réalisation de tests de Student de comparaison de moyennes entre nos groupes histologiques d'intérêt. Dans un second temps, nous avons réalisé des analyses de régressions linéaires et logistiques multivariées afin d'estimer la significativité de l'association entre le phénotype sanguin et le diagnostic de la biopsie en ajustant sur les différents facteurs de confusion. En complément des facteurs de confusion connus, qui ont été « forcés » dans les modèles, nous avons aussi testé des interactions dans les modèles concernant quelques variables susceptibles de modifier l'interprétation de nos résultats (association significative en univarié au seuil de  $p < 0.2$  puis sélection backward) : l'âge et le genre des receveurs et

donneurs, le rang de greffe, le statut CMV, la durée d'ischémie froide, la présence de DSA au moment de la biopsie, le délai après transplantation et l'indication de la biopsie. Les résultats principaux sont exprimés sous la forme d'Odds Ratio (OR) avec l'intervalle de confiance à 95%. Les résultats des régressions linéaires sont exprimés par un « coefficient Estimate » : pour les variables qualitatives (comme les catégories histologiques), le coefficient Estimate représente la différence moyenne entre deux groupes, ajustée sur toutes les autres variables du modèle. Pour les variables quantitatives (comme l'âge du receveur) le coefficient Estimate représente la variation de la variable étudiée lorsque la variable explicative augmente d'une unité (un an pour l'âge), ajusté sur toutes les autres variables. La significativité du coefficient Estimate est évaluée par une t value et un  $\Pr(>|t|) < 0.05$ .

Les analyses de survie des greffons (avec décès censurés), des patients ou patient-greffe selon le groupe histologique ont été estimées à l'aide de la méthode de Kaplan Meier. La survie du greffe est définie comme le délai entre la transplantation et le retour en dialyse ou une nouvelle transplantation, les données sont censurées au dernier suivi (19 juin 2018) et aux décès. La survie du patient est définie par le délai entre la transplantation et le décès toutes causes confondues. Ces probabilités ont été comparées 2 à 2 à l'aide de tests du LogRank. Afin de tenir compte de la multiplicité des tests, nous avons appliqué la méthode du « false discovery rate » de Benjamini et Hochberg en considérant un *false discovery rate* = 0.05. Les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel R et du logiciel GraphPad Prism. Aucune méthode d'imputation n'a été utilisée pour les données manquantes.

### III. Résultats

#### 1. Caractéristiques démographiques

Entre juin 2008 et décembre 2016, nous avons collecté de manière prospective 1640 biopsies de greffons associées à l'analyse simultanée du phénotype lymphocytaire sanguin de 1097 patients transplantés rénaux (Figure 8). Plus de la moitié des patients (57%) ayant été transplanté d'un rein ou d'une transplantation combinée rein-pancréas à Nantes durant cette période ont été inclus dans l'étude (Figure 9).

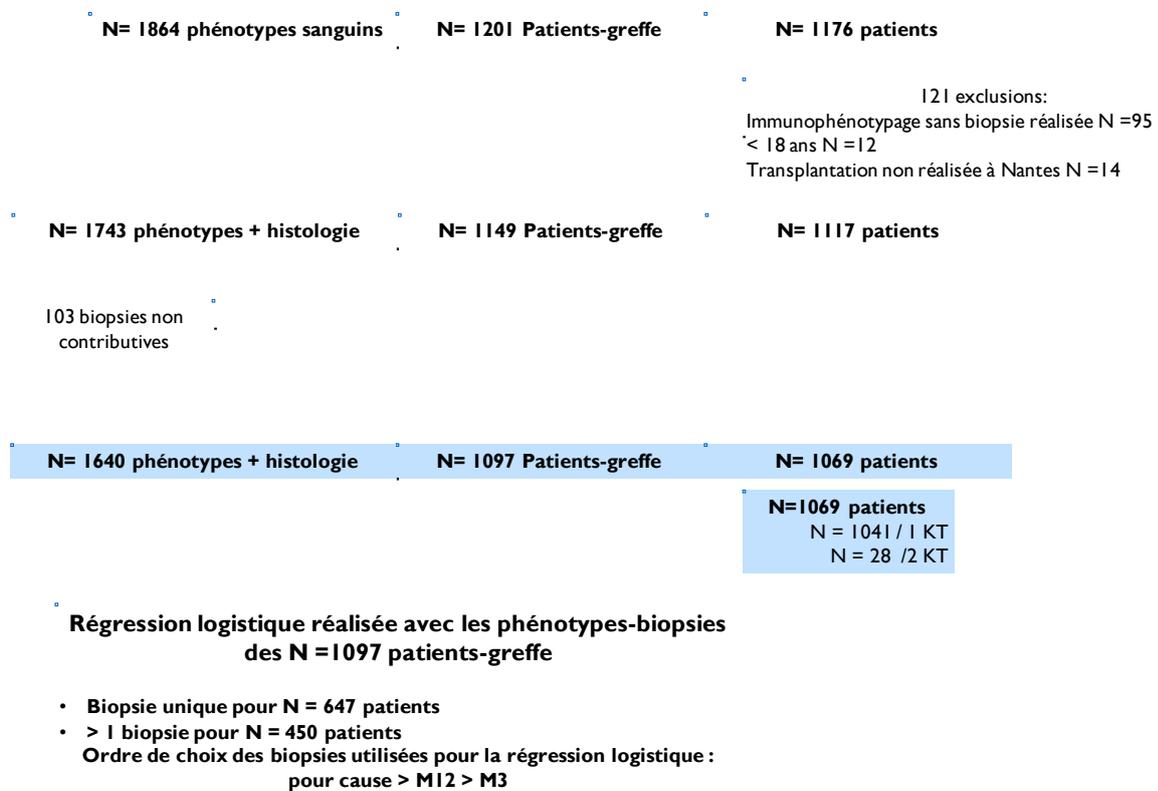
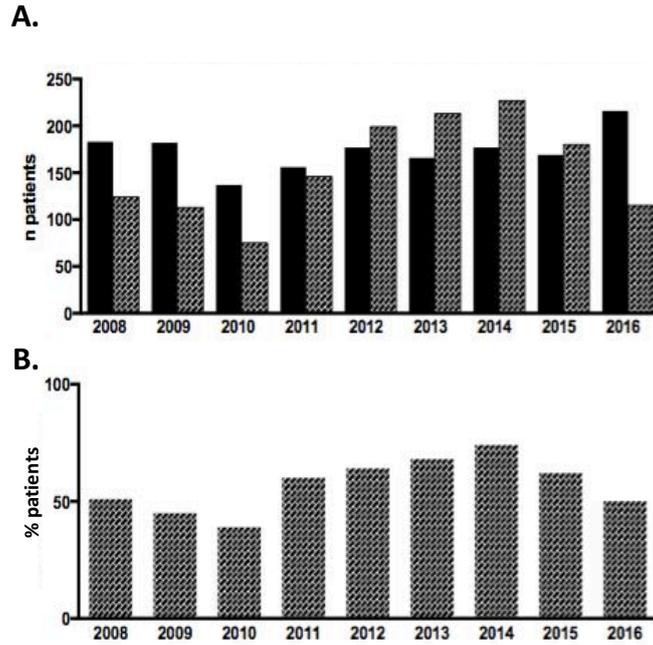


Figure 8 Flow Chart



*Figure 9. Patients transplantés rein ou rein-pancréas à Nantes entre 2008 et 2016. A. Nombre de transplantations et d'inclusions par année B. Pourcentage d'inclusions par année*

Les caractéristiques démographiques des 1097 patients sont présentées dans le Tableau VII. Le suivi médian était de 4,6 années (IQR 2,8-33 ans). Les patients étaient principalement des hommes (61%) âgés de 50 ans (minimum 18, maximum 87 ans). 90% des patients avaient reçu une greffe rénale et 10% une greffe combinée rein-pancréas. La maladie initiale était une néphropathie diabétique dans 23% des cas et une glomérulonéphrite dans 24%. Il s'agissait d'une première greffe pour 83,2% des patients. Avant la transplantation, 29,4% des patients étaient immunisés contre les molécules HLA de classe I et 25,7% contre les molécules HLA de classe II, mais seulement 5% avaient des DSA. La majorité des patients avaient reçu un greffon provenant d'un donneur décédé (89,5%). La moyenne d'âge des donneurs était de 52 ans (minimum 4 ans maximum 87 ans), 39,1% étaient des donneurs à critères élargis. La durée d'ischémie froide était de 15 heures (minimum 0,6 heure maximum 53 heures) et 32% des greffons ont présenté un retard de reprise de fonction. 54,5% des patients avaient reçu un traitement d'induction non-déplétant (Basiliximab) et 42,3% un traitement déplétant-lymphocytaire (Thymoglobuline). Tous recevaient des anti-calcineurines en traitement d'entretien (ciclosporine 12%, tacrolimus 87,9%). 98,6% des patients recevaient un traitement anti-prolifératif (95,8% de MMF/MPA et 2,8% d'azathioprine) et 84% recevaient des corticostéroïdes oraux.

Tableau VII. Caractéristiques démographiques des 1097 patients

	NA	Median or n	Min	Q1	Q3	Max
<b>Recipient characteristics n= 1097</b>						
Age recipient (y)	0	50	18	38	61	87
Male gender recipient	0	669	61%			
Year graft	0	2012	1985	2008	2014	2016
Recipient BMI (kg/m2)	0	23,9	14,2	21,1	27,2	39,5
Initial disease	0					
	Unknown	92	8%			
	Primary glomerulopathies	267	24%			
	Malformative uropathy , reflux	479	44%			
	Nephroangiosclerosis/hypertension	76	7%			
	Diabetes	183	17%			
Time spent on dialysis (m)	4	40	0	8	89	998
Pre-emptive transplantation	0	233	21%			
Transplant type	0					
	R	978	89%			
	RP	118	10,8%			
	RC	1	0,1%			
Transplant rank	0					
	1	913	83,2%			
	2	170	15,5%			
	3	12	1,1%			
	4	1	0,1%			
	5	1	0,1%			
Recipient history of Diabetes	0	257	23,4%			
	HTA	0	981	89,4%		
	Cardiovascular diseases	0	411	37,5%		
<b>Donor characteristics</b>						
Age donor (y)	0	52	4	40	63	87
Male gender donor	1	649	61%			
Living donor	0	115	10,5%			
Deceased Donor	0	982	89,5%			
	SCD	8	533	54,3%		
	ECD	8	384	39,1%		
	Circulatory death	8	57	5,8%		
<b>Transplant characteristics</b>						
Cold ischemia time (h)	0	15,8	0,6	12,1	20,6	53
Delay graft function	23	348	32%			
Induction	71					
	None	34	3,1%			
	Non depleting	598	54,5%			
	Depleting induction	464	42,3%			
Maintenance therapy	1					
	CSA	132	12,0%			
	tacro	964	87,9%			
	mTOR	19	1,7%			
	MMFMFA	1051	95,8%			
	AZA	31	2,8%			
	Steroids	922	84,0%			
HLA A+B+DR mismatch	0					
	0	18	2%			
	1	34	3%			
	2	91	8%			
	3	227	21%			
	4	307	28%			
	5	287	26%			
	6	133	12%			
Daily anti-HLA immunization class I /class II	1	322 /282	29% / 26%			
	None	664	60,5%			
Daily anti HLA DSA		65	5,9%			
CMV R- /D-	13	377	34,4%			
CMV R- /D+		235	21,4%			
CMV R+ /D-		236	21,5%			
CMV R+ /D+		236	21,5%			
<b>Features on the day of biopsy</b>						
Time from transplant to biopsy (d)		366	0	100	491	11395
Indications biopsies	37					
	Cause	464	42%			
	M3	180	16%			
	M12	416	38%			
Recipient SCR at the biopsy	5	126	49	114	200	1138
class I / class II DSA on the day of biopsy	26	74 / 175	5% / 11 %			
<b>Complications post transplantation</b>						
Time from transplant to last follow-up (y)		4,6	0	2,8	8	33
Anti-HLA-DSAs	48	243	22,2%			
Urinary infection	0	308	28%			
	Time until UI (m)	16	0	3	66	642
BKv	0	174	16%			
	Time until BK viremia (m)	15	2	8	29	364
Neoplasia	0	186	17%			
	Time until neoplasia (m)	93	0	46	182	646

## 2. Descriptions des diagnostics histologiques des biopsies rénales

Les 1640 biopsies ont été réalisées avec un délai médian de 1 an après la transplantation (IQR 96-419 jours) (Figure 10 et Tableau VIII).

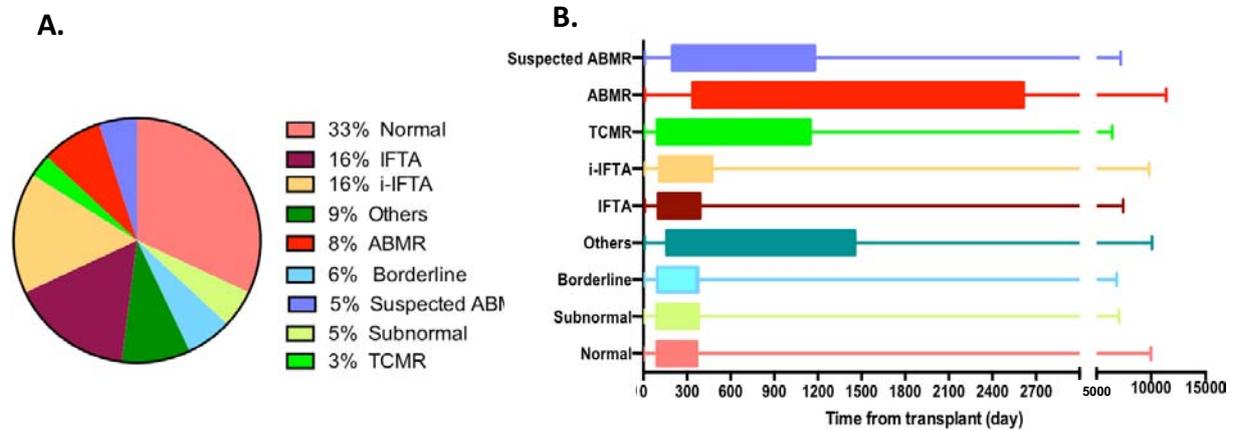


Figure 10. Diagnostics histologiques des 1640 biopsies, toutes indications de biopsies confondues. A. Distribution des 9 catégories diagnostiques. B. Distribution des catégories histologiques en fonction de l'intervalle de temps post transplantation

37% des biopsies avaient été réalisées « pour cause » (délai médian 687 jours IQR 130-2398), 29% étaient des biopsies de surveillance à 3 mois et 34% des biopsies de surveillance à 12 mois post-transplantation. Un tiers des biopsies étaient histologiquement classées « normales » (33%) et 5% « subnormales ». Les lésions de FIAT isolées représentaient 32% des biopsies, dont la moitié présentait des infiltrats inflammatoires au sein des zones de la fibrose FIAT-i (16%). La majorité des FIAT étaient de grade I (65%), 25% de grade II et 10% grade III (Figure 10A). 8% des biopsies retrouvaient un rejet humoral dont 1% était associé à des lésions de rejet cellulaire (rejet mixte), il s'agissait dans 3% de rejets humoraux aigus et pour 4% de rejets humoraux chroniques actifs. 5% des biopsies présentaient des lésions suspectes de rejet humoral (3% de lésions aiguës d'inflammation de la microcirculation et 2% de lésions chroniques actives). Les rejets cellulaires n'ont été diagnostiqués que sur 3% des biopsies. Enfin 6% des biopsies étaient classées borderline et 9% répondaient à « un autre diagnostic » histologique. L'incidence des lésions était différente en fonction du délai à la transplantation (Figure 10B) : les biopsies normales étaient principalement observées dans la 1<sup>ère</sup> année (113 jours en moyenne) sur des biopsies de surveillance (46% à 3 mois et 34% à 12 mois ; 20% sur des biopsies pour cause), les rejets humoraux étaient retrouvés principalement après 1 an (674 jours, 77% des biopsies pour cause, 7% et 16% sur les biopsies de surveillance à 3 et 12 mois respectivement).

Tableau VIII. Description des 1640 biopsies

Histologies n=1640				
	n=	%	time (d)	IQR
<b>All</b>	1640		366	[100 ; 491]
Pour cause	<b>608</b>	37%	687	[130 ; 2398]
Surveillance M3	<b>478</b>	29%		
Surveillance M12	<b>554</b>	34%		
<b>Normal</b>	<b>549</b>	<b>33%</b>	<b>113</b>	[93 ; 368]
<b>Sub Normal</b>	<b>79</b>	<b>5%</b>	<b>110</b>	[91 ; 378]
<b>Borderline changes</b>	<b>92</b>	<b>6%</b>	<b>364</b>	[95 ; 376]
<b>Others</b>	<b>149</b>	<b>9%</b>	<b>371</b>	[159 ; 1456]
Recurrence of initial disease	36	24%		
BKv	34	23%		
Acute pyelonephritis	18	12%		
de novo GN	16	11%		
isolated GA	17	11%		
NTA	13	9%		
MAT	11	7%		
Cortical necrosis	4	3%		
<b>IFTA</b>	<b>264</b>	<b>16%</b>	<b>365</b>	[100 ; 390]
I	230	87%		
II	31	12%		
III	3	1%		
<b>i-IFTA</b>	<b>255</b>	<b>16%</b>	<b>366</b>	[108 ; 472]
I	165	65%		
II	65	25%		
III	25	10%		
<b>TCMR</b>	<b>41</b>	<b>3%</b>	<b>351</b>	[94 ; 1148]
<b>Acute TCMR</b>				
Grade IA	5	12%		
Grade IB	10	24%		
Grade IIA	15	37%		
Grade IIB	3	7%		
<b>Chronic active TCMR</b>	8	20%		
<b>ABMR</b>	<b>128</b>	<b>8%</b>	<b>674</b>	[337 ; 2615]
Active ABMR	42	3%		
Chronic activ ABMR	68	4%		
Mixed	18	1%		
<b>Suspected ABMR</b>	<b>83</b>	<b>5%</b>	<b>382</b>	[198 ; 1180]
Suspected Active ABMR	45	3%		
Suspect Chronic active ABMR	38	2%		

Les suspicions de rejet humoral et les rejets cellulaires étaient décrits plus tôt après la transplantation : 382 jours pour les suspicions de rejet humoral (55% sur des biopsies pour cause, 13% de biopsies de surveillance à 3 mois et 31% biopsies de surveillance à 12 mois) et 351 jours après la transplantation pour les rejets cellulaires (78% sur des biopsies pour cause, 15% à 3 mois et 7% à 12 mois sur les biopsies de surveillance). La Figure 11 détaille les lésions élémentaires de la classification de Banff pour chaque diagnostic histologique. Les rejets humoraux et les suspicions de rejets humoraux présentent les mêmes lésions histologiques mais les suspicions de rejet humoral ont une moindre atteinte des capillaires péri-tubulaires et moins d'immunofluorescence C4d positive (29% vs 45% des biopsies de rejets humoraux). Les rejets cellulaires avaient des atteintes d'endartérite plus sévères que les rejets humoraux. Enfin, les rejets cellulaires, humoraux et les suspicions de rejets humoraux avaient les mêmes atteintes concernant la fibrose (ci) et l'artériopathie chronique d'allogreffe (cv). La figure 12 représente la distribution des lésions élémentaires de chaque diagnostic.

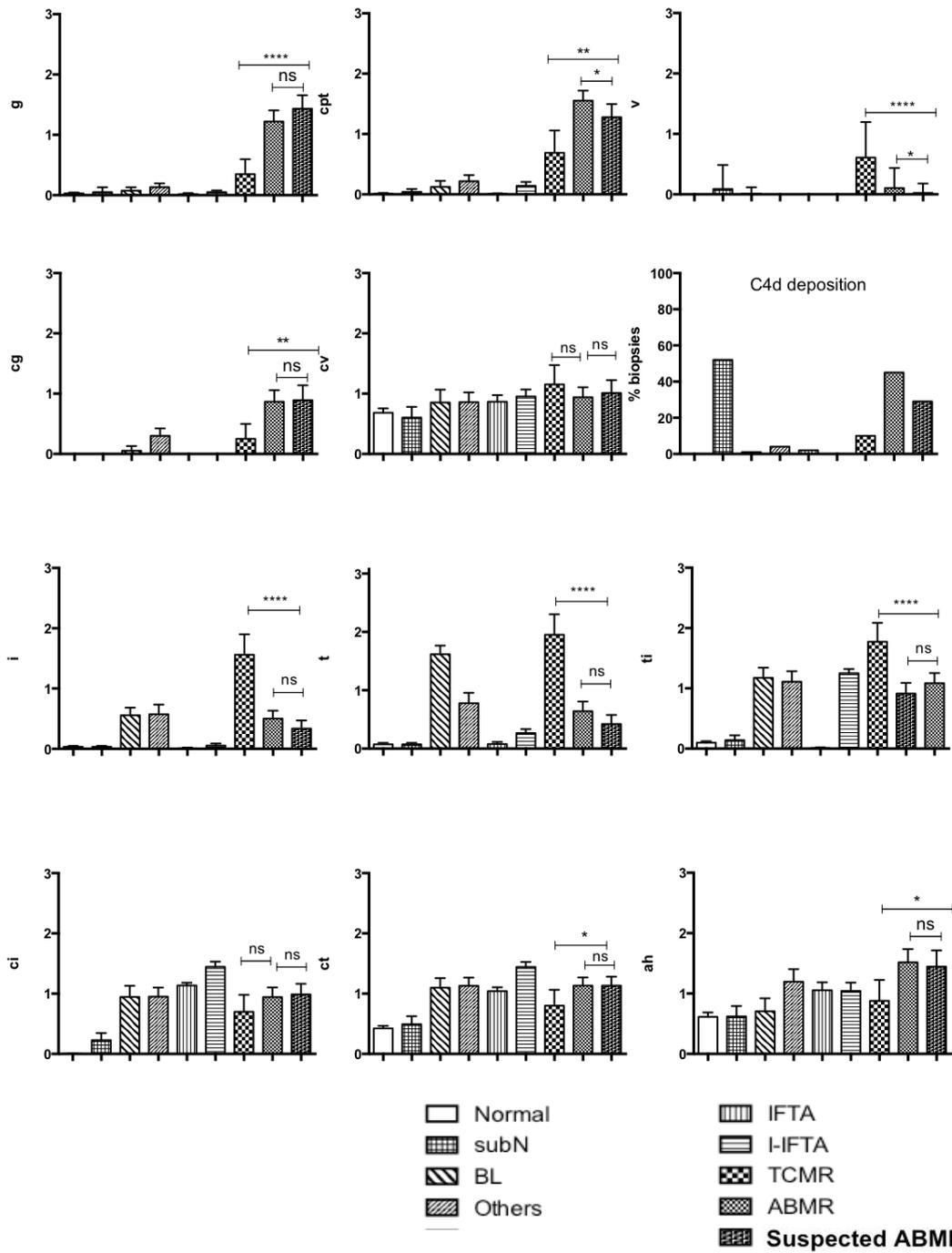


Figure 11.. Comparaison des lésions élémentaires histologiques des 9 catégories diagnostiques. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$  \*\*\* =  $p < 0,001$  \*\*\*\* =  $p < 0,0001$

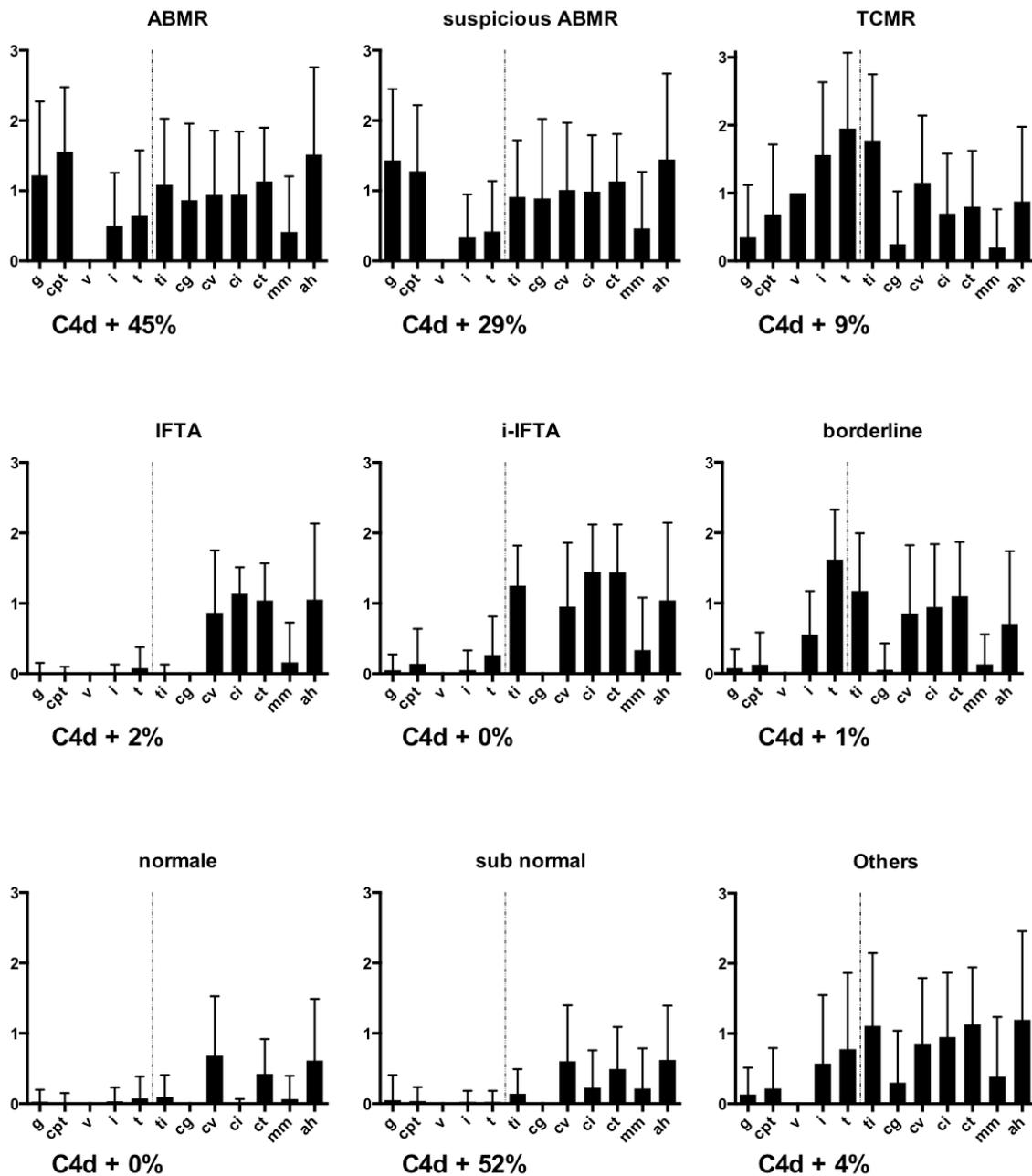


Figure 12. Distribution des lésions élémentaires de chaque catégorie histologique

Pour rappel, afin de réaliser l'analyse de corrélation entre les phénotypes lymphocytaires sanguins et l'histologie du greffon rénal, nous avons pris l'option : 1) de ne considérer qu'une seule biopsie par patient, en considérant pour les patients ayant bénéficié de plus d'une biopsie (n= 450) les biopsies pour cause par rapport aux biopsies de surveillance à 12 mois et les biopsies de surveillance à 12 mois par rapport aux surveillance de 3 mois 2) de regrouper les biopsies de surveillance (à 3 mois n= 180 et à 12 mois n= 416) avec les biopsies pour cause (n= 464) et 3) de limiter notre étude aux 9 catégories diagnostics décrites dans les méthodes : histologie normale (n=350; 32%), subnormal (n=56 ; 5%) IFTA (n=179 ; 16%), i-IFTA (n=180 ; 16%), TCMR (n= 31 ; 3%), AMR (n=89 ; 8%), suspicion de rejet humoral

AMR (n=49 ; 5%), lésions borderline (n= 56 ; 5%), et autres diagnostics (n= 107 ; 10%).

### 3. Caractéristiques cliniques et biologiques en fonction des lésions histologiques

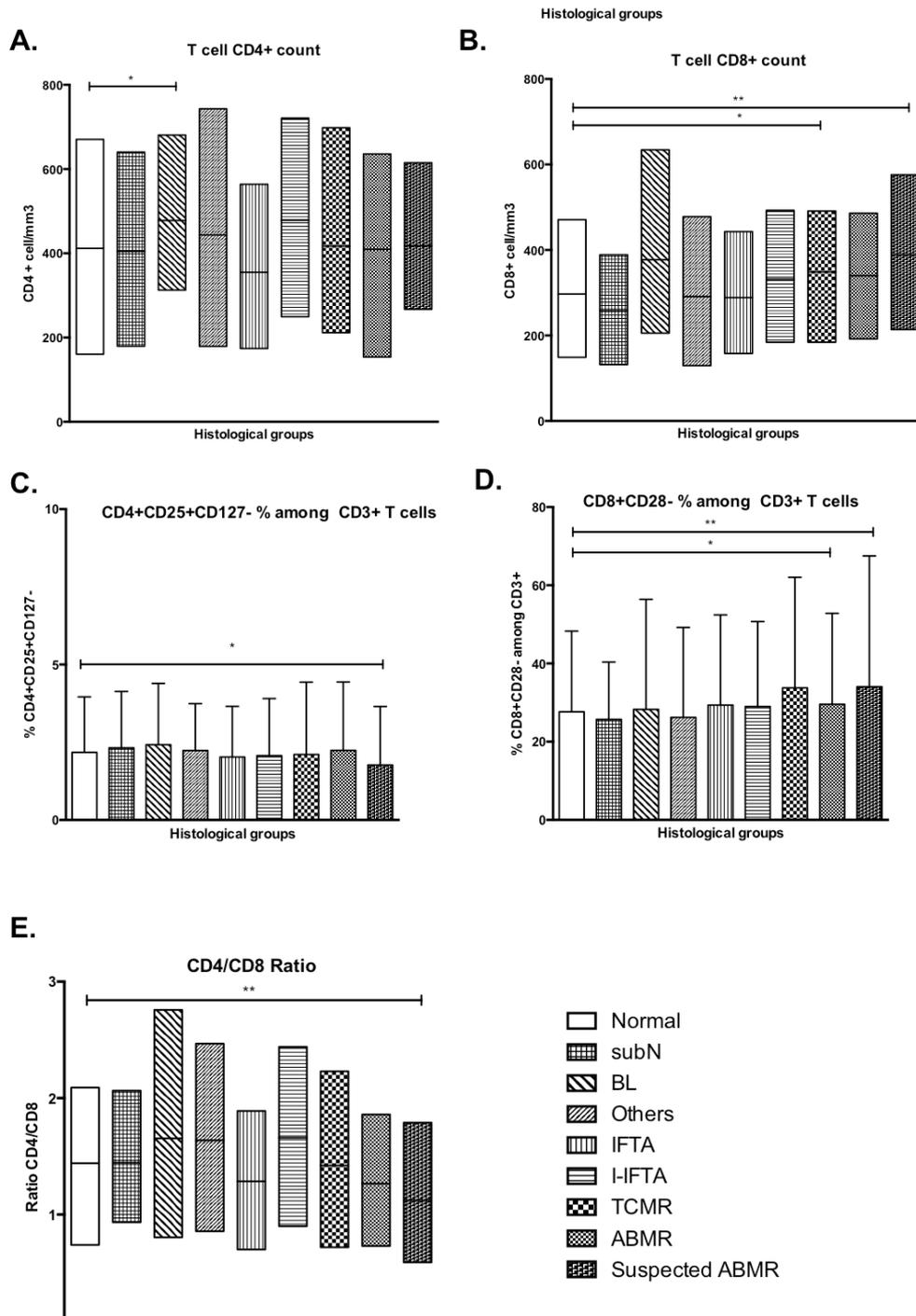
Les caractéristiques cliniques et biologiques des 1097 patients selon leur diagnostic histologique à la biopsie de greffon sont présentées dans le Tableau IX. Les patients appartenant aux groupes "rejet humoral" étaient les plus anciens transplantés (année de transplantation moyenne 2007). Les temps d'ischémie froide les plus courts étaient retrouvés chez les patients des groupes histologie normale (15,1 heures) et subnormale (12,8 heures), les ischémies froides les plus longues étaient retrouvées chez les patients avec un rejet humoral (19,9 heures). 45% des patients avec rejet humoral avaient une immunisation anti-classe I avant la transplantation et 40% une immunisation anti-classe II, les patients avec une suspicion de rejet humoral avaient une immunisation comparable (41% présentaient des anticorps anti HLA I et 45% des anti HLA II) Les patients de ces deux groupes étaient ceux ayant le plus bénéficié d'une retransplantation (22% et 27% respectivement). 85% des patients du groupe « rejet humoral » avaient développé des DSA de novo, 50% des patients avec biopsies subnormales, 35% des patients appartenant au groupe « rejets cellulaires » et 16% au groupe « suspicions de rejets humoral ». Conformément à notre définition, aucun patient des groupes « histologie normale » et « suspicion de rejet humoral » n'avait de DSA le jour de la biopsie. L'immunisation pour les autres groupes étaient hétérogènes mais toujours plus importante en classe II : 82% des patients avec rejet humoral avaient des DSA classe II et 36% de classe I, 18% des patients avec biopsie subnormale avaient des DSA de classe I et 41% des DSA de classe II. Au terme du suivi, 16% des patients du groupe suspicion de rejet humoral avaient développé des DSA (5,8±4 ans après la transplantation) et 12% des patients avec biopsie normale (suivi à 5 ans). La créatinine sérique au moment de la biopsie était plus élevée dans les groupes rejet cellulaire (263µmol/L ± 143), rejet humoral (234 µmol/L ±157), suspicion de rejet humoral (209 µmol/L ± 127) et la catégories autres comprenant les récives de maladies initiales et les néphropathies infectieuse ( BKv , pyélonéphrite, créatinine sérique 213µmol/L ±142). Les patients avec lésions borderline avaient présenté plus d'infection urinaire (41%) et la virémie BKvirus était plus fréquente dans la catégorie autres diagnostics (30%).

Tableau IX. Caractéristiques démographiques de la population en fonction du diagnostique histologique

	Normale		Subnormal		Borderline		Others		IFTA		i-IFTA		TCMR		ABMR		Suspected ABMR		p		
	350	sd or % 32%	56	sd or % 5%	56	sd or % 5%	107	sd or % 10%	179	sd or % 16%	180	sd or % 16%	31	sd or % 3%	89	sd or % 8%	49	sd or % 4%			
<b>Year graft</b>	2012	±4	2012	5	2010	5	2009	7	2011	4	2010	5	2009	4	2007	6	2010	5	1,55E-12		
<b>Initial disease</b>									<b>Recipient characteristics</b>										1,00E-04		
<b>Unknown</b>	29	8%	4	7%	2	4%	6	6%	19	11%	16	9%	4	13%	9	10%	3	6%			
<b>Primary glomerulopathies</b>	73	21%	12	21%	21	38%	51	48%	35	20%	37	21%	5	16%	22	25%	11	22%			
<b>Malformative uropathy , reflux</b>	160	46%	25	45%	21	38%	31	29%	88	49%	83	46%	17	55%	35	39%	19	39%			
<b>Nephroangiosclerosis/hypertension</b>	20	6%	1	2%	3	5%	9	8%	12	7%	19	11%	0	0%	5	6%	7	14%			
<b>Diabetes</b>	68	19%	14	25%	9	16%	10	9%	25	14%	25	14%	5	16%	18	20%	9	18%			
<b>Transplantation rank</b>									<b>Donor characteristics</b>										5,00E-04		
<b>1</b>	295	84%	45	80%	54	96%	84	79%	139	78%	162	90%	29	94%	69	78%	36	73%			
<b>2</b>	49	14%	10	18%	1	2%	20	19%	38	21%	17	9%	2	6%	20	22%	13	27%			
<b>3</b>	6	2%	1	2%	1	2%	2	2%	2	1%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%			
<b>4</b>	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	1	1%	0	0%	0	0%	0	0%			
<b>5</b>	0	0%	0	0%	0	0%	1	1%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%			
<b>Age donor (y)</b>	48,8	16,6	48,3	15,6	51,6	16,7	51,4	16,2	53,3	15,7	53,6	16,8	47,5	18,8	46,4	18,4	52,5	17,8	0,01		
<b>Male gender donor</b>	195	56%	27	48%	30	54%	65	61%	128	72%	110	61%	20	65%	47	53%	27	55%	0,01		
<b>Living donor</b>	39	11%	16	29%	6	11%	14	13%	12	7%	14	8%	2	6%	9	10%	3	6%	0,005		
<b>Deceased Donor</b>	311	89%	40	71%	50	89%	93	87%	167	93%	166	92%	29	94%	80	90%	46	94%			
<b>SCD</b>	205	59%	23	41%	31	55%	53	50%	89	50%	93	52%	18	58%	53	60%	23	47%	0,124		
<b>ECD</b>	105	30%	17	30%	19	34%	37	35%	77	43%	72	40%	10	32%	26	29%	23	47%			
<b>C,arrete</b>	22	6%	3	5%	1	2%	6	6%	12	7%	10	6%	1	3%	1	1%	1	2%			
<b>Cold ischemia time (h)</b>	15,1	±7	12,8	±9	16,8	±9	18,6	±11	<b>Transplant characteristics</b>										2,22E-05		
<b>Induction</b>									17,1	±8	17,4	±9	17,2	±5	19,9	±10	18,5	±8	1,00E-04		
<b>None</b>	7	2%	1	2%	1	2%	9	8%	3	2%	4	2%	1	3%	8	9%	0	0%			
<b>Non depleting</b>	194	55%	29	52%	41	73%	50	47%	84	47%	121	67%	20	65%	37	42%	22	45%			
<b>Depleting induction</b>	148	42%	26	46%	14	25%	48	45%	92	51%	55	31%	10	32%	44	49%	27	55%			
<b>Maintenance therapy</b>									<b>Features on the day of biopsy</b>												
<b>CSA</b>	20	6%	5	9%	15	27%	24	22%	16	9%	20	11%	3	10%	23	26%	6	12%	1,00E-04		
<b>tacro</b>	328	94%	51	91%	41	73%	84	79%	163	91%	161	89%	27	87%	67	75%	42	86%	1,00E-04		
<b>Daily anti-HLA immunization class I</b>	110	31%	19	34%	10	18%	27	25%	49	27%	42	23%	5	16%	40	45%	20	41%	0,002		
<b>class II</b>	81	23%	23	41%	5	9%	26	24%	54	30%	29	16%	6	19%	36	40%	22	45%	1,00E-04		
<b>Daily anti HLA DSA</b>	18	5%	12	21%	1	2%	5	5%	8	4%	2	1%	0	0%	17	19%	2	4%	1,00E-04		
<b>Time from transplant to biopsy (y)</b>	1,3	2,7	1,6	3,9	2,2	3,4	3,9	5,6	<b>Features on the day of biopsy</b>		2,0	3,5	2,5	4,0	2,8	4,2	5,2	6,0	2,9	4,0	3,28E-07
<b>Indications biopsies</b>																				1,00E-04	
<b>Cause</b>	89	25%	25	45%	22	39%	66	62%	57	32%	74	41%	27	87%	72	81%	32	65%			
<b>M3</b>	95	27%	13	23%	11	20%	9	8%	21	12%	27	15%	1	3%	1	1%	2	4%			
<b>M12</b>	153	44%	18	32%	20	36%	30	28%	94	53%	74	41%	3	10%	11	12%	13	27%			
<b>Recipient SCR at the biopsy</b>	160,7	±117	166,1	±76	171,9	±120	213,8	±142	173,1	±105	174,3	±112	263,7	±143	234,7	±157	209,2	±127	7,11E-06		
<b>Recipient SCR at biopsy + 12 months</b>	138,4	±75	144,7	±48	154,4	±86	188,1	±72	158,4	±70	168,9	±94	215,0	±136	203,3	±134	206,3	±115	6,92E-09		
<b>Anti HLA class I DSA on the day of biopsy</b>	0	0%	10	18%	2	4%	0	0%	1	1%	2	1%	3	10%	32	36%	0	0%	1,00E-04		
<b>Anti HLA class II DSA on the day of biopsy</b>	0	0%	23	41%	2	4%	5	5%	6	3%	8	4%	4	13%	73	82%	0	0%	1,00E-04		
<b>tacro PBR</b>	8,3	±2	8,3	±2	7,9	±3	7,9	±4	8,1	±2	7,4	±2	7,8	±2	7,4	±2	7,4	±2	0,05		
<b>Time from transplant to last follow-up (y)</b>	5	±3	5,3	±4	6,1	±4	7,1	±6	<b>Complications</b>										7,12E-05		
<b>Anti-HLA-DSAs</b>	43	12%	28	50%	7	13%	15	14%	26	15%	29	16%	11	35%	76	85%	8	16%	1,00E-04		
<b>Recipient SCR at 12 months (µmol/L)</b>	133	±56	138	±41	135	±52	171	±85	145	±56	146	±55	167	±88	149	±72	158	±84	2,10E-03		
<b>Last Recipient SCR</b>	160	±114	177	±106	210	±146	293	±198	204	±147	221	±165	318	±228	337	±222	337	±293	7,99E-18		
<b>Urinary infection</b>	81	23%	13	23%	23	41%	36	34%	42	23%	52	29%	12	39%	32	36%	17	35%	0,02		
<b>BKv</b>	54	15%	8	14%	9	16%	32	30%	17	9%	23	13%	6	19%	15	17%	10	20%	0,004		
<b>Neoplasia</b>	52	15%	7	13%	12	21%	24	22%	22	12%	37	21%	8	26%	16	18%	8	16%	0,18		

4. Description des phénotypes lymphocytaires T CD4+ et CD8+ en fonction des lésions histologiques

Les phénotypes lymphocytaires T CD3+CD4+, T CD3+CD8+, Treg CD4+CD25+CD127- et LT cytotoxiques CD8+CD28- ont été analysés chez les 1097 patients (Figure 13 et Tableau X et XI).



**Figure 13. Description des phénotypes lymphocytaires T en fonction des 9 catégories histologiques.** A. Nombre de LT CD4+. B. Nombre de LT CD8+, C. pourcentage de Treg parmi les LT totaux CD3+ D. Pourcentage de LT CD8+CD28- parmi les LT totaux CD3+. E. Ratio CD4/CD8

La valeur moyenne des LT CD4+ circulants au moment des biopsies était de 474 cellules/mm<sup>3</sup>, les patients avec une biopsie normale avaient moins de LT CD4+ circulants que les biopsies borderline (465 vs 547 cellules/mm<sup>3</sup> p = 0,04). Le compte moyen de LT CD8+ était de 375 cellules/mm<sup>3</sup> ; les patients avec des lésions de suspicions de rejet humoral et les rejets cellulaires avaient plus de LT CD8+ que les biopsies normales (546 et 379 cellules /mm<sup>3</sup> respectivement vs 360 cellules /mm<sup>3</sup> p=0,002 et p = 0,04). Le ratio CD4/CD8 était en moyenne de 1,7 et significativement inférieur chez les patients avec suspicion de rejet humoral (1,3 vs 1,7 chez les biopsies normales p = 0,003).

Tableau X. Descriptions des phénotypes lymphocytaires T en fonction des lésions histologiques. A. Valeurs absolues des phénotypes lymphocytaires sanguins périphériques (en cellules / mm<sup>3</sup>) B. Pourcentage des sous-populations lymphocytaires T parmi les LT totaux CD3+

A.	All	Normale	Subnormal	Borderline	Others	IFTA	i-IFTA	TCMR	ABMR	Suspected ABMR
n=	1097	350	56	56	107	179	180	31	89	49
LT CD4+	474 ±355	465 ±360	444 ±336	548 ±363	504 ±400	410 ±325	516 ±321	467 ±381	513 ±429	428 ±256
LT CD8 +	375 ±356	360 ±318	272 ±172	464 ±525	338 ±288	363 ±394	376 ±329	379 ±255	417 ±340	546 ±572
Ratio CD4/CD8	1,7 ±1	1,7 ±1	1,7 ±0	1,9 ±1	1,9 ±1	1,5 ±1	1,9 ±1	1,6 ±1	1,5 ±1	1,2 ±0
Treg CD4+CD25+CD127-	27 ±23	28 ±26	24 ±18	29 ±22	28 ±25	23 ±15	27 ±22	25 ±24	31 ±26	21 ±12
LT CD8+CD28-	163 ±273	147 ±232	80 ±93	247 ±460	130 ±189	165 ±294	155 ±242	175 ±203	182 ±216	331 ±519
B.	All	Normale	Subnormal	Borderline	Others	IFTA	i-IFTA	TCMR	ABMR	Suspected ABMR
n=	1097	350	56	56	107	179	180	31	89	49
LT CD4+	37 ±15	36 ±15	39 ±16	41 ±14	39 ±15	35 ±14	41 ±15	40 ±15	37 ±13	33 ±14
LT CD8 +	30 ±13	29 ±13	27 ±9	31 ±15	27 ±13	31 ±13	30 ±12	34 ±14	32 ±13	36 ±16
Treg CD4+CD25+CD127-	2,3 ±1	2,3 ±1	2,3 ±1	2,4 ±1	2,4 ±1	2,2 ±1	2,3 ±1	2,3 ±1	2,5 ±1	1,8 ±1
LT CD8+CD28-	12 ±12	11 ±11	8 ±7	14 ±15	9 ±9	13 ±12	12 ±11	16 ±15	14 ±12	19 ±18

Tableau XI. Comparaison en analyse univariée des sous-populations lymphocytaires sanguines chez les patients avec biopsies normales par rapport aux patients avec rejet humoral ( ABMR), suspicion de rejet humoral (suspected ABMR) rejet cellulaire ( TCMR) et lésions borderline

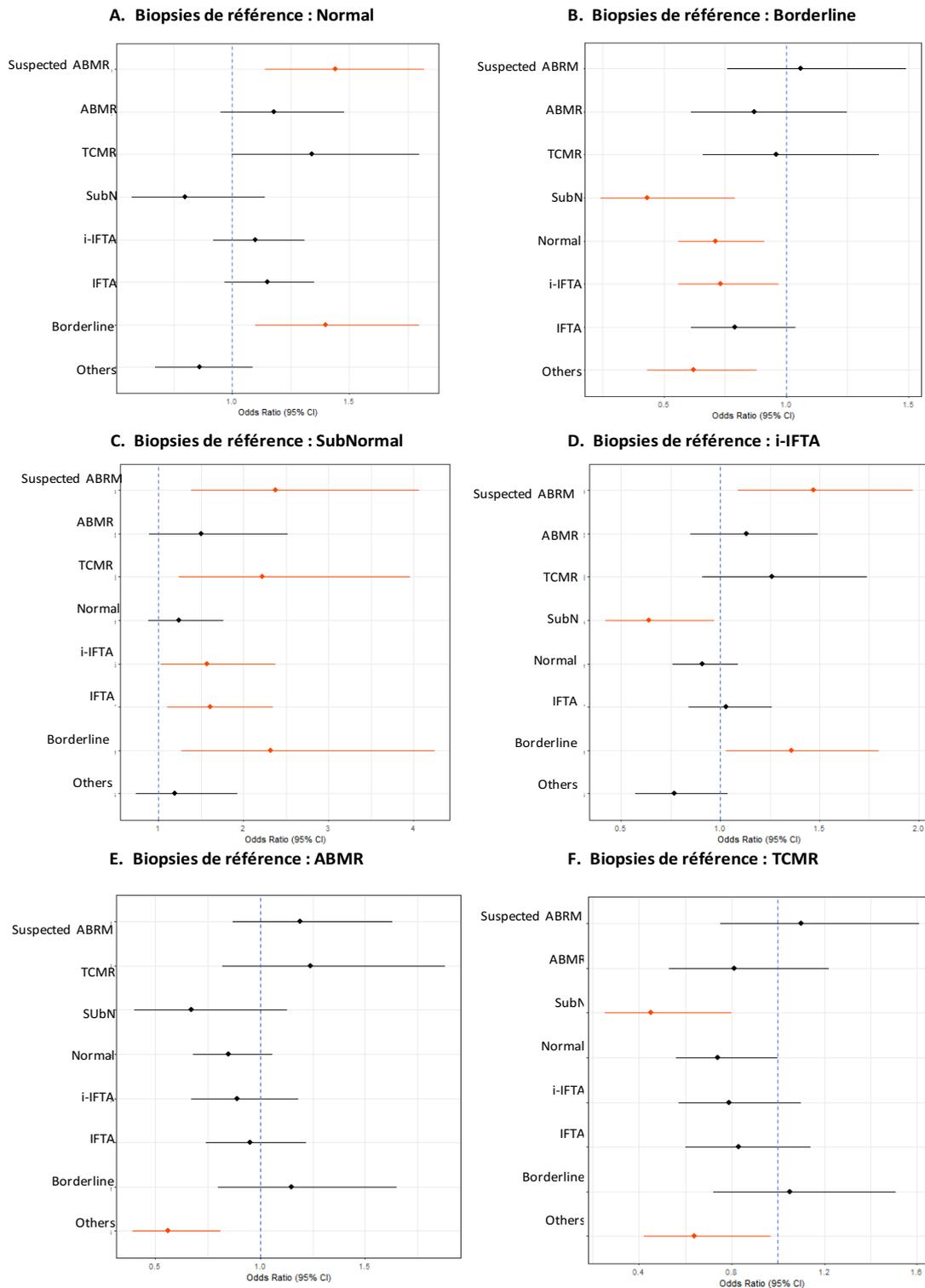
	ABMR	Suspected ABMR	TCMR	Borderline
LT CD4+	0.921	0.204	0.228	<b>0.044</b>
LT CD8 +	0.099	<b>0.002</b>	<b>0.046</b>	0.401
Ratio CD4/CD8	0.175	<b>0.003</b>	0.954	0.289
Treg CD4+CD25+CD127-	0.468	<b>0.017</b>	0.913	0.828
LT CD8+CD28-	<b>0.040</b>	<b>0.003</b>	0.072	0.085

Le pourcentage de LT régulateurs circulants était en moyenne de 2,3%, il était plus bas chez les patients avec une suspicion de rejet humoral que chez les patients avec une biopsie normale (1,8 % vs 2,3% p = 0,01). Le pourcentage de LTCD8+CD28- était de 12% sur l'ensemble des 1097 patients, et

significativement augmenté chez les patients avec suspicion de rejet humoral par rapport aux patients avec une biopsie normale (19% vs 11%  $p=0,003$ ), et chez les patients avec un rejet humoral (14%  $p = 0,04$ ). Les patients avec un rejet cellulaire avaient aussi un pourcentage important de CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> de 14% ( $p = 0,07$ ) sans différence statistique avec les biopsies normales, probablement du fait du petit effectif des rejets cellulaires ( $n= 31$ ).

#### 5. Analyse des phénotypes sanguins lymphocytaires en fonction des différents diagnostics histologiques

Nous avons retrouvé en analyse univariée une augmentation du pourcentage des LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> chez les patients présentant un rejet humoral et ceux présentant des lésions suspectes de rejet humoral (Figures 13 et Tableau XI). Afin d'étudier la corrélation entre notre phénotype lymphocytaire sanguin d'intérêt CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> et l'histologie du greffon rénal nous avons réalisé une analyse de régression logistique multivariée en analysant le risque de présenter un des 9 diagnostics histologiques pour chaque augmentation de 10% des LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> dans le sang au même moment que la biopsie, en changeant dans chaque modèle le groupe de référence. L'analyse était ajustée sur l'âge et le genre, le rang de transplantation, la compatibilité CMV, la présence de DSA, le délai après la transplantation, la durée d'ischémie froide, les indications de biopsies et le traitement d'induction (Figure 14 et tableau XII). La comparaison ajustée des patients du groupe histologie normale avec les 8 autres catégories diagnostics (figure 14A) retrouvait que pour chaque augmentation de 10% du taux de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> circulants sanguin, le risque de présenter un diagnostic histologique de lésions borderline était augmenté de 1.40 par rapport à une biopsie normale (OR =1,40 IC95 [1,1-1,8]) et de 1.44 pour des lésions de rejet humoral suspicieux sans DSA (OR=1,44 IC95 [1,14-1,82] avec une tendance pour le rejet cellulaire (OR 1,34 [1-1,8]). La comparaison des patients présentant une biopsie borderline (Figure14B) montrait que le pourcentage de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> confortait le diagnostic de borderline vis à vis des biopsies normales (OR= 0,71 (IC95 [0,56-0,91]) subnormales (OR=0,43 IC95 [0,24-0,79] de FIAT inflammatoires (OR=0,73 IC95 [0,56-0,97] et des autres diagnostics comme les néphropathies à BKv ou les récurrences de la maladie



**Figure 14. Etude de corrélation entre la fréquence des lymphocytes T CD8+CD28<sup>-</sup> du sang périphérique et le diagnostic histologique concomitant des greffons.** Analyse multivariée en régression logistique. L'Odd ratio représente le risque de présenter un autre diagnostic de référence pour chaque augmentation de 10 % des LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> dans le sang circulant au moment de la biopsie. Exemple : la figure A montre que pour chaque augmentation de 10%

initiale. A l'inverse l'augmentation des LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> sanguins dans les biopsies subnormales (Figure 14C) était à risque de rejet cellulaire (OR =1,4 IC95 [1,1-1,8]), de FIAT (OR =1,4 IC95 [1,1-1,8]) et de

**Tableau XII. Résultats des régressions logistiques des histologies. Le groupe de référence est inscrit en haut à gauche de chaque tableau**

**A**

Normal		OR	IC 95%	
Subnormal		0.8	0.57	1.14
Borderline		<b>1.4</b>	<b>1.1</b>	<b>1.8</b>
Others		0.86	0.67	1.09
IFTA		1.15	0.97	1.35
i-IFTA		1.1	0.92	1.31
TCMR		1.34	1	1.8
ABMR		1.18	0.95	1.48
Suspected ABMR		<b>1.44</b>	<b>1.14</b>	<b>1.82</b>

**B**

Borderline		OR	IC 95%	
Normal		<b>0.71</b>	<b>0.56</b>	<b>0.91</b>
Subnormal		<b>0.43</b>	<b>0.24</b>	<b>0.79</b>
Others		<b>0.62</b>	<b>0.43</b>	<b>0.88</b>
IFTA		0.79	0.61	1.04
i-IFTA		<b>0.73</b>	<b>0.56</b>	<b>0.97</b>
TCMR		0.96	0.66	1.38
ABMR		0.87	0.61	1.25
Suspected ABMR		1.06	0.76	1.49

**C**

Subnormal		OR	IC 95%	
Normal		1.24	0.88	1.76
Borderline		<b>2.32</b>	<b>1.27</b>	<b>4.25</b>
Others		1.19	0.73	1.93
IFTA		<b>1.61</b>	<b>1.1</b>	<b>2.35</b>
i-IFTA		<b>1.57</b>	<b>1.03</b>	<b>2.38</b>
TCMR		<b>2.22</b>	<b>1.24</b>	<b>3.96</b>
ABMR		1.5	0.89	2.52
Suspected ABMR		<b>2.38</b>	<b>1.39</b>	<b>4.07</b>

**D**

i-IFTA		OR	IC 95%	
Normal		0.91	0.76	1.09
Subnormal		<b>0.64</b>	<b>0.42</b>	<b>0.97</b>
Borderline		<b>1.36</b>	<b>1.03</b>	<b>1.8</b>
Others		0.77	0.57	1.04
IFTA		1.03	0.84	1.26
TCMR		1.26	0.91	1.74
ABMR		1.13	0.85	1.49
Suspected ABMR		<b>1.47</b>	<b>1.09</b>	<b>1.97</b>

**E**

ABMR		OR	IC 95%	
Normal		0.85	0.68	1.06
Subnormal		0.67	0.4	1.13
Borderline		1.15	0.8	1.65
Others		<b>0.56</b>	<b>0.39</b>	<b>0.81</b>
IFTA		0.95	0.74	1.22
i-IFTA		0.89	0.67	1.18
TCMR		1.24	0.82	1.88
Suspected ABMR		1.19	0.87	1.63

**F**

TCMR		OR	IC 95%	
Normal		0.74	0.56	1
Subnormal		<b>0.45</b>	<b>0.25</b>	<b>0.8</b>
Borderline		1.05	0.72	1.51
Others		<b>0.64</b>	<b>0.42</b>	<b>0.97</b>
IFTA		0.83	0.6	1.14
i-IFTA		0.79	0.57	1.1
ABMR		0.81	0.53	1.22
Suspected ABMR		1.1	0.75	1.61

**G**

IFTA		OR	IC 95%	
Normal		0.87	0.74	1.03
Subnormal		<b>0.62</b>	<b>0.43</b>	<b>0.91</b>
Borderline		1.26	0.97	1.65
Others		<b>0.75</b>	<b>0.57</b>	<b>0.99</b>
i-IFTA		0.97	0.79	1.19
TCMR		1.21	0.88	1.66
ABMR		1.05	0.82	1.34
Suspected ABMR		<b>1.37</b>	<b>1.07</b>	<b>1.75</b>

**H**

Others		OR	IC 95%	
Normal		1.17	0.91	1.49
Subnormal		0.84	0.52	1.36
Borderline		<b>1.62</b>	<b>1.13</b>	<b>2.31</b>
IFTA		<b>1.33</b>	<b>1.01</b>	<b>1.75</b>
i-IFTA		1.3	0.96	1.74
TCMR		<b>1.56</b>	<b>1.03</b>	<b>2.37</b>
ABMR		<b>1.79</b>	<b>1.23</b>	<b>2.59</b>
Suspected ABMR		<b>2.04</b>	<b>1.37</b>	<b>3.05</b>

**I**

Suspected ABMR		OR	IC 95%	
Normal		<b>0.69</b>	<b>0.55</b>	<b>0.87</b>
Subnormal		<b>0.42</b>	<b>0.25</b>	<b>0.72</b>
Borderline		0.94	0.67	1.32
Others		<b>0.49</b>	<b>0.33</b>	<b>0.73</b>
IFTA		<b>0.73</b>	<b>0.57</b>	<b>0.93</b>
i-IFTA		<b>0.68</b>	<b>0.51</b>	<b>0.91</b>
TCMR		0.91	0.62	1.33
ABMR		0.84	0.61	1.15

FIAT inflammatoires (OR =1,4 IC95 [1,1-1,8]) de lésions borderline (OR =1,4 IC95 [1,1-1,8]) et de lésions suspectes de rejet humoral (OR =1,4 IC95 [1,1-1,8]).

Concernant les Treg circulants sanguins, l'analyse univariée montrait une diminution du pourcentage de Treg chez les patients avec une suspicion de rejet humoral par rapport aux biopsies normales, mais l'analyse en régression logistique ne retrouvait pas d'association entre les diagnostics histologiques et le pourcentage de Treg circulants et les diagnostics histologiques (Figure 15)

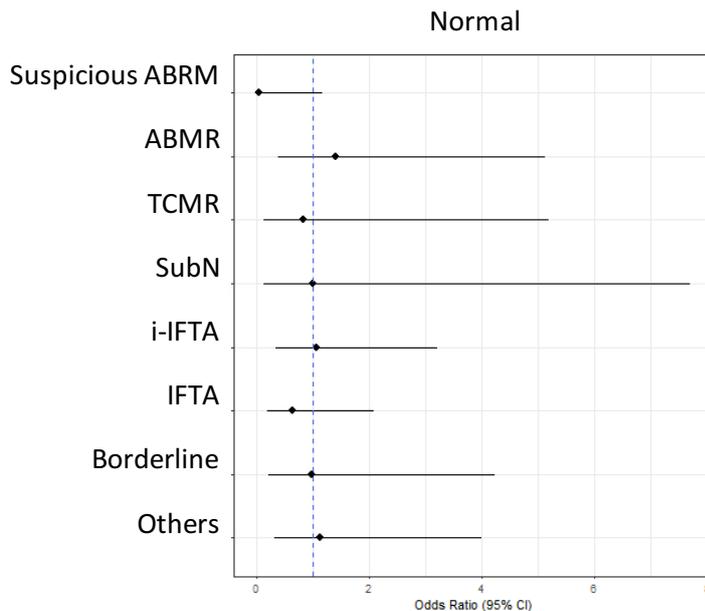
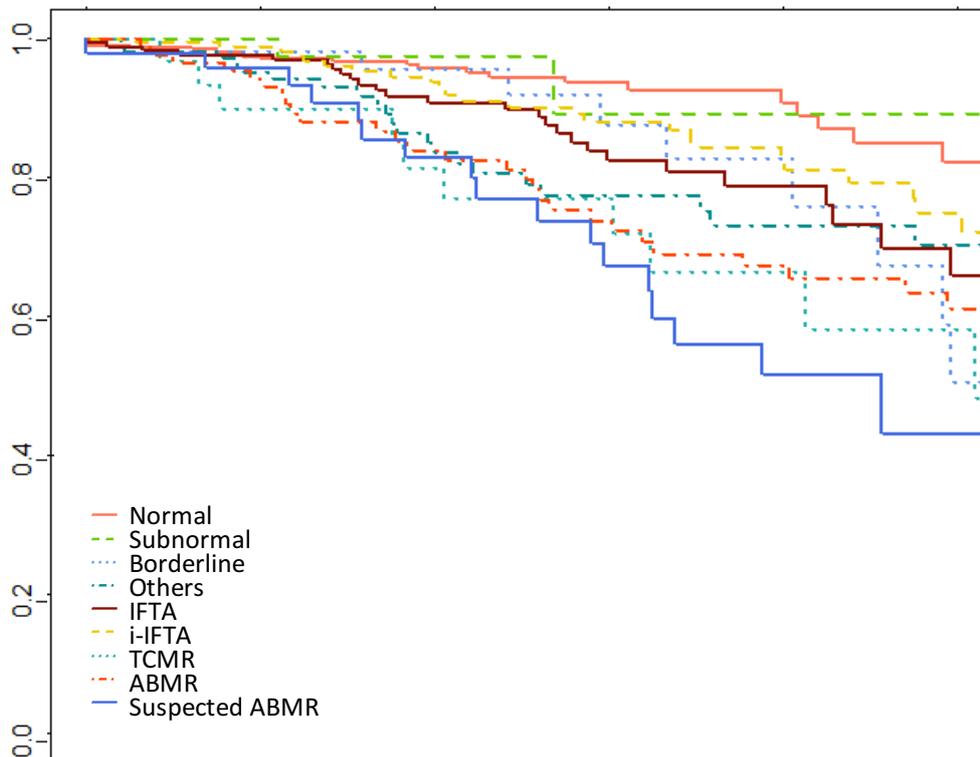


Figure 15. Corrélation multivariée entre la fréquence des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+CD127-du sang périphérique et le diagnostic histologique concomitant des greffons

#### 6. Analyse de survie des greffons en fonction des différents diagnostics histologiques

Toutes histologies confondues la survie de greffe décès censurés était de 98% à 1 an et de 77% à 10 ans. Les greffons avec biopsie normale avaient une survie à 10 ans de 82%, les subnormales de 89% (Figure 16). Les greffons ayant la moins bonne survie à 10 ans et significativement inférieure par rapport aux biopsies normales étaient les suspicions de rejet humoral (43%,  $p = 9,8.10^{-7}$ ), les rejets cellulaires (56%  $p = 2,9.10^{-6}$ ) et humoraux (57%,  $p=1,7.10^{-6}$ ), les lésions de FIAT (65%,  $p = 0,01$ ), le groupe « autres » comprenant les récives et les néphropathies à BKv (68%,  $p =0,0001$ ) et les FIAT inflammatoires (74%,  $p=0,01$ ). Le groupe borderline avait une survie de 47% à 10 ans mais l'effectif est trop petit pour être significatif. Les lésions de rejet cellulaire et de suspicion de rejet humoral avaient une survie également significativement inférieure aux patients présentant des biopsies FIAT et FIAT inflammatoires ( $p= 0,02$  et  $p =0,01$ ,  $p =0,02$  et  $p =0,007$  respectivement)). La survie des patients était identique pour tous les diagnostics histologiques (données non représentées).



Normal	309	258	218	164	127	99	73	53	35	23
SubNormal	52	43	29	21	13	11	8	7	6	4
Borderline	51	45	36	30	22	17	15	11	8	4
Others	95	88	73	53	47	40	33	27	25	23
IFTA	161	145	119	97	81	54	40	33	26	16
i-IFTA	159	141	118	106	90	73	60	49	38	28
TCMR	24	21	19	17	16	16	11	8	7	6
ABMR	75	67	58	54	50	41	35	32	26	22
Suspicious ABMR	44	41	36	29	24	20	15	10	8	5

	Normal	SubNormal	Borderline	Others	IFTA	i-IFTA	TCMR	ABMR
SubNormal	0,31							
Borderline	0,03	0,07						
Others	<b>1,04E-04</b>	<b>0,005</b>	0,49					
IFTA	<b>0,01</b>	0,04	0,83	0,17				
i-IFTA	<b>0,01</b>	0,03	0,71	0,27	0,98			
TCMR	<b>2,91E-06</b>	<b>0,001</b>	0,09	0,12	<b>0,02</b>	<b>0,01</b>		
ABMR	<b>1,72E-06</b>	<b>0,001</b>	0,18	0,52	0,03	0,079	0,33	
Suspicious ABMR	<b>9,80E-07</b>	<b>0,002</b>	0,09	0,22	<b>0,02</b>	<b>0,007</b>	0,90	0,58

Figure 16. Etude de survie à 10 de la transplantation en fonction du diagnostic histologique. Survie du greffon sans retour en dialyse ni retransplantation, décès censurés. pvalue calculée avec le false discovery rate Benjamini-Hochberg,  $fdr = 0.05$ , du fait de des mesures répétées entre chaque groupe histologique s

### 7. Résultats complémentaires

Nous avons ainsi vérifié notre hypothèse et démontré que le pourcentage de lymphocytes sanguins circulants  $CD8^+CD28^-$  pouvait être un marqueur sanguin significativement associé à des diagnostics histologiques observés au même moment sur la biopsie des greffons. Plus particulièrement, notre observation concerne l'association significative de la fréquence des  $CD8^+CD28^-$  dont l'augmentation dans le sang circulant est significativement associée à des diagnostics histologiques de suspicions de rejet

humoral et de lésions borderline indépendamment de facteurs de confusion comme l'âge, du statut CMV, du traitement d'induction et de l'indication de la biopsie chez le receveur. Nous avons réalisé ensuite trois analyses supplémentaires afin : 1/ d'analyser les variables associées au taux de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, 2/ d'étudier l'évolution naturelle et la prise en charge des patients avec suspicion de rejet humoral, ce groupe ayant été mis en avant par les résultats de l'analyse de corrélation entre LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> circulants et histologie, 3/ analyser les résultats des immunophénotypages des lymphocytes B CD19<sup>+</sup> et des cellules NK CD16<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> réalisés à partir de 2014 et n'ayant pas pu être pris en compte dans l'analyse principale.

#### 7.1. Analyses des variables associées au pourcentage de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> - circulants

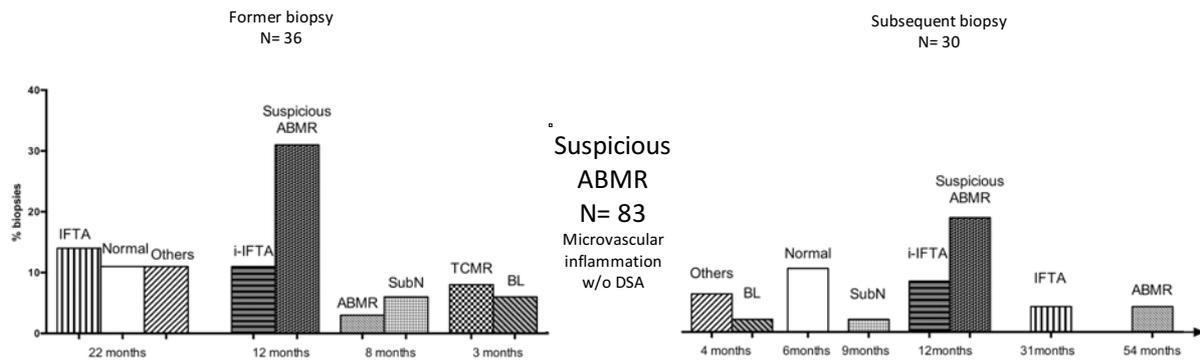
Nous avons analysé les variables associées à la variation du taux de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> circulants. Pour cela nous avons réalisé une régression linéaire permettant de comparer les pourcentages de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> entre les patients ayant une biopsie normale et les patients ayant une suspicion de rejet humoral, ajustée sur l'âge, le genre, le rang de transplantation, le statut CMV, le délai à la transplantation, le traitement d'induction (Tableau XIII) L'analyse en régression linéaire confirmait que les patients avec suspicion de rejet humoral avaient plus de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> circulants que les patients avec biopsie normales (+ 4,68% p 0,001). Le pourcentage de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> circulants était aussi associé de manière indépendante à la séropositivité CMV par rapport aux patients CMV négatif (+9,3% de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> p = 2,3 $\times 10^{-14}$  chez les couples receveurs et donneur séropositifs, +9% p = 2,4 $\times 10^{-12}$  lors des mismatches receveur positif, +7,8% p = 2,1  $\times 10^{-10}$  dans les couples CMV R-/D+). L'âge du receveur était également associé à une augmentation de 0.1% pour chaque année supplémentaire (p= 0,01). Les patients qui avaient reçu un traitement d'induction non déplétant avaient en moyenne 3,5% de moins de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> que les patients ayant reçu un traitement déplétant. Ces analyses confirmaient l'association entre un taux élevé de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> et les lésions histologiques suspicion de rejet humoral, et démontrait une association forte et indépendante entre le statut CMV et le taux de CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> circulants.

Tableau XII. Analyse multivariée avec régression linéaire multiples des variables clinico biologiques associées au pourcentage de LT CD8+CD28- sanguins. Le coefficient Estimate représente la moyenne de différence entre les deux groupes étudiés (par exemple +4,67 % de LT CD8CD28- chez les patients avec suspicion de rejet humoral par rapport aux patients biopsie normale, résultat ajusté à toutes les variables du modèle)

	Estimate (%)	sd	t value	Pr(> t )	
<b>Suspected ABMR vs Normal biopsies</b>	<b>4,68</b>	<b>1,38</b>	<b>3,384</b>	<b>0,001</b>	<b>***</b>
<b>Age Recipient (y)</b>	<b>0,12</b>	<b>0,05</b>	<b>2,453</b>	<b>0,014</b>	<b>*</b>
Age donor (y)	0,04	0,04	0,985	0,325	
Male gender recipient	-1,21	0,94	-1,296	0,195	
Formers transplants	0,62	1,36	0,453	0,650	
<b>CMV R+/D+</b>	<b>9,34</b>	<b>1,19</b>	<b>7,832</b>	<b>2,32E-14</b>	<b>***</b>
<b>CMV R+ /D-</b>	<b>9,05</b>	<b>1,26</b>	<b>7,162</b>	<b>2,44E-12</b>	<b>***</b>
<b>CMV R- / D+</b>	<b>7,87</b>	<b>1,22</b>	<b>6,466</b>	<b>2,15E-10</b>	<b>***</b>
Time from transplant to biopsy (d)	0,10	0,06	1,644	0,101	
Cold ischemia time (h)	0,00	0,00	0,916	0,360	
<b>Non depleting vs Depleting Induction</b>	<b>-3,53</b>	<b>1,06</b>	<b>-3,328</b>	<b>0,001</b>	<b>***</b>

## 7.2. Evolution naturelle et prise en charge des suspicions de rejets humoraux.

Le profil phénotypique CD8+CD28- similaire entre rejet cellulaire et les suspicions de rejet humoral nous a incités à étudier l'évolution naturelle des suspicions de rejet humoral et la prise en charge médicale qui avait été faite. Parmi les 1640 biopsies réalisées 83 retrouvaient des lésions de suspicion de rejet humoral. Une précédente biopsie avait été réalisée chez 36 patients parmi les 83 (Figure 17). 8% des biopsies réalisées dans les 3 mois précédant le diagnostic de suspicion de rejet humoral étaient des rejets cellulaires, 6% des lésions borderline. Un tiers des biopsies étaient déjà considérées comme suspicion de rejet humoral 1 an auparavant. 30 patients ont eu une biopsie après le diagnostic de suspicion de rejet humoral, pour 17% l'histologie restait suspecte de rejet humorale 12 mois plus tard et pour 10% l'histologie s'était normalisée à 10 mois. Seulement 4% ont évolué en rejet humoral chronique actif, 54 mois après la suspicion histologique.



**Figure 17. Evolution naturelle du diagnostic histologique de suspicion de rejet humoral. Analyse des résultats histologiques précédant la suspicion de rejet humoral (n = 36 patients) et succédant à ce diagnostic (n=30).**

Les 53 patients qui n'ont pas eu de biopsie de contrôle avaient une fonction du greffon trop dégradée pour espérer une récupération fonctionnelle (31 patients /53) ou parce que le diagnostic de suspicion avait été posé en cours d'une biopsie de surveillance et qu'il n'y avait pas eu de dégradation de fonction du greffon ultérieurement (22 patients). 3 stratégies de prise en charge ont été observées : pour 34 patients (40%) aucune modification thérapeutique n'a été réalisée et les patients ont conservé un schéma d'immunosuppresseurs sans corticoïdes. 45 patients (54%) ont vu le maintien ou l'ajout d'une corticothérapie orale, et 4 patients (5%) ont reçu des bolus de corticoïdes (Tableau XIV) Les 3 groupes présentaient une créatinine sérique comparable, mais le diagnostic de suspicion de rejet humoral dans le groupe "corticoïdes oraux" avait principalement été posé après des biopsies pour cause (67%) contrairement aux patients du groupe sans corticoïdes qui avaient principalement bénéficié d'une biopsie de surveillance (59%) (p =0,04). A 4 ans de suivi, 50% des patients du groupe sans corticoïde avaient un greffon fonctionnel, et 33% du groupe avec corticoïdes oraux (ns). Il n'y a pas eu plus d'infection opportuniste entre les 3 groupes.

**Tableau XIV. Comparaison des patients avec suspicion de rejet humoral en fonction de la prise en charge médicale.**

	No steroids		Triple therapy		Pulses steroids		p
n=	34		45		4		
Time from transplant to biopsy (d)	379	IQR 352-954	383	IQR 160-1424	230	IQR 32-634	0,14
SCr at the biopsy	161	IQR 111-201	160	IQR 129-238	189	IQR 90-467	0,15
Indication Biopsie							0,04
Indicated biopsies	14	41%	30	67%	2	50%	
Surveillance biopsy	20	59%	15	33%	2	50%	
Incidence of graft lost at 10y post transplant	17	50%	15	33%	3	75%	0,1
Urinary tract infection	11	32%	16	36%	1	25%	0,2
Median time to UTI (d)	537	IQR 25-1331	336	IQR 62-1403	403		0,53*
Opportunistic infections	8	24%	9	20%	1	25%	0,20
Median time between biopsy and OI (d)	617	IQR 180-1441	451	IQR 40-989	11		0,37*

\* Comparison between No change and triple therapy

Nous avons montré que les patients avec suspicions de rejet humoral, définis par l'atteinte de la microcirculation sans DSA, présentaient une augmentation des LT CD8+CD28- tout comme les lésions borderlines et les rejets cellulaires. Nous avons décrit les prises en charge médicales réalisées en l'absence de cette information phénotypique, et constaté des stratégies hétérogènes, pour lesquelles l'argument biologique d'un phénotype lymphocytaire associé au rejet pourrait aider à homogénéiser les pratiques.

### 7.3. Analyse complémentaire des lymphocytes B et des cellules NK

A partir de 2014, nous avons collecté en plus de l'étude des sous-populations de lymphocytes T, l'immunophénotypage des lymphocytes B CD19+ et des cellules NK CD16+56-. Nous avons analysé les données des patients ayant bénéficié de l'intégralité de l'analyse phénotypique populations lymphocytaires T CD4+, CD8+, Treg, CD8+CD28-, LB CD19+ et cellules NK CD16+CD56- soit 416 patients lors de la biopsie de surveillance à 3 mois et 395 patients à 12 mois (Figure 18 et Tableau XV). Les LT CD4+ n'avaient pas augmenté de manière significative entre 3 et 12 mois : de 335 cell/mm<sup>3</sup> à 416 cell/mm<sup>3</sup> (p=0,2) et le nombre de Treg était resté stable de 21 cell/mm<sup>3</sup> à 22 cell/mm<sup>3</sup> (p = 0,9). A l'inverse le nombre de LT CD8+ était passé de 217 cell/mm<sup>3</sup> à 314 cell/mm<sup>3</sup> p <0,0001, et le nombre de LT CD8+CD28- a augmenté de 39 cell/mm<sup>3</sup> à 101 cell/mm<sup>3</sup> p <0,0001. Les LB et les cellules NK s'étaient également reconstitués : de 84 à 108 cell/mm<sup>3</sup> p <0,006 et de 110 à 136 cell/mm<sup>3</sup> p <0,0001.

Figure 18. Comparaison des taux circulants de lymphocytes CD4+, CD8+ , Treg, CD8+CD28-, LB et cellules NK à 3 mois n = 416 et à 12 mois n = 395

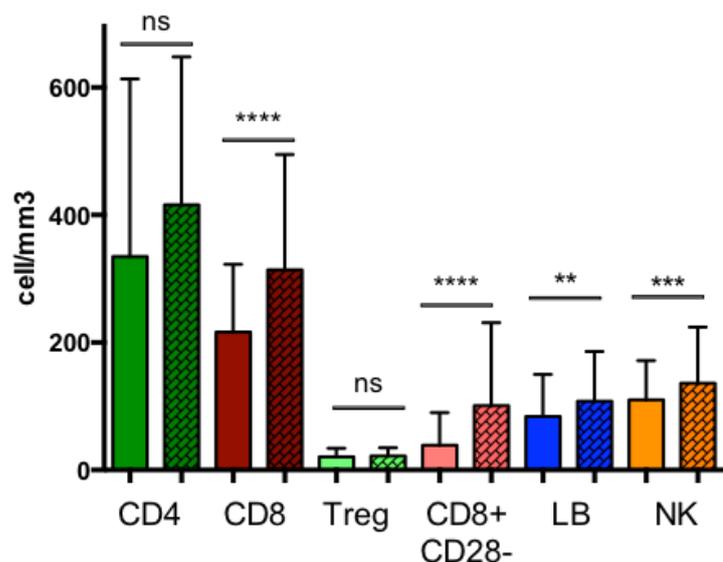


Tableau XIII. Valeurs absolues des sous-populations lymphocytaire à 3 mois et à 12 mois de la transplantation (cellules /mm<sup>3</sup>)

	CD4	CD8 M3 ( N= 416)	TREG	CD8+CD28-	CD19	CD56
Minimum	11	9	0	1	0	0
25% Percentile	132,3	116,5	10	18,7	45	63
<b>Median</b>	<b>335</b>	<b>217</b>	<b>21</b>	<b>39</b>	<b>84</b>	<b>110</b>
75% Percentile	613,3	322,5	34	90	150	171,8
Maximum	3054	3005	422,2	2023	1574	707
	M12 (N = 395)					
Minimum	44	18	2,57	2	3	9
25% Percentile	203	191	15	31	64	83
<b>Median</b>	<b>416</b>	<b>314</b>	<b>22</b>	<b>101</b>	<b>108</b>	<b>136</b>
75% Percentile	648	495	35,1	231	186	224
Maximum	1651	2019	156,9	1615	2082	1179

Nous avons analysé ces données avec un modèle multivariés ajusté sur les traitements d'induction, les âges des donneurs et receveurs, le genre, le rang de transplantation, la durée d'ischémie froide et l'appariement des sérologies CMV donneur/receveur (Table XVI). Le traitement d'induction déplétant a entraîné une diminution à 3 mois post transplantation de 25/mm<sup>3</sup> LT CD4+ en moyenne ( $p = 2 \cdot 10^{-16}$ ) et de 13 cell/mm<sup>3</sup> Treg ( $p < 0,00001$ ) Cet effet perdurait à 12 mois post transplantation : les patients ayant reçu une induction déplétante avaient en moyenne 17 Treg/mm<sup>3</sup> de moins que les patients traités par induction non déplétante ( $p = 2 \cdot 10^{-16}$ ). Le nombre de LT CD8+CD28- était aussi influencé par le traitement d'induction à 3 mois : une diminution moyenne de 60 CD8+CD28-/mm<sup>3</sup> ( $p = 1 \cdot 10^{-6}$ ) mais cet effet n'était pas retrouvé sur le nombre de CD8+CD28- à 12 mois ( $p = 0,449$ ). On retrouvait l'association du statut CMV sur le nombre de CD8+CD28- (+251/mm<sup>3</sup> LT CD8+CD28- à 12 mois de la transplantation chez les patients receveurs CMV+ que chez les receveurs séronégatifs ( $p = 2 \cdot 10^{-16}$ ).

Tableau XIV. Analyse multivariée avec régression linéaire multiples des variables clinico biologique associées au phénotype lymphocytaire sanguin à 3 mois et à 12 mois (valeurs absolues en cellules / mm<sup>3</sup>). Le coefficient Estimate représente la moyenne de la différence entre les deux groupes étudiés (par exemple – 25/mm<sup>3</sup> CD4 chez- les patients ayant reçu un traitement d'induction déplétant. Pour les variables quantitative, le coefficient Estimates évalue la variation du taux de lymphocyte par unité (par exemple pour l'âge du receveur : à chaque année les patients avaient un taux de Treg qui diminuait de 0,3 cell/mm<sup>3</sup>) résultats ajusté à toutes les variables du modèle

M3	Variables	Estimate (cell/mm3)	Std. Error	t value	Pr(> t )	
<b>CD4</b>	Lymphocyte-depleting induction	<b>-25,69</b>	1,21	-21,25	2,00E-16	***
	Cold ischemia	<b>-0,18</b>	0,07	-2,64	0,01	**
<b>TREG</b>	Lymphocyte-depleting induction	<b>-13,54</b>	3,10	-4,37	1,46E-05	***
	Recipient age	<b>-0,37</b>	0,14	-2,69	0,01	**
	CMV D+/R-	-3,16	2,07	-1,53	0,13	
	CMV D-/R+	-0,85	2,14	-0,40	0,69	
	CMV D+/R+	-2,87	2,14	-1,34	0,18	
<b>CD8+CD28-</b>	Lymphocyte-depleting induction	<b>-60,79</b>	12,62	-4,82	1,84E-06	***
	CMV D+/R-	<b>67,90</b>	14,00	4,85	1,57E-06	***
	CMV D+/R+	<b>90,91</b>	13,66	6,65	6,50E-11	***
M12		Estimate (cell/mm3)	Std, Error	t value	Pr(> t )	
<b>CD4</b>	Lymphocyte-depleting induction	<b>-17,58</b>	1,12	-15,76	2,00E-16	***
	CMV D+/R-	<b>-8,00</b>	1,22	-6,56	1,16E-10	***
	CMV D-/R+	<b>-3,26</b>	1,26	-2,59	9,97E-03	**
	CMV D+/R+	<b>-5,59</b>	1,26	-4,42	1,16E-05	***
<b>TREG</b>	Lymphocyte-depleting induction	<b>-17,45</b>	1,90	-9,17	<2e-16	***
	Recipient age	<b>-0,19</b>	0,09	-2,11	0,04	*
<b>CD8+CD28-</b>	Lymphocyte-depleting induction	19,56	25,84	0,76	0,45	
	CMV D+/R-	<b>251,58</b>	28,08	8,96	2,00E-16	***
	CMV D-/R+	<b>150,05</b>	29,02	5,17	3,21E-07	***
	CMV D+/R+	<b>203,01</b>	29,06	6,99	7,67E-12	***

#### IV. Discussion

La survie des greffons rénaux est grevée en grande partie par la survenue de rejets chroniques<sup>4</sup>. Prévenir ces atteintes est un enjeu majeur car ces lésions chroniques sont irréversibles et il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement curatif. Déterminer une signature biologique chez les patients à risque de développer un rejet chronique permettrait d'optimiser leur prise en charge thérapeutique. Dans cette optique plusieurs études portant sur les sous-populations lymphocytaires sanguines des patients transplantés rénaux tolérants, en rejet chronique et d'individus sains ont été réalisées par notre équipe<sup>21,68,111, 125, 137</sup>. L'analyse des patients tolérants permettait d'étudier les mécanismes cellulaires qui pourraient être associés à une meilleure survie de greffon en l'absence de rejet. Notre équipe a ainsi démontré en 2006 que les patients tolérants présentaient un répertoire du TCR V $\beta$  déséquilibré pour la sous-population LT CD8<sup>+</sup><sup>146</sup>, et un nombre de CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> sanguins inférieur aux patients en rejet chronique<sup>127</sup>, mais identique à ceux des individus sains, suggérant que la diminution du nombre de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> sanguins était une caractéristique des patients en rejet chronique. D'autre part Braudeau et al avaient montré que les patients en rejet chronique présentaient un taux circulant de LT régulateurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>FoxP<sup>+</sup> diminué<sup>111</sup>. Ces études ont été réalisées sur de faibles effectifs (22 et 38 patients) avec des comparaisons réalisées en univariées et reliées à une analyse histologique insuffisante par rapport à la classification de Banff actuelle. Nous avons entrepris de réaliser une étude prospective de corrélation entre ces phénotypes lymphocytaires circulants et l'histologie de la biopsie de greffon afin de confirmer ces résultats par analyse multivariée sur une cohorte homogène. Nous avons réalisé une cohorte prospective de 1097 patients transplantés rénaux ayant bénéficié de 1640 biopsies de greffons associées à l'analyse phénotypique sur échantillons sanguins des lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127 et des LT cytotoxiques CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>. Nous avons montré en analyse multivariée qu'il existait une augmentation du pourcentage des LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> lors des lésions histologiques borderline et des suspicions de rejet humoral.

1. Corrélation entre les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> sanguins circulants et l'histologie de la biopsie de greffon rénal

Nous avons réalisé la relecture des 1640 biopsies, et actualisé leur diagnostic à la classification de Banff 2015. Une des forces de notre étude est la précision histologique rapportée aux phénotypes lymphocytaires circulants. Les études phénotypiques existantes chez les patients transplantés rénaux utilisaient principalement l'entité de néphropathie

chronique d'allogreffe regroupant des lésions immunes de rejets humoraux chroniques et non immunologique<sup>111, 147</sup> (Tableau V). Nous avons distingué 9 catégories histologiques afin d'identifier une signature phénotypique pour chaque lésion. Nous avons notamment distingué les lésions aspécifiques « subnormales » correspondant à des dépôts de C4d isolés ou la présence de DSA sans lésion histologique, « suspicions de rejet humoral » et « FIAT inflammatoire » afin d'apporter un argument phénotypique au moment de la biopsie pour conforter ou infirmer la suspicion histologique de rejet.

Nous avons démontré en analyse multivariée que les biopsies « suspicion de rejet humoral » définies par une atteinte de la microvascularisation sans DSA, ainsi que les biopsies borderlines étaient associées à une augmentation des LT cytotoxiques CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> sanguins circulants par rapport aux biopsies normales. Il est possible que ce soit également le cas des biopsies de rejet cellulaire, mais notre population ne comprenait que 31 TCMR ce qui a pu entraîner un manque de puissance pour ce sous-groupe. Ces résultats confortent l'étude de Baeten réalisée sur 38 patients où les patients en rejet chronique présentaient un nombre augmenté de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> par rapport aux témoins sains et aux patients tolérants<sup>68</sup>. Plus récemment Yap et al ont montré que les patients ayant un taux élevé de TEMRA CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup> avaient deux fois plus de risque d'échec de greffe<sup>125</sup>. Les LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> sont des lymphocytes soumis à une stimulation antigénique répétée et ayant des capacités cytotoxiques importantes<sup>122</sup>. Plusieurs nomenclatures sont utilisées pour définir les sous-population de LT CD8+, il a été démontré que le nombre de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> était corrélé au nombre de TEMRA<sup>148</sup>. Nous avons donc choisi ce phénotype lymphocytaire CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> qui avait l'avantage d'être réalisable par les laboratoires de routine clinique.

## 2. Absence de corrélation entre les LT régulateurs circulants et l'histologie de la biopsie de greffon

Nous avons également analysé la sous-population des LT régulateurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-</sup> circulants, décrits comme étant augmentés chez les patients tolérants<sup>115</sup>. Nous n'avons pas mis en évidence d'association entre le pourcentage de LT régulateurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-</sup> circulants et l'histologie du greffon rénal. L'analyse univariée montrait une diminution du nombre de Treg associée aux lésions histologiques de suspicion de rejet humoral mais cette différence n'était pas retrouvée après ajustement sur l'âge, le délai depuis la transplantation, le rang de greffe, les traitements immunosuppresseurs, les statuts CMV et l'ischémie froide. La littérature présente plusieurs études sur de petites cohortes où les Treg sont augmentés en fréquence dans le sang les patients tolérants<sup>115, 147</sup>, le phénotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-</sup> ne nous a pas permis de trouver de différence que ce soit en valeur absolue ou en pourcentage pour

le nombre de Treg dans le sang entre les 9 catégories histologiques. D'autre part la présence des Treg a été montrée dans la littérature comme associée à des conditions immunologiques différentes : d'une part l'augmentation des Treg a été démontrée associée à un état de tolérance<sup>119</sup>, mais l'histologie de ces patients n'est pas ou très rarement disponible pour des questions principalement éthiques<sup>149</sup>, et il est possible que des lésions subcliniques de rejet y soient associées. D'autre part des études histologiques de patients avec rejets de greffe ont montré que l'état pro-inflammatoire favorisé par les rejets entraînait une réponse anti-inflammatoire compensatrice conduisant à une augmentation des Treg infiltrant le greffon<sup>150</sup>, nécessaire à la cicatrisation des lésions engendrées par l'inflammation<sup>120</sup>. Cette dualité se retrouve dans la littérature où les résultats de corrélation entre Treg sanguins et devenir de greffe sont hétérogènes. Une méta-analyse récente regroupant 6 études (avec comme effectif maximal 86 patients) retrouvait une diminution des rejets aigus et des dysfonctions de greffons chez les patients ayant un fort taux de Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>-</sup>foxP 3+ circulants<sup>151</sup>. Les auteurs concluent cependant que les faibles effectifs ne permettent pas d'utiliser les Treg comme biomarqueurs.

### 3. Données démographiques et histologiques de notre cohorte

Les données démographiques de notre cohorte de 1097 patients transplantés à Nantes étaient comparables aux études nationales et internationales<sup>152 153, 154</sup>. La survie de greffe décès censurés à 10 ans était de 77% ce qui est semblable aux résultats de Stegall et al (74% de survie à 10 ans, analyses de 575 patients transplantés entre 2002 et 2005)<sup>5</sup>. Nous avons montré que les biopsies subnormales avaient une survie de greffe à 10 ans comparable aux biopsies normales. A l'inverse les biopsies ayant les moins bonnes survies étaient les suspicions de rejet humoral, les rejets humoraux et les rejets cellulaires. La notion de « suspicion de rejet humoral » a été retiré de la classification de Banff 2017, le diagnostic de rejet humoral pouvant alors être posé en l'absence de DSA si les lésions de la microcirculation sont associées à une fixation C4d et à une surexpression des gènes associés au rejet humoral en analyse biomoléculaire de la biopsie de greffon<sup>91</sup>. Nous avons montré que la répartition des diagnostics histologiques était différente en fonction du délai post transplantation. Les rejets humoraux étaient retrouvés en médiane 674 jours après la transplantation (IQR 337-2615), alors que les rejets cellulaires étaient retrouvés plus tôt (351 jours IQR 94-1148). Ces résultats sont comparables à ceux de Halloran et al portant sur 703 biopsies<sup>155</sup> prélevées entre 3 jours et 35 après la transplantation. Nous avons considéré toutes les indications de biopsies y compris les biopsies de surveillance ce qui explique que nous trouvions un pourcentage de rejet plus faible que celui décrit par Halloran où seules les biopsies

réalisées pour dysfonction du greffon étaient étudiées (13% de rejets vs 28%). Cependant si l'on considère uniquement les biopsies « pour cause » de notre étude nous retrouvons les mêmes proportions de rejets humoraux (99 rejets humoraux / 608 biopsies soit 16% vs 15% chez Halloran) mais un taux plus faible de rejet cellulaire (5% vs 9 %). L'immunisation des patients était comparable aux données de la littérature, 22% des patients avaient développé des DSA de novo à 4 ans de la transplantation<sup>156</sup>.

#### 4. Evaluation des paramètres associés à l'augmentation des LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>circulants

Après avoir démontré une corrélation entre le pourcentage de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> circulants et l'histologie du greffon, nous avons étudié les covariables associées de manière indépendante au taux de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> circulants. Nous avons montré que le nombre de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> circulants était associé au statut sérologique CMV. Les patients avec une sérologie CMV donneur ou receveur positive (CMV D+ ou R+) avaient un taux nettement supérieur de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> circulants que les patients CMV donneur et receveur négatif (CMV D-/R-). Ceci est en accord avec les données de la littérature<sup>157</sup>. L'augmentation des LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> est en effet retrouvée chez les individus sains et chez les insuffisants rénaux CMV séropositifs en attente de transplantation<sup>158</sup> suggérant que les traitements immunosuppresseurs impactent peu la réponse cellulaire anti-CMV. La même équipe démontrait que le maintien d'une réponse cellulaire contre le CMV entraînait une accumulation de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> oligoclonaux et participait à la diminution du pool des LT naïfs et à l'immunosénescence<sup>158</sup>. Bayard a montré que la séropositivité CMV était également associée à une augmentation des cellules NK circulantes<sup>159</sup>. Cette pression immunitaire médiée par les LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> et les cellules NK chez les patients CMV séropositifs pourrait être impliquée dans la survenue de certains cancers<sup>160</sup>. Il pourrait être intéressant d'étudier l'incidence des infections opportunistes, de BK virus et des cancers en fonction du taux de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> chez les patients transplantés rénaux. La réplication CMV est connue comme étant un facteur de risque de rejets aigus<sup>161</sup>. Stern et al ont de plus montré sur 917 patients transplantés rénaux que le statut sérologique CMV avait aussi un impact sur le devenir de la greffe. Les patients CMV D+ ou R+ étaient plus à risque de perte de greffon que les patients CMV D-/R- (6% de perte de greffon à 4 ans chez les patients CMV D+ ou R+ vs 2% chez CMV D-/R)<sup>162</sup>. La même étude démontrait chez 163 patients greffés pulmonaires 2 fois plus de rejets chez les patients CMV D+ ou R+ par rapport aux patients CMV D-/R, mais ceci n'était pas retrouvé chez les patients transplantés rénaux. Nous avons donc démontré une association entre le taux de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> circulants et la sérologie CMV en plus d'une association indépendante entre le taux de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> circulants et l'histologie de rejet.

## 5. Description des phénotypes lymphocytaires à 3 mois et à 12 mois de greffe

A partir de 2014, nous avons ajouté l'immunophénotypage des lymphocytes B CD19+ et des cellules NK CD56+ aux phénotypes lymphocytaires T. Nous avons exposé les résultats des prélèvements réalisés à 3 et 12 mois post transplantation dans le but d'établir une référence des mesures de ces sous-populations lymphocytaires chez les patients transplantés rénaux. Les valeurs absolues retrouvées sont comparables à celles de la littérature sur les phénotypes lymphocytaires des patients avec une fonction de greffon stable sous immunosuppresseurs pour les taux de Treg à 12 mois<sup>163</sup> et pour les cellules NK à 24 mois<sup>145</sup>. A 12 mois post transplantation les LB gardaient un taux légèrement inférieurs aux témoins sains<sup>45</sup> (108 CD19+/mm<sup>3</sup> vs 157 CD19+/mm<sup>3</sup>).

Les taux de LT CD4+ et de Treg entre 3 et 12 mois post-transplantation restaient stables, tandis que les LT CD8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>, LB CD19+ et les cellules NK augmentaient de manière significative, soulignant l'impact principal des traitements d'induction sur les LT CD4<sup>+</sup>. En analyse multivariée, les taux de CD4+ et des Treg à 12 mois étaient plus bas en cas de traitement d'induction par déplétion lymphocytaire, alors que les taux de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> étaient indépendants de l'induction. L'étude de Grafals et al concernant 45 patients ayant reçu une induction déplétante par ATG corroborait ces cinétiques de reconstitutions des pools de LT CD8+ dans les trois premiers mois alors que les LT CD4+ restaient inférieurs à leur niveau de base jusque plus de 12 mois après la transplantation<sup>163</sup>.

## 6. Limites de l'étude

Nous avons réalisé une étude monocentrique concernant exclusivement les patients transplantés et ayant bénéficiés de biopsies au CHU de Nantes. D'autre part, nous n'avons pas mis en évidence un phénotype sanguin particulier chez les patients ayant une biopsie de FIAT ni de FIAT inflammatoire. Nous avons pris le parti de regrouper les 3 grades de sévérité des FIAT afin de ne pas multiplier le nombre de catégories histologiques. Des études récentes ont mis en avant que les FIAT inflammatoires de grade 2 et 3 avaient une moins bonne survie de greffon à 5 ans que les FIAT inflammatoire de grade 1<sup>94</sup> et la classification de Banff 2017 a étoffé le diagnostic de rejet cellulaire chronique par les grades IA et IB définis par la présence de lésions de FIAT-inflammatoires de grade 2 et 3, en l'absence d'autres étiologie<sup>91</sup>. Après connaissance des résultats de notre étude, nous pouvons envisager d'étudier le phénotype des LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> circulants en fonction de la sévérité de la FIAT inflammatoire, ainsi que d'analyser si les FIAT- inflammatoires d'origine non allo-immune (dans les contextes de pyélonéphrites, ou de néphropathies au BKvirus) ont le même pourcentage de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> circulants que les FIAT-inflammatoires considérées comme rejet cellulaire chronique.

## 7. Perspectives

Nous avons ainsi démontré que le phénotype des lymphocytes sanguins circulants est associé au diagnostic histologique de la biopsie de greffons. Les patients avec des lésions borderlines et des suspicions de rejet humoral présentaient un pourcentage de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> supérieur patients ayant des biopsies normales. Les LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> sont reconnus comme ayant des capacités cytotoxiques importantes<sup>122</sup>, ce qui nous fait penser qu'un fort taux de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> circulants pourrait être associé à une infiltration intra greffon importante et à des lésions histologiques. Nous avons comme prochain objectif d'évaluer si le pourcentage de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> circulants permettrait de différencier les lésions borderlines et les suspicions de rejet humoral de mauvais pronostic des lésions non délétères pour la survie du greffon. Nous avons décrit la prise en charge des patients du groupe suspicion de rejet humoral, et constaté que trois stratégies thérapeutiques avaient été employées : le maintien d'une bithérapie sans corticoïdes, le maintien ou l'ajout de corticoïdes oraux dans une trithérapie immunosuppressive, ou la réalisation de bolus de corticoïdes. Les trois groupes de patients présentaient un taux de créatinine comparable, mais il n'y avait pas de consensus de prise en charge. Nous avons mis en avant une tendance à une perte de greffe à 10 ans augmentée chez les patients ayant reçu des bolus (75%) et chez les patients sans ajout de corticoïdes (50%) que chez les patients traités par corticoïdes oraux (33%) mais les résultats n'étaient pas statistiquement significatifs (p=0,1). Il n'y avait pas de différence d'incidence d'infection opportuniste. (p=0,2). Stratifier le risque immunologique par la mesure des LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> circulants le jour de la biopsie permettrait de standardiser la prise en charge de ces lésions histologiques douteuses. Une étude prospective multicentrique randomisée est actuellement en cours I4BIS<sup>164</sup>, dont le but est d'établir la supériorité d'un traitement par bolus de corticoïdes chez les patients ayant des lésions borderline à la biopsie de surveillance à 3 par rapport à l'absence de modification thérapeutique (maintien d'une trithérapie avec doses décroissantes de corticoïdes). Nous pourrions réaliser une étude ancillaire où le phénotype CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> dans le sang serait réalisé lors de la biopsie des 3 mois, afin de rechercher une association entre ce phénotype et l'histologie de contrôle envisagée dans l'étude à 12 mois, et ainsi d'évaluer si le taux de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> à la biopsie permet de différencier les greffons qui évolueront vers un rejet.

Une autre application à la mesure des lymphocytes CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> circulants s'inscrirait dans le cadre de l'utilisation de plus en plus fréquente du Belatacept. L'action immunosuppressive principale du Belatacept est de diminuer la costimulation des lymphocytes T en inhibant l'activation par le CD28. Cet

immunosuppresseur n'a pas les effets délétères hémodynamiques, néphrotoxiques et métaboliques des CNI, et permet une diminution de la production des DSA<sup>128</sup>, et une amélioration de la survie des greffons. Cependant il a été notifié une augmentation des rejets cellulaires pour certains patients (20% chez les patients traités par Belatacept vs 11% sous ciclosporine). Différents profils lymphocytaires seraient impliqués dans la survenue de ces rejets. Espinosa et al ont démontré que sur 14 patients traités par Belatacept, 9 avaient présenté un rejet aigu. Ces patients avaient un taux supérieur de LT CD4<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>PD1<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup> en pré transplantation<sup>165</sup>. Une autre étude, basée sur un modèle de primate, retrouvent un taux de TEMRA plus important en pré-transplantation chez les individus présentant un rejet sous Belatacept, avec une perte de l'expression du CD28 dans les jours suivant la transplantation<sup>129</sup>. L'étude du phénotype CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> circulant pourrait permettre d'identifier les patients à risque de rejet cellulaire sous Belatacept.

Nous proposons ainsi de réaliser le phénotype CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> en complément des phénotypes CD8 et CD4 réalisés à chaque date anniversaire. Ce phénotype réalisable en routine, pourrait être un signe d'alerte de risque immunologique majoré. Notre objectif à terme est d'identifier des marqueurs sanguins de risque de rejet et qui pourraient aider à la prise en charge des patients dont les biopsies de surveillance sont anormales. Les lésions borderlines, les suspicions de rejets humoraux, et la FIAT inflammatoire sont des diagnostics étant principalement retrouvés lors des biopsies systématiques, et pour lesquelles la prise en charge thérapeutique n'est pas codifiée. Il faudra définir un seuil de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> au-delà duquel le risque d'avoir une histologie de rejet se majore. Il est probable que recourir à un ensemble de marqueurs sanguins, histologiques et urinaires permettrait de mieux classer ces histologies limites. L'enjeu principal reste de prévenir et de traiter ces lésions afin de ne pas aboutir aux lésions séquellaires de rejet humoral chronique et de fibrose aspécifique, responsable de la perte des greffons.

## V. Bibliographie

1. Tonelli, M. *et al.* Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **11**, 2093–2109 (2011).
2. Bayat, S., Kessler, M., Briancon, S. & Frimat, L. Survival of transplanted and dialysed patients in a French region with focus on outcomes in the elderly. *Nephrol. Dial. Transplant.* **25**, 292–300 (2010).
3. Ekberg, H. *et al.* Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2562–2575 (2007).
4. Lamb, K. E., Lodhi, S. & Meier-Kriesche, H.-U. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **11**, 450–462 (2011).
5. Stegall, M. D., Cornell, L. D., Park, W. D., Smith, B. H. & Cosio, F. G. Renal Allograft Histology at 10 Years After Transplantation in the Tacrolimus Era: Evidence of Pervasive Chronic Injury. *Am. J. Transplant.* **18**, 180–188 (2018).
6. Stegall, M. D., Cornell, L. D., Park, W. D., Smith, B. H. & Cosio, F. G. Renal Allograft Histology at 10 Years After Transplantation in the Tacrolimus Era: Evidence of Pervasive Chronic Injury. *Am. J. Transplant.* **18**, 180–188 (2018).
7. Dendrou, C. A., Petersen, J., Rossjohn, J. & Fugger, L. HLA variation and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 325–339 (2018).
8. WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System.
9. Blackwell, J. M., Jamieson, S. E. & Burgner, D. HLA and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 370–385 (2009).
10. Kampstra, A. S. B. & Toes, R. E. M. HLA class II and rheumatoid arthritis: the bumpy road of revelation. *Immunogenetics* **69**, 597–603 (2017).
11. Bonatti, H. Effect of Human Leukocyte Antigen Compatibility on Kidney Graft Survival: Comparative Analysis of Two Decades. *Yearb. Surg.* **2008**, 126–127 (2008).
12. Snanoudj, R. & Legendre, C. [New aspects of HLA compatibility in organ transplantation]. *Nephrol. Ther.* (2016). doi:10.1016/j.nephro.2016.01.006
13. Heise, E., Manning, C. & Thacker, L. HLA phenotypes of ESRD patients are risk factors in the panel-reactive antibody (PRA) response. *Clin. Transplant.* **15 Suppl 6**, 22–27 (2001).
14. Hussain, S. K. *et al.* HLA and Risk of Diffuse Large B cell Lymphoma After Solid Organ Transplantation. *Transplantation* **100**, 2453–2460 (2016).
15. Sato, T. *et al.* Dual Functions of Runx Proteins for Reactivating CD8 and Silencing CD4 at the Commitment Process into CD8 Thymocytes. *Immunity* **22**, 317–328 (2005).
16. Sinclair, C., Bains, I., Yates, A. J. & Seddon, B. Asymmetric thymocyte death underlies the CD4:CD8 T-cell ratio in the adaptive immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E2905–E2914 (2013).
17. Wikby, A. *et al.* An immune risk phenotype, cognitive impairment, and survival in very late life: impact of allostatic load in Swedish octogenarian and nonagenarian humans. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **60**, 556–565 (2005).
18. Yang, J. Y. C. & Sarwal, M. M. Transplant genetics and genomics. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 309–326 (2017).
19. Halloran, P. F. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2715–2729 (2004).
20. Sullivan, J. A., Adams, A. B. & Burlingham, W. J. The Emerging Role of TH17 Cells in Organ Transplantation. *Transplantation* **97**, 483–489 (2014).
21. Chenouard, A. *et al.* Renal Operational Tolerance Is Associated With a Defect of Blood Tfh Cells That Exhibit Impaired B Cell Help. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **17**, 1490–1501 (2017).
22. Alessandrini, A. & Turka, L. A. FOXP3-Positive Regulatory T Cells and Kidney Allograft Tolerance. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **69**, 667–674 (2017).
23. Hori, S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* **299**, 1057–1061 (2003).

24. Wood, K. J. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells in transplantation tolerance: Regulatory lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 199–210 (2003).
25. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M. & Hafler, D. A. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 490–500 (2010).
26. Semple, K. *et al.* Strong CD28 costimulation suppresses induction of regulatory T cells from naive precursors through Lck signaling. *Blood* **117**, 3096–3103 (2011).
27. Schmitt, E. G. & Williams, C. B. Generation and Function of Induced Regulatory T Cells. *Front. Immunol.* **4**, (2013).
28. Miyara, M. *et al.* Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* **30**, 899–911 (2009).
29. Rodríguez-Perea, A. L., Arcia, E. D., Rueda, C. M. & Velilla, P. A. Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents: Regulatory T cells in humans and rodents. *Clin. Exp. Immunol.* **185**, 281–291 (2016).
30. Miyara, M. *et al.* Sialyl Lewis x (CD15s) identifies highly differentiated and most suppressive FOXP3<sup>high</sup> regulatory T cells in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 7225–7230 (2015).
31. Himmel, M. E., MacDonald, K. G., Garcia, R. V., Steiner, T. S. & Levings, M. K. Helios<sup>+</sup> and Helios<sup>-</sup> Cells Coexist within the Natural FOXP3<sup>+</sup> T Regulatory Cell Subset in Humans. *J. Immunol.* **190**, 2001–2008 (2013).
32. Baron, U. *et al.* DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3<sup>+</sup> conventional T cells. *Eur. J. Immunol.* **37**, 2378–2389 (2007).
33. Miyara, M. *et al.* Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4<sup>+</sup> T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity* **30**, 899–911 (2009).
34. Izcue, A., Coombes, J. L. & Powrie, F. Regulatory Lymphocytes and Intestinal Inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 313–338 (2009).
35. Rubtsov, Y. P. *et al.* Regulatory T Cell-Derived Interleukin-10 Limits Inflammation at Environmental Interfaces. *Immunity* **28**, 546–558 (2008).
36. Motyka, B. *et al.* Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* **103**, 491–500 (2000).
37. Barry, M. & Bleackley, R. C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 401–409 (2002).
38. Wojciechowski, S. *et al.* Bim mediates apoptosis of CD127<sup>lo</sup> effector T cells and limits T cell memory. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1694–1706 (2006).
39. Kaech, S. M. *et al.* Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat. Immunol.* **4**, 1191–1198 (2003).
40. Wherry, E. J. *et al.* Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat. Immunol.* **4**, 225–234 (2003).
41. Farber, D. L., Yudanin, N. A. & Restifo, N. P. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 24–35 (2014).
42. Klein, U. & Dalla-Favera, R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 22–33 (2008).
43. Carsetti, R., Rosado, M. M. & Wardmann, H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol. Rev.* **197**, 179–191 (2004).
44. Pelanda, R. & Torres, R. M. Receptor editing for better or for worse. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 184–190 (2006).
45. Perez-Andres, M. *et al.* Human peripheral blood B-cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin. Cytom.* **78B**, S47–S60 (2010).
46. Mitchison, N. A. T-cell-B-cell cooperation. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 308–312 (2004).
47. Djamali, A. *et al.* Diagnosis and Management of Antibody-Mediated Rejection: Current Status and Novel Approaches. *Am. J. Transplant.* **14**, 255–271 (2014).
48. Popi, A. F., Longo-Maugéri, I. M. & Mariano, M. An Overview of B-1 Cells as Antigen-Presenting Cells. *Front. Immunol.* **7**, (2016).
49. Youinou, P., Taher, T. E., Pers, J.-O., Mageed, R. A. & Renaudineau, Y. B lymphocyte cytokines and rheumatic autoimmune disease. *Arthritis Rheum.* **60**, 1873–1880 (2009).
50. DiLillo, D. J., Horikawa, M. & Tedder, T. F. B-lymphocyte effector functions in health and disease. *Immunol. Res.* **49**, 281–292 (2011).

51. Liu, Y. *et al.* IL-10-producing regulatory B cells suppressed effector T but enhanced regulatory T cells in chronic HBV infection. *Clin. Sci.* CS20160069 (2016). doi:10.1042/CS20160069
52. Blair, P. A. *et al.* CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* **32**, 129–140 (2010).
53. Siewe, B. *et al.* Regulatory B cells inhibit cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity and elimination of infected CD4 T cells after in vitro reactivation of HIV latent reservoirs. *PLoS One* **9**, e92934 (2014).
54. Patel, R. & Terasaki, P. I. Significance of the Positive Crossmatch Test in Kidney Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **280**, 735–739 (1969).
55. Haririan, A. *et al.* Positive Cross-Match Living Donor Kidney Transplantation: Longer-Term Outcomes. *Am. J. Transplant.* **9**, 536–542 (2009).
56. Couzi, L. *et al.* Interpretation of Positive Flow Cytometric Crossmatch in the Era of the Single-Antigen Bead Assay: *Transplantation* **91**, 527–535 (2011).
57. Worthington, J. E., Robson, A. J., Sheldon, S., Langton, A. & Martin, S. A comparison of enzyme-linked immunoabsorbent assays and flow cytometry techniques for the detection of HLA specific antibodies. *Hum. Immunol.* **62**, 1178–1184 (2001).
58. Jonathan Visentin. Propriétés des anticorps anti-HLA en transplantation d'organes. Immunologie. Université de Bordeaux, 2016.
59. Agence de biomédecine. Procédure d'application des règles de répartition et d'attribution des greffons prélevés sur personne décédée, Arrêté du 6 novembre 1996 mis à jour en Octobre 214. (1996).
60. Montgomery, R. A. *et al.* Desensitization in HLA-incompatible kidney recipients and survival. *N. Engl. J. Med.* **365**, 318–326 (2011).
61. Aubert, O. *et al.* Antibody-Mediated Rejection Due to Preexisting versus De Novo Donor-Specific Antibodies in Kidney Allograft Recipients. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* (2017). doi:10.1681/ASN.2016070797
62. Noel, C. *et al.* Daclizumab versus Antithymocyte Globulin in High-Immunological-Risk Renal Transplant Recipients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 1385–1392 (2009).
63. Brennan, D. C., Daller, J. A., Lake, K. D., Cibrik, D. & Del Castillo, D. Rabbit Antithymocyte Globulin versus Basiliximab in Renal Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1967–1977 (2006).
64. <https://kdigo.org/.../2017/.../KDIGO-Tx-Recipient-Guideline-Sum>.
65. Tang, Q. *et al.* Altered balance between effector T cells and FOXP3+ HELIOS+ regulatory T cells after thymoglobulin induction in kidney transplant recipients. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* **25**, 1257–1267 (2012).
66. Furukawa, A., Wisel, S. A. & Tang, Q. Impact of immune-modulatory drugs on Treg. *Transplantation* **100**, 2288–2300 (2016).
67. Clinical Guidelines for Kidney Transplantation revised 2018 AMB.03.001 Rev 08 Eff Date: 25-June-2018  
<http://www.transplant.bc.ca/documents/health%20professionals/clinical%20guidelines/clinical%20guidelines%20for%20kidney%20transplantation.pdf>.
68. Baeten, D. Phenotypically and Functionally Distinct CD8+ Lymphocyte Populations in Long-Term Drug-Free Tolerance and Chronic Rejection in Human Kidney Graft Recipients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 294–304 (2005).
69. Heidt, S. *et al.* Calcineurin inhibitors affect B cell antibody responses indirectly by interfering with T cell help. *Clin. Exp. Immunol.* **159**, 199–207 (2010).
70. Allison, A. C. & Eugui, E. M. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. *Transplantation* **80**, S181-190 (2005).
71. Rostaing, L. *et al.* Long-Term Belatacept Exposure Maintains Efficacy and Safety at 5 Years: Results From the Long-Term Extension of the BENEFIT Study: BENEFIT Long-Term Extension. *Am. J. Transplant.* **13**, 2875–2883 (2013).
72. Adams, A. B. *et al.* Belatacept Combined With Transient Calcineurin Inhibitor Therapy Prevents Rejection and Promotes Improved Long-Term Renal Allograft Function. *Am. J. Transplant.* **17**, 2922–2936 (2017).
73. Lefaucheur, C. *et al.* Comparison of Combination Plasmapheresis/IVIg/Anti-CD20 Versus

- High-Dose IVIg in the Treatment of Antibody-Mediated Rejection. *Am. J. Transplant.* **9**, 1099–1107 (2009).
74. Chen, J. *et al.* Cutting Edge: CTLA-4Ig Inhibits Memory B Cell Responses and Promotes Allograft Survival in Sensitized Recipients. *J. Immunol.* **195**, 4069–4073 (2015).
  75. Vincenti, F. *et al.* Three-Year Outcomes from BENEFIT, a Randomized, Active-Controlled, Parallel-Group Study in Adult Kidney Transplant Recipients: Three-Year Outcomes from BENEFIT. *Am. J. Transplant.* **12**, 210–217 (2012).
  76. Kamburova, E. G. *et al.* Longitudinal Analysis of T and B Cell Phenotype and Function in Renal Transplant Recipients with or without Rituximab Induction Therapy. *PLoS ONE* **9**, e112658 (2014).
  77. Vo, A. A. *et al.* Use of intravenous immune globulin and rituximab for desensitization of highly HLA-sensitized patients awaiting kidney transplantation. *Transplantation* **89**, 1095–1102 (2010).
  78. Hara, S. Cell mediated rejection revisited: Past, current, and future directions: Cell mediated rejection revisited. *Nephrology* **23**, 45–51 (2018).
  79. Roufousse, C. *et al.* A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology: *Transplantation* **1** (2018). doi:10.1097/TP.0000000000002366
  80. Loupy, A. *et al.* Subclinical Rejection Phenotypes at 1 Year Post-Transplant and Outcome of Kidney Allografts. *J. Am. Soc. Nephrol.* **26**, 1721–1731 (2015).
  81. Ibrahim, S., Dawson, D. V. & Sanfilippo, F. Predominant infiltration of rejecting human renal allografts with T cells expressing CD8 and CD45RO. *Transplantation* **59**, 724–728 (1995).
  82. Meier-Kriesche, H.-U., Schold, J. D., Srinivas, T. R. & Kaplan, B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **4**, 378–383 (2004).
  83. Beimler, J. & Zeier, M. Borderline rejection after renal transplantation - to treat or not to treat: **Treatment of borderline rejection.** *Clin. Transplant.* **23**, 19–25 (2009).
  84. Loupy, A. *et al.* Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA). *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **11**, 56–65 (2011).
  85. Becker, Y. T., Becker, B. N., Pirsch, J. D. & Sollinger, H. W. Rituximab as Treatment for Refractory Kidney Transplant Rejection. *Am. J. Transplant.* **4**, 996–1001 (2004).
  86. Gimeno, J. *et al.* Impact of the Banff 2013 classification on the diagnosis of suspicious versus conclusive late antibody-mediated rejection in allografts without acute dysfunction. *Nephrol. Dial. Transplant.* **31**, 1938–1946 (2016).
  87. Dörje, C. *et al.* Early Versus Late Acute Antibody-Mediated Rejection in Renal Transplant Recipients: *Transplant. J.* **96**, 79–84 (2013).
  88. Sellarés, J. *et al.* Understanding the Causes of Kidney Transplant Failure: The Dominant Role of Antibody-Mediated Rejection and Nonadherence: Attributing Causes of Kidney Transplant Loss. *Am. J. Transplant.* **12**, 388–399 (2012).
  89. Gosset, C. *et al.* Circulating donor-specific anti-HLA antibodies are a major factor in premature and accelerated allograft fibrosis. *Kidney Int.* **92**, 729–742 (2017).
  90. Nankivell, B. J. *et al.* The causes, significance and consequences of inflammatory fibrosis in kidney transplantation: The Banff i-IFTA lesion. *Am. J. Transplant.* **18**, 364–376 (2018).
  91. Haas, M. *et al.* The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am. J. Transplant.* **18**, 293–307 (2018).
  92. Mengel, M. *et al.* Scoring Total Inflammation Is Superior to the Current Banff Inflammation Score in Predicting Outcome and the Degree of Molecular Disturbance in Renal Allografts. *Am. J. Transplant.* **9**, 1859–1867 (2009).
  93. Gago, M., Cornell, L. D., Kremers, W. K., Stegall, M. D. & Cosio, F. G. Kidney Allograft Inflammation and Fibrosis, Causes and Consequences: Fibrosis and Inflammation in Kidney Grafts. *Am. J. Transplant.* **12**, 1199–1207 (2012).
  94. Lefaucheur, C. *et al.* T cell-mediated rejection is a major determinant of inflammation in scarred areas in kidney allografts. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* (2017). doi:10.1111/ajt.14565

95. Loupy, A. *et al.* Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **9**, 2561–2570 (2009).
96. Furness, P. N. *et al.* Protocol biopsy of the stable renal transplant: a multicenter study of methods and complication rates: *Transplantation* **76**, 969–973 (2003).
97. Vanhove, T., Goldschmeding, R. & Kuypers, D. Kidney Fibrosis: Origins and Interventions. *Transplantation* **101**, 713–726 (2017).
98. Couvrat-Desvergnès, G. *et al.* Comparison of graft and patient survival according to the transplantation centre policy for 1-year screening biopsy among stable kidney recipients: a propensity score-based study. *Nephrol. Dial. Transplant.* (2018). doi:10.1093/ndt/gfy221
99. Menon, M. C., Murphy, B. & Heeger, P. S. Moving Biomarkers toward Clinical Implementation in Kidney Transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **28**, 735–747 (2017).
100. Danger, R., Sawitzki, B. & Brouard, S. Immune monitoring in renal transplantation: The search for biomarkers. *Eur. J. Immunol.* **46**, 2695–2704 (2016).
101. Reeve, J. *et al.* Molecular Diagnosis of T Cell-Mediated Rejection in Human Kidney Transplant Biopsies: Molecular Diagnosis of TCMR. *Am. J. Transplant.* **13**, 645–655 (2013).
102. Sarwal, M. *et al.* Molecular Heterogeneity in Acute Renal Allograft Rejection Identified by DNA Microarray Profiling. *N. Engl. J. Med.* **349**, 125–138 (2003).
103. de Freitas, D. G. *et al.* The nature of biopsies with ‘borderline rejection’ and prospects for eliminating this category. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **12**, 191–201 (2012).
104. O’Connell, P. J. *et al.* Biopsy transcriptome expression profiling to identify kidney transplants at risk of chronic injury: a multicentre, prospective study. *The Lancet* **388**, 983–993 (2016).
105. Sellarés, J. *et al.* Molecular Diagnosis of Antibody-Mediated Rejection in Human Kidney Transplants: Molecular Diagnosis of ABMR. *Am. J. Transplant.* **13**, 971–983 (2013).
106. Ganusov, V. V. & De Boer, R. J. Do most lymphocytes in humans really reside in the gut? *Trends Immunol.* **28**, 514–518 (2007).
107. Totterman. Immunologic diagnosis of kidney rejection using FACS analysis of graft-infiltrating functional and activated T and NK cell subsets. *Transplantation* (1989).
108. Miqueu, P. *et al.* Analysis of the peripheral T-cell repertoire in kidney transplant patients. *Eur. J. Immunol.* **40**, 3280–3290 (2010).
109. Muczynski, K. A., Leca, N., Anderson, A. E., Kieran, N. & Anderson, S. K. Multicolor Flow Cytometry and Cytokine Analysis Provides Enhanced Information on Kidney Transplant Biopsies. *Kidney Int. Rep.* **3**, 956–969 (2018).
110. Bestard, O. *et al.* Achieving donor-specific hyporesponsiveness is associated with FOXP3+ regulatory T cell recruitment in human renal allograft infiltrates. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 4901–4909 (2007).
111. Braudeau, C. *et al.* Variation in numbers of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> FOXP3<sup>+</sup> T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. *Transpl. Int.* **20**, 845–855 (2007).
112. McRae, J. L., Chia, J. S., Pommey, S. A. & Dwyer, K. M. Evaluation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+/-</sup> CD39<sup>+</sup> T-cell populations in peripheral blood of patients following kidney transplantation and during acute allograft rejection: CD39<sup>+</sup> T cells in kidney transplant recipients. *Nephrology* **22**, 505–512 (2017).
113. Alvarez, C. M., Opelz, G., Garcia, L. F. & Süsal, C. Expression of Regulatory T–Cell-Related Molecule Genes and Clinical Outcome in Kidney Transplant Recipients: *Transplantation* **87**, 857–863 (2009).
114. Roussey-Kesler, G. *et al.* Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **6**, 736–746 (2006).
115. Braza, F. *et al.* Central Role of CD45RA–Foxp3hi Memory Regulatory T Cells in Clinical Kidney Transplantation Tolerance. *J. Am. Soc. Nephrol.* **26**, 1795–1805 (2015).
116. Veronese, F. *et al.* Pathological and clinical correlates of FOXP3+ cells in renal allografts during acute rejection. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **7**, 914–922 (2007).
117. Muthukumar, T. *et al.* Messenger RNA for *FOXP3* in the Urine of Renal-Allograft Recipients. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2342–2351 (2005).

118. Ashton-Chess, J., Giral, M., Soulillou, J.-P. & Brouard, S. Using Biomarkers of Tolerance and Rejection to Identify High- and Low-Risk Patients Following Kidney Transplantation: *Transplantation* **87**, S95–S99 (2009).
119. Braza, F., Durand, M., Degauque, N. & Brouard, S. Regulatory T Cells in Kidney Transplantation: New Directions?: Regulatory T Cells in Kidney Transplantation. *Am. J. Transplant.* **15**, 2288–2300 (2015).
120. Grimbert, P. *et al.* The Regulatory/Cytotoxic Graft-Infiltrating T Cells Differentiate Renal Allograft Borderline Change From Acute Rejection: *Transplantation* **83**, 341–346 (2007).
121. Bestard, O. *et al.* Intra-graft Regulatory T Cells in Protocol Biopsies Retain Foxp3 Demethylation and Are Protective Biomarkers for Kidney Graft Outcome: Intra-graft Foxp3+ Treg Modulates the Advent of IF/TA. *Am. J. Transplant.* **11**, 2162–2172 (2011).
122. Strioga, M., Pasukoniene, V. & Characiejus, D. CD8+ CD28– and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease: CD8+ CD28– (CD8+ CD57+) T cells in health and disease. *Immunology* **134**, 17–32 (2011).
123. Traitanon, O. *et al.* IL-15 Induces Alloreactive CD28<sup>–</sup> Memory CD8 T Cell Proliferation and CTLA4-Ig Resistant Memory CD8 T Cell Activation: Alloreactive CD28<sup>–</sup> Memory T Cell Activation. *Am. J. Transplant.* **14**, 1277–1289 (2014).
124. Żabińska, M., Krajewska, M., Kościelska-Kasprzak, K. & Klinger, M. CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD28<sup>–</sup> T Lymphocytes in Patients with Lupus Nephritis. *J. Immunol. Res.* **2016**, 1–7 (2016).
125. Yap, M. *et al.* Expansion of Highly Differentiated Cytotoxic Terminally Differentiated Effector Memory CD8+ T Cells in a Subset of Clinically Stable Kidney Transplant Recipients: A Potential Marker for Late Graft Dysfunction. *J. Am. Soc. Nephrol.* **25**, 1856–1868 (2014).
126. Robertson, H. & Kirby, J. A. Post-transplant renal tubulitis: the recruitment, differentiation and persistence of intra-epithelial T cells. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **3**, 3–10 (2003).
127. Baeten, D. Phenotypically and Functionally Distinct CD8+ Lymphocyte Populations in Long-Term Drug-Free Tolerance and Chronic Rejection in Human Kidney Graft Recipients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 294–304 (2005).
128. Vincenti, F. *et al.* Belatacept and Long-Term Outcomes in Kidney Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **374**, 333–343 (2016).
129. Mathews, D. V. *et al.* Belatacept-Resistant Rejection Is Associated With CD28<sup>+</sup> Memory CD8 T Cells. *Am. J. Transplant.* **17**, 2285–2299 (2017).
130. Nouël, A. *et al.* B cells display an abnormal distribution and an impaired suppressive function in patients with chronic antibody-mediated rejection. *Kidney Int.* **85**, 590–599 (2014).
131. Loupy, A., Hill, G. S. & Jordan, S. C. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nat. Rev. Nephrol.* **8**, 348–357 (2012).
132. Lefaucheur, C. *et al.* IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **27**, 293–304 (2016).
133. Snanoudj, R. *et al.* Restricted specificity of peripheral alloreactive memory B cells in HLA-sensitized patients awaiting a kidney transplant. *Kidney Int.* **87**, 1230–1240 (2015).
134. Karahan, G. E. *et al.* A Memory B Cell Crossmatch Assay for Quantification of Donor-Specific Memory B Cells in the Peripheral Blood of HLA-Immunized Individuals. *Am. J. Transplant.* **17**, 2617–2626 (2017).
135. Newell, K. A. *et al.* Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.* **120**, 1836–1847 (2010).
136. Pallier, A. *et al.* Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int.* **78**, 503–513 (2010).
137. Chesneau, M. *et al.* Unique B Cell Differentiation Profile in Tolerant Kidney Transplant Patients. *Am. J. Transplant.* **14**, 144–155 (2014).
138. Asadullah, K. Interleukin-10 Therapy--Review of a New Approach. *Pharmacol. Rev.* **55**, 241–269 (2003).
139. Shabir, S. *et al.* Transitional B Lymphocytes Are Associated With Protection From Kidney Allograft Rejection: A Prospective Study: Transitional B Cells and Rejection. *Am. J. Transplant.* **15**, 1384–1391 (2015).
140. Nouël, A. *et al.* B cells display an abnormal distribution and an impaired suppressive function

- in patients with chronic antibody-mediated rejection. *Kidney Int.* **85**, 590–599 (2014).
141. Chesneau, M. *et al.* Tolerant Kidney Transplant Patients Produce B Cells with Regulatory Properties. *J. Am. Soc. Nephrol.* **26**, 2588–2598 (2015).
142. Trojan, K. *et al.* Association of peripheral NK cell counts with Helios<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>-</sup> T<sub>regs</sub> in patients with good long-term renal allograft function: NK cells and Tregs in renal transplantation. *Clin. Exp. Immunol.* **188**, 467–479 (2017).
143. Hadad, U., Martinez, O. & Krams, S. M. NK cells after transplantation: friend or foe. *Immunol. Res.* **58**, 259–267 (2014).
144. Venner, J. M., Hidalgo, L. G., Famulski, K. S., Chang, J. & Halloran, P. F. The Molecular Landscape of Antibody-Mediated Kidney Transplant Rejection: Evidence for NK Involvement Through CD16a Fc Receptors: Molecular Phenotype of ABMR. *Am. J. Transplant.* **15**, 1336–1348 (2015).
145. Dugast, E. *et al.* Broad Impairment of Natural Killer Cells From Operationally Tolerant Kidney Transplanted Patients. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
146. Brouard, S. *et al.* Operationally Tolerant and Minimally Immunosuppressed Kidney Recipients Display Strongly Altered Blood T-Cell Clonal Regulation. *Am. J. Transplant.* **5**, 330–340 (2005).
147. Moraes-Vieira, P. M. M. *et al.* Differential monocyte STAT6 activation and CD4+CD25+Foxp3+ T cells in kidney operational tolerance transplanted individuals. *Hum. Immunol.* **71**, 442–450 (2010).
148. Yap, M., Tilly, G., Giral, M., Brouard, S. & Degauque, N. Benefits of Using CD45RA and CD28 to Investigate CD8 Subsets in Kidney Transplant Recipients: CD8 T Cell Nomenclature. *Am. J. Transplant.* **16**, 999–1006 (2016).
149. Brouard, S. *et al.* The natural history of clinical operational tolerance after kidney transplantation through twenty-seven cases. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **12**, 3296–3307 (2012).
150. Bestard, O. *et al.* Presence of FoxP3+ Regulatory T Cells Predicts Outcome of Subclinical Rejection of Renal Allografts. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 2020–2026 (2008).
151. Herrera-Gómez, F. *et al.* The number of FoxP3 regulatory T cells in the circulation may be a predictive biomarker for kidney transplant recipients: A multistage systematic review. *Int. Immunopharmacol.* **65**, 483–492 (2018).
152. El-Zoghby, Z. M. *et al.* Identifying Specific Causes of Kidney Allograft Loss. *Am. J. Transplant.* **9**, 527–535 (2009).
153. Rapport Rein 2016.pdf.
154. Coemans, M. *et al.* Analyses of the short- and long-term graft survival after kidney transplantation in Europe between 1986 and 2015. *Kidney Int.* **94**, 964–973 (2018).
155. Halloran, P. F. *et al.* Disappearance of T Cell-Mediated Rejection Despite Continued Antibody-Mediated Rejection in Late Kidney Transplant Recipients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **26**, 1711–1720 (2015).
156. Libri, I. *et al.* Trends in Immune Cell Function Assay and Donor-Specific HLA Antibodies in Kidney Transplantation: A 3-Year Prospective Study: ImmuKnow and Anti-HLA Antibodies. *Am. J. Transplant.* **13**, 3215–3222 (2013).
157. Zielinski, M. *et al.* Impact of Donor and Recipient Human Cytomegalovirus Status on Kidney Transplantation. *Int. Immunol.* (2017). doi:10.1093/intimm/dxx062
158. Meijers, R. W. J. *et al.* Cytomegalovirus contributes partly to uraemia-associated premature immunological ageing of the T cell compartment: CMV effect on T cell ageing in ESRD patients. *Clin. Exp. Immunol.* **174**, 424–432 (2013).
159. Bayard, C. *et al.* Coordinated expansion of both memory T cells and NK cells in response to CMV infection in humans. *Eur. J. Immunol.* **46**, 1168–1179 (2016).
160. Luo, X.-H. *et al.* The impact of inflationary cytomegalovirus-specific memory T cells on anti-tumour immune responses in patients with cancer. *Immunology* **155**, 294–308 (2018).
161. Sagedal, S. *et al.* The Impact of Cytomegalovirus Infection and Disease on Rejection Episodes in Renal Allograft Recipients. *Am. J. Transplant.* **2**, 850–856 (2002).
162. Stern, M. *et al.* Cytomegalovirus Serology and Replication Remain Associated With Solid Organ Graft Rejection and Graft Loss in the Era of Prophylactic Treatment: *Transplantation* **98**,

1013–1018 (2014).

163. Grafals, M. *et al.* Immunophenotyping and efficacy of low dose ATG in non-sensitized kidney recipients undergoing early steroid withdrawal: a randomized pilot study. *PLoS One* **9**, e104408 (2014).

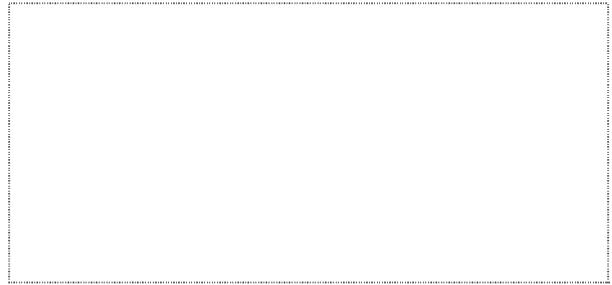
164. Evaluation of a Strategy Based on the 3-month Screening Biopsy to Optimize the Immunosuppression in Renal Transplantation: the I4BiS Study.

165. Espinosa, J. *et al.* CD57<sup>+</sup> CD4 T Cells Underlie Belatacept-Resistant Allograft Rejection. *Am. J. Transplant.* **16**, 1102–1112 (2016).

166. de Graav, G. N. *et al.* Follicular T helper cells and humoral reactivity in kidney transplant patients: Tfh cells in kidney transplantation. *Clin. Exp. Immunol.* **180**, 329–340 (2015).

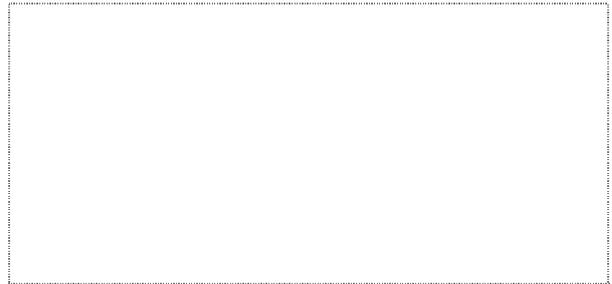
167. Korecka-Polak, A. *et al.* Human Peripheral Blood CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T Cells of Renal Allograft Recipients Do Not Express FOXP3 Protein. *Transplant. Proc.* **43**, 2917–2921 (2011).

**Vu, le Président du Jury,**  
(tampon et signature)



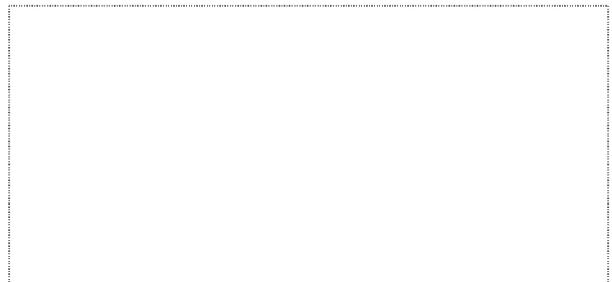
Titre Prénom NOM

**Vu, le Directeur de Thèse,**  
(tampon et signature)



Titre Prénom NOM

**Vu, le Doyen de la Faculté,**



Professeur Pascale JOLLIET

NOM : LE BOT

PRENOM : Sabine

**Titre de Thèse : Corrélation entre les phénotypes lymphocytaires sanguins périphériques et le diagnostic histologique de la biopsie de greffon chez le patient transplanté rénal.**

---

### RESUME (10 lignes)

Les rejets chroniques grèvent la survie au long terme des greffons rénaux. Prévenir la survenue de ces atteintes est un enjeu majeur car elles sont irréversibles. L'objectif de ce travail était la recherche d'une corrélation entre les sous-populations lymphocytaires sanguines et l'histologie de la biopsie de greffon. Nous avons analysé les phénotypes cytotoxiques CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> et les LT régulateurs décrits associés aux rejets chroniques dans des études de petits effectifs. Nous avons réalisé, sur une cohorte prospective de 1097 patients transplantés rénaux, l'analyse de 1640 biopsies associées à l'immunophénotypage des LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> et des Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127 sanguins. Nous avons montré en analyse multivariée qu'il existait une augmentation du pourcentage des LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> lors des lésions histologiques borderlines et des suspicions de rejet humoral. Ce phénotypage réalisable en routine pourrait s'inscrire dans la surveillance des patients transplantés rénaux et constituer un signal d'alerte de risque de rejet.

---

### MOTS-CLES

TRANSPLANTATION RENALE  
IMMUNOPHENOTYPAGE LYMPHOCYTAIRE  
HISTOLOGIE DE GREFFON  
INFLAMMATION DE LA MICROCIRCULATION  
LESIONS BORDERLINE