

**MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE**

Soutenu devant le jury interrégional

Le 3 décembre 2013

Par *Erwan Dumontet*

Conformément aux dispositions du décret
du 23 janvier 2003 tient lieu de :

**THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MEDECINE**

ETUDE DU PHENOTYPE ET DE L'EXPRESSION DES MIARNS CHEZ LES PATIENTS
PRESENTANT UNE GREFFE COMBINEE REIN-FOIE

Président :

Pr Régis Josien

Membres du jury :

Pr Alain Reynaud

Pr Karin Tarte

Dr Sophie Brouard

Dr Sophie Conchon

Remerciements

Au moment de présenter ma thèse d'exercice je tiens à remercier les personnes suivantes :

Monsieur le professeur Régis Josien qui me fait l'honneur de présider cette soutenance,

Monsieur le professeur Alain Reynaud, qui je le sais, jugera ce travail avec l'inestimable rigueur bienveillante qui le caractérise,

Madame le professeur Karin Tarte qui m'honore de son jugement et de sa confiance,

Messieurs les professeurs François Tron et Olivier Boyer, de la faculté de médecine de Rouen, qui ont fait naître mon goût pour l'immunologie,

Madame le docteur Edith Bigot-Corbel, qui m'a honoré de sa confiance en me chargeant d'enseignements,

Mesdames les docteurs Sophie Brouard et Sophie Conchon, sans qui ce travail n'aurait jamais été possible.

Soyez assurés de mon plus profond respect

Je voudrais dédier ce travail :

A mes parents, ce que vous êtes fait de moi ce que je suis,

A Mathilde, ma petite sœur qui me surpasse en toute chose,

Aux amis d'hier et d'aujourd'hui qui m'ont soutenu chaque jour,

A ma tendre Cécile sans qui l'avenir n'aurait pas de raison d'être.

Soyez assurés de mon amour le plus sincère

Table des matières

Remerciements	2
Table des figures	5
Liste des abréviations	6
Introduction	7
I. Greffe de foie et greffe combinée rein-foie dans les modèles animaux : découverte des phénomènes de tolérance	9
A. La greffe hépatique chez le rat : un modèle de tolérance d'organe	9
B. La greffe combinée rein-foie chez le rat : vers l'induction d'un état de tolérance systémique	13
II. La greffe combinée rein-foie chez l'Homme : amélioration du devenir clinique et diminution des rejets	15
A. Indications et épidémiologie de la greffe combinée rein-foie	15
B. La greffe combinée rein-foie améliore la survie sans rejet et la survie globale	17
III. Etat des connaissances des phénomènes de tolérance chez l'Homme	19
A. Certains patients sevrés de tout traitement immunosuppresseur conservent une greffe hépatique ou rénale fonctionnelle sur le long terme	19
B. Les signatures phénotypiques et géniques induites par les phénomènes de tolérance fonctionnelles différent selon la nature de la greffe	19
IV. Nouvelle approche des phénomènes de tolérance : l'étude des profils de miARNs	21
A. Biogenèse et mode d'action des miARNs	21
B. L'étude des miARN en greffe d'organe	22
Résultats	24
I. Paramètres cliniques	25
II. Etude des différences phénotypiques entre la transplantation combinée rein-foie et la transplantation unique rein ou foie chez des patients sous immunosuppresseurs ou tolérants	27
A. Les CLK présentent plus de B mémoires CD19 ⁺ CD24 ⁺ CD38 ^{Low} que les L-STA et plus de Treg CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{High} CD127 ^{Low} FOXP3 ⁺ Helios ⁺ que les K-STA	27
B. Le profil phénotypique des CLK diffère de celui des tolérants foie (L-TOL)	32
C. Le profil phénotypique des CLK diffère de celui des tolérants rein (K-TOL)	33

III. Etude du profil de miARN associé avec la transplantation combinée rein-foie et comparaison avec les profils associés à la transplantation unique rein ou foie chez des patients sous immunosuppresseur ou tolérants	34
A. Les CLK expriment une signature miARNs combinée influencée par les deux greffons	34
B. Les patients CLK n'expriment pas les profils de miARNs des patients L-TOL et K-TOL	35
C. Les patients CLK, L-TOL et K-TOL mettent en jeu des réseaux de gènes différents	38
Discussion	42
Matériels et méthodes	48
I. Population étudiée	49
II. Préparation des échantillons sanguins	49
III. Immunophénotypage des éléments mononucléés du sang périphérique	50
IV. Méthodes de biologie moléculaire	51
A. Profilage des signatures d'expression des miARNs	51
B. Mesures individuelle de l'expression des miARNs	51
C. Analyse de l'expression génique des puces à ADN	52
V. Analyses statistiques	52
Annexes	54
Bibliographie	63
Serment médical	71

Table des figures

Figure 1 : Histologie des greffons hépatiques en cas de rejet ou de tolérance _____	12
Figure 2 : Nombre de transplantations combinées rein-foie selon le registre des greffes américain ____	15
Figure 3 : Biogenèse et action des miARNs _____	21
Figure 4 : Résumé de la stratégie de marquage lors du phénotypage _____	28
Figure 5 : Fréquence des lymphocytes T conventionnels _____	29
Figure 6 : Fréquence des lymphocytes T régulateurs _____	30
Figure 7 : Fréquences des lymphocytes T minoritaires _____	30
Figure 8 : Fréquence des lymphocytes NK _____	31
Figure 9 : Fréquence des lymphocytes B _____	32
Figure 10 : Seul le miR-451a est différemment exprimé entre les CLK et les K-STA _____	35
Figure 11 : ACP basée sur les profils miARNs de tolérance hépatique ou rénale _____	36
Figure 12 : ACP basée sur les profils de miARNs en tolérance hépatique ou rénale _____	37
Figure 13 : Identification des cibles des miARNs différemment exprimés en tolérance rénale ou hépatique _____	39
Figure 14 : Catégories GO significativement surreprésentées dans les gènes cibles des profils miARNs associés à la tolérance rénale ou hépatique _____	40
Figure 15 : Graphiques de la surreprésentation des transcrits géniques en lien avec les lignages cellulaires parmi les cibles prédites des profils miARNs liés à la tolérance rénale ou hépatique _____	41

Liste des abréviations

ACP : Analyse en Composante Principale
AMR : Antibody Mediated Reject (=rejet humoral)
ASAT : Aspartate amino-transférase
ALAT : Alanine amino-tranférase
BN : rat Brown Norway
CLK : Greffe combinée rein-foie
CM : Mémoire centrale
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMSP : Cellules Mononucléées du sang Périphérique
DA : rat Dark Agouti
DSA : Donor Specific Antibody
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EM : Effecteur mémoire
HLA-G : Human Leucocyte Antigen class G
INR : International Normalized Ratio
K-TOL : Greffe de rein à l'état de tolérance opérationnelle
K-STA : Greffe de rein cliniquement stable
LEW : rat Lewis
L-TOL : Greffe de foie à l'état de tolérance opérationnelle
L-STA : Greffe de foie cliniquement stable
mAb : Anticorps monoclonal
miARN :microARN
mARN : ARN messenger
PRA : Panel Reactive Antibody
UNOS : United Network for Organ Sharing
TEMRA : Effecteur différencié terminal
Score MELD : Score du Model for End-Stage Liver Disease

Introduction

Chez un hôte immunocompétent, toute greffe d'organe présentant un CMH étranger sera rejetée à moins que des mesures immunosuppressives ne soient mises en place. Cette sentence est à la base de la connaissance moderne de l'immunologie des greffes. Cependant, il est maintenant communément admis que tous les tissus ne sont pas rejetés à la même vitesse ni avec la même vigueur. C'est notamment le cas du foie, qui résiste fréquemment aux phénomènes de rejet et dont la greffe permettrait de diminuer le rejet des autres organes. Ce phénomène de tolérance immunologique, entorse à la règle fondamentale du soi/non-soi, a été défini expérimentalement par Billingham *et al.* en 1953 chez la souris (1) avant d'être plus largement étudié sur d'autres modèles animaux propices à sa mise en place comme le cochon et le rat. Cette tolérance immunologique se définit par la présence des quatre critères suivants :

- Organe greffé fonctionnel et absence de lésion histologique
- Hôte immunocompétent capable de répondre à des agressions extérieures
- Absence d'immunosuppresseur
- Spécificité de cet état de tolérance par acceptation d'une seconde greffe du même donneur et rejet d'un tiers

**I. Greffe de foie et greffe combinée rein-foie dans les modèles animaux :
découverte des phénomènes de tolérance**

A. La greffe hépatique chez le rat : un modèle de tolérance d'organe

La relative clémence de la réponse immunitaire dirigée contre les allogreffes hépatiques est particulièrement marquée chez le cochon et le rat. Dans ces modèles animaux, des greffons hépatiques allogéniques peuvent ne pas être rejetés et même conduire à un état de tolérance immunologique spécifique à l'encontre des antigènes CMH du donneur. Les premières observations ont été réalisées par Garnier *et al.* chez le cochon (2–4) et les modifications immunologiques liées à ces greffes ont été étudiées par Calne *et al.* sans que les mécanismes immunologiques soutenant cet état de tolérance ne soient mis à jour (5,6). Par la suite, le rat a supplanté le porc comme modèle animal du fait de la bonne disponibilité de lignées consanguines, des bonnes connaissances du système immunitaire de ce modèle et grâce à la moindre mortalité péri-opératoire due à l'amélioration des techniques chirurgicales. Les travaux de Kamada *et al.* ont démontré que le devenir des greffes hépatiques chez le rat était génétiquement déterminé et dépendait principalement des combinaisons donneur/receveur (Table I) (7).

Table I : Temps de survie (jours) des greffes hépatiques des différents croisements des fonds génétiques de rat

Receveur (CMH)	Donneur (CMH)	Survie moyenne (n)	Réf.
PVG (RT1 ^c)	DA (RT1 ^a)	>100 (70)	1
PVG (RT1 ^c)	PVG-RT1 ^a	321 (3)	2
PVG (RT1 ^c)	LEW (RT1 ^l)	32 (5)	2
		<81(9) ; >218 (1)	3
PVG (RT1 ^c)	WAG (RT1 ^u)	<81(9) ; >194 (1)	3
PVG (RT1 ^c)	BN (RT1 ⁿ)	210 (5)	2
PVG (RT1 ^c)	AUG (RT1 ^c)	179 (4)	2
AUG (RT1 ^c)	PVG (RT1 ^c)	59 (5)	2
AUG (RT1 ^c)	DA (RT1 ^a)	11 (5)	2
AUG (RT1 ^c)	LEW (RT1 ^l)	16 (5)	2
AUG (RT1 ^c)	BN (RT1 ⁿ)	52 (4) ; 487 (1)	2
AO (RT1 ^u)	DA (RT1 ^a)	17 (4)	4
HO.B2 (RT1 ^u)	PVG-RT1 ^a	231 (5)	2
LOU (RT1 ^u)	DA (RT1 ^a)	16 (6)	4
WAG (RT1 ^u)	LEW (RT1 ^l)	<90 (5) ; >100 (4)	3
DA (RT1 ^a)	PVG (RT1 ^c)	>100 (4)	3
		224 (5)	2
DA (RT1 ^a)	LEW (RT1 ^l)	197 (5)	2
		<11 (10)	5
DA (RT1 ^a)	BN (RT1 ⁿ)	216 (5)	2
DA (RT1 ^a)	AUG (RT1 ^c)	161 (5)	2
LEW (RT1 ^l)	BN (RT1 ⁿ)	202 (4)	2
		14 (6) ; >180 (2)	6
		<22 (8)	7
		<35 (4) ; >90 (8)	8
LEW (RT1 ^l)	AUG (RT1 ^c)	18 (5)	2
LEW (RT1 ^l)	PVG (RT1 ^c)	16 (5)	2
LEW (RT1 ^l)	DA (RT1 ^a)	11 (5)	2
LEW (RT1 ^l)	(LEWxBN)F ₁ (RT1 ^{l/n})	>120 (7)	9
BN (RT1 ⁿ)	DA (RT1 ^a)	11 (6)	2
		26 (8)	4
BN (RT1 ⁿ)	PVG (RT1 ^c)	36 (5)	2
BN (RT1 ⁿ)	AUG (RT1 ^c)	45 (5)	2
BN (RT1 ⁿ)	LEW (RT1 ^l)	48 (5)	2
		<22 (13) ; <90 (3) ; >90 (7)	5
BN (RT1 ⁿ)	(LEWxBN)F ₁ (RT1 ^{l/n})	>120 (7)	9

(1) Kamada & Calne, 1983

(2) Zimmermann *et al.*, 1983

(3) Limmer, Herbertson & Calne, 1980

(4) Kamada, 1982

(5) Ulrichs *et al.*, 1981(6) Tamisier *et al.*, 1983(7) Engemann *et al.*, 1982(8) Engemann *et al.*, 1983(9) Houssin *et al.*, 1980

La majeure partie des études a été réalisée selon le schéma : greffe de foie de rat Dark Agouti (DA) vers un rat receveur Piebald-Viral-Glaxo (PVG), le foie étant positionné comme chez l'homme en position orthotopique. Dans ce modèle, en dehors des exceptionnels problèmes chirurgicaux, une tolérance complète du greffon est atteinte dans 100% des cas (8). Le receveur PVG accepte aussi les greffes des souches Lewis LEW.RT1^l mais pas celles des souches Brown Norway BN.RT1ⁿ confirmant la restriction des phénomènes de tolérance à certains haplotypes de donneurs. Ces phénomènes de tolérance ne sont pas une simple ignorance immunologique mais un réel mécanisme actif. Les foies DA allogreffés aux receveurs PVG présentent des signes histologiques clairs de rejet. Les lésions sont maximales à la seconde semaine post-greffe, avec une infiltration de cellules mononucléées dans les espaces portes et les sinusoides hépatiques. Au-delà, de la 4^{ème} semaine cet infiltrat semble avoir disparu et à 1 mois post-greffe le foie retrouve un aspect histologique normal (Figure 1A et B). Les résultats des tests hépatiques standards augmentent modérément durant les premières semaines de greffe puis retournent rapidement à la normale. Au contraire, une greffe de foie DA vers un receveur BN entraîne un phénomène de rejet aigu marqué à l'histologie par une inflammation forte des espaces portes, un infiltrat mononucléé massif des sinusoides hépatiques ainsi que la présence de foyers de nécrose hépatique (Figure 1C). Les résultats des tests hépatiques restent très élevés jusqu'à la mort de l'animal qui survient dans l'année suivant la greffe. Enfin, une greffe de foie DA vers un receveur hétérozygote issu d'un croisement (PVGxBN)_{F1} ne rejettera pas le greffon. Cependant, la réaction inflammatoire sera sévère, proche de celle observée chez le rat homozygote BN (Figure 1D). Mais au-delà d'un mois post greffe, celle-ci sera totalement résolutive laissant une architecture hépatique strictement normale malgré des résultats aux tests hépatiques perturbés (9). Ce modèle de greffe hépatique pose donc les questions des mécanismes immunologiques mis en place par le greffon hépatique pour arrêter une réaction de rejet et de ceux impliqués dans la maintenance de cet état de tolérance.

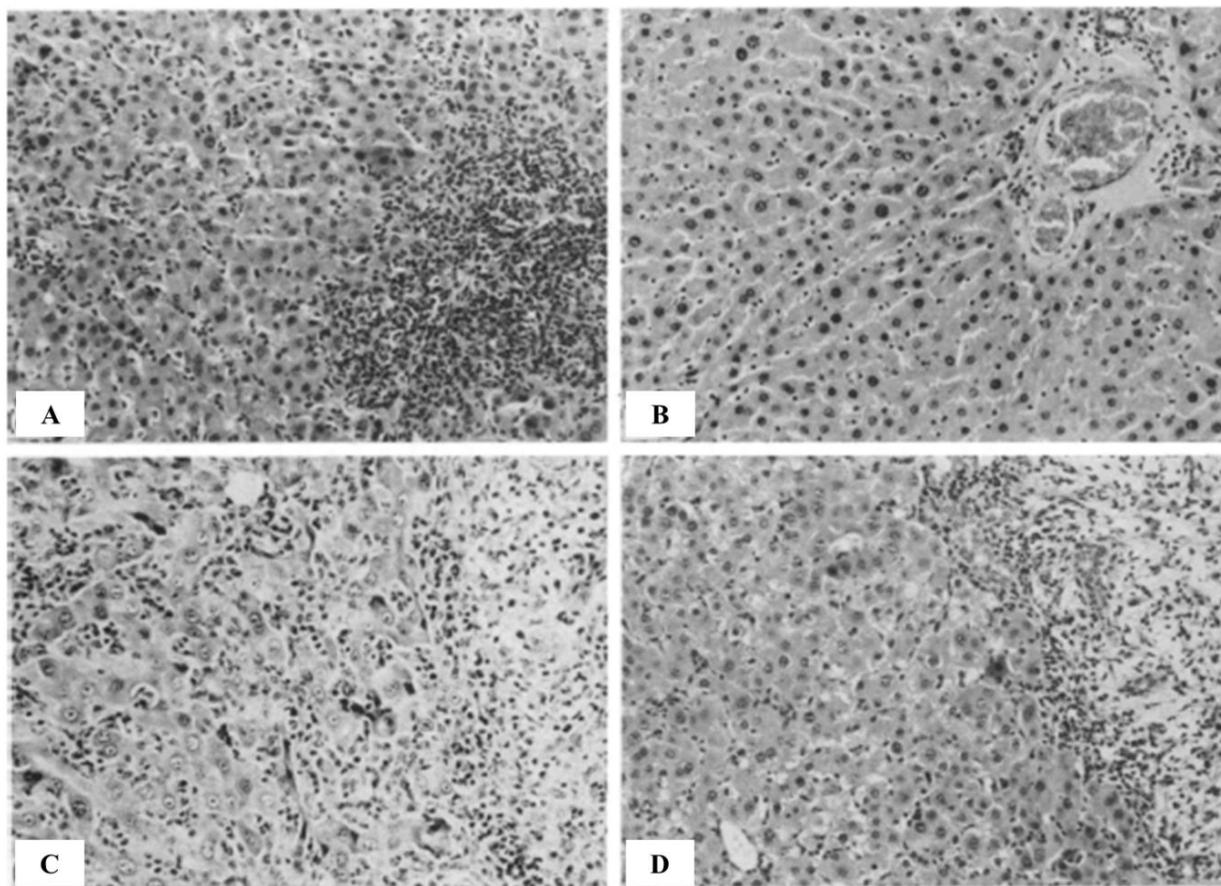


Figure 1 : Histologie des greffons hépatiques en cas de rejet ou de tolérance

A) Aspect d'un foie DA chez un receveur PVG, 1 semaine après la transplantation : présence d'un infiltrat mononucléaire dans les espaces portes et les sinusoides hépatiques.

B) Foie DA chez un receveur PVG, 4 mois après la transplantation : histologie normale avec faible présence d'infiltrat mononucléé.

C) Foie DA chez un receveur BN, 12 jours après la transplantation : fort œdème des espaces portes, infiltrat mononucléé majeur envahissant le parenchyme hépatique et images de nécroses hépatocellulaires. Le foie sera rejeté conduisant à la mort de l'animal.

D) Foie DA chez un receveur (BNxPVG) F_1 , 4 semaines après la transplantation : même aspect histologique qu'en C mais retour à la normal en 3 mois.

Section colorée en hématoxyline et éosine au grossissement x60. *Kamada et Calne, 1983*

B. La greffe combinée rein-foie chez le rat : vers l'induction d'un état de tolérance systémique

Au-delà d'une augmentation infinie de sa survie, la greffe hépatique conduit à un état de tolérance systémique. Calne *et al.* ont été les premiers à montrer, dans leur modèle de cochon, qu'une greffe hépatique effectuée en même temps qu'une greffe rénale permettait une survie indéfinie de la greffe rénale alors que leurs contrôles sans greffon hépatique la rejetaient rapidement (6). L'étude de cet état de tolérance systémique a ensuite été approfondie chez le rat. Les rats PVG greffés avec un foie DA ont montré une capacité à accepter une greffe allogénique DA, simultanée ou retardée, de cœur (10), de rein (11) ou de peau (12). Les résultats notamment sur la survie d'une greffe de peau sont particulièrement convaincants dans la mesure où elle nécessite habituellement de fortes doses d'immunosuppresseurs. Dans tous les cas, cet état de tolérance est spécifique pour les antigènes du donneur car une seconde greffe d'un donneur tiers est systématiquement et rapidement rejetée, même lorsque les différences portaient sur les antigènes mineurs de greffe (13). Les mécanismes impliqués dans cet effet protecteur de la greffe hépatique sur la seconde greffe ne sont pas encore clairement élucidés. Kamada *et al.* ont montré que l'injection journalière de lymphes de rats PVG greffés avec des foies de rats DA prolongeait la survie d'allogreffes de rein, cœur ou peau chez un receveur PVG non immunodéprimé. Cet effet était spécifique pour les antigènes du foie du donneur et l'effet d'immunotolérance était réversible et de courte durée (14). Par ailleurs, l'injection de sérum DA chez des rats PVG retardait à la fois les phénomènes de rejets aigu et chronique d'une greffe de cœur PVG.RT1^a mais le retrait des molécules solubles de classe I du CMH de ces sérums DA abolissait complètement cet effet immunosuppresseur (15). Les molécules solubles du CMH de classe I, qui résultent principalement d'une synthèse hépatique (16), pourraient inhiber l'effet des lymphocytes T cytotoxiques. On notera que lorsque des rats PVG sont sensibilisés par des suspensions de cellules hépatiques DA, il s'en suit un état de rejet plutôt que de tolérance. Ainsi, Kamada *et al.* montrent que l'injection intrapéritonéale d'une suspension d'hépatocytes DA chez des rats PVG conduit à une sensibilisation et au rejet accéléré d'une greffe cardiaque DA hétérotopique, et ceci en dépit d'une dose d'antigènes injectée égale ou supérieure à celle d'un foie entier. La mise en place des phénomènes de tolérance requiert donc la présence d'un foie intact en position anatomique.

D'un point de vue schématique, la tolérance hépato-induite semble se mettre en place de la manière suivante. Dès la greffe, le foie jouerait un rôle d'éponge piégeant les lymphocytes réactifs anti-donneur, les faisant ainsi disparaître de la circulation sanguine. Dans le même temps, une immunosuppression rapide et forte capable d'interrompre des réactions de rejet déjà avancées sur des organes distants (cœur, rein, peau) se met en place. Cette immunosuppression pourrait être la résultante d'un relargage massif d'allo-antigènes du greffon hépatique vers la circulation sanguine comme l'attestent les forts taux d'antigènes CMH de classe I retrouvés dans le sérum des receveurs 24H après la greffe. Quelques jours après la greffe, une réaction immunitaire anti-donneur se met en place et disparaît dans le premier mois de greffe. Le receveur est alors dans un état de tolérance aux antigènes du donneur hépatique comme en témoigne l'acceptation des greffes secondaires de cœur, rein ou peau.

II. La greffe combinée rein-foie chez l'Homme : amélioration du devenir clinique et diminution des rejets

A. Indications et épidémiologie de la greffe combinée rein-foie

Chez l'Homme, les premières greffes combinées rein-foie (CLK) ont été décrites dès 1983 par Magrietrer *et al.* (17). La transplantation rénale est effectuée dans la fosse iliaque en position hétérotopique tandis que le foie est placé en position orthotopique. Cette pratique n'a longtemps concerné qu'un petit groupe de patients répondant aux critères suivants : coexistence chez l'insuffisant rénal chronique d'une hépatopathie à évolution cirrhogène généralement d'origine virale B ou C, présence d'une maladie métabolique d'origine hépatique détruisant le rein (hyperoxalurie type I), ou plus rarement les polykystoses hépatorénales majeures. Les doubles greffes rein-foie ne se sont réellement développées qu'à partir de 2002 avec l'inclusion de la créatinine dans le score MELD (Model for End stage Liver Disease) (18,19). Le score MELD a été introduit pour prédire la mortalité due à la maladie hépatique. Les principales variables de ce score comprennent la bilirubinémie, l'INR (International Normalized Ratio), et la créatininémie. L'inclusion de la créatininémie dans le score MELD a induit une augmentation systématique de ce score chez les patients insuffisants rénaux les orientant plus facilement vers une greffe combinée rein-foie. Par ailleurs, plusieurs études locales ou de registres nationaux ont souligné une meilleure survie des greffes combinées comparativement aux simples greffes hépatiques en cas d'insuffisance rénale pré-greffe (20–23). Ces résultats encourageants ont amplifié l'engouement naissant pour ces greffes combinées.

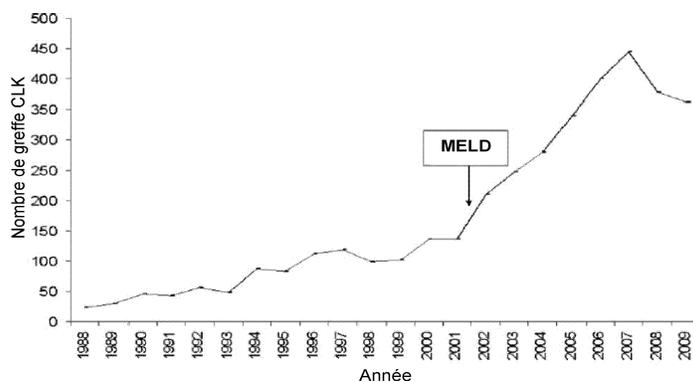


Figure 2 : Nombre de transplantations combinées rein-foie selon le registre des greffes américain

Forte augmentation du nombre annuel de greffes combinées à l'instauration du score MELD. Chopra *et al.*, 2011

Pour encadrer cette hausse rapide et faire face à la pénurie croissante d'organe, des critères consensuels d'éligibilité à la greffe combinée rein-foie ont été formalisés. Seuls les patients associant une défaillance hépatique nécessitant une greffe de foie à l'un des 4 critères suivants devront être orientés vers une greffe combinée (24).

- Insuffisance rénale terminale sous dialyse
- Insuffisance rénale chronique non dialysée mais avec un taux de filtration glomérulaire (GFR) inférieur à 30mL/min et une protéinurie supérieur à 3 g/24H
- Insuffisance rénale aigue requérant une dialyse bihebdomadaire durant plus de 6 semaines
- Maladie métabolique ou génétique requérant une greffe rénale selon l'avis du néphrologue

Concernant la pratique française, on recensait 16.818 greffes entre 1989 et 1994 dont seulement 61 greffes combinées rein-foie. Ces dernières années ont aussi été marquée par une augmentation du nombre de greffe combinée rein-foie en France (Table II), devenue deuxième greffe combinée juste derrière la greffe rein-pancréas, avec 41 greffes en 2012 selon l'agence de la biomédecine.

Table II : Evolution du nombre de greffes d'organes effectuées de 2005 à 2012

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Rein	1024	1037	1061	1011	1047	1092	1164	1161
Foie	2572	2731	2912	2937	2826	2889	2976	3044
Rein-Foie	42	39	48	50	38	40	48	41
Rein-Pancréas	84	82	83	73	69	83	67	58

Le nombre de greffes rein et foie comprend les greffes donneurs vivants hors dominos

Source : <http://www.agence-biomedecine.fr>

B. La greffe combinée rein-foie améliore la survie sans rejet et la survie globale

Les études cliniques récentes montrent un effet protecteur de la greffe hépatique sur la greffe rénale, comme cela avait été démontré chez le rat dans les années soixante-dix. Malgré une forte mortalité dans la période péri-opératoire, les patients CLK présentent des taux de rejets aigus et chroniques moindres que les patients simples transplantés rein (25–27). Quelques études cliniques précoces ont ainsi suggéré que l’allo-greffon hépatique protégeait le rein des rejets hyper aigus même dans les cas de greffe avec préexistence d’anticorps lymphotoxiques. Dans une série de 12 patients, Fung *et al.* ont montré que les quatre patients ayant un crossmatch positif le "négativaient" et diminuaient leur taux de PRA (*Panel Reactive Antibodies*) après une greffe CLK (28,29). Plusieurs études mono-centriques impliquant de faibles effectifs ont confirmé ces résultats : l’incidence des rejets cellulaires étaient plus faible et le taux de survie des allogreffes rénales était significativement plus important chez les patients ayant subi une greffe combinée rein-foie comparativement aux greffes rein unique (25,26,30–33). Récemment, la comparaison de 13 patients CLK hyper immunisés contre leur donneur avec 43 CLK non immunisés n’a pas montré de différence entre les deux groupes quant aux médiane de survie et dysfonction de l’allogreffe rénale. Seule la survenue d’un épisode de rejet rénal aigu lors de la première année de greffe était significativement plus élevée chez les patients hyperimmunisés (5 vs. 1; $p=0.002$). Le greffon hépatique semble jouer un rôle protecteur chez les CLK en cas d’hyper-immunisation pré-greffe (34). L’étude du devenir clinique des receveurs CLK à travers le registre UNOS a confirmé une incidence moindre des défaillances rénales résultantes d’un rejet chronique comparé aux greffes rénales uniques (2% vs. 8% $p<0.0001$) (35). De même, il a été montré une diminution significative du rejet de l’allogreffe hépatique comparativement aux greffes hépatiques uniques (16% vs. 24%, $p<0.001$) ainsi qu’une réduction significative du taux de rejet de l’allogreffe rénale à un an comparativement aux greffes rénales uniques (36). Cependant, cet effet bénéfique du greffon hépatique sur la greffe rénale reste controversé. Dans une étude de 38 patients, la survie des patients et de l’allogreffe rénale était moindre chez les patients ayant un crossmatch positif (respectivement 33% et 17%) comparativement aux cas de crossmatch négatifs (78% et 75%) et les forts taux de PRA (>10%) conservaient un effet délétère sur la survie, principalement marqué dans les cas de crossmatch

positifs (37). De la même manière, l'étude du registre UNOS par Katznelson *et al.* n'a pas permis de retrouver le rôle protecteur du foie chez les patients CLK. En effet, le taux de survie à 3 ans ne différait pas de manière significative : 78% en cas de greffe rénale unique contre 81% en cas de greffe combinée rein-foie. Cette étude rapporte une survie identique de la fonction rénale entre les patients greffés rein uniquement ou les patients greffés CLK s'ils présentaient plus de deux *mismatches* HLA ou un fort taux de PRA en pré-greffe (PRA>50%). Les auteurs concluaient que le greffon hépatique en cas de greffe combinée rein-foie ne protégeait pas le rein des phénomènes de rejet, n'améliorait pas la fonction rénale et n'augmentait pas la survie globale (38).

Bien que les données cliniques ne permettent pas de déterminer avec certitude les mécanismes immunologiques mis en jeu lors de transplantations combinées, elles suggèrent l'existence d'un effet des greffons l'un sur l'autre. La question de la mise en place de phénomènes immunologiques de tolérance pouvant être associés à ce qui a déjà pu être décrit lors des greffes hépatiques ou rénales est donc ouverte.

III. Etat des connaissances des phénomènes de tolérance chez l'Homme

A. Certains patients sevrés de tout traitement immunosuppresseur conservent une greffe hépatique ou rénale fonctionnelle sur le long terme

Chez l'Homme, depuis l'apparition à la fin des années 80, de la ciclosporine et le développement des autres immunosuppresseurs limitant le rejet des greffes allogéniques, la greffe est devenue la réponse médicale privilégiée en cas de défaillance d'organe. La généralisation de cette pratique a permis de mettre en évidence dès 1993, plusieurs cas de tolérance en greffe rénale ou hépatique (39). La pratique de la greffe combinée rein-foie étant plus récente, il n'a, à notre connaissance, pas encore été rapporté de cas de tolérance dans ces greffes. Chez l'Homme, on parlera préférentiellement de tolérance clinique ou mieux tolérance opérationnelle. En effet, les cas reportés concernent le plus souvent des patients non observants ayant arrêtés par eux-mêmes leur traitement immunosuppresseur. La biopsie d'organe n'est donc pas disponible pour vérifier l'absence de lésion histologique. Par ailleurs, les tests d'immunocompétence décrits par Billingham *et al* ne sont pas applicables à la pratique clinique. Au-delà de ces cas « spontanés » d'immunotolérance, de nombreux essais cliniques montrent qu'une proportion non négligeable de patients transplantés hépatiques a pu diminuer ou, dans certaines conditions favorables, arrêter son traitement immunosuppresseur sans compromettre la survie à long terme de leur greffon (40). Fort de ce constat, d'importants moyens ont été mis en place pour la recherche de biomarqueurs prédictifs de cette tolérance opérationnelle et pour la compréhension de ses mécanismes immunologiques.

B. Les signatures phénotypiques et géniques induites par les phénomènes de tolérance fonctionnelles diffèrent selon la nature de la greffe

L'immunophénotypage sanguin a montré une augmentation du nombre de lymphocytes NK et lymphocytes $\gamma\delta$ chez les patients tolérants greffés foie (L-TOL) (41,42), tandis que les patients tolérants greffés rein (K-TOL) présentent une augmentation du nombre de lymphocytes B (43,44). Par ailleurs, des études de type transcriptomique par puces à ADN sur cellules du sang périphérique ont montré que certaines signatures d'expression génique pouvaient discriminer tolérance opérationnelle, rejet chronique et patient sous immunosuppresseurs (45). Ainsi, trois études chez les transplantés rénaux ont mises en évidence des signatures d'expression de gènes

des lymphocytes B (46–48). La comparaison de ces études rapporte 35 gènes communs, dont 24 en lien avec les cellules B, différenciellement exprimés entre patients tolérants et patients stables sous traitement (46). Ces résultats confirment la prédominance B vue au phénotype. Concernant les patients tolérants greffés foie, le travail de Martinez-Llordella *et al.* a confirmé le phénotype sanguin par la mise en évidence d'une surexpression des gènes en relation avec les populations NK et $\gamma\delta$ et la baisse d'expression des gènes en lien avec la réponse au stress, et avec la réponse inflammatoire (42). Cette description des profils de patient tolérants après une allogreffe de foie ou de rein suggère une divergence dans les mécanismes de mise en place et dans les acteurs cellulaires concernés. L'étude de Lozano *et al.* confirme chez ces populations de patients tolérants deux profils non chevauchants : lymphocytes NK et $\gamma\delta$ chez les greffés foie *versus* populations lymphocytaires B chez les greffés rein. Ce travail mené sur deux cohortes parallèles de transplantés permet de s'affranchir des habituelles limites liées à la comparaison de travaux effectués sur différentes plateformes génomiques ou selon des marquages cellulaires divers. Ces différences phénotypiques et géniques semblent être le reflet d'une réalité clinique. En effet, les patients greffés foie parviennent fréquemment à l'état de tolérance opérationnelle ($\approx 20\%$) tandis qu'à ce jour aucun protocole d'arrêt des immunosuppresseurs n'a pu être mené avec succès chez patients transplantés rein (49). Malgré ces différences phénotypiques et génétiques, aucun mécanisme de tolérance périphérique n'a encore été mis à jour. Ceci a conduit au développement d'une autre approche : l'étude des profils d'expression des microARNs (miARN).

IV. Nouvelle approche des phénomènes de tolérance : l'étude des profils de miARNs

A. Biogenèse et mode d'action des miARNs

Les miARNs sont transcrits à partir de gènes codant ou non pour des protéines. Ils sont transcrits par les ARN polymérase II dans le noyau et un miARN primaire (pri-miARN) est formé. Ces pri-miARNs sont clivés en précurseurs miARN (pré-miARN) par un complexe microprotéique, le microprocesseur complexe, comportant la ribonucléase de type III Drosha et son cofacteur, la protéine DiGeorge syndrome Critical Region 8 (DGCR8). Le pré-miARN, replié en tige boucle par complémentarité imparfaite de base est transporté dans le cytoplasme par l'exportine 5. Il est ensuite clivé par un complexe protéique comportant la ribonucléase de type III Dicer, la protéine TAR RNA-binding protein (TRBP) ou la protéine kinase R activator (PACT) et une protéine argonaute 1 à 4, libérant un ARN double-brin d'environ 22 nucléotides. Ce duplex est alors ouvert, un des brins s'associe à la protéine Argonaute pour former le complexe RISC (RNA-induced silencing complex), alors que le fragment complémentaire appelé miARN* est le plus souvent dégradé. Le miARN comporte à son extrémité 5' la seed sequence, séquence clé qui va servir de guide pour le complexe RISC afin d'identifier la séquence complémentaire présente à l'extrémité 3'-UTR de l'ARNm cible. RISC inhibe alors l'expression du gène par répression de la traduction ou dégradation de l'ARNm (Figure 3). Ces miARNs sont capables de moduler de nombreuses fonctions cellulaires : prolifération, différenciation, synthèse de protéines (50) et agissent dans tous les tissus, y compris les effecteurs cellulaires de l'immunité innée et adaptative (51). Leur régulation a pu être impliquée dans certaines pathologies auto-immunes (52) et dans le rejet en transplantation rénale (53,54).

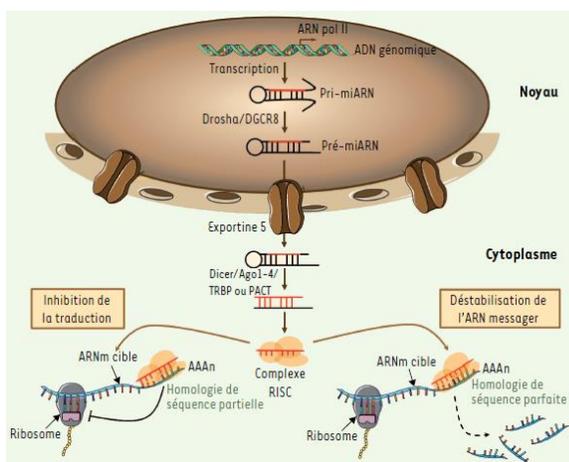


Figure 3 : Biogenèse et action des miARNs

Reproduction avec l'aimable autorisation de Mr. Anglicheau

B. L'étude des miARN en greffe d'organe

En matière de transplantation rénale, la possibilité d'utiliser les miARNs comme biomarqueurs du rejet aigu a été étudiée dès 2008. Sui *et al.* rapportent ainsi une liste de 20 miARNs intra-greffe différentiellement exprimés entre des patients présentant un rejet aigu confirmé à l'histologie et des témoins sains. Parmi ceux-ci, 12 étaient surexprimés et 8 sous-exprimés lors du rejet (55). De la même manière, Anglicheau *et al.* ont pu discriminer les patients en rejet aigu de greffe rénale des allogreffes stables en se basant sur un panel d'expression de 17 miARNs intra-greffe (53). De même, les niveaux d'expression des miARN miR-142-5p, miR-155, et miR-223 sont plus élevés dans les cellules mononucléées du sang périphérique (CMSP) en cas de rejet aigu. Cela traduit le fait qu'un suivi non invasif par simple prélèvement sanguin pourrait déterminer le statut immunologique de la greffe. Dans le cadre de la tolérance d'organe, une surexpression du miR-142-3p est retrouvée dans les CMSP, et préférentiellement les lymphocytes B de patients tolérants une greffe rénale (54). Cette modulation du miR-142-3p induit une baisse d'expression du TGF- β 1 et semble être impliquée dans un processus de rétrocontrôle (54).

En greffe hépatique plusieurs travaux ont montré un lien entre les niveaux d'expressions des miARNs intra-greffe ou sériques et l'état du greffon. Les modèles de greffe hépatique chez le rat ont rapporté que le miR-146a était significativement sous-exprimé en cas d'atteinte ischémiques et pourrait être impliqué dans les phénomènes de rejet cellulaires (56,57). De plus, Chen *et al.* ont montré que cette baisse du miR-146a s'accompagnait d'une augmentation d'expression des voies inflammatoires liées au TLR4 avec surexpressions des protéines TLR4, TRAF6 et IRAK1. Enfin chez l'Homme, Farid *et al.* rapportent une augmentation sérique des miR-122 et miR-148a positivement corrélée à l'augmentation des ASAT et ALAT en cas de rejet aigu. Cependant, la cinétique de ces miARNs semble plus précoce et mieux corrélée à l'amélioration clinique que les traditionnels dosages enzymatiques (58).

Ni les modèles animaux de greffe combinée, ni les données cliniques actuelles ne permettent de déterminer avec certitude les mécanismes immunologiques mis en jeu lors des transplantations combinées rein-foie. Pour explorer cette question, nous avons effectué un

phénotypage sanguin exhaustif ainsi qu'une étude de la signature miARN des patients ayant reçu une greffe combinée rein-foie et nous les avons comparé aux patients ayant reçu une greffe rénale (K-STA) ou hépatique (L-STA) unique qui était cliniquement stable sous immunosuppresseurs. Par ailleurs, pour évaluer l'effet positif potentiel de ces greffes combinées, leurs caractéristiques ont été comparées à celles des patients tolérants ayant reçu une greffe rénale ou hépatique unique et présentant un greffon parfaitement fonctionnel depuis plusieurs années en dehors de tout traitement immunosuppresseur.

Résultats

I. Paramètres cliniques

Notre travail se déroule en deux temps distincts comprenant : une étude des phénotypes sanguins, nommée ci-après « cohorte CMF », puis une étude de l'expression des miARNs comportant 3 cohortes de patients. Au total, 130 patients ont été inclus dans ce travail, dont 45 ont participé à la cohorte CMF et 124 à l'étude d'expression des miARNs. Parmi les 39 patients ayant participé aux 2 études, 25 appartenaient à la cohorte 1 (10 CLK, 10 L-STA, 5 K-STA) et 14 appartenaient à la cohorte 2 (5 CLK, 9 K-STA). Sur l'ensemble des 130 patients impliqué dans ce travail l'âge moyen était de 54 ± 11 ans, la durée de greffe moyenne au moment de l'étude était de 88 ± 54 mois et le sex-ratio était de 1.35. Parmi eux, 48 provenaient de Barcelone, 47 de Nantes, 25 de San Francisco et 10 de Rennes. Durant leur suivi, 30% des patients ont présenté un épisode de rejet aigu résolutif sous traitement immunosuppresseur, 18% ont développé une pathologie tumorale (majoritairement de nature cutanée bénigne), et 14% ont présenté une réactivation CMV. Les indications de greffes variaient selon la nature de l'organe greffé. L'hépatopathie alcoolique était la première cause de greffe chez les CLK et les L-STA, et la seconde cause de greffe des L-TOL, respectivement 32% (n=9) et 37% (n=15) 33% (n=3). La polykystose était la première cause de greffe chez les K-STA et la seconde chez les CLK, respectivement 34% (n=13) et 21% (n=6). Les hépatites virales (B ou C) représentaient 11% des CLK (n=3), 27% des L-STA (n=11) et 44% des L-TOL (n=4). Enfin, on notera, chez 29% des patients CLK (n=8), l'association d'une pathologie primitive hépatique et d'une pathologie primitive rénale.

La répartition des patients à l'intérieur de nos différentes cohortes permet l'observation des points suivants (table III).

Table III : Résumé des informations cliniques des cohortes de patients de l'étude CMF et de l'étude d'expression des miARNs

	Global	Etude du phénotype sanguin				Etude d'expression des miARNs										
		Global	Sous-groupes			Global	Cohorte 1			Cohorte 2			Cohorte 3			
			CLK	L-STA	K-STA		CLK	L-STA	K-STA	CLK	L-STA	K-STA	L-STA	L-TOL	K-STA	K-TOL
Nombre	130	45	15	15	15	124	10	10	9	20	20	18	9	9	10	9
Age	54±11	55±11	62±7 [§]	56±8	49±14 [§]	54±11	61±7	56±7	61±5	53±10 [*]	61±8 ^{**}	44±12 ^{**}	48±8	56±15	55±9	50±14
Sexe																
Homme	73	25	9	7	9	71	5	5	5	10	9	13	3	9	6	6
Femme	54	20	6	8	6	50	5	5	4	10	11	5	3	0	4	3
Tps de greffe	88±54	68±26	69±28	59±28	76±21	87±52	69±12 [§]	53±9 [§]	71±9 [§]	65±42	71±20	74±21	133±64	126±55	113±69	178±72
Centre																
Barcelone	48	0	0	0	0	48	0	0	0	10	20	0	9	9	0	0
Nantes	47	15	0	0	15	46	0	0	9	0	0	18	0	0	10	9
Rennes	10	5	5	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
San Francisco	25	25	10	15	0	20	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
Biologie																
Créatinine		121±38	133±52	103±27	126±24		124±24	107±24	133±34							
ASAT		30±28	39±37	32±29	19±5		45±42	32±35	19±2							
ALAT		30±33	25±46	36±28	23±14		57±52	28±26	17±5							

Age des patients (années) et temps de greffe (mois) exprimés en moyenne±écart-type. La créatininémie est exprimée en µmol/L. Les ASAT et ALAT sont exprimées en UI. Les comparaisons des moyennes ont été effectuées par le test HSD de Tukey à la suite d'une ANOVA. Les p-values sont exprimées comme suit : *<0.05, §<0.01, ¶<0.001

NB : Aucune information clinique n'a pu être retrouvée pour 3 L-STA de la cohorte 3

Au sein de la cohorte CMF, l'âge moyen des patients CLK (62 ± 7 ans) était significativement supérieur à celui des patients K-STA (49 ± 14 ans, $p < 0.001$), mais non différent de celui des L-STA (56 ± 8 ans). Le temps de greffe moyen ne différait pas entre les groupes de patient : 69 ± 28 mois pour les CLK, 59 ± 28 mois pour les L-STA et 76 ± 21 mois pour les K-STA. Les paramètres biochimiques disponibles (créatininémie, ASAT et ALAT) montraient des fonctions rénales et hépatiques conservées et non différentes dans l'ensemble des 3 groupes de patients.

Au sein de l'étude d'expression des miARNs la comparaison inter-cohorte ne retrouvait pas de différence significative concernant l'âge moyen des patients (cohorte 1 : 59 ± 6 ans, cohorte 2 : 53 ± 12 ans et cohorte 3 : 52 ± 12 ans) ou le sex-ratio. Ces trois cohortes dissemblaient uniquement sur la durée de greffe : 64 ± 13 mois pour la cohorte 1, 70 ± 29 mois pour la cohorte 2 et 137 ± 68 mois pour la cohorte 3 ($p < 0.001$). La comparaison des différents groupes de patient à l'intérieur de ces 3 cohortes montrait peu de différence. Ainsi, dans la cohorte 1 les L-STA présentaient un temps de suivi de greffe inférieur aux CLK et au K-STA, respectivement 53 ± 9 mois vs. 69 ± 12 mois et 71 ± 9 mois ($p < 0.01$). Enfin dans la cohorte 2, les CLK étaient plus jeunes que les L-STA (53 ± 10 vs. 61 ± 8 , $p < 0.5$) et plus âgés que les K-STA (53 ± 10 vs. 44 ± 12 , $p < 0.5$). Le détail de ces données cliniques est repris intégralement dans l'Annexe I.

II. Etude des différences phénotypiques entre la transplantation combinée rein-foie et la transplantation unique rein ou foie chez des patients sous immunosuppresseurs ou tolérants

A. Les CLK présentent plus de B mémoires $CD19^+CD24^+CD38^{Low}$ que les L-STA et plus de Treg $CD3^+CD4^+CD25^{High}CD127^{Low}FOXP3^+Helios^+$ que les K-STA

Nous avons effectué un phénotypage exhaustif en cytométrie en flux des cellules mononucléées sanguines de 15 patients CLK et comparé avec celui de 15 patients L-STA et 15 patients K-STA (Figure 4).

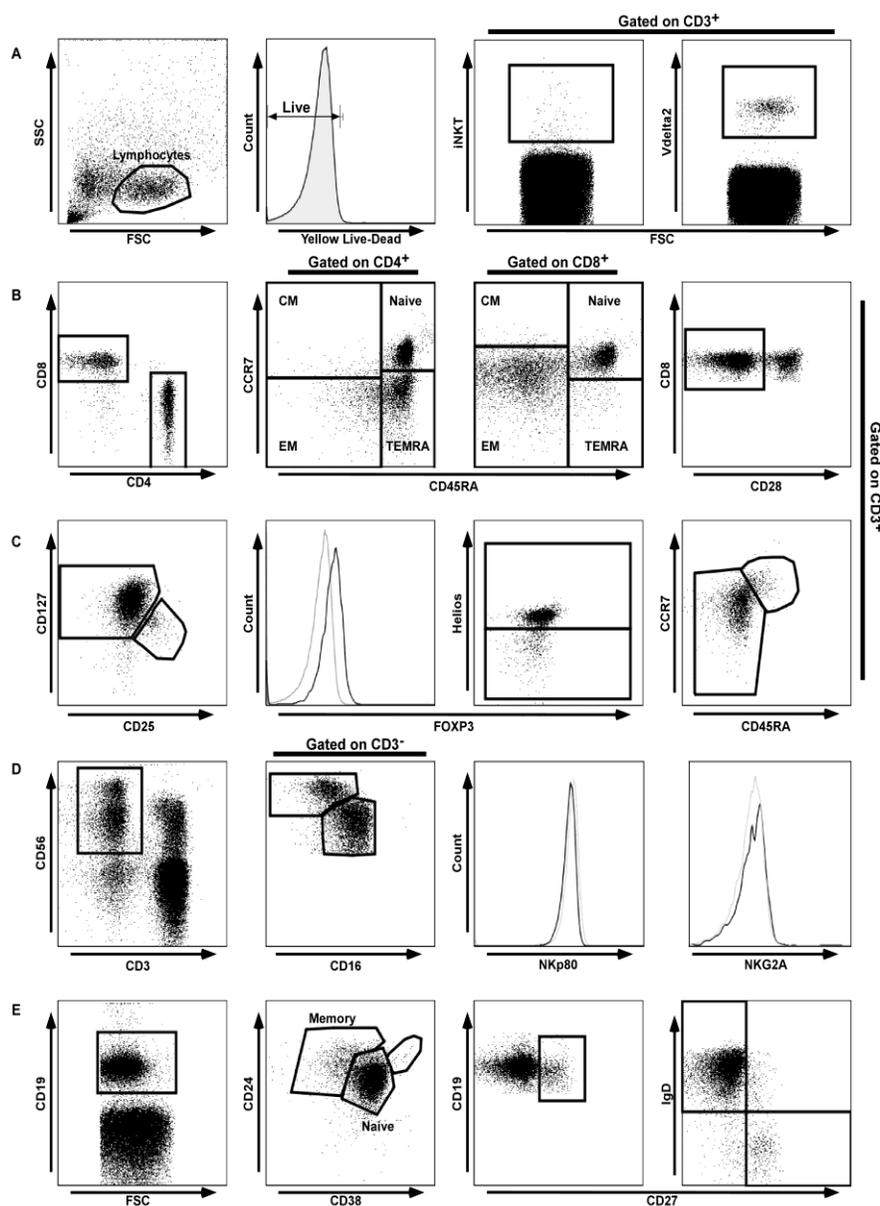


Figure 4 : Résumé de la stratégie de marquage lors du phénotypage

Dot-plot représentatifs d'un patient CLK

A) Les lymphocytes ont été sélectionnés sur leur morphologie selon les échelles FSC/SSC et les cellules mortes exclues selon un marquage *yellow-dead cells*. La sélection des lymphocytes CD3⁺ permet l'étude des cellules T rares : NKT and T $\gamma\delta$ selon l'expression de leurs récepteurs spécifiques. B) Les lymphocytes CD3⁺ conventionnels ont été dichotomisés en CD4⁺ et CD8⁺. Selon leur niveau d'expression de CD45RA et CCR7, nous les avons classés en 4 sous-populations : naïves (CD45RA⁺CCR7⁻), mémoires centrales (CM) (CD45RA⁺CCR7⁺), effecteurs mémoires (EM) (CD45RA⁻CCR7⁺), effecteurs différenciés terminaux (TEMRA) (CD45RA⁺CCR7⁻). Les fréquences de lymphocytes CD8⁺CD28⁻ ont aussi été étudiées. C) Pour les Treg nous avons classiquement sélectionné les lymphocytes CD4⁺CD25⁺CD127^{low}, ceux-ci exprimaient plus FOXP3 (courbe noire) que les T conventionnels (courbe grise). L'expression intracellulaire d'Hélios a été recherchée sur ces cellules FOXP3⁺. Une étude dichotomique des Treg en cellules mémoires (CD45RA⁻CCR7⁺) et naïves (CD45RA⁺CCR7⁻) a été effectuée. D) La sélection des lymphocytes CD3⁻ permet l'étude des lymphocytes NK CD3⁻CD56⁺ séparés en NK sécrétoires CD56^{Bright}CD16^{+/-} et NK cytotoxiques NK CD56^{Dim}CD16^{High}. L'expression membranaire de NKp80 et NKG2A a été étudié dans ces 2 sous-populations (respectivement les courbes noires et grises). E) Enfin les lymphocytes B ont été marqués par le CD19⁺ et les cellules B mémoires ont été étudiés selon deux approches : CD19⁺CD27⁺ ou CD19⁺CD24^{High}CD38^{Low}. L'existence de commutation isotypique sur les lymphocytes B mémoire a été recherchée selon les niveaux d'expression d'IgD et CD27.

Nous n'avons retrouvé aucune différence de fréquence des cellules T $CD3^+CD4^+$ et des cellules T $CD3^+CD8^+$ entre les trois groupes avec respectivement 54.4% (IC95% [44.5-64.2]) et 33% (IC95% [25.8-40.8]) pour les CLK, 60.2% (IC95% [51.9-68.5]) et 28.2% (IC95% [18.4-37.9]) pour les L-STA, 52.6% (IC95% [43.5-61.7]) et 36.3% (IC95% [27.9-44.7]) pour les K-STA. Les CLK présentait une fréquence intermédiaire et non statistiquement différente de $CD8^+EM$ 30.0% (IC95% [18.9-41.1]) et $CD4^+CM$ 1.8% (IC95% [1.3-2.4]) comparativement aux L-STA et K-STA alors que les L-STA possédaient significativement moins de $CD8^+EM$ que les K-STA (23.6% (IC95% [15.5-31.7]) vs. 40.3% (IC95% [31.3-49.3]), $p < 0.05$) mais plus de $CD4^+CM$, (2.9% (IC95% [1.9-3.9]) vs. 1.2% (IC95% [0.8-1.5]), $p < 0.001$). Les trois groupes ne présentaient pas de différence en quant aux cellules T $CD8^+CD28^-$ (Figure 5).

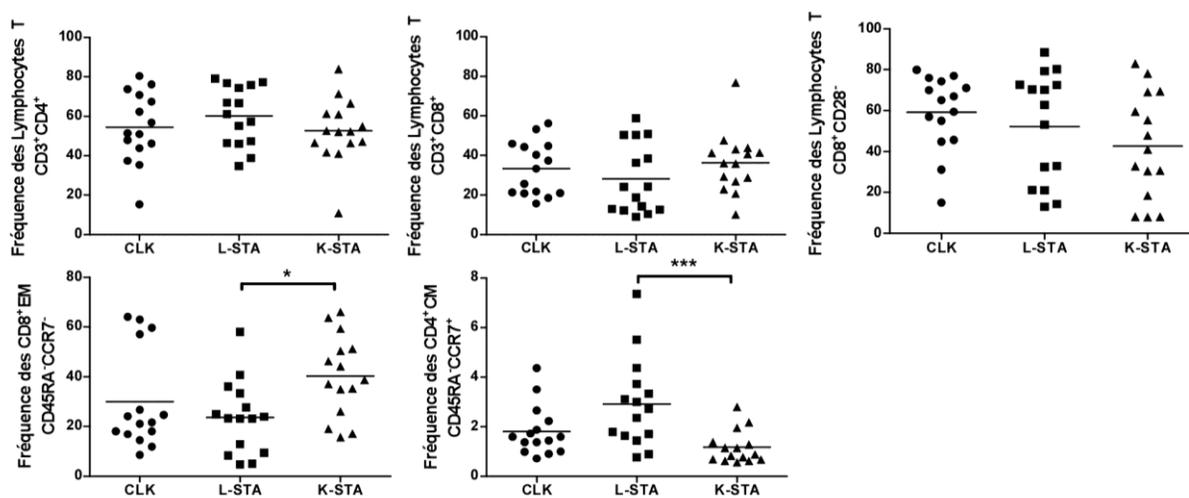


Figure 5 : Fréquence des lymphocytes T conventionnels

Ni les lymphocytes $CD3^+CD4^+$, ni les $CD3^+CD8^+$, ni les $CD8^+CD28^-$ ne sont significativement différents entre les 3 groupes de patients. Les L-STA montrent significativement moins de $CD8^+EM$ que les K-STA ($p < 0.05$) mais plus de $CD4^+CM$ ($p < 0.001$). Les CLK présentent des fréquences intermédiaires entre les L-STA et les K-STA pour les $CD8^+EM$ et les $CD4^+CM$.

La fréquence des Treg $CD3^+CD4^+CD25^{High}CD127^{Low}$ ainsi que leur niveau d'expression intracellulaire de FOXP3 était similaire dans les trois groupes de patients : 3.4% (IC95% [2.6-4.3]), L-STA: 3.8% (IC95% [3.1-4.5]), K-STA: 3.9% (IC95% [3.3-4.5]). Aucune différence n'a été retrouvée lors de la dichotomie des Treg entre cellules naïves $CD45RA^+CCR7^+$ et cellules mémoires $CD45RA^-CCR7^-$. Par ailleurs, aucune différence n'a été retrouvée dans les fréquences de Treg FOXP3⁺Hélios⁺ entre les CLK 79.6% (IC95% [77.1-82.1]) et les L-STA 75.6% (IC95% [71.1-

80.2]), mais on soulignera que ces dernières étaient significativement plus élevés que chez les K-STA 61.8% (IC95% [56.2-67.4]) (respectivement, $p < 0.01$ et $p < 0.001$) (Figure 6).

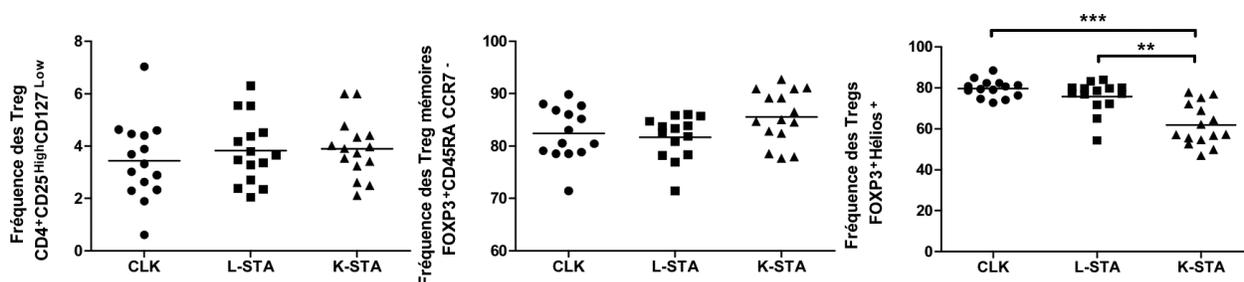


Figure 6 : Fréquence des lymphocytes T régulateurs

Aucune différence n’a été retrouvée dans les fréquences globales de Treg ou dans la dichotomie mémoire/naïve entre les 3 groupes. Cependant, les CLK et les L-STA possèdent plus de Treg FOXP3⁺Hélios⁺ que les K-STA.

L’étude des populations mineures des lymphocytes T du sang n’a pas permis de mettre en évidence de différence significative entre les trois groupes concernant les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les lymphocytes T Natural Killer T (NKT) avec des fréquences respectives de 0.87% (IC95% [0.44-1.30]) et 0.19% (IC95% [0.13-0.25]) pour les CLK, 1.99% (IC95% [0.94-3.04]) et 0.15% (IC95% [0.09-0.20]) pour les L-STA et 3.01% (IC95% [0.82-5.21]) et 0.19% (IC95% [0.14-0.24]) pour les K-STA (Figure 7).

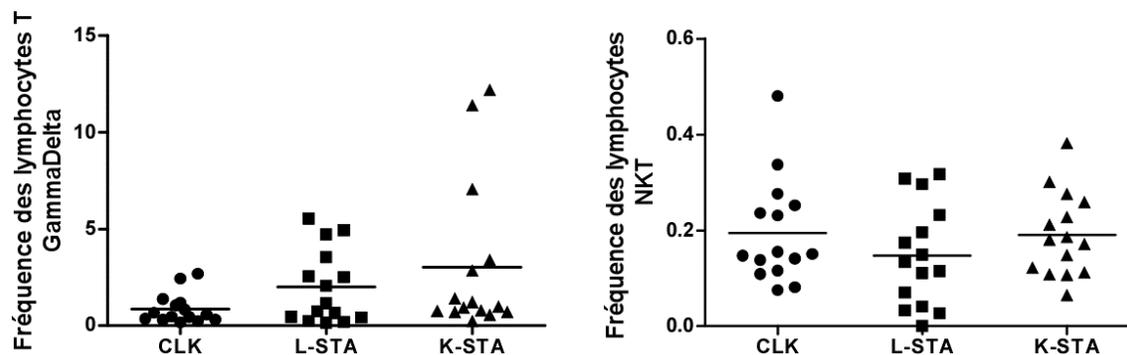


Figure 7 : Fréquences des lymphocytes T minoritaires

Aucune différence significative de fréquence des populations T $\gamma\delta$ ou NKT n’a été retrouvée.

Les lymphocytes NK totaux CD3⁻CD56⁺ ne présentait pas non plus de différence : 9.37% (IC95% [6.26-12.48]) pour les CLK, 11.92% (IC95% [6.43-17.41]) pour les L-STA et 13.43% (IC95% [8.54-18.32]) pour les K-STA. A l’intérieur de ce compartiment NK, aucune différence n’a été relevée concernant les NK sécrétoires CD3⁻CD56^{Bright}CD16^{+/-} ou cytotoxiques CD3⁻

CD56^{Dim}CD16^{High} : 13.97% (IC95% [9.54-18.41]) et 68.25% (IC95% [59.75-76.74]) pour les CLK, 14.80% (IC95% [8.51-21.10]) et 63.55% (IC95% [50.36-76.75]) pour les L-STA, 14.61% (IC95% [8.73-20.48]) et 72.30% (IC95% [64.33-80.27]) pour les K-STA. Les patients K-STA montraient une surexpression des molécules de type récepteur activateur des NK (KAR, représentées dans notre étude par NKp80) comparativement aux patient L-STA à la fois sur les NK sécrétoires (3398 (IC95% [3000-3796]) vs. 2519 (IC95% [2100-2937])) et les NK cytotoxiques (2492 (IC95% [2230-2755]) vs. 1832 (IC95% [1597-2067])), p<0.01). Tandis que les deux sous-populations de NK des patients CLK présentait un niveau d'expression extracellulaire intermédiaire et non statiquement différent de NKp80. Par ailleurs, aucune différence n'a été observée entre les trois groupes de patients concernant l'expression extracellulaire des récepteurs inhibiteurs de NK (KIR, représentées dans notre étude par NKG2A) (Figure 8).

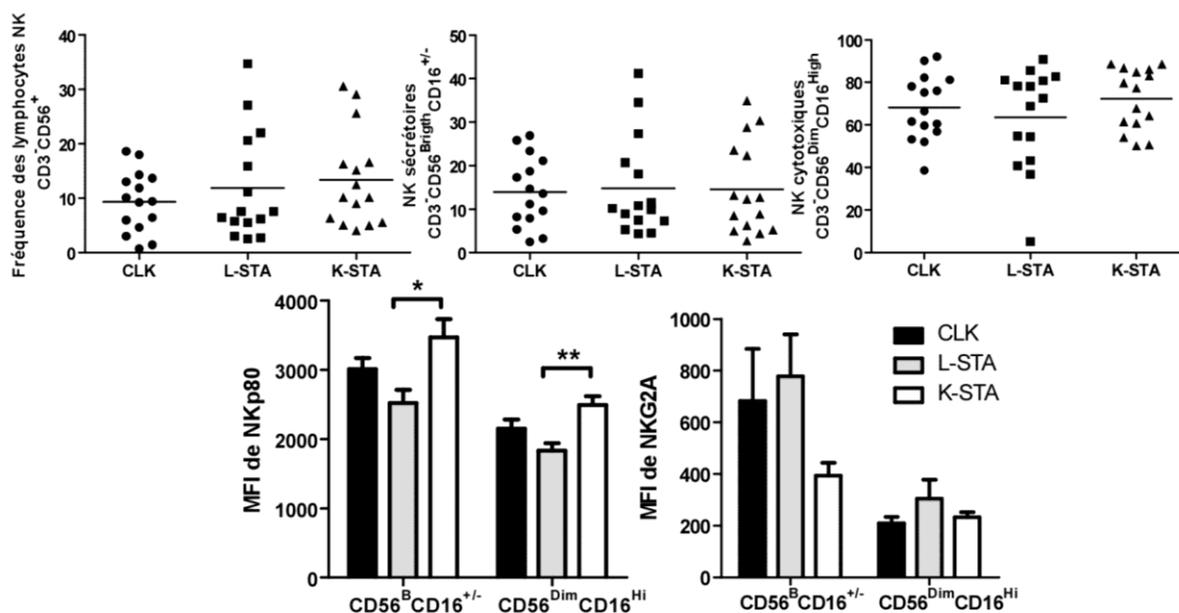


Figure 8 : Fréquence des lymphocytes NK

Aucune différence dans la fréquence des lymphocytes NK ni dans leur répartition sécrétoire/cytotoxique n'a été retrouvée. A la fois les NK sécrétoires et cytotoxiques des K-STA exprimaient plus de NKp80 que les CLK ou les K-STA mais autant de NKG2A.

L'étude des lymphocytes B n'a montrée aucune différence dans les proportions globales de CD19⁺ entre les 3 groupes : 6.4% (IC95% [4.2-8.6]) pour les CLK, 6.5% (IC95% [4.0-9.0]) pour les L-STA et 5.6% (IC95% [4.2-7.0]) pour les K-STA. Les groupes de patients CLK et K-STA

affichaient une augmentation significative de la fréquence des cellules B mémoires $CD19^+CD24^+CD38^{Low}$ comparativement au groupe des L-STA ($p < 0.05$ dans les deux cas) avec respectivement 26.9% (IC95% [14.6-39.3]), 22% (IC95% [15.3-30.1]) et 13.10% (IC95% [8.3-17.9]). Ces résultats sont parfaitement corrélés au marquage mémoire $CD19^+CD27^+$ plus couramment utilisé ($R=0.97$ (IC95% [0.95-0.98]), $p < 0.001$). Au-delà de ces similarités, on retrouvait une fréquence de lymphocytes B mémoires *switchés* $CD19^+CD27^+IgD^-$ de 18.5% (IC95% [10.0-26.0]) intermédiaire à l'augmentation retrouvée entre les K-STA et les L-STA 32% (IC95% [18.4-45.6]) et 10% (IC95% [5-18.7]) avec $p < 0.01$. Enfin, aucune différence n'a été observée concernant les fréquences de lymphocytes B $CD19^+CD24^{High}CD38^{High}$ entre les 3 groupes : CLK 1.6% (IC95% [0.9-2.4]), L-STA 3.7% (IC95% [1.5-5.8]) et K-STA 1.9% (IC95% [1.4-2.4]) (Figure 9).

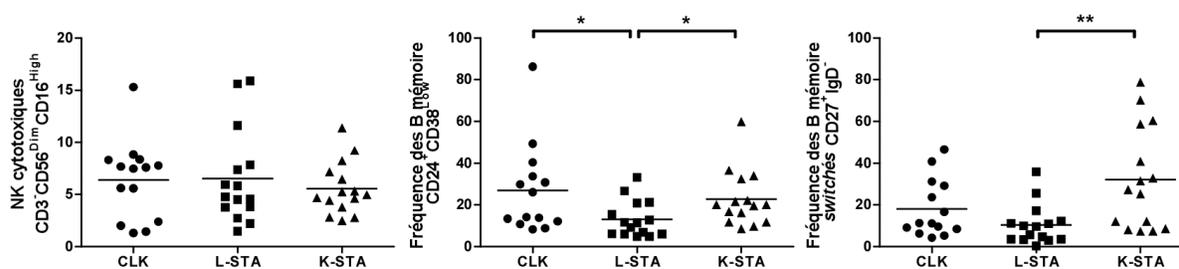


Figure 9 : Fréquence des lymphocytes B

Aucune différence de fréquence de lymphocytes B $CD19^+$ n'a été mise en évidence entre les 3 groupes. Les CLK et les K-STA montraient une augmentation significative de fréquence des lymphocytes B mémoires $CD19^+CD24^+CD38^{Low}$. La fréquence des B mémoires *switchés* était supérieure chez les K-STA comparativement aux 2 autres groupes.

En résumé, le phénotype sanguin des CLK diffère de celui des L-STA et ressemble à celui des K-STA par sa plus haute fréquence de cellules B mémoire $CD19^+CD24^+CD38^{Low}$. Inversement il diffère de celui des K-STA et ressemble à celui des L-STA par sa plus haute fréquence de Treg $CD3^+CD4^+CD25^{High}CD127^{Low}FOXP3^+Helios^+$. Concernant les autres populations cellulaires le groupe des CLK présente souvent des fréquences cellulaires intermédiaires entre L-STA et K-STA.

B. Le profil phénotypique des CLK diffère de celui des tolérants foie (L-TOL)

Plusieurs études ont décrit une augmentation des fréquences de Treg, définis par les marquages $CD4^+CD25^{High}$, $CD4^+FOXP3^+$ ou $CD4^+CD25^+CD127^-FOXP3^+$, dans le sang périphérique

des L-TOL comparativement aux patients traités par une immunosuppression standard (46,59), ou à eux-mêmes avant sevrage en immunosuppresseurs (60). Dans ce travail, nous rapportons une fréquence égale de Treg entre nos trois groupes de patients qui demeure deux fois moindre que les fréquences rapportées précédemment chez les patients L-TOL (42). De même, nous rapportons des fréquences de lymphocytes $T\gamma\delta$ similaires entre CLK, L-STA et K-STA et inférieures aux 6% précédemment retrouvés pour les L-TOL par Martinez-Llordella *et al.* (42).

C. Le profil phénotypique des CLK diffère de celui des tolérants rein (K-TOL)

Une augmentation de fréquence des B totaux a été décrite chez les patients tolérants rein (K-TOL) par plusieurs équipes dont la notre (44,47,48,61). Selon ces études, cette augmentation des lymphocytes B était attribuable à une augmentation de la fréquence des B mémoires $CD19^+CD27^+$ (44,46), ou à une augmentation des cellules B naïves (définies comme $CD19^+CD27^-IgM^+IgD^+$) (47,48). Ce n'est pas le cas pour les patients CLK qui présentent une plus faible fréquence de B $CD19^+$ ou B mémoires $CD19^+CD27^+$ que celle rapportée dans les études sus-citées. Enfin, une augmentation de la fréquence des cellules NK $CD3^-CD56^+$ a été retrouvée chez les patients K-TOL dans une unique étude de Sagoo *et al.* (48) et ne semble pas présente chez nos patients CLK.

Pour résumer, l'influence de la greffe combinée rein-foie conduit à un phénotype sanguin mixte entre les patients ayant subi une greffe de rein ou de foie unique et principalement marqué par les fréquences intermédiaires de lymphocytes $CD8^+CD45RA^-CCR7^-$ EM, $CD4^+CD45RA^-CCR7^+$ CM et B mémoires *switchées* ainsi que par le phénotype fonctionnel NK intermédiaire. Il est par ailleurs intéressant de noter que les CLK présentent une augmentation de fréquence des lymphocytes B mémoires $CD19^+CD24^+CD38^{Low}$ comparativement aux patients greffés uniquement d'un foie et une augmentation de la proportion des cellules Treg $CD3^+CD4^+CD25^{High}CD127^{Low}FOXP3^+Helios^+$ comparativement aux patients greffés uniquement d'un rein sans pour autant atteindre les fréquences décrites précédemment lors de l'installation des phénomènes de tolérance.

III. Etude du profil de miARN associé avec la transplantation combinée rein-foie et comparaison avec les profils associés à la transplantation unique rein ou foie chez des patients sous immunosuppresseur ou tolérants

A. Les CLK expriment une signature miARNs combinée influencée par les deux greffons

Grace à la technologie TaqMan Low Density Array (TLDA), nous avons mesuré en qPCR le niveau d'expression de 754 miARN sur une première cohorte de 29 patients répartis en 3 groupes : 10 CLK, 9 K-STA et 10 L-STA. Au total, 542 miARNs étaient exprimés ($Cq < 35$) dans au moins la moitié des échantillons de chaque groupe. Parmi ces 542 miARN, aucun n'était spécifiquement exprimé dans le groupe CLK comparativement à la réunion des groupes L-STA et K-STA. L'utilisation de tests statistiques sans correction pour le multitesting (pour éviter les faux négatifs) a mis en évidence 35 et 8 miARN différentiellement exprimés entre le groupe CLK et K-STA et entre le groupe CLK et L-STA ($p < 0.05$) (Annexe 2). Pour se concentrer sur les différences biologiquement significatives nous avons sélectionné les 10 miARNs qui montraient un bon niveau d'expression ($Cq < 30$) et un facteur de variation (FC) de 2 ou plus. Nous les avons validés par une mesure d'expression individuelle en PCR TaqMan effectuée sur les mêmes échantillons. La différence d'expression a été confirmée pour 6 d'entre eux ($p < 0.05$) : miR-142-3p, miR-142-5p, miR-29, miR-545 avec une surexpression dans le groupe CLK vs. K-STA et miR-451a et miR-486-5p avec une sous-expression dans le groupe CLK vs. K-STA. Nous avons alors effectué une seconde étape de validation de ces 6 miARNs sur une seconde cohorte indépendante comprenant 58 patients répartis en 3 groupes : 20 CLK, 20 L-STA et 18 K-STA. Seuls 2 miARNs furent finalement validés : miR-451a qui était significativement surexprimé dans les groupes CLK et L-STA comparativement aux K-STA ($p < 0.001$) et miR-486-5p était significativement sous-exprimé dans le groupe K-STA comparativement aux L-STA ($p < 0.001$) (figure 10).

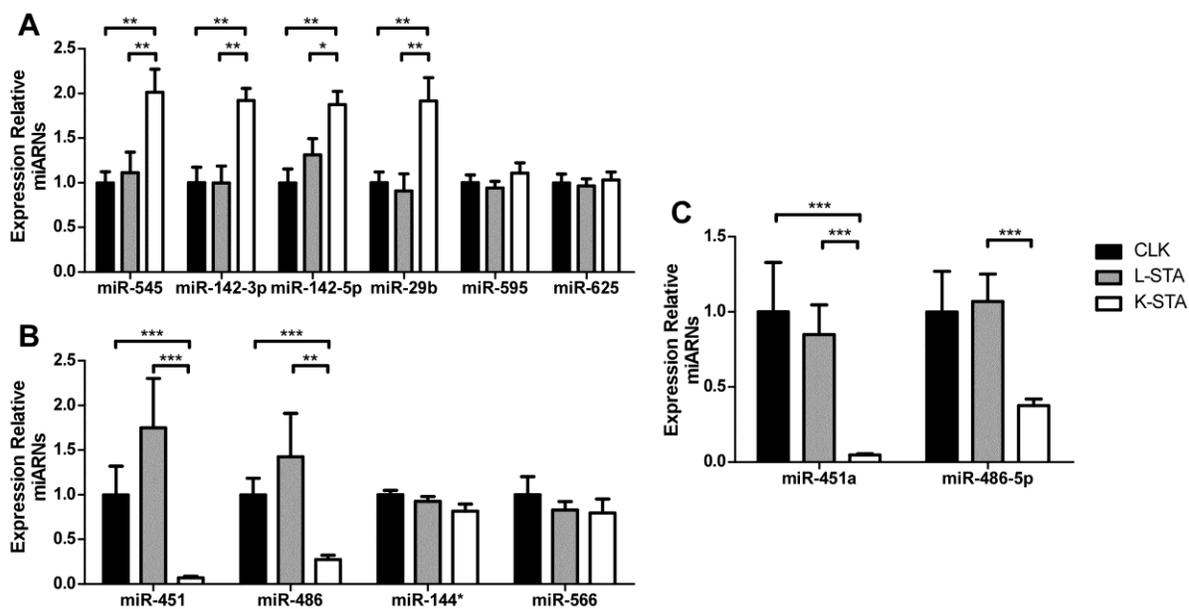


Figure 10 : Seul le miR-451a est différemment exprimé entre les CLK et les K-STA

Expression relative des miARNs sur (A) et sous-exprimés (B) : validation interne (A & B), validation externe (C).

Au final, parmi les 542 miARNs exprimés dans les CMSP nous n'avons pas retrouvé de miARN exprimé de manière significative différente entre les CLK et les L-STA et seul un unique miARN était différentiellement exprimé entre les CLK et les K-STA. Cela suggère de la part des CLK une expression combinée des profils de miARN associées avec les L-STA et les K-STA.

B. Les patients CLK n'expriment pas les profils de miARNs des patients L-TOL et K-TOL

Les niveaux d'expression des miARNs ont été mesurés sur une troisième cohorte indépendante comprenant 37 patients répartis en 4 groupes : 9 K-TOL, 10 K-STA, 9 L-TOL et 9 L-STA. Un total de 448 miARNs étaient correctement exprimés ($Cq < 35$) dans au moins la moitié des patients de chaque groupe. Parmi ces 448 miARNs, 5 et 8 miARNs étaient respectivement sous- et surexprimés ($p < 0.05$) dans le groupe K-TOL comparativement aux K-STA, 7 et 5 miARNs étaient respectivement sous- et surexprimés ($p < 0.05$) dans le groupe L-TOL comparativement aux L-STA (Annexe II). Seul le miR-513-3p était retrouvé dans les signatures de tolérance K-TOL et L-TOL, mais il était sous-exprimé chez les K-TOL et surexprimé chez les L-TOL, suggérant un effet opposé selon le type d'organe greffé. Une analyse en composante principale (ACP) basée sur l'expression des 13 miARNs différentiellement exprimés entre les groupes K-STA et K-TOL montre une séparation claire entre ces deux groupes alors que les L-STA et L-TOL apparaissent

superposés. De même, une ACP basée sur l'expression des 12 miARNs différemment exprimés entre L-STA et L-TOL montre une bonne séparation de ces 2 groupes et un net chevauchement des groupes K-STA et K-TOL. Tout ceci, montre que le profil d'expression des miARNs engagés dans les phénomènes de tolérance est spécifique selon la nature de l'organe transplanté (figure 11).

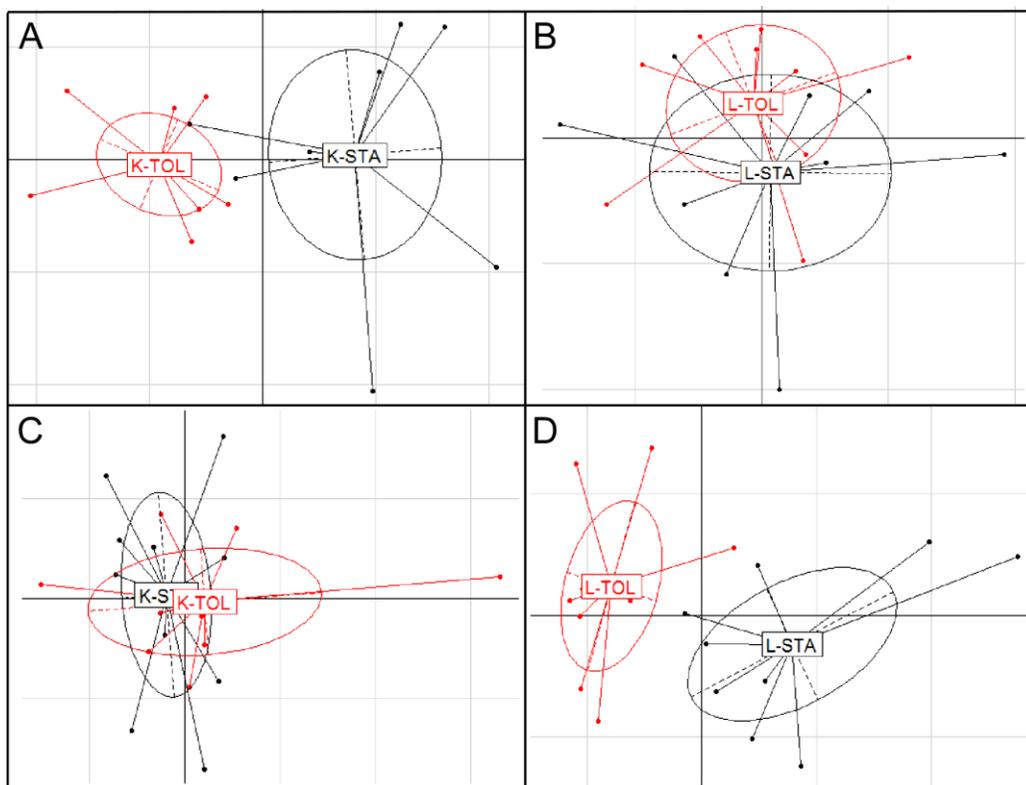


Figure 11 : ACP basée sur les profils miARNs de tolérance hépatique ou rénale

A) Une ACP basée sur les 13 miARNs différemment exprimés entre K-STA et K-TOL montre une séparation claire des deux groupes de patients transplantés rénaux tandis (B) que les L-STA et L-TOL sont superposés.

C) La même analyse basée sur les 12 miARNs différemment exprimés entre L-STA et L-TOL ne montre aucune séparation entre K-STA et K-TOL, alors que l'on retrouve une séparation nette entre les L-STA et les L-TOL (D).

Les graphs d'ACP représentent la première (axe des x) et la seconde (axe des y) composante de l'ACP

Dès lors, nous avons regardé si les CLK partageaient un des profils de tolérance hépatique ou rénale. Pour cela nous avons agrégé les deux jeux de données TLDA dans un jeu de donnée global finalement composé de 10 CLK, 19 L-STA, 19 K-STA, 9 L-TOL et 9 K-TOL. Pour ce faire nous avons utilisé l'algorithme Combat (62) qui permettait de corriger le bruit de fond et de normaliser l'expression des miARNs entre les deux jeux de données. Le chevauchement complet des miARNs et le regroupement des patients K-STA et L-STA sans a priori selon leur origine expérimentale a confirmé la validité de cette méthode (Annexe III). La fusion des deux expériences TLDA a cependant été à l'origine de la perte des certains miARNs exprimés uniquement dans l'un des deux jeux de données. C'est le cas de 4 miARNs associées avec la tolérance en greffe rénale : miR-508-3p, miR-654-5P, miR-513-3p, miR-509-3p et de 2 miARNs associées avec la tolérance hépatique : miR-513-3p and miR-652. Des ACP basées sur l'expression des 9 miARNs restant associés à la tolérance rénale ou sur les 10 miARNs restant associés à la tolérance hépatique ont montré respectivement que les CLK ne se regroupaient ni avec les K-TOL ni avec les K-STA et que le groupe des CLK était superposable à celui des L-STA et distant des L-TOL (figure 12). Ces résultats semblent indiquer que les CLK ne partagent pas les profils d'expression de miARN engagés dans les phénomènes de tolérance en cas de greffe hépatique ou rénale.

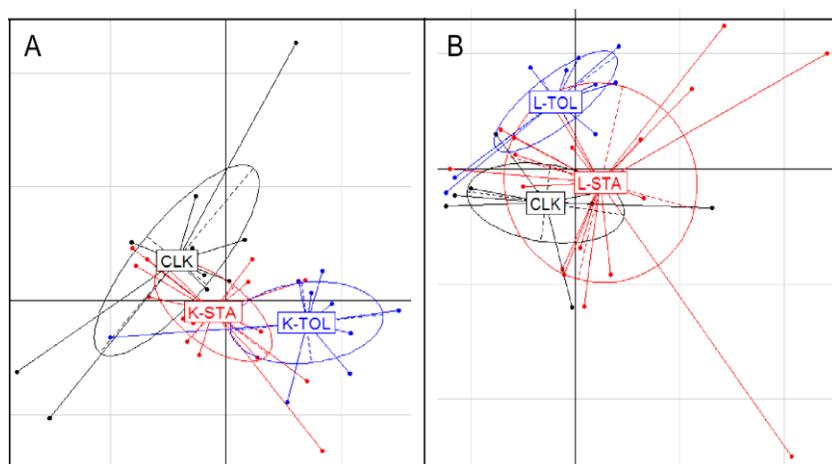


Figure 12 : ACP basée sur les profils de miARNs en tolérance hépatique ou rénale

A) ACP base sur le profil miARN lié à la tolérance rénale, les CLK ne se regroupent ni avec les K-STA ni avec les K-TOL (vraisemblance 46.7%).

B) ACP base sur le profil miARN lié à la tolérance hépatique, les CLK se regroupent préférentiellement avec les L-STA mais pas avec les L-TOL (vraisemblance 39.6%).

Sur ces graphes la première (axe x) et la seconde (axe y) composante de l'ACP sont représentées.

C. Les patients CLK, L-TOL et K-TOL mettent en jeu des réseaux de gènes différents

A l'aide de la banque de donnée miRDB (63) nous avons étudié les gènes cibles du miR-451a propre aux CLK et des 13 et 12 miARNs identifiés dans les profils des K-TOL et L-TOL. Nous avons restreint l'analyse aux gènes différentiellement exprimés dans le sang de ces patients retrouvés lors d'une étude de puce à ADN menée précédemment par notre équipe (Annexe IV) (46,59). Une analyse a été effectuée séparément sur les miARN sur- ou sous-exprimés des K-TOL ou des L-TOL. Parmi les gènes ciblés par les 5 miARNs surexprimés chez les K-TOL, 91 étaient régulés à la baisse ($p < 0.05$ et $\log_2FC < 0$) chez les K-TOL comparativement aux K-STA. Pareillement, parmi les gènes cibles prédis pour les 7 miARNs surexprimés chez les L-TOL, 57 étaient régulés à la baisse ($p < 0.05$ et $\log_2FC < 0$) chez les T-TOL comparativement aux L-STA. Aucun gène n'était commun entre les 91 et 57 gènes régulés à la baisse par les miARNs engagés dans la tolérance rénale ou hépatique. La même analyse a été menée sur les miARNs sous-exprimés chez les K-TOL et les L-TOL. Parmi les gènes cibles prédis des 8 miARN sous-exprimés chez les K-TOL, 126 gènes étaient régulés à la hausse ($p < 0.05$ et $\log_2FC < 0$) chez les K-TOL comparativement aux K-STA. De même, parmi les gènes cibles prédis pour les 5 miARNs sous-exprimés chez les L-TOL, 93 étaient régulés à la baisse ($p < 0.05$ et $\log_2FC < 0$) chez les L-TOL comparativement aux L-STA. La comparaison de ces 126 et 93 gènes cibles des profils miARN des K-TOL et L-TOL permet la mise en évidence de 4 gènes régulés à la hausse et communs aux mécanismes de la tolérance rénale et hépatique : KLHL28 (kelch-like 28), MTF1 (metal-regulatory transcription factor 1), PHF17 (PHD finger protein 17) et PHF20L1 (PHD finger protein 20-like 1). Enfin, selon les prédictions de la banque de donnée miRDB, aucune des cibles prédite pour le miR-451a, surexprimé dans la comparaison CLK vs. K-STA, n'a été retrouvée parmi les 91 gènes prédits pour être régulés à la baisse lors de la comparaison K-STA vs. K-TOL.

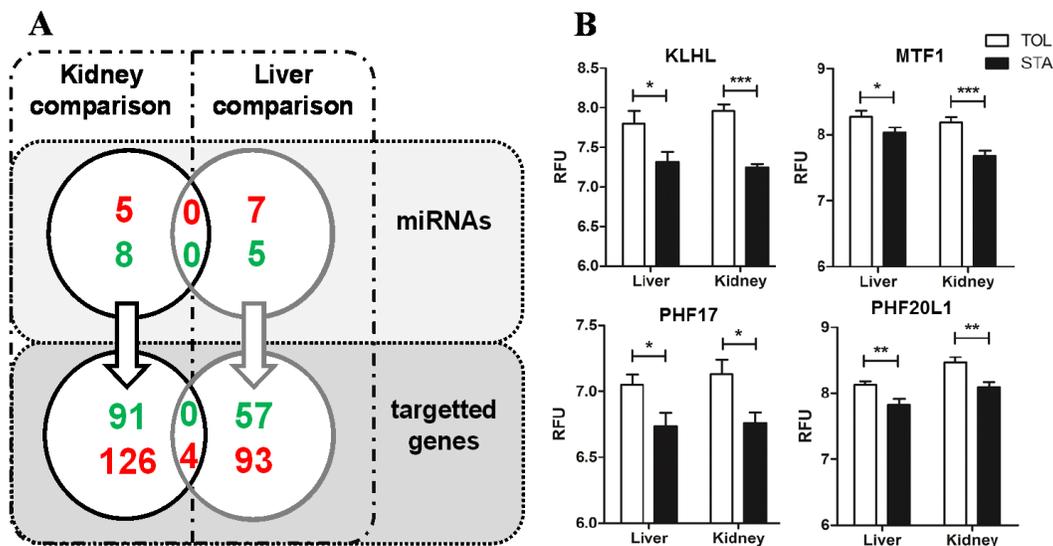


Figure 13 : Identification des cibles des miARNs différentiellement exprimés en tolérance rénale ou hépatique

A) Résumé des miARN et gènes sous-exprimés (vert) ou surexprimés (rouge) en tolérance hépatique ou rénale.

B) Niveau d'expression des gènes KLHL, MTF1, PHF17 and PHF20L1 chez les transplantés rein ou foie exprimé en Unité Relative de Fluorescence (RFU), données extraites de l'étude de Lozano *et al.* (59).

L'utilisation du logiciel Gominer software nous a permis d'aller plus loin et d'identifier les ontologies géniques (GO) dans l'optique de corrélérer les cibles régulées à la baisse ou à la hausse, par les miARNs, avec des fonctions biologiques spécifiques (64). Pour l'ensemble des 217 gènes retrouvés différentiellement exprimés entre les groupes K-TOL et K-STA, 3 catégories GO relatives à la régulation du cycle cellulaire et à l'oxydo-réduction ont été mises en évidence avec un taux de faux positif (FDR) inférieur à 0.05. La même analyse basée sur les 91 gènes cibles des 5 miARNs surexprimés dans la comparaison K-TOL vs. K-STA à rapporter 2 catégories GO en lien la compartimentalisation des protéines et la différenciation musculaire (FDR<0.05) (figure 14). Aucune catégorie GO n'était significativement enrichie parmi les 126 cibles des 8 miARNs sous-exprimés dans la comparaison K-TOL vs. L-STA. Par ailleurs, aucune catégorie GO n'était significativement représentée parmi les 150 gènes régulés à la hausse ou à la baisse et ciblés par les 12 miARNs en lien avec la tolérance hépatique.

Predicted targets with differential expression in renal tolerance					
GO number	GO category	Total genes	Changed genes	Enrichment	FDR
GO:0045840	positive regulation of mitosis	18	5	15.5	0.007
GO:0051785	positive regulation of nuclear division	18	5	15.5	0.007
GO:0051341	regulation of oxidoreductase activity	39	7	10.0	0.010

Predicted targets with over-expression in renal tolerance					
GO number	GO category	Total genes	Changed genes	Enrichment	FDR
GO:0045184	establishment of protein localization	735	16	2.7	0.032
GO:0042692	muscle cell differentiation	115	7	7.6	0.019

Figure 14 : Catégories GO significativement surreprésentées dans les gènes cibles des profils miARNs associés à la tolérance rénale ou hépatique

Seules les catégories GO enrichies avec un FDR<0.05 sont représentées.

Enfin, après la fonction, nous avons cherché à relier ces gènes cibles avec des populations cellulaires. Nous avons ainsi utilisé le *Hæmatology Expression Atlas*, qui contient les ensembles de gènes préférentiellement exprimés par les cellules sanguines, à la recherche d'un enrichissement cellulaire au sein de nos cibles géniques L-TOL ou K-TOL (65). Nous avons mis en évidence une augmentation des transcrits de lymphocytes B CD19⁺ au sein des cibles géniques de miARN en lien avec la tolérance rénale (enrichissement normalisé = 3.2; FDR<0.001) ainsi qu'une augmentation des transcrits de lymphocytes NK CD56⁺ au sein des cibles géniques de miARN en lien avec la tolérance hépatique (enrichissement normalisé = 3.1; FDR<0.001) (Figure 15). Ces résultats confortent les changements phénotypiques précédemment observés dans ces deux cohortes de patients (44,46).

Pour conclure ces données moléculaires montrent que les patients CLK sont caractérisés par un profil de miARNs spécifique et mettent en jeu un réseau de gènes non impliqué dans les mécanismes de tolérance opérationnel rénal ou hépatique

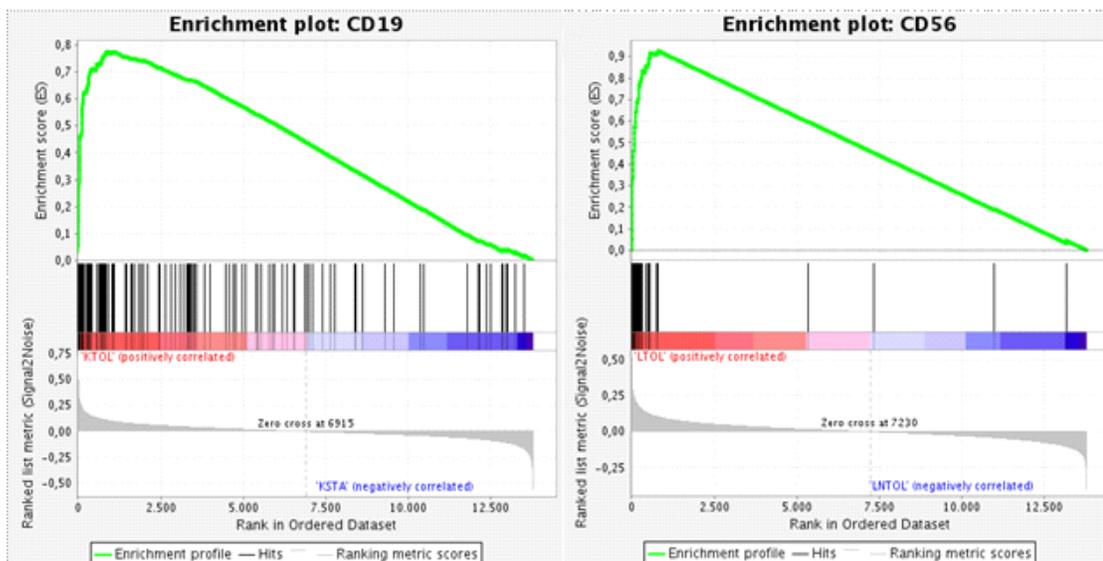


Figure 15 : Graphiques de la surreprésentation des transcrits géniques en lien avec les lignages cellulaires parmi les cibles prédites des profils miARNs liés à la tolérance rénale ou hépatique

On retrouve un enrichissement significatif en gènes de lymphocytes B CD19⁺ dans la tolérance rénale et en gènes de lymphocytes NK CD56⁺ dans la tolérance hépatique. La partie haute du graphique représente le score d'enrichissement pour les gènes sélectionnés. La partie intermédiaire montre comment se classent les gènes les uns par rapport aux autres dans la sélection en fonction du type cellulaire testé. La partie basse montre les valeurs de corrélation lié avec un phénotype donné (TOL ou STA).

Discussion

Le but de cette étude était d'analyser le phénotype et le profil miARN des patients ayant reçu une double greffe rein-foie en les comparant aux patients transplantés uniquement avec un foie ou un rein. Comme de nombreuses publications laissent entendre un rôle protecteur potentiel de ces doubles transplantations avec un effet bénéfique du premier greffon sur le second (25–27), nous avons comparé le profil des CLK avec celui des patients dit tolérants opérationnels dans le cas de greffe hépatique ou rénale.

Bien que, pour la majorité des marqueurs analysés, les CLK présentent un phénotype cellulaire sanguin intermédiaire entre les L-STA et K-STA, quelques différences peuvent être observées. En effet, les CLK et les K-STA ont deux fois plus de lymphocytes B mémoires $CD19^+CD24^+CD38^{Low}$ que les L-STA ($p < 0.05$). Dans notre travail, l'âge moyen des CLK était significativement plus élevé que celui des K-STA, ce qui aurait pu expliquer cette différence. Cependant nous n'avons retrouvé aucune corrélation significative entre âge et fréquence des sous-populations lymphocytaires B dans ces groupes. Bien qu'à ce stade de l'étude il soit encore trop tôt pour objectiver une meilleure survie de greffe chez nos patients CLK, il est intéressant de noter qu'une augmentation des lymphocytes B, et particulièrement des B mémoires, a été clairement associée avec les phénomènes de tolérance rénale (44,47,48). Celle-ci n'a pas été retrouvée chez les patients tolérants hépatiques (44,46), ce que nous confirmons dans notre étude. A contrario, cette augmentation de fréquence des lymphocytes B peut aussi être associée avec l'apparition d'anticorps associés au rejet humoral (AMR), cause majeure de perte du greffon dans la première année (66). De nombreuses études suggèrent un rôle du foie dans l'épuration des anticorps préformés lymphocytotoxiques, permettant la "négativation" de crossmatch connus positifs avant la greffe hépatique (28,29). Mjörnstedt *et al.* rapportent le cas d'une femme de 50 ans ayant un crossmatch positif persistant après plasmaphérèse avec un PRA > 70%. Dès la reperfusion portale le PRA était divisé par deux à 35% puis 26% après reperfusion artérielle. Le crossmatch était devenu totalement négatif dès le 14^{ème} jour suivant la greffe et aucun signe de rejet n'a été observé pendant la première année de suivi de cette greffe combinée. Cependant, ce phénomène n'est pas toujours décrit comme protecteur et n'exclut pas les effets délétères à long terme sur les greffons hépatiques ou rénaux (37,38). En effet, récemment O'Leary *et al.* ont rapporté que les anticorps anti-donneurs (DSA) ciblant le CMH de classe II, qu'ils soient

préformés ou *de novo* étaient associés à un risque significativement accru d'AMR rénal ($p = 0.006$), de rejet hépatique ($p = 0.002$), de mort du patient ($p = 0.02$), et de perte des allogreffons hépatiques ($p = 0.02$) et rénaux ($p = 0.045$) (67).

Cette augmentation des B mémoires est donc associée, selon les conditions inflammatoires du microenvironnement du greffon, aux phénomènes de rejet humoral ou de tolérance opérationnelle. Une prolongation de suivi incluant les critères diagnostiques classiques du rejet humoral chronique : histologie, suivi des DSA, pourrait aider à mieux définir le rôle des lymphocytes B dans notre population CLK.

En parallèle, nous avons retrouvé un déséquilibre des fréquences de Treg avec une augmentation des $CD4^+CD25^{\text{High}}CD127^{\text{Low}}FOXP3^+Helios^+$ et une baisse de leur contrepartie $CD4^+CD25^{\text{High}}CD127^{\text{Low}}FOXP3^+Helios^-$ dans les groupes CLK et L-STA. Les travaux de Himmel *et al.* ont montré que les clones de Treg $FOXP3^+Helios^-$ produisent, comparativement aux clones $FOXP3^+Helios^+$, significativement plus d'IFN- γ et de CCL3, une chimiokine inflammatoire qui active et attire les polynucléaires neutrophiles dans les organes solides (68). D'une part, nous pouvons penser que la faible fréquence des Treg $FOXP3^+Helios^-$ retrouvée dans nos groupes CLK et L-STA reflète une faible fréquence intra-greffon qui le protège de l'inflammation vasculaire responsable des phénomènes de rejets aigus et chroniques. D'autre part, les Tregs $FOXP3^+Helios^+$ ont été décrit comme exprimant dix fois plus de ARNm de TGF- β comparativement à la fraction $FOXP3^+Helios^-$ (69). L'augmentation des Treg $FOXP3^+Helios^+$ chez les CLK et les L-STA pourrait indiquer l'existence d'un mécanisme immuno-régulateur médié par le TGF- β similaire à celui rapporté pour les K-TOL dans les précédents travaux de notre équipe (54).

D'autres mécanismes ont été proposés comme associés aux phénomènes de tolérances comme le microchimérisme hématopoïétique. Cette hypothèse impliquerait la migration de *passenger leukocytes* vers les tissus lymphoïdes du receveur induisant localement une réponse hôte contre greffon menant à un état de tolérance immunologique spécifique du donneur (70,71). Cependant le groupe de A. Sanchez-Fueyo pour les L-TOL et le nôtre pour les K-TOL a clairement mis en évidence l'absence de microchimérisme sanguin chez ces patients (données non publiées), suggérant un processus transitoire ou non impliqué dans les mécanismes de

tolérance. Une étude du microchimérisme sanguin chez nos patients CLK pourrait définir leur statut quant à cette hypothèse.

Concernant l'expression des miARNs, les CLK n'expriment pas de profil propre. Parmi les quelques miARNs différentiels entre CLK vs. L-STA et CLK vs. K-STA, nous avons validé la surexpression d'un miARN, miR-451a, présente à la fois chez les CLK et les L-STA. Cette surexpression du miR-451a est associée à la régulation du Macrophage Inhibitor Factor (MIF) (72). De plus, le miR-451a participe au contrôle de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires dans les cellules dendritiques infectées par le virus *influenzae*. Il induit une réduction de synthèse de l'interleukine 6 (IL-6), du Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α), de l'Interféron bêta (IFN- β) et d'autres chemokines (73). La surexpression du miR-451a dans les CLK et les L-STA comparativement aux K-STA suggère un mécanisme par lequel la transplantation hépatique pourrait induire un contrôle des signaux pro-inflammatoires médiés par les cellules dendritiques ou les macrophages, deux populations cellulaires qui ont clairement été impliquées dans les phénomènes de rejet aigu et chronique (74–76). Nous n'avons pas retrouvé le miR-451a dans les profils de miARNs des L-TOL et K-TOL respectivement associés avec la tolérance hépatique ou rénale. Ceci a été confirmé par l'analyse en composante principale. Cependant comme plusieurs miARNs peuvent conduire à la régulation d'une même cible génique, nous avons analysé les cibles prédites pour ces miARNs. Là encore aucune des cibles prédites pour le miR-451a n'a été retrouvée parmi les cibles des profils miARN des L-TOL ou des K-TOL. Ces données, associées au fait qu'aucun profil transcriptionnel ou miARN (Lozano et al., 2011), ni aucun phénotype commun (Pallier et al., 2010) n'a pu être trouvée entre L-TOL et K-TOL, conforte l'idée que différents réseaux de gènes sont impliqués, en fonction de l'organe transplanté et du type de transplantation réalisée.

Parmi les 1101 et 1654 cibles géniques prédites identifiées respectivement chez les K-TOL et les L-TOL, seul 4 gènes étaient communs aux 2 groupes de patients: PHF17, PHF20L1, KLHL28 et MTF1. PHF17 et PHF20L1 sont deux *PHD finger proteins* et KLHL28 est un membre de la famille des *kelch like* protéines. A notre connaissance aucun de ces 4 gènes n'a encore été rapporté comme impliqué dans des processus immunologiques de rejet ou de tolérance. Cependant, il est à noter que le gène MTF1 code pour un facteur de transcription impliqué dans

l'homéostasie des métaux lourds (77). Or, Bohne *et al.* ont rapporté que les L-TOL étaient caractérisés par une expression intra-greffe augmentée des gènes impliqués dans la régulation métabolique du fer, même en amont d'un sevrage en immunosuppresseurs. Ceci se traduit par des ferritinémie et hépcidinémie augmentées, ainsi qu'une augmentation des dépôts de fer dans les hépatocytes des patients L-TOL (59). Le métabolisme du fer pourrait jouer un rôle crucial dans la régulation de la réponse alloimmune dans le greffon hépatique. Comme nous avons retrouvé une surexpression de MTF1 dans les patient L-TOL et K-TOL nous pouvons émettre l'hypothèse d'un rôle plus ubiquitaire du métabolisme du fer dans la mise en place des phénomènes immunologiques conduisant à l'état de tolérance opérationnel.

Enfin l'analyse d'un enrichissement en transcrits cellulaires à l'intérieur des différentes cibles prédites pour les miARNs impliqués dans les profils des K-TOL et L-TOL a montré une augmentation respective des transcrits en lien avec les lymphocytes CD19⁺ ou avec les lymphocytes CD56⁺. Ce résultat est en parfaite harmonie avec les profils phénotypiques et transcriptionnels décrits précédemment lors de l'étude de patients tolérants hépatiques ou rénaux (46) et confirme la cohérence de notre analyse *in silico* des cibles de miARN.

Un des biais de notre étude réside dans l'utilisation de tests statistiques non-paramétriques et non corrigés pour le multitesting. Nos résultats souffrent probablement d'un excès d'optimisme : fort taux de faux positifs. Pour cette raison, de futures validations seront requises pour déterminer quels miARNs sont réellement en lien avec les profils de L-TOL et de K-TOL comme nous avons pu faire pour les différences entre patients CLK, L-STA et K-STA. Par ailleurs, la prédiction de cibles géniques de miARN a été décriée car incluant un très fort taux de faux positifs (78). A la lumière de ceci, il faudra être prudent dans l'analyse des gènes non-validés et exposés dans cette étude. Cependant, en dépit d'un fort taux de faux positifs, aucun miARN et très peu de gènes ont été retrouvés commun à nos patients CLK, K-TOL et L-TOL. Ceci renforce l'idée que le bon devenir clinique de CLK, et les phénomènes de tolérance hépatique et rénale sont très probablement dirigés et maintenus par des mécanismes transcriptionnels différents. Pour aller plus loin dans notre étude, plusieurs pistes de travail s'offrent à nous. Tout d'abord, nous avons montré que les lymphocytes NK des CLK et L-STA présentaient un phénotype peu activé avec un niveau stable de NKG2A associé à une baisse d'expression de

NKp80 comparativement aux K-STA. Cette balance fonctionnelle orientée « inhibition » devra être confirmée par la réalisation d'un phénotypage plus exhaustif des récepteurs KAR et KIR présents à la surface des NK de nos 3 groupes de patients. Par ailleurs, grâce aux travaux menés dans les domaines de l'immunologie de la grossesse et des tumeurs, nous savons qu'une voie d'échappement des tissus à la cytotoxicité médiée par les NK passe par l'expression membranaire du HLA-G (79,80). Or, la surexpression des molécules HLA-G membranaires dans les épithéliums biliaires et des formes solubles du HLA-G (sHLA-G) dans le sérum des transplantés foie ou combiné rein-foie a été retrouvée significativement associée à une baisse du rejet de greffe (81–83). A défaut d'avoir accès à des biopsies de greffon, le dosage par ELISA du sHLA-G dans le plasma de nos patients permettrait de confirmer une surexpression du sHLA-G chez les CLK et les L-STA. De plus, l'existence d'une corrélation entre expression du sHLA-G et phénotype membranaire des NK pourrait être recherchée. Concernant les autres populations cellulaires à étudier, les patients L-TOL ont montré une surexpression du HLA-G à la surface de leurs cellules dendritiques myéloïdes (mDC) (84) et nous avons, de notre côté, retrouvé une augmentation miR-451a chez les CLK et les L-TOL. Ce miARN semble impliqué dans le contrôle des signaux pro-inflammatoires médiées par les cellules dendritiques (73). Ces deux indices incitent à une étude plus approfondie des sous populations de cellules dendritiques chez nos patients et à tester *in vitro* l'influence d'une modulation du miR-451a via les techniques de transfection plasmidique ou de siARN.

En conclusion, les patients ayant subis une double greffe rein-foie présentent un phénotype sanguin suggérant une influence mixte provenant des greffons hépatique et rénaux. En ce qui concerne l'expression des miARN, les CLK ne possèdent pas de profil propre et semble plus distant des K-STA que des L-STA. Sur la base de nos observations phénotypiques et moléculaires les phénomènes de tolérances hépatiques et rénales semblent distincts et différer des régulations mises en jeu chez les patients CLK. Ceci renforce l'idée d'une régulation différente selon la nature de la greffe. Un suivi dans le temps de notre cohorte de CLK permettra l'observation des fréquences de survenue des phénomènes de rejet, d'apparition de DSA ou de la transplantation combinée et la comparaison à ce que nous savons des patients simples transplantés.

Matériels et méthodes

I. Population étudiée

130 patients ont été inclus dans cette étude, réunis en 4 cohortes distinctes. Les comités d'éthique locaux ont approuvés tous les aspects de cette étude et tous les patients ont donné un consentement éclairé écrit. Tous les détails cliniques sont joints à l'annexe I. Les critères majeurs d'appartenance à un groupe clinique étaient les suivants :

1) K-TOL (n=9) : patients présentant un greffon rénal fonctionnel (créatininémie <150 μ mol/L et protéinurie <1g/24h) en l'absence de tout traitement immunosuppresseur depuis au moins 1 an. L'arrêt des immunosuppresseurs était dû à l'absence de compliance (n=7), un désordre lymphoprolifératif post-transplantation (n=1) ou une toxicité des inhibiteurs de calcineurine (n=1).

2) K-STA (n=38) : patients présentant un greffon rénal fonctionnel depuis au moins 3 ans (protéinurie <1g/24h, créatininémie stable avec des variations inférieures à 25%) sous protocole immunosuppresseur standard.

3) L-TOL (n=9) : patients présentant un greffon hépatique fonctionnel intentionnellement sevrés de tout immunosuppresseur depuis au minimum 1 an.

4) L-STA (n=44) : patients présentant un greffon hépatique fonctionnel depuis au moins 3 ans sous protocole immunosuppresseur standard. Tous les receveurs de foie étudiés ici indemne de carcinome hépatocellulaire.

5) CLK (n=30) : patients présentant un double greffe rein-foie simultanée provenant d'un donneur cadavérique depuis au moins 1 an et demi sous protocole immunosuppresseur standard. Tous les patients doubles greffés étaient indemnes de carcinome hépatocellulaire.

II. Préparation des échantillons sanguins

Les échantillons de sang ont été collectés sur tube EDTA et préparés pour analyse dans les 4 heures suivant le prélèvement. Les cellules mononucléées sanguines ont été recueillies selon un gradient de densité de type Ficoll (Eurobio, Les Ulis, France), congelées en TRIzol® (Invitrogen, CergyPontoise, France) à -80°C ou congelées en azote liquide dans une solution de DMSO et sérum de veaux fœtal à 10% (Sigma Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France). L'ARN a été extrait des cellules sanguines périphériques selon la méthode TRIzol® (Invitrogen,

CergyPontoise, France). La quantité et la qualité des ARNs utilisés ont été vérifiées grâce à l'Agilent 2100 BioAnalyzer (Palo Alto, CA, USA) et au Nanodrop (Labtech, Palaiseau, France).

III. Immunophénotypage des éléments mononucléés du sang périphérique

La cytométrie en flux a été réalisée sur les cellules mononucléaires sanguines congelées en utilisant 5 combinaisons d'anticorps monoclonaux (mAb) sur un BD LSRII (BD Biosciences, Pont de Claix, France). Ces données brutes ont été analysées à l'aide du logiciel FlowJo (TriStar Inc, Ashland, OR, USA). Les lymphocytes T ont été marqués avec les monoclonaux suivants : VioBlue anti-CD3 mAb (clone BW264/56/IgG2a/Miltenyi), FITC anti-CD4 (clone VIT4, Miltenyi Biotech, Paris, France), VioGreen anti-CD8 mAb (clone BW135/80, Miltenyi Biotech), APC-Vio770 anti-CD45RA mAb (clone T6D11, Miltenyi Biotech), BV605 anti-CD27 mAb (clone L128, BD Biosciences), PE-CF594 anti-CD28 (clone CD28.2, BD Biosciences) and PE-Cy7 anti-CD197 (clone 3D12, BD Biosciences). L'analyse de ces lymphocytes T reposait sur une dichotomie CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ puis sur la recherche de leurs sous-populations mémoires selon la classification : naïves (CD45RA⁺CCR7⁺), mémoires centrales (CM) (CD45RA⁻CCR7⁺), effecteurs mémoires (EM) (CD45RA⁻CCR7⁻) et effecteurs différenciés terminaux (TEMRA) (CD45RA⁺CCR7⁻). Les lymphocytes régulateurs ont été définis par le marquage CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁻ en utilisant les monoclonaux : BV605 anti-CD3 (clone OKT3, BioLegend, London, UK), APC-Cy7 anti-CD4 (clone OKT4, BioLegend), BV421 anti-CD25 (clone BC96, BioLegend), AlexaFluor647 anti-CD127 (clone A019D5, BioLegend). Les Treg mémoires étaient marquées par le PE-Cy7 anti-CD196 (clone G043H7, BioLegend) et le VioGreen anti-CD45RA (clone T6D11, Miltenyi). Les marquages intracellulaires ont été réalisés à l'aide du kit de perméabilisation/lavage de BD Biosciences et des monoclonaux : PerCP-Cy5.5 anti-FOXP3 (clone PCH101, eBioscience) et AlexaFluor488 anti-Hélios (clone 22F6, BioLegend). Les lymphocytes rares NKT et T γ δ ont été détectés à l'aide des monoclonaux VioGreen anti-CD3 (BW264/56/IgG2a/Miltenyi), PE anti-iNKT (6B11/IgG1/Miltenyi) et FITC anti-TCR-V δ 2 (123R3/IgG1/Miltenyi). Pour les lymphocytes NK le marquage comprenait les monoclonaux FITC anti-CD3 (BW264/56/IgG2a/Miltenyi), PE-Vio770 anti-CD56 (AF12-7H3/IgG1/Miltenyi), VioGreen anti-CD16 (VEP13/IgM/Miltenyi), APC anti-NKp80 (4A4.D10/IgG1/Miltenyi) et PE anti-NKG2A (131411/IgG2a/R&D systems). Les NK étaient repérés comme étant CD3⁻CD56⁺ puis séparés entre NK sécrétoires CD3⁻CD56^{Bright}CD16^{+/-} et NK

cytotoxiques CD3⁻CD56^{Dim}CD16^{High}. L'expression extracellulaire de NKp80 et NKG2A a été approximé par l'étude des MFI correspondantes. Enfin, les lymphocytes B ont été analysés selon la classification CD38/CD24 décrite par Mauri *et al.* (85,86) grâce aux monoclonaux APC-Vio770 anti-CD19 (LT19/IgG1/Miltenyi), PE-CF594 anti-CD24 (ML5/IgG2a/BD Biosciences), BV421 anti-CD38 (HIT2/IgG1, BD Biosciences), BV605 anti-CD27 (L128/IgG1/BD Biosciences), FITC anti-IgM (G20-127/IgG1/BD Biosciences) et PE anti-IgD (IA6-2/IgG2a/BD Biosciences).

IV. Méthodes de biologie moléculaire

A. Profilage des signatures d'expression des miARNs

Le profilage des miARNs a été effectué par l'utilisation des cartes TaqMan Low Density Arrays (TLDA) pool A v2.1 et pool B v3.0 pour la cohorte 1 et pool A v2.0 et pool B v2.0 pour la cohorte 3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Une étape de pré-amplification des ARNs a été effectuée dans les deux expériences (87). Les analyses ont été réalisées indépendamment sur les deux cohortes. En bref, 100ng d'ARN total pour la première cohorte et 200ng pour la seconde cohorte ont été rétrotranscrits à l'aide des primers Megaplex stem-loop des pools A ou B et pré-amplifiés par 12 cycles de réaction de PCR utilisant les primers MegaplexPreAmp des pools A ou B. La PCR quantitative a été réalisé sur le ViiA7 pour la première cohorte et sur l'ABI Prism 7900 HT pour la seconde cohorte (Applied Biosystems). Pour toutes les analyses les miARNs devaient avoir un cycle de quantification (Cq) inférieur à 35 cycles dans plus de la moitié des échantillons de chaque groupe pour être analysés. Pour tous les échantillons la normalisation a été effectuée par soustraction du Cq moyen à l'ARN mesuré (88).

B. Mesures individuelle de l'expression des miARNs

La mesure individuelle de l'expression des miARN a été effectuée selon le protocole de mesure TaqMan miARN (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en utilisant les sondes : miR-545 (assay ID: 002267), hsa-miR-142-3p (assay ID: 000464), hsa-miR-142-5p (assay ID: 002248), miR-29b (assay ID: 000413), miR-595 (assay ID: 0001987), miR-625-3p (assay ID: 002432), miR-451a (assay ID: 001141), miR-486-5p (assay ID: 001278), miR-144* (assay ID: 002148), miR-566 (assay ID: 001533) et mmu-miR-374b-5p (assay ID: 001319) avec 10ng d'ARN total, sur le ViiA7 (Applied Biosystems). Le miARN mmu-miR-374b-5p a été choisi comme contrôle interne

d'expression des cellules mononucléaires sanguines périphériques car il avait la plus faible variance et était bien exprimé ($Cq_{\text{moyen}}=19,35\pm 0,68$) dans l'ensemble des échantillons testé sur les TLDA. L'expression relative entre un échantillon et une référence a été calculé selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (PE Applied Biosystems 1997).

C. Analyse de l'expression génique des puces à ADN

Les données d'expression de gènes correspondent à 27317 sondes traitées dans une analyse précédente (59). Ces données représentent l'expression de 12 K-TOL, 12 K-STA, 12 L-TOL et 12 L-STA sur de puces de type Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Les sondes possédant un t de Student inférieur à 0,05 lors des comparaisons K-TOL vs. K-STA ou L-TOL vs. L-STA ont été sélectionnées. Selon la méthode décrite par Lozano *et al.*, nous avons utilisé les transcrits de lignée cellulaire sanguins identifiés dans le *Haematology Expression Atlas* pour générer des ensembles de gènes préférentiellement exprimés dans les cellules sanguines périphériques : lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, lymphocytes B CD19⁺, lymphocytes NK CD56⁺ et monocytes CD14⁺ (59,65). L'utilisation du logiciel GSEA nous a ainsi permis de rechercher à travers les gènes sélectionnés un enrichissement spécifique des différents lignages sanguins avec un taux de fausse découverte (FDR) inférieur à 5%. Afin d'évaluer la signification biologique des gènes sélectionnés, le logiciel GOMiner a été utilisé pour identifier les catégories de GO surreprésentées en fonction de la liste de gènes identifiés par rapport à tous les autres gènes exprimés dans la puce (64). Seules les catégories d'ontogénie génique impliquant au moins 5 gènes ont été sélectionnées.

V. Analyses statistiques

Les différences d'expression des miARNs ont été identifiées à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney. Les p-values n'ont volontairement pas été corrigées pour les tests itératifs pour limiter l'impact des faux négatifs. Il en résulte la présence de faux positifs due à des résultats trop optimistes nécessitant une étape de validation externe pour confirmer l'existence d'une véritable différence d'expression. Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc a été utilisé lors de la comparaison de plus de 2 groupes. Les corrélations ont été évaluées par la méthode de Spearman. Pour les données suivants un loi

normale, les différences de moyennes entre les groupes ont été étudiées par le test HSD de Tukey à la suite d'une ANOVA. Tous les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel R v2.14 (89). Les analyses en composante principal (ACP) ont été réalisées à l'aide du *package* ade4 (90). Les illustrations ont été réalisées à l'aide du logiciel The GraphPad Prism v.5 (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA) et les différences significatives ont été reportées selon : * lorsque $p < 0.05$, ** lorsque $p < 0.01$ et *** lorsque $p < 0.001$.

Annexes

Groupe	Etude miRNA	Centre	Age Receveur (année)	Sexe Receveur	Maladie initiale	Rejet aigu	Cancer	Episode viral	Temps greffe (mois)	Créatinémie (μmol/L)	Proteinurie (g/24h)	ASAT (UI)	ALAT (UI)	Donneur	Sexe Donneur	Age Donneur	Traitement	
CLK	CLK 1.1	San Francisco	47	F	Stockage du Glycogène	NA	NA	NA	59	141	NA	26	27	NLD	F	36	Inh-mTor+MPA	
	CLK 1.2	San Francisco	61	F	Polykystose	NA	NA	NA	82	110	NA	18	10	NLD	M	36	FK+MPA	
	CLK 1.3	San Francisco	65	F	Cirrhose cryptogénique	NA	NA	NA	83	96	NA	16	18	NLD	F	57	FK+MPA+CS	
	CLK 1.4	San Francisco	58	F	Hépatopathie alcoolique	NA	NA	NA	64	150	NA	53	54	NLD	M	55	FK+MPA+CS	
	CLK 1.5	San Francisco	57	F	NASH	NA	NA	NA	53	132	NA	35	62	NLD	F	53	FK+MPA+CS	
	CLK 1.6	San Francisco	68	M	Cirrhose biliaire primitive	NA	NA	NA	61	88	NA	47	79	NLD	F	17	FK+MPA+CS	
	CLK 1.7	San Francisco	61	M	Hépatite C	NA	NA	NA	81	118	NA	65	109	NLD	F	23	FK+MPA+CS	
	CLK 1.8	San Francisco	58	M	Hépatite C	NA	NA	NA	80	118	NA	155	172	NLD	F	17	MPA+CS+CSA	
	CLK 1.9	San Francisco	60	M	Hépatopathie alcoolique	NA	NA	NA	54	163	NA	16	18	NLD	F	40	FK+MPA+CS	
	CLK 1.10	San Francisco	71	M	Cirrhose cryptogénique	NA	NA	NA	75	121	NA	18	16	NLD	F	63	FK+MPA	
	CLK 2.1	Rennes	62	F	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	CLK 2.2	Rennes	72	M	NA	NA	NA	NA	NA	72	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	CLK 2.3	Rennes	60	M	Hépatopathie alcoolique Néphropathie à IgA	0	0	0	15	167	NA	16	20	NLD	M	22	FK+MPA+CS	
CLK 2.4	Rennes	67	M	NA	NA	NA	NA	132	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
CLK 2.5	Rennes	50	M	NA	NA	NA	NA	49	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
L-STA	L-STA 1.1	San Francisco	62	M	Cholangite Sclérosante Primitive	NA	NA	NA	48	103	NA	16	14	NLD	M	50	FK+MPA	
	L-STA 1.2	San Francisco	48	M	Hépatite C	NA	NA	NA	57	109	NA	30	17	NLD	M	28	FK+MPA	
	L-STA 1.3	San Francisco	59	M	Hépatite C	NA	NA	NA	57	118	NA	21	17	NLD	M	28	MPA+CS	
	L-STA 1.4	San Francisco	47	F	Hépatite fulminante	NA	NA	NA	48	43	NA	12	8	NLD	M	44	FK+MPA	
	L-STA 1.5	San Francisco	56	F	NASH	NA	NA	NA	54	98	NA	17	33	NLD	M	17	FK+MPA+CS	
	L-STA 1.6	San Francisco	65	M	Hépatopathie alcoolique	NA	NA	NA	35	132	NA	127	88	NLD	M	78	FK+MPA	
	L-STA 1.7	San Francisco	58	F	Hépatite fulminante	NA	NA	NA	66	123	NA	28	15	NLD	M	65	FK+CS	
	L-STA 1.8	San Francisco	56	M	Hépatopathie alcoolique	NA	NA	NA	60	99	NA	11	9	NLD	M	51	FK+MPA	
	L-STA 1.9	San Francisco	61	F	NASH	NA	NA	NA	62	109	NA	38	58	NLD	M	30	FK+MPA	
	L-STA 1.10	San Francisco	45	F	Sarcidose	NA	NA	NA	45	98	NA	17	16	NLD	F	20	FK+MPA+CS	
		San Francisco	45	F	Hépatite fulminante	NA	NA	NA	49	55	NA	31	39	NLD	F	53	FK+MPA	
		San Francisco	69	M	Hépatite B	NA	NA	NA	80	106	NA	34	35	NLD	NA	49	MPA+CS	
		San Francisco	46	M	Hépatite C	NA	NA	NA	152	99	NA	46	94	NLD	F	NA	CS+CSA	
	San Francisco	58	F	Hépatopathie alcoolique	NA	NA	NA	43	156	NA	10	<36	LD	M	NA	MPA		
	San Francisco	59	F	Hépatite fulminante	NA	NA	NA	34	98	NA	37	61	NLD	M	18	MPA+FK+CS		
K-STA	K-STA 1.1	Nantes	67	F	Polykystose	0	Basocellulaire	0	79	127	0.06	20	16	NLD	M	50	Inh-mTor+CSA	
	K-STA 1.2	Nantes	65	F	Polykystose	0	0	0	73	121	0.09	16	21	NLD	F	69	FK+Inh-mTor+CS	
	K-STA 1.3	Nantes	56	F	Néphropathie à IgA	0	0	0	62	133	0.14	18	11	NLD	F	38	CSA+Inh-mTor	
	K-STA 1.4	Nantes	67	M	Néphropathie diabétique	0	0	0	77	107	0.07	18	20	NLD	M	48	Inh-mTor+CSA	
	K-STA 1.8	Nantes	58	M	Glomérulonéphrite	0	Spino-cellulaire	0	79	123	0.1	22	28	NLD	M	42	CSA	
	K-STA 2.1	Nantes	32	M	Polykystose	0	0	0	78	170	0.3	16	16	NLD	M	38	FK+Inh-mTor	
	K-STA 2.2	Nantes	40	F	IRC ND	0	0	0	67	100	0.02	14	9	NLD	M	26	Inh-mTor+FK	
	K-STA 2.3	Nantes	54	M	Néphro-angiosclérose	0	K Prostatique Basocellulaires	NA	61	131	0.16	13	20	NLD	M	58	FK+Inh-mTor	
	K-STA 2.4	Nantes	37	M	Néphropathie lupique	0	K rénal	0	119	150	0.4	19	17	NLD	M	29	CSA+AZA+CS	
	K-STA 2.5	Nantes	40	M	Glomérulosclérose segmentaire et focale	0	0	CMV	131	162	0.15	23	22	NLD	F	36	CSA+AZA	
	K-STA 2.6	Nantes	56	M	Polykystose	0	K épidermoïde	0	63	126	0.12	19	19	NLD	M	53	FK+Inh-mTor	
	K-STA 2.7	Nantes	56	M	Néphropathie à IgA	0	0	0	62	150	0.36	19	14	NLD	F	46	FK+Inh-mTor	
	K-STA 2.8	Nantes	22	M	Syndrome d'Alport	0	0	0	63	113	0.21	32	42	NLD	M	20	FK+CS	
K-STA 2.9	Nantes	35	F	Malformation rénale	0	0	0	63	87	0.06	NA	NA	NLD	M	19	FK-AZA		
	Nantes	49	F	Polykystose	0	0	0	61	93	0.12	NA	64	NLD	F	46	Inh-mTor+FK		

Cohorte	Groupe	Etude miRNA	Centre	Age Receveur (année)	Sexe Receveur	Maladie initiale	Rejet aigu	Cancer	Episode viral	Temps greffe (mois)	Créatinémie (μmol/L)	Proteinurie (g/24h)	ASAT (UJ)	ALAT (UJ)	Donneur	Sexe Donneur	Age Donneur	Traitement
Cohorte 1	CLK	CLK 1.1	San Francisco	47	F	Stockage du Glycogène	NA	NA	NA	59	141	NA	26	27	NLD	F	36	Inh-mTor+MPA
		CLK 1.2	San Francisco	61	F	Polykystose	NA	NA	NA	82	110	NA	18	10	NLD	M	36	FK+MPA
		CLK 1.3	San Francisco	65	F	Cirrhose cryptogénique	NA	NA	NA	83	96	NA	16	18	NLD	F	57	FK+MPA+CS
		CLK 1.4	San Francisco	58	F	Hépatopathie alcoolique	NA	NA	NA	64	150	NA	53	54	NLD	M	55	FK+MPA+CS
		CLK 1.5	San Francisco	57	F	NASH	NA	NA	NA	53	132	NA	35	62	NLD	F	53	FK+MPA+CS
		CLK 1.6	San Francisco	68	M	Cirrhose biliaire primitive	NA	NA	NA	61	88	NA	47	79	NLD	F	17	FK+MPA+CS
		CLK 1.7	San Francisco	61	M	Hépatite C	NA	NA	NA	81	118	NA	65	109	NLD	F	23	FK+MPA+CS
		CLK 1.8	San Francisco	58	M	Hépatite C	NA	NA	NA	80	118	NA	155	172	NLD	F	17	MPA+CS+CSA
		CLK 1.9	San Francisco	60	M	Hépatopathie alcoolique	NA	NA	NA	54	163	NA	16	18	NLD	F	40	FK+MPA+CS
		CLK 1.10	San Francisco	71	M	Cirrhose cryptogénique	NA	NA	NA	75	121	NA	18	16	NLD	F	63	FK+MPA
	L-STA	L-STA 1.1	San Francisco	62	M	Cholangite Sclérosante Primitive	NA	NA	NA	48	103	NA	16	14	NLD	M	50	FK+MPA
		L-STA 1.2	San Francisco	48	M	Hépatite C	NA	NA	NA	57	109	NA	30	17	NLD	M	28	FK+MPA
		L-STA 1.3	San Francisco	59	M	Hépatite C	NA	NA	NA	57	118	NA	21	17	NLD	M	28	MPA+CS
		L-STA 1.4	San Francisco	47	F	Hépatite fulminante	NA	NA	NA	48	43	NA	12	8	NLD	M	44	FK+MPA
		L-STA 1.5	San Francisco	56	F	NASH	NA	NA	NA	54	98	NA	17	33	NLD	M	17	FK+MPA+CS
		L-STA 1.6	San Francisco	65	M	Hépatopathie alcoolique	NA	NA	NA	35	132	NA	127	88	NLD	M	78	FK+MPA
		L-STA 1.7	San Francisco	58	F	Hépatite fulminante	NA	NA	NA	66	123	NA	28	15	NLD	M	65	FK+CS
		L-STA 1.8	San Francisco	56	M	Hépatopathie alcoolique	NA	NA	NA	60	99	NA	11	9	NLD	M	51	FK+MPA
		L-STA 1.9	San Francisco	61	F	NASH	NA	NA	NA	62	109	NA	38	58	NLD	M	30	FK+MPA
		L-STA 1.10	San Francisco	45	F	Sarcoïdose	NA	NA	NA	45	98	NA	17	16	NLD	F	20	Inh-mTor+FK+MPA+CS
	K-STA	K-STA 1.1	Nantes	67	F	Polykystose	0	Basocellulaire	0	79	127	0	20	16	NLD	M	50	Inh-mTor+CSA
		K-STA 1.2	Nantes	65	F	Polykystose	0	0	0	73	121	0	16	21	NLD	F	69	FK+Inh-mTor+CS
		K-STA 1.3	Nantes	56	F	Néphropathie à IgA	0	0	0	62	133	0	18	11	NLD	F	38	CSA+Inh-mTor
		K-STA 1.4	Nantes	67	M	Néphropathie diabétique	0	0	0	77	107	0	18	20	NLD	M	48	Inh-mTor+CSA
		K-STA 1.5	Nantes	57	F	Polykystose	0	Seïn	0	59	76	0	19	13	NLD	M	45	FK+Inh-mTor
		K-STA 1.6	Nantes	64	M	Polykystose	0	0	CMV	64	180	0	16	14	NLD	M	67	FK+Inh-mTor
		K-STA 1.7	Nantes	59	M	Néphro-angiosclérose	0	K cutané	CMV	81	183	0	20	16	NLD	M	64	FK
		K-STA 1.8	Nantes	58	M	Glomérulonéphrite	0	Spinocellulaire	0	79	123	0	22	28	NLD	M	42	CSA
		K-STA 1.9	Nantes	56	M	Néphropathie à IgA	0	0	0	62	150	0	19	14	NLD	F	46	FK+Inh-mTor

Cohorte	Groupe	Etude miRNA	Centre	Age Receveur (année)	Sexe Receveur	Maladie initiale	Rejet aigu	Cancer	Episode viral	Temps greffe (mois)	Créatinémie (µmol/L)	Proteinurie (g/24h)	ASAT (UJ)	ALAT (UJ)	Donneur	Sexe Donneur	Age Donneur	Traitement		
Cohorte 2	CLK	CLK 2.1	Rennes	62	F	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	NA	NA	NA	
		CLK 2.2	Rennes	72	M	Polykystose	NA	K cutané	NA	72	73	0	18	14	NLD	NA	NA	NA	FK	
		CLK 2.3	Rennes	60	M	Hépatopathie alcoolique Néphropathie à IgA	0	0	0	15	167	NA	16	21	NLD	M	22		FK+MPA+CS	
		CLK 2.4	Rennes	67	M	Hépatopathie alcoolique	NA	NA	NA	144	98	NA	28	28	NLD	NA	NA	NA	FK	
		CLK 2.5	Rennes	50	M	Hyperoxalurie	1 (02/13)	NA	NA	1	49	285	NA	31	22	NLD	NA	NA	NA	FK+MPA
		CLK 2.6	Rennes	51	F	NA	NA	NA	NA	108	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	NA	NA	NA	NA
		CLK 2.7	Rennes	55	F	Cirrhose biliaire primitive Cirrhosis	1 (02/13)	K cutané	NA	42	333	2	20	27	NLD	NA	NA	NA	CS+CSA	
		CLK 2.8	Rennes	55	M	Glomérulonéphrite rapidement progressive	1 (03/11)	0	0	0	37	105	NA	30	37	NLD	M	22		FK+CS
		CLK 2.9	Rennes	56	F	Polykystose	NA	NA	1	18	114	NA	13	8	NLD	NA	NA	NA	FK+MPA	
		CLK 2.10	Rennes	61	M	Hépatopathie alcoolique Néphropathie à IgA	NA	NA	NA	152	119	NA	101	185	NLD	NA	NA	NA	FK	
		CLK 2.11	Barcelone	51	M	Hépatopathie alcoolique Néphropathie à IgA	1	0	0	67	NA	NA	NA	NA	NLD	M	50		Inh-mTor	
		CLK 2.12	Barcelone	34	F	Hyperoxalurie	1	0	0	50	NA	NA	NA	NA	NLD	F	45		FK+MPA+CS	
		CLK 2.13	Barcelone	49	F	Polykystose	0	0	0	43	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	53		FK+MPA	
		CLK 2.14	Barcelone	41	F	Hépatite C Malformation rénale	0	0	0	52	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	NA	NA	NA	NA
		CLK 2.15	Barcelone	62	M	Hépatopathie alcoolique Néphropathie à IgA	0	0	0	42	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	67		FK	
		CLK 2.16	Barcelone	44	F	Polykystose	0	0	0	18	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	60		FK+MPA	
		CLK 2.17	Barcelone	46	F	Hépatopathie alcoolique Glomérulonéphrite mésangiale	0	0	0	18	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	42		FK+MPA	
		CLK 2.18	Barcelone	48	F	Polykystose	0	0	0	100	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	NA	NA	CSA	
		CLK 2.19	Barcelone	64	M	Hépatopathie alcoolique Glomérulosclérose segmentaire et focale	0	0	0	83	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	NA	NA	CSA	
		CLK 2.20	Barcelone	42	M	Cholangite Sclérosante Primitive	0	0	CMV	120	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	NA	NA	CSA	
	L-STA 2.1	Barcelone	61	F	Hépatopathie alcoolique	1	NA	CMV	84	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	NA	NA	FK+MPA		
	L-STA 2.2	Barcelone	71	M	Hépatopathie alcoolique	0	NA	0	75	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	63		FK		
	L-STA 2.3	Barcelone	49	M	Hépatite C	1	NA	0	52	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	38		FK + CS		
	L-STA 2.4	Barcelone	62	F	Hépatopathie alcoolique	1	NA	0	84	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	NA	NA	FK		
	L-STA 2.5	Barcelone	61	M	Hépatopathie alcoolique	0	NA	0	37	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	30		FK		
	L-STA 2.6	Barcelone	52	F	NASH	1	NA	0	53	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	51		FK+MPA		
	L-STA 2.7	Barcelone	71	F	Cirrhose biliaire primitive	0	NA	0	54	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	22		FK		
	L-STA 2.8	Barcelone	65	F	Hépatite C	0	NA	0	54	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	15		FK		
	L-STA 2.9	Barcelone	69	M	Hépatopathie alcoolique	1	NA	0	87	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	68		CSA		
	L-STA 2.10	Barcelone	67	F	Cirrhose biliaire primitive	1	NA	0	54	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	28		FK		
	L-STA 2.11	Barcelone	65	F	Hépatopathie alcoolique	0	NA	0	64	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	NA		FK + AZA + CS		
	L-STA 2.12	Barcelone	53	M	Hépatite C	1	NA	0	55	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	NA	NA	CSA		
	L-STA 2.13	Barcelone	62	M	Hépatite C	0	NA	0	95	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	NA	NA	FK		
	L-STA 2.14	Barcelone	59	F	Polykystose	0	NA	0	82	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	62		FK		
	L-STA 2.15	Barcelone	46	M	Hépatopathie alcoolique	0	NA	0	45	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	42		FK+MPA		
	L-STA 2.16	Barcelone	57	F	Hépatite C	0	NA	0	95	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	45		FK		
	L-STA 2.17	Barcelone	49	F	Hépatite autoimmune	0	NA	0	83	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	NA	NA	FK		
	L-STA 2.18	Barcelone	68	M	Hépatite C	0	NA	0	102	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	20		CSA		
	L-STA 2.19	Barcelone	70	M	Cirrhose biliaire primitive	0	NA	0	61	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	24		FK+MPA		
	L-STA 2.20	Barcelone	64	F	Hépatopathie alcoolique	0	NA	0	103	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	70		FK		
	K-STA 2.1	Nantes	32	M	Polykystose	0	0	0	78	170	0	16	16	NLD	M	38		FK+Inh-mTor		
	K-STA 2.2	Nantes	40	F	IRC ND	0	0	0	67	100	0	14	9	NLD	M	26		Inh-mTor+FK		
	K-STA 2.3	Nantes	54	M	Néphro-angiosclérose	0	0	K Prostatique K cutané	NA	61	131	0	13	20	NLD	M	58		FK+Inh-mTor	
	K-STA 2.4	Nantes	37	M	Lupus Nephritis	0	0	K Rénal	0	119	150	0	19	17	NLD	M	29		CSA+AZA+CS	
	K-STA 2.5	Nantes	40	M	Glomérulosclérose segmentaire et focale	0	0	0	CMV	131	162	0	23	22	NLD	F	36		CSA+AZA	
	K-STA 2.6	Nantes	56	M	Polykystose	0	0	K cutané	0	63	126	0	19	19	NLD	M	53		FK+Inh-mTor	
	K-STA 2.7	Nantes	56	M	Néphropathie à IgA	0	0	0	62	150	0	19	14	NLD	F	46		FK+Inh-mTor		
	K-STA 2.8	Nantes	22	M	Syndrôme d'Alport	0	0	0	63	113	0	32	42	NLD	M	20		FK+CS		
K-STA 2.9	Nantes	35	F	Malformation rénale	0	0	0	63	87	0	NA	NA	NLD	M	19		FK+AZA			
K-STA 2.10	Nantes	55	M	Polykystose	0	0	0	72	159	0	16	19	NLD	M	58		FK			
K-STA 2.11	Nantes	38	M	Glomérulosclérose segmentaire et focale	0	0	0	95	106	0	52	131	NLD	M	32		CSA+CS			
K-STA 2.12	Nantes	49	M	IRC ND	0	0	0	63	94	0	NA	NA	NLD	M	52		FK+Inh-mTor			
K-STA 2.13	Nantes	67	F	Néphropathie à IgA	0	0	K cutané	0	64	89	0	NA	NA	NLD	F	69		Inh-mTor+CSA		
K-STA 2.14	Nantes	20	M	Néphropathie à IgA	0	0	0	67	132	0	19	14	NLD	M	28		CSA+Inh-mTor			
K-STA 2.15	Nantes	45	M	Malformation rénale	0	0	0	62	146	0	20	20	NLD	M	55		CSA+Inh-mTor			
K-STA 2.16	Nantes	47	F	Glomérulosclérose segmentaire et focale	0	0	0	60	134	NA	17	11	NLD	M	43		CSA+Inh-mTor			
K-STA 2.17	Nantes	51	M	IRC ND	0	0	0	61	141	NA	19	20	NLD	F	43		FK+Inh-mTor			
K-STA 2.18	Nantes	45	F	Malformation rénale	0	0	0	72	73	NA	16	19	NLD	F	39		FK+Inh-mTor			

Cohorte	Groupe	Etude miRNA	Centre	Age Receveur (année)	Sexe Receveur	Maladie initiale	Rejet aigu	Cancer	Episode viral	Temps greffe (mois)	Créatinémie (µmol/L)	Proteinurie (g/24h)	ASAT (UI)	ALAT (UI)	Donneur	Sexe Donneur	Age Donneur	Traitement	Durée hors immunosuppresseur (mois)	
Cohorte 3	K-STA	K-STA 3.1	Nantes	59	F	Polykystose	0	0	0	106	88	0	NA	NA	NLD	M	21	FK+AZA+CS		
		K-STA 3.2	Nantes	63	F	Glomérulonéphrite	1	0	0	236	133	0	NA	NA	NLD	M	38	CSA+AZA		
		K-STA 3.3	Nantes	43	M	Néphropathie à IgA	0	1	1	78	174	0	NA	NA	NLD	F	59	FK+MPA		
		K-STA 3.4	Nantes	54	F	Polykystose	0	0	0	60	93	0	NA	NA	NLD	F	46	FK+MPA		
		K-STA 3.5	Nantes	69	F	IRC ND	0	0	0	235	131	0	NA	NA	NLD	M	47	CSA+AZA		
		K-STA 3.6	Nantes	59	M	Glomerulosclérose segmentaire et focale	0	0	0	60	131	0	NA	NA	NLD	M	58	FK+MPA		
		K-STA 3.7	Nantes	54	M	Néphropathie à IgA	0	0	0	63	94	0	NA	NA	NLD	M	52	FK+MPA		
		K-STA 3.8	Nantes	61	M	Polykystose	0	0	0	72	159	0	NA	NA	NLD	M	58	FK		
		K-STA 3.9	Nantes	38	M	Polykystose	0	0	0	77	170	0	NA	NA	NLD	M	38	FK+MPA		
		K-STA 3.10	Nantes	52	M	Polykystose	0	0	0	145	149	0	NA	NA	NLD	M	29	FK+MPA		
	K-TOL	K-TOL 3.1	Nantes	73	F	Malformation rénale	2	1	1	105	92	NA	NA	NA	NA	NLD	M	39	NA	89
		K-TOL 3.2	Nantes	26	M	Malformation rénale	1		1	156	121	0	NA	NA	NLD	M	21	NA	64	
		K-TOL 3.3	Nantes	38	M	NA	1	0	1	272	144	1	NA	NA	NLD	M	7	NA	160	
		K-TOL 3.4	Nantes	63	M	Glomérulonéphrite	0	0	1	255	105	0	NA	NA	NLD	M	17	NA	100	
		K-TOL 3.5	Nantes	42	M	Glomérulonéphrite	0	0	0	117	110	NA	NA	NA	NLD	M	28	NA	100	
		K-TOL 3.6	Nantes	53	M	Néphropathie iatrogène	0	0	0	126	135	NA	NA	NA	LD	F	40	NA	90	
		K-TOL 3.7	Nantes	55	F	NA	0	0	1	281	68	0	NA	NA	LD	F	NA	NA	80	
		K-TOL 3.8	Nantes	54	M	NA	0	1	0	179	104	0	NA	NA	NLD	M	40	NA	92	
		K-TOL 3.9	Nantes	47	F	NA	0	0	0	112	89	NA	NA	NA	NLD	F	16	NA	90	
	L-STA	L-STA 3.1	Barcelone	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		L-STA 3.2	Barcelone	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		L-STA 3.3	Barcelone	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		L-STA 3.4	Barcelone	47	M	Hépatopathie alcoolique	1	0	0	215	80	NA	25	34	NLD	NA	NA	NA	MPA	
		L-STA 3.5	Barcelone	50	F	Hépatopathie alcoolique	1	0	0	180	79	NA	30	25	NLD	NA	NA	NA	MPA	
		L-STA 3.6	Barcelone	40	M	Anyloïdose	1	0	0	NA	73	NA	37	28	NLD	NA	NA	NA	CSA	
		L-STA 3.7	Barcelone	61	M	Hépatopathie alcoolique	1	0	0	110	95	NA	22	31	NLD	NA	NA	NA	MPA	
		L-STA 3.8	Barcelone	48	F	Hépatite B	1	0	0	105	76	NA	24	36	NLD	NA	NA	NA	FK	
		L-STA 3.9	Barcelone	40	F	Hépatopathie alcoolique	1	0	0	54	89	NA	25	31	NLD	NA	NA	NA	FK	
	L-TOL	L-TOL 3.1	Barcelone	30	M	Hépatite B	NA	0	NA	74	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	NA	NA	NA	44
		L-TOL 3.2	Barcelone	58	M	Hépatopathie alcoolique	NA	0	NA	50	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	NA	NA	NA	12
		L-TOL 3.3	Barcelone	62	M	Hépatopathie alcoolique	NA	0	NA	113	NA	NA	NA	NA	NLD	NA	NA	NA	NA	72
		L-TOL 3.4	Barcelone	61	M	NASH	1	0	0	216	106	NA	NA	NA	NLD	NA	NA	NA	NA	12
		L-TOL 3.5	Barcelone	71	M	Hépatopathie alcoolique	1	0	0	192	104	NA	NA	NA	NLD	M	31	NA	NA	12
		L-TOL 3.6	Barcelone	63	M	Hépatite B	0	0	0	84	110	NA	NA	NA	NLD	M	49	NA	NA	12
		L-TOL 3.7	Barcelone	74	M	Hépatite C	1	0	0	120	105	NA	NA	NA	NLD	M	65	NA	NA	12
		L-TOL 3.8	Barcelone	35	M	Maladie de Caroli	1	0	0	160	88	NA	NA	NA	NLD	F	62	NA	NA	12
		L-TOL 3.9	Barcelone	52	M	Hépatite C	1	0	0	128	106	NA	NA	NA	NLD	F	76	NA	NA	12

Annexe I Ensemble des données cliniques disponibles sur les 130 patients inclus dans ce travail et répartition selon les différentes cohortes.

Liste des abréviations : NA : donnée manquante, NASH : Stéatose Hépatique Non Alcoolique, ND : Non déterminé, NLD : Donneur décédé, LD : Donneur vivant, UI : unité internationale, FK : Tacrolimus, AZA : Azathioprine, MPA : Mycophénolate Mofétil, CSA : Ciclosporine A, CS : Corticostéroïdes, Inh-mTor : Inhibiteur de mTor.

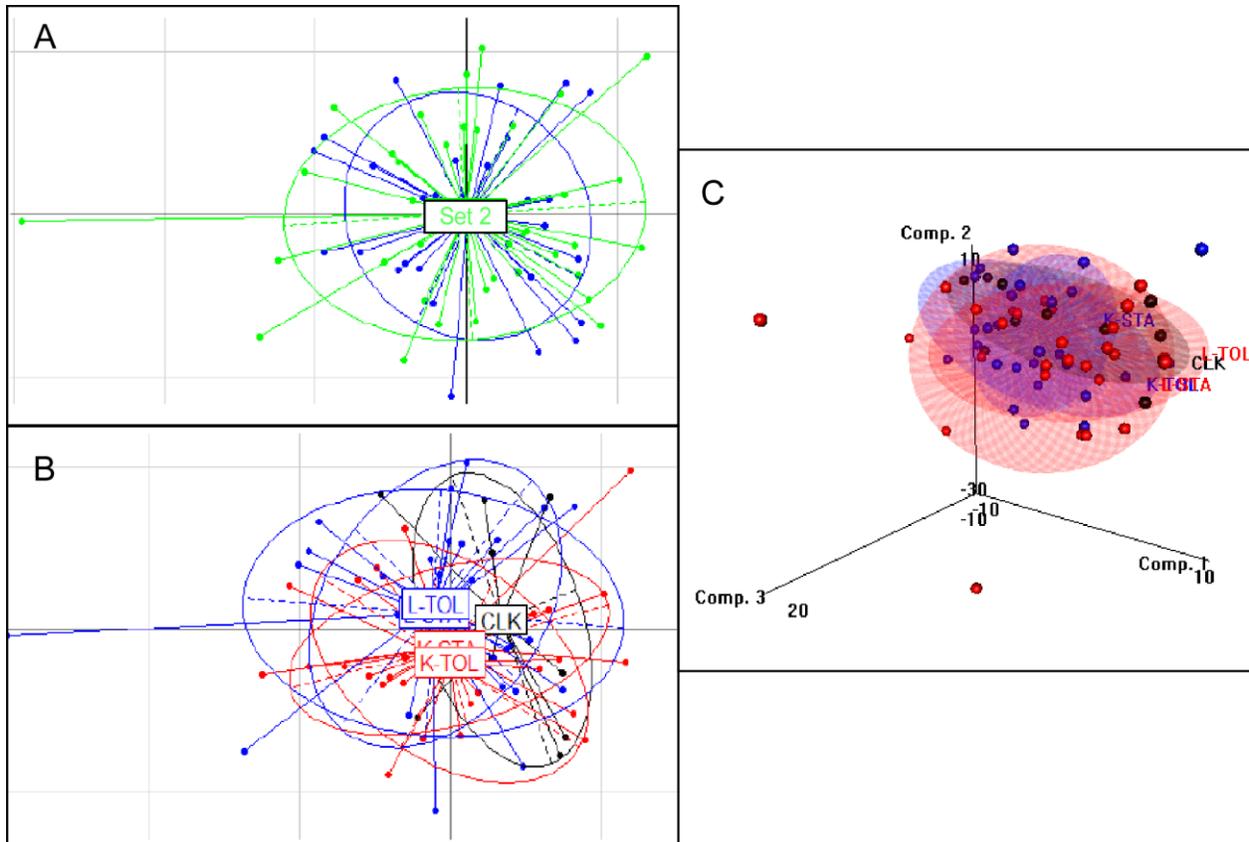
A	miARN	CLK/L-STA (Log2 FC)	Cq moyen
1	hsa-let-7f-2*	-0.32	29.3
2	hsa-miR-375	1.61	32.6
3	hsa-miR-424*	-0.23	25.6
4	hsa-miR-449	1.94	30.6
5	hsa-miR-548d	-1.60	31.9
6	hsa-miR-566	1.62	29.2
7	hsa-miR-579	0.50	26.8
8	hsa-miR-629	0.82	20.8

B	miARN	CLK/K-STA (Log2 FC)	Cq moyen
1	hsa-miR-101	0.26	23.5
2	hsa-miR-126	0.38	16.6
3	hsa-miR-126*	-0.74	20.0
4	hsa-miR-140	0.38	19.1
5	hsa-miR-142-3p	1.00	16.5
6	hsa-miR-142-5p	0.93	22.7
7	hsa-miR-144*	-3.06	23.8
8	hsa-miR-151-3p	-1.00	21.6
9	hsa-miR-151-5P	-1.00	23.0
10	hsa-miR-194	0.58	25.2
11	hsa-miR-19b	0.85	16.4
12	hsa-miR-210	-0.32	23.7
13	hsa-miR-26a-1*	-1.00	26.9
14	hsa-miR-26b	0.49	18.5
15	hsa-miR-296	-1.00	25.6
16	hsa-miR-29b	1.43	24.0
17	hsa-miR-32	0.93	27.9
18	hsa-miR-328	-0.51	21.0
19	hsa-miR-362-3p	0.49	28.2
20	hsa-miR-369-5p	-1.12	31.5
21	hsa-miR-425*	-0.51	22.4
22	hsa-miR-451a	-3.32	21.9
23	hsa-miR-486	-1.74	24.1
24	hsa-miR-518c	1.23	31.3
25	hsa-miR-519b-3p	-2.84	35.2
26	hsa-miR-520f	1.24	33.0
27	hsa-miR-545	1.38	29.0
28	hsa-miR-583	-1.74	31.1
29	hsa-miR-590-3P	0.58	24.1
30	hsa-miR-590-5p	0.85	20.8
31	hsa-miR-595	5.83	26.9
32	hsa-miR-604	3.42	34.2
33	hsa-miR-625*	-1.32	24.5
34	hsa-miR-744*	-0.51	24.7
35	hsa-miR-93*	-0.51	22.4

Annexe II : miARNs différentiellement exprimés entre le groupe CLK et le groupe L-STA (A) ou K-STA (B), avec p-value non corrigées <0.05

A	miRNA	p-value	K-TOL/K-STA (Log2 FC)	B	miRNA	p-value	L-TOL/L-STA (Log2 FC)
1	hsa-miR-130b*	0.003	-0.71	1	hsa-miR-1	0.009	2.28
2	hsa-miR-581	0.011	0.97	2	hsa-miR-30c	0.015	-0.21
3	hsa-miR-643	0.017	1.09	3	hsa-miR-99a*	0.015	-2.12
4	hsa-miR-148b	0.022	-0.36	4	hsa-miR-212	0.019	0.42
5	hsa-miR-450b-5p	0.022	0.73	5	hsa-miR-92a	0.019	-0.28
6	hsa-miR-508-3p	0.034	-2.43	6	hsa-miR-30c-1*	0.022	2.58
7	hsa-miR-142-3p	0.034	0.57	7	hsa-miR-145*	0.031	0.84
8	hsa-miR-654-5p	0.035	-1.42	8	hsa-miR-513-3p	0.031	1.24
9	hsa-miR-513-3p	0.035	-0.67	9	hsa-miR-32	0.038	0.93
10	hsa-miR-644	0.038	-2.18	10	hsa-miR-454	0.038	0.48
11	hsa-miR-876-3p	0.039	0.76	11	hsa-miR-145	0.047	-0.66
12	hsa-miR-98	0.041	-0.57	12	hsa-miR-652	0.047	-0.22
13	hsa-miR-509-3p	0.043	-1.60				

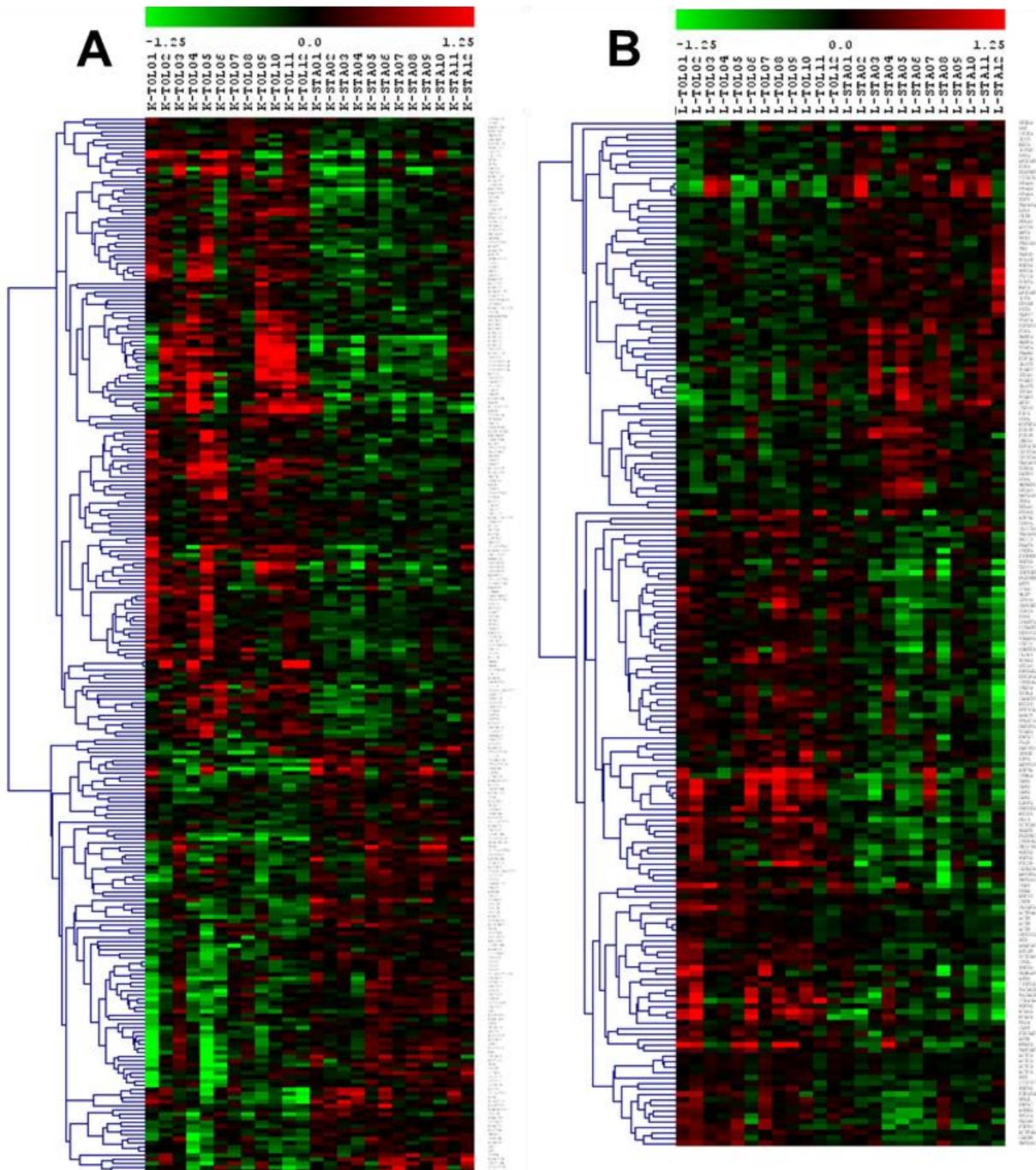
Annexe III Profils des miARN associés avec la tolérance rénale (A) ou hépatique (B),



Annexe IV : Résultat graphique d'une ACP basée sur l'ensemble des miARNs exprimés dans les 2 jeux de données

- A) ACP basée sur l'ensemble des échantillons de la cohorte 1 (bleu) et de la cohorte 3 (vert) (vraisemblance 19,7%)
 B) ACP selon les groupes de patients provenant des 2 cohortes K-TOL et K-TOL en rouge, L-TOL et L-TOL en bleu et en noir (vraisemblance 19.7%).
 C) Idem à B mais en 3D (vraisemblance 25.4%).

Nous n'observons aucune ségrégation selon la cohorte ou le groupe de patient ce qui souligne la bonne efficacité de l'algorithme Combat pour la correction du bruit de fond et la normalisation. Sur ces graphiques d'ACP sont représentées la première (axe x), la seconde (axe y) et la troisième (axe z) composante de chaque analyse.



Annexe V : Clustering des gènes modulés en transplantation rénale (A) et hépatique (B)

Selon le test de student (p -value <0.05), les 91 et 126 gènes respectivement régulés à la baisse ($\log_2FC<0$) et à la hausse ($\log_2FC>0$) en transplantation rénale et les 57 et 93 régulés à la baisse et à la hausse en transplantation hépatique sont représentés sur cette carte d'expression.

Bibliographie

1. Billingham R, Brent L, Medawar P. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*. 1953 Oct 3;172:603–6.
2. Cordier G, Garnier H, Clot JP, Camplez P, Gorin JP, Clot P, et al. Orthotopic liver graft in pigs. First results. *Mémoires Académie Chir Fr*. 1966 Nov 16;92(27):799–807.
3. Garnier H, Clot JP, Bertrand M, Camplez P, Kunlin A, Gorin JP, et al. Liver transplantation in the pig: surgical approach. *Comptes Rendus Hebd Séances Académie Sci Série Sci Nat*. 1965 May 24;260(21):5621–3.
4. Garnier H, Clot JP, Chomette G. Orthotopic transplantation of the porcine liver. *Surg Gynecol Obstet*. 1970 Jan;130(1):105–11.
5. Calne RY, White HJ, Yoffa DE, Binns RM, Maginn RR, Herbertson RM, et al. Prolonged survival of liver transplants in the pig. *Br Med J*. 1967 Dec 16;4(5580):645–8.
6. Calne RY, Sells RA, Pena JR, Davis DR, Millard PR, Herbertson BM, et al. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature*. 1969 Aug 2;223(5205):472–6.
7. Kamada N. The immunology of experimental liver transplantation in the rat. *Immunology*. 1985 Jul;55(3):369–89.
8. Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat. *Surgery*. 1983 Jan;93(1 Pt 1):64–9.
9. Kamada N, Davies HS, Wight D, Culank L, Roser B. Liver transplantation in the rat. Biochemical and histological evidence of complete tolerance induction in non-rejector strains. *Transplantation*. 1983 Apr;35(4):304–11.
10. Kamada N, Wight DG. Antigen-specific immunosuppression induced by liver transplantation in the rat. *Transplantation*. 1984 Sep;38(3):217–21.
11. Kamada N. A description of cuff techniques for renal transplantation in the rat. Use in studies of tolerance induction during combined liver grafting. *Transplantation*. 1985 Jan;39(1):93–5.
12. Kamada N, Brons G, Davies HS. Fully allogeneic liver grafting in rats induces a state of systemic nonreactivity to donor transplantation antigens. *Transplantation*. 1980 May;29(5):429–31.
13. Engemann R, Ulrichs K, Muller-Ruchholts W, Hamelmann H. A mechanism of tolerance in arterialized rat liver transplantation. *Transplant Proc*. 1983;15:729.
14. Kamada N. Transfer of specific immunosuppression of graft rejection using lymph from tolerant liver-grafted rats. *Immunology*. 1985 Jun;55(2):241–7.
15. Sumimoto R, Kamada N. Specific suppression of allograft rejection by soluble class I antigen and complexes with monoclonal antibody. *Transplantation*. 1990 Oct;50(4):678–82.

16. Spencer SC, Fabre JW. Bulk purification of a naturally occurring soluble form of RT1-A class I major histocompatibility complex antigens from DA rat liver, and studies of specific immunosuppression. *Transplantation*. 1987 Jul;44(1):141–8.
17. Margreiter R, Kramar R, Huber C, Steiner E, Niederwieser D, Judmaier G, et al. Combined liver and kidney transplantation. *Lancet*. 1984 May 12;1(8385):1077–8.
18. Chopra A, Cantarovich M, Bain VG. Simultaneous liver and kidney transplants: optimizing use of this double resource. *Transplantation*. 2011 Jun 27;91(12):1305–9.
19. Gonwa TA, McBride MA, Anderson K, Mai ML, Wadei H, Ahsan N. Continued influence of preoperative renal function on outcome of orthotopic liver transplant (OLT) in the US: where will MELD lead us? *Am J Transplant*. 2006 Nov;6(11):2651–9.
20. Jeyarajah DR, Gonwa TA, McBride M, Testa G, Abbasoglu O, Husberg BS, et al. Hepatorenal syndrome: combined liver kidney transplants versus isolated liver transplant. *Transplantation*. 1997 Dec 27;64(12):1760–5.
21. Nair S, Verma S, Thuluvath PJ. Pretransplant renal function predicts survival in patients undergoing orthotopic liver transplantation. *Hepatol Baltim Md*. 2002 May;35(5):1179–85.
22. O’Riordan A, Donaldson N, Cairns H, Wendon J, O’Grady JG, Heaton N, et al. Risk score predicting decline in renal function postliver transplant: role in patient selection for combined liver kidney transplantation. *Transplantation*. 2010 Jun 15;89(11):1378–84.
23. Papafragkakis H, Martin P, Akalin E. Combined liver and kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010 Jun;15(3):263–8.
24. Charlton MR, Wall WJ, Ojo AO, Ginès P, Textor S, Shihab FS, et al. Report of the first international liver transplantation society expert panel consensus conference on renal insufficiency in liver transplantation. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. 2009 Nov;15(11):S1–34.
25. Faenza A, Fuga G, Nardo B, Varotti G, Faenza S, Stefoni S, et al. Combined liver-kidney transplantation: the experience of the University of Bologna and the case of preoperative positive cross-match. *Transplant Proc*. 2006 May;38(4):1118–21.
26. Lang M, Neumann U, Kahl A, Steinmüller T, Settmacher U, Neuhaus P. Long-term outcome of 27 patients after combined liver-kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2001 Mar;33(1-2):1440–1.
27. Larue JR, Hiesse C, Samuel D, Blanchet P, Bensadoun H, Benoit G, et al. Experience in one center of combined kidney and liver transplantation in 22 patients: incidence of graft rejection and long-term graft outcome. *Transplant Proc*. 1997 Mar;29(1-2):243–4.
28. Fung J, Makowka L, Tzakis A, Klintmalm G, Duquesnoy R, Gordon R, et al. Combined liver-kidney transplantation: analysis of patients with preformed lymphocytotoxic antibodies. *Transplant Proc*. 1988 Feb;20(1 Suppl 1):88–91.

29. Mjörnstedt L, Friman S, Bäckman L, Rydberg L, Olausson M. Combined liver and kidney transplantation against a positive cross match in a patient with multispecific HLA-antibodies. *Transplant Proc.* 1997 Nov;29(7):3164–5.
30. Chava SP, Singh B, Stangou A, Battula N, Bowles M, O’Grady J, et al. Simultaneous combined liver and kidney transplantation: a single center experience. *Clin Transplant.* 2010 Jun;24(3):E62–68.
31. al-Edreesi M, Merouani A, Seidman E, StVil D, Bensoussan A, Laberge JM, et al. Successful combined liver and kidney transplantation in children despite HLA mismatching. *Transplant Proc.* 1996 Dec;28(6):3621–3.
32. Mehrabi A, Fonouni H, Ayoub E, Rahbari NN, Müller SA, Morath C, et al. A single center experience of combined liver kidney transplantation. *Clin Transplant.* 2009 Dec;23 Suppl 21:102–14.
33. Rasmussen A, Davies HF, Jamieson NV, Evans DB, Calne RY. Combined transplantation of liver and kidney from the same donor protects the kidney from rejection and improves kidney graft survival. *Transplantation.* 1995 Mar 27;59(6):919–21.
34. Leca N, Warner P, Bakthavatsalam R, Nelson K, Halldorson J, Rayhill S, et al. Outcomes of Simultaneous Liver and Kidney Transplantation in Relation to a High Level of Preformed Donor-Specific Antibodies. *Transplantation.* 2013 Jul 30;
35. Fong T-L, Bunnapradist S, Jordan SC, Selby RR, Cho YW. Analysis of the United Network for Organ Sharing database comparing renal allografts and patient survival in combined liver-kidney transplantation with the contralateral allografts in kidney alone or kidney-pancreas transplantation. *Transplantation.* 2003 Jul 27;76(2):348–53.
36. Rana A, Robles S, Russo MJ, Halazun KJ, Woodland DC, Witkowski P, et al. The combined organ effect: protection against rejection? *Ann Surg.* 2008 Nov;248(5):871–9.
37. Saidman SL, Duquesnoy RJ, Demetris AJ, McCauley J, Ramos H, Mazariegos G, et al. Combined liver-kidney transplantation and the effect of preformed lymphocytotoxic antibodies. *Transpl Immunol.* 1994;2(1):61–7.
38. Katznelson S, Cecka JM. The liver neither protects the kidney from rejection nor improves kidney graft survival after combined liver and kidney transplantation from the same donor. *Transplantation.* 1996 May 15;61(9):1403–5.
39. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Murase N, Ricordi C, Ildstad S, et al. Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. *Hepatology Baltim Md.* 1993 Jun;17(6):1127–52.
40. Lerut J, Sanchez-Fueyo A. An appraisal of tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant.* 2006 Aug;6(8):1774–80.

41. Li L, Wozniak LJ, Rodder S, Heish S, Talisetti A, Wang Q, et al. A common peripheral blood gene set for diagnosis of operational tolerance in pediatric and adult liver transplantation. 2012 May;1218–28.
42. Martínez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, Ramoni M, Tisone G, Rimola A, et al. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant*. 2007 Feb;7(2):309–19.
43. Haynes LD, Jankowska-Gan E, Sheka A, Keller MR, Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI, et al. Donor-specific indirect pathway analysis reveals a B-cell-independent signature which reflects outcomes in kidney transplant recipients. 2012 Mar;640–8.
44. Pallier A, Hillion S, Danger R, Giral M, Racapé M, Degauque N, 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*. 2010 Sep;78(5):503–13.
45. Brouard S, Mansfield E, Braud C, Li L, Giral M, Hsieh S, et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 25;104(39):15448–53.
46. Lozano JJ, Pallier A, Martinez-Llordella M, Danger R, López M, Giral M, et al. Comparison of transcriptional and blood cell-phenotypic markers between operationally tolerant liver and kidney recipients. 2011 Sep;1916–26.
47. Newell KA, Asare A, Kirk AD, Gisler TD, Bourcier K, Suthanthiran M, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. 2010 Jun;120(6):1836–47.
48. Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, Tomiuk S, Stephens DA, Miqueu P, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. 2010 Jun;120(6):1848–61.
49. Londoño M-C, Danger R, Giral M, Soullillou J-P, Sánchez-Fueyo A, Brouard S. A Need for Biomarkers of Operational Tolerance in Liver and Kidney Transplantation. 2012 Apr 4 [cited 2012 May 30]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22486792>
50. Lindberg RLP, Hoffmann F, Mehling M, Kuhle J, Kappos L. Altered expression of miR-17-5p in CD4+ lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Eur J Immunol*. 2010 Mar;40(3):888–98.
51. Lodish HF, Zhou B, Liu G, Chen C-Z. Micromanagement of the immune system by microRNAs. 2008 Feb;120–30.
52. Sonkoly E, Pivarcsi A. Advances in microRNAs: implications for immunity and inflammatory diseases. *J Cell Mol Med*. 2009 Jan;13(1):24–38.

53. Anglicheau D, Sharma VK, Ding R, Hummel A, Snopkowski C, Dadhania D, et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 31;106(13):5330–5.
54. Danger R, Pallier A, Giral M, Martínez-Llordella M, Lozano JJ, Degauque N, et al. Upregulation of miR-142-3p in peripheral blood mononuclear cells of operationally tolerant patients with a renal transplant. *J Am Soc Nephrol*. 2012 Apr; *Journal of the American Society of Nephrology*:597–606.
55. Sui W, Dai Y, Huang Y, Lan H, Yan Q, Huang H. Microarray analysis of MicroRNA expression in acute rejection after renal transplantation. *Transpl Immunol*. 2008 Apr;19(1):81–5.
56. Chen Q, Kong L, Xu X, Geng Q, Tang W, Jiang W. Down-regulation of microRNA-146a in the early stage of liver ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc*. 2013 Mar;45(2):492–6.
57. Hu J, Wang Z, Tan C-J, Liao B-Y, Zhang X, Xu M, et al. Plasma microRNA, a potential biomarker for acute rejection after liver transplantation. *Transplantation*. 2013 Apr 27;95(8):991–9.
58. Farid WRR, Pan Q, van der Meer AJP, de Ruiter PE, Ramakrishnaiah V, de Jonge J, et al. Hepatocyte-derived microRNAs as serum biomarkers of hepatic injury and rejection after liver transplantation. *Liver Transplant Off Publ Am Assoc Study Liver Dis Int Liver Transplant Soc*. 2012 Mar;18(3):290–7.
59. Bohne F, Martínez-Llordella M, Lozano J-J, Miquel R, Benítez C, Londoño M-C, et al. Intra-graft expression of genes involved in iron homeostasis predicts the development of operational tolerance in human liver transplantation. *J Clin Invest*. 2012 Jan 3;122(1):368–82.
60. Pons JA, Revilla-Nuin B, Baroja-Mazo A, Ramírez P, Martínez-Alarcón L, Sánchez-Bueno F, et al. FoxP3 in peripheral blood is associated with operational tolerance in liver transplant patients during immunosuppression withdrawal. *Transplantation*. 2008 Nov 27;86(10):1370–8.
61. Louis S, Braudeau C, Giral M, Dupont A, Moizant F, Robillard N, et al. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation*. 2006 Feb 15;81(3):398–407.
62. Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostat Oxf Engl*. 2007 Jan;8(1):118–27.
63. Wang X. miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *Rna New York N*. 2008 Jun;14(6):1012–7.
64. Zeeberg BR, Feng W, Wang G, Wang MD, Fojo AT, Sunshine M, et al. GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol*. 2003;4(4):R28.
65. Watkins NA, Gusnanto A, de Bono B, De S, Miranda-Saavedra D, Hardie DL, et al. A HaemAtlas: characterizing gene expression in differentiated human blood cells. *Blood*. 2009 May 7;113(19):e1–9.

66. Einecke G, Sis B, Reeve J, Mengel M, Campbell PM, Hidalgo LG, et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant*. 2009 Nov;9(11):2520–31.
67. O’Leary JG, Gebel HM, Ruiz R, Bray RA, Marr JD, Zhou XJ, et al. Class II alloantibody and mortality in simultaneous liver-kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2013 Apr;13(4):954–60.
68. Himmel ME, MacDonald KG, Garcia RV, Steiner TS, Levings MK. Helios+ and Helios– Cells Coexist within the Natural FOXP3+ T Regulatory Cell Subset in Humans. *J Immunol*. 2013 Mar 1;190(5):2001–8.
69. Zabransky DJ, Nirschl CJ, Durham NM, Park BV, Ceccato CM, Bruno TC, et al. Phenotypic and functional properties of Helios+ regulatory T cells. *Plos One*. 2012;7(3):e34547.
70. Murase N, Starzl TE, Tanabe M, Fujisaki S, Miyazawa H, Ye Q, et al. Variable chimerism, graft-versus-host disease, and tolerance after different kinds of cell and whole organ transplantation from Lewis to brown Norway rats. *Transplantation*. 1995 Jul 27;60(2):158–71.
71. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Ramos H, Zeevi A, Rudert WA, et al. Systemic chimerism in human female recipients of male livers. *Lancet*. 1992 Oct 10;340(8824):876–7.
72. Bandres E, Bitarte N, Arias F, Agorreta J, Fortes P, Agirre X, et al. microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2009 Apr 1;15(7):2281–90.
73. Rosenberger CM, Podyminogin RL, Navarro G, Zhao G-W, Askovich PS, Weiss MJ, et al. miR-451 regulates dendritic cell cytokine responses to influenza infection. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2012 Dec 15;189(12):5965–75.
74. Girlanda R, Kleiner DE, Duan Z, Ford EAS, Wright EC, Mannon RB, et al. Monocyte infiltration and kidney allograft dysfunction during acute rejection. *Am J Transplant*. 2008 Mar;8(3):600–7.
75. Ozdemir BH, Ozdemir FN, Güngen Y, Haberal M. Role of macrophages and lymphocytes in the induction of neovascularization in renal allograft rejection. *Am J Kidney Dis*. 2002 Feb;39(2):347–53.
76. Tinckam KJ, Djurdjev O, Magil AB. Glomerular monocytes predict worse outcomes after acute renal allograft rejection independent of C4d status. *Kidney Int*. 2005 Oct;68(4):1866–74.
77. Starzynski RR, Gonçalves AS, Muzeau F, Tyrolczyk Z, Smuda E, Drapier J-C, et al. STAT5 proteins are involved in down-regulation of iron regulatory protein 1 gene expression by nitric oxide. *Biochem J*. 2006 Dec 1;400(2):367–75.
78. Mazière P, Enright AJ. Prediction of microRNA targets. *Drug Discov Today*. 2007 Jun;12(11-12):452–8.

79. Agaugué S, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-derived suppressor cells and cytokinic balance in favor of Th2 versus Th1/Th17. *Blood*. 2011 Jun 30;117(26):7021–31.
80. Rico-Rosillo MG, Vega-Robledo GB. Immunological mechanisms involved in pregnancy. *Ginecol Obstet México*. 2012 May;80(5):332–40.
81. Créput C, Durrbach A, Menier C, Guettier C, Samuel D, Dausset J, et al. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in biliary epithelial cells is associated with allograft acceptance in liver-kidney transplantation. *J Hepatol*. 2003 Oct;39(4):587–94.
82. Créput C, Durrbach A, Samuel D, Eschwege P, Amor M, Kriaa F, et al. Incidence of renal and liver rejection and patient survival rate following combined liver and kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2003 Mar;3(3):348–56.
83. Zarkhin V, Talisetti A, Li L, Wozniak LJ, McDiarmid SV, Cox K, et al. Expression of soluble HLA-G identifies favorable outcomes in liver transplant recipients. *Transplantation*. 2010 Nov 15;90(9):1000–5.
84. Castellaneta A, Mazariegos GV, Nayyar N, Zeevi A, Thomson AW. HLA-G level on monocytoïd dendritic cells correlates with regulatory T-cell Foxp3 expression in liver transplant tolerance. *Transplantation*. 2011 May 27;91(10):1132–40.
85. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, 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*. 2010 Jan 29;32(1):129–40.
86. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:221–41.
87. Mestdagh P, Feys T, Bernard N, Guenther S, Chen C, Speleman F, et al. High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA. *Nucleic Acids Res*. 2008 Dec;36(21):e143.
88. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol*. 2009;10(6):R64.
89. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2011.
90. Chessel D, Dufour A. The ade4 package-I- One-table methods. *R News*. 2004;4(1):5–10.

Serment médical

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies.

Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

NOM : DUMONTET

PRENOM : ERWAN

Titre de Thèse :

ETUDE DU PHENOTYPE ET DE L'EXPRESSION DES miARNs CHEZ LES PATIENTS
PRESENTANT UNE GREFFE COMBINEE REIN-FOIE

Introduction : Les études animales et cliniques suggèrent que, lors d'une greffe combinée rein-foie, l'allogreffe hépatique protégerait la greffe rénale des phénomènes de rejets. Nous avons comparé le phénotype sanguin et les profils d'expression des miARNs de patients présentant une greffe combinée rein-foie (CLK) avec des patients simples transplantés foie (L-STA) ou rein (K-STA). Pour évaluer l'effet positif de la greffe combinée, les profils d'expression des miARNs des CLK ont été comparés avec ceux de patients tolérants transplantés foie (L-TOL) ou rein (K-TOL).

Méthode : Nous avons effectué un phénotypage exhaustif des CMSP en cytométrie en flux et un profilage de l'expression des miRNAs grâce à la technologie TLDA. Toutes les différences d'expression des miARNs ont été confirmées par PCR TaqMan individuelles sur une cohorte indépendante.

Résultats : Les CLK présentent plus de B mémoires $CD19^+CD24^+CD38^{Low}$ que les L-STA et plus de Treg $CD3^+CD4^+CD25^{High}CD127^{Low}FOXP3^+Helios^+$ que les K-STA. Par ailleurs, le phénotype sanguin des CLK diffère de celui des patients tolérants L-TOL et K-TOL. Au niveau moléculaire les CLK expriment un profil miARN mixte influencé par les deux greffons et n'ayant rien de commun avec les profils miARN observés chez les patients L-TOL et K-TOL. Ceci se traduit par la mise en place de réseaux de gènes différents entre les patients CLK, L-TOL et K-TOL.

Conclusion : L'influence de la greffe combinée engendre un phénotype sanguin et un profil miRNA à mi-chemin entre L-STA et K-STA, non partagé par les patients tolérants

MOTS-CLES

Greffe combinée rein-foie, Tolérance, miARN, Immunophénotypage, Transplantation