Année 2016 N°

Thèse

Pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

Thibault MOLES

Né le 19/08/1988 à Bayonne (64)

IMPACT DU TAUX DE LYMPHOCYTES NK DANS LE REJET HUMORAL CHEZ LES PATIENTS GREFFES RENAUX IMMUNISES DE NOVO

Présentée et soutenue publiquement le 19/10/2016 devant un jury composé de :

Président du Jury : Professeur BÜCHLER Matthias, Néphrologie, PU, Faculté de Médecine – Tours

Membres du Jury : Professeur THIERRY Antoine, Néphrologie, PU, Faculté de Médecine – Poitiers

Professeur BARON Christophe, Néphrologie, PU, Faculté de Médecine – Tours

Professeur THIBAULT Gilles, Immunologie, PU, Faculté de Médecine – Tours

Directeur de thèse : Docteur Philippe GATAULT, Néphrologie, MCU, Faculté de Médecine – Tours

UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS

FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN
Professeur Patrice DIOT

VICE-DOYEN
Professeur Henri MARRET

ASSESSEURS
Professeur Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*

Professeur Mathias BUCHLER, *Relations internationales*

Professeur Hubert LARDY, *Moyens – relations avec l'Université*

Professeur Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ, *Médecine générale*

Professeur François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*

Pr. Patrick VOURC'H, *Recherche*

SECRETAIRE GENERALE
Madame Fanny BOBLETER

****

DOYENS HONORAIRES

Professeur Emile ARON (†) – *1962-1966*

Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962
Professeur Georges DESBUQUOIS (†)- *1966-1972*

Professeur André GOUAZE - *1972-1994*

Professeur Jean-Claude ROLLAND – *1994-2004*

Professeur Dominique PERROTIN – *2004-2014*

PROFESSEURS EMERITES

Professeur Alain AUTRET

Professeur Catherine BARTHELEMY

Professeur Jean-Claude BESNARD

Professeur Philippe BOUGNOUX

Professeur Etienne DANQUECHIN-DORVAL

Professeur Olivier LE FLOCH

Professeur Yvon LEBRANCHU

Professeur Elisabeth LECA

Professeur Etienne LEMARIE

Professeur Gérard LORETTE

Professeur Michel ROBERT

Professeur Alain ROBIER

PROFESSEURS HONORAIRES

P. ANTHONIOZ – A. AUDURIER – P. BAGROS – G. BALLON – P.BARDOS – J.L. BAULIEU – C. BERGER – P. BEUTTER – C. BINET – P. BONNET – M. BROCHIER – P. BURDIN – L. CASTELLANI – B. CHARBONNIER – P. CHOUTET – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – G. GINIES – B. GRENIER – A. GOUAZE – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – J. LANSAC – Y. LANSON – J. LAUGIER – P. LECOMTE – G. LELORD – G. LEROY – Y. LHUINTRE – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAINE – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – L. POURCELOT – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – J.C. ROLLAND – A. SAINDELLE – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – J. THOUVENOT – B. TOUMIEUX – J. WEILL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

MM.	ALISON Daniel	Radiologie et imagerie médicale
	ANDRES Christian	Biochimie et biologie moléculaire
	ANGOULVANT Denis	Cardiologie
	ARBEILLE Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
	AUPART Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	BABUTY Dominique	Cardiologie
	BALLON Nicolas	Psychiatrie ; addictologie
Mme	BARILLOT Isabelle	Cancérologie ; radiothérapie
MM.	BARON Christophe	Immunologie
	BERNARD Louis	Maladies infectieuses et maladies tropicales
	BODY Gilles	Gynécologie et obstétrique
	BONNARD Christian	Chirurgie infantile
Mme	BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
MM.	BRILHAULT Jean	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	BRUNEREAU Laurent	Radiologie et imagerie médicale
	BRUYERE Franck	Urologie
	BUCHLER Matthias	Néphrologie
	CALAIS Gilles	Cancérologie, radiothérapie
	CAMUS Vincent	Psychiatrie d'adultes
	CHANDENIER Jacques	Parasitologie, mycologie
	CHANTEPIE Alain	Pédiatrie
	COLOMBAT Philippe	Hématologie, transfusion
	CONSTANS Thierry	Médecine interne, gériatrie
	CORCIA Philippe	Neurologie
	COSNAY Pierre	Cardiologie
	COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et imagerie médicale
	COUET Charles	Nutrition
	DE LA LANDE DE CALAN Loïc	Chirurgie digestive
	DE TOFFOL Bertrand	Neurologie
	DEQUIN Pierre-François	Thérapeutique
	DESTRIEUX Christophe	Anatomie

DIOT Patrice ..... Pneumologie

DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague Anatomie & cytologie pathologiques

DUCLUZEAU Pierre-Henri ..... Médecine interne, nutrition

DUMONT Pascal ..... Chirurgie thoracique et cardiovasculaire

EL HAGE Wissam ..... Psychiatrie adultes

EHRMANN Stephan ..... Réanimation d'urgence

FAUCHIER Laurent ..... Cardiologie

FAVARD Luc ..... Chirurgie orthopédique et traumatologique

FOUQUET Bernard ..... Médecine physique et de réadaptation

FRANCOIS Patrick ..... Neurochirurgie

FROMONT-HANKARD Gaëlle ..... Anatomie & cytologie pathologiques

GAILLARD Philippe ..... Psychiatrie d'adultes

GOGA Dominique ..... Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie

GOUDEAU Alain ..... Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière

GOUPILLE Philippe ..... Rhumatologie

GRUEL Yves ..... Hématologie, transfusion

GUERIF Fabrice ..... Biologie et médecine du développement et de la reproduction

GUILMOT Jean-Louis ..... Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire

GUYETANT Serge ..... Anatomie et cytologie pathologiques

GYAN Emmanuel ..... Hématologie, transfusion

HAILLOT Olivier ..... Urologie

HALIMI Jean-Michel ..... Thérapeutique

HANKARD Régis ..... Pédiatrie

HERAULT Olivier ..... Hématologie, transfusion

HERBRETEAU Denis ..... Radiologie et imagerie médicale

Mme HOMMET Caroline ..... Médecine interne, gériatrie

MM. HUTEN Noël ..... Chirurgie générale

LABARTHE François ..... Pédiatrie

LAFFON Marc ..... Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence

LARDY Hubert ..... Chirurgie infantile

LAURE Boris ..... Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie

LECOMTE Thierry ..... Gastroentérologie, hépatologie

LESCANNE Emmanuel ..... Oto-rhino-laryngologie

LINASSIER Claude ..... Cancérologie, radiothérapie

MACHET Laurent ..... Dermato-vénéréologie

MAILLOT François ..... Médecine interne, gériatrie

MARCHAND-ADAM Sylvain ..... Pneumologie

MARRET Henri ..... Gynécologie-obstétrique

Mme MARUANI Annabel ..... Dermatologie-vénéréologie

MM. MEREGHETTI Laurent ..... Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière

MORINIERE Sylvain ..... Oto-rhino-laryngologie

Mme MOUSSATA Driffa ..... Gastro-entérologie

MM. MULLEMAN Denis ..... Rhumatologie

ODENT Thierry ..... Chirurgie infantile

PAGES Jean-Christophe ..... Biochimie et biologie moléculaire

PAINTAUD Gilles ..... Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique

PATAT Frédéric ..... Biophysique et médecine nucléaire

PERROTIN Dominique ..... Réanimation médical, médecine d'urgence

PERROTIN Franck ..... Gynécologie-obstétrique

PISELLA Pierre-Jean ..... Ophtalmologie

QUENTIN Roland ..... Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière

REMERAND Francis ..... Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence

ROINGEARD Philippe ..... Biologie cellulaire

ROSSET Philippe ..... Chirurgie orthopédique et traumatologique

ROYERE Dominique ..... Biologie et médecine du développement et de la reproduction

RUSCH Emmanuel ..... Epidémiologie, économie de la santé et prévention

SALAME Ephrem ..... Chirurgie digestive

SALIBA Elie ..... Biologie et médecine du développement et de la reproduction

Mme SANTIAGO-RIBEIRO Maria ..... Biophysique et médecine nucléaire

MM. SIRINELLI Dominique ..... Radiologie et imagerie médicale

THOMAS-CASTELNAU Pierre ..... Pédiatrie

Mme TOUTAIN Annick ..... Génétique

MM. VAILLANT Loïc ..... Dermato-vénéréologie

VELUT Stéphane ..... Anatomie

VOURC'H Patrick ..... Biochimie et biologie moléculaire

WATIER Hervé ..... Immunologie

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

M. LEBEAU Jean-Pierre
Mme LEHR-DRYLEWICZ Anne-Marie

PROFESSEURS ASSOCIES

MM. MALLET Donatien ..... Soins palliatifs
POTIER Alain ..... Médecine Générale
ROBERT Jean ..... Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme ANGOULVANT Théodora ..... Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique

M. BAKHOS David ..... Physiologie

Mme BERNARD-BRUNET Anne ..... Cardiologie

M. BERTRAND Philippe ..... Biostatistiques, informatique médical et technologies de communication

Mmes BLANCHARD Emmanuelle ..... Biologie cellulaire

BLASCO Hélène ..... Biochimie et biologie moléculaire

M. BOISSINOT Éric ..... Physiologie

Mme CAILLE Agnès ..... Biostatistiques, informatique médical et technologies de communication

M. DESOUBEAUX Guillaume ..... Parasitologie et mycologie

Mmes DOMELIER Anne-Sophie ..... Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière

DUFOUR Diane ..... Biophysique et médecine nucléaire

FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie . Anatomie et cytologie pathologiques

M. GATAULT Philippe ..... Néphrologie

Mmes GAUDY-GRAFFIN Catherine ..... Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière

GOUILLEUX Valérie ..... Immunologie

GUILLON-GRAMMATICO Leslie ..... Epidémiologie, économie de la santé et prévention

MM. HOARAU Cyrille ..... Immunologie

HOURIOUX Christophe ..... Biologie cellulaire

Mmes	LARTIGUE Marie-Frédérique	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
	LE GUELLEC Chantal	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
	MACHET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques
MM.	PIVER Eric	Biochimie et biologie moléculaire
	ROUMY Jérôme	Biophysique et médecine nucléaire
	PLANTIER Laurent	Physiologie
Mme	SAINT-MARTIN Pauline	Médecine légale et droit de la santé
MM.	SAMIMI Mahtab	Dermatologie-vénéréologie
	TERNANT David	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique

MAITRES DE CONFERENCES

Mmes	AGUILLON-HERNANDEZ Nadia	Neurosciences
	ESNARD Annick	Biologie cellulaire
M.	LEMOINE Maël	Philosophie
Mme	MONJAUZE Cécile	Sciences du langage - orthophonie
M.	PATIENT Romuald	Biologie cellulaire
Mme	RENOUX-JACQUET Cécile	Médecine Générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

M.	IVANES Fabrice	Cardiologie

CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRA

M.	BOUAKAZ Ayache	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
Mmes	BRUNEAU Nicole	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
	CHALON Sylvie	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
MM.	CHARBONNEAU Michel	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
	COURTY Yves	Chargé de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
	GAUDRAY Patrick	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292

	GILOT Philippe	Chargé de Recherche INRA – UMR INRA 1282
	GOUILLEUX Fabrice	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
Mmes	GOMOT Marie	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
	GRANDIN Nathalie	Chargée de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
	HEUZE-VOURCH Nathalie	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
MM.	KORKMAZ Brice	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
	LAUMONNIER Frédéric	Chargé de Recherche INSERM - UMR INSERM 930
	LE PAPE Alain	Directeur de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
Mme	MARTINEAU Joëlle	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
MM.	MAZURIER Frédéric	Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292
	MEUNIER Jean-Christophe	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 966
	RAOUL William	Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292
Mme	RIO Pascale	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1069
M.	SI TAHAR Mustapha	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie

Mme	DELORE Claire	Orthophoniste
MM.	GOUIN Jean-Marie	Praticien Hospitalier
	MONDON Karl	Praticien Hospitalier
Mme	PERRIER Danièle	Orthophoniste

Pour l'Ecole d'Orthoptie

Mme	LALA Emmanuelle	Praticien Hospitalier
M.	MAJZOUB Samuel	Praticien Hospitalier

Pour l'Ethique Médicale

Mme	BIRMELE Béatrice	Praticien Hospitalier

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,

de mes chers condisciples

et selon la tradition d'Hippocrate,

je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur

et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,

et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux

ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira

les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas

à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,

je rendrai à leurs enfants

l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime

si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre

et méprisé de mes confrères

si j'y manque.

RESUME

Introduction. Le rejet humoral (ABMR) chronique, causé par les anticorps anti-HLA spécifiques du greffon (DSA), est la principale cause de perte de greffons rénaux. La pathogénicité des DSA repose certainement sur l'activation du complément. Le rôle délétère du recrutement des lymphocytes natural killers (NK) par les DSA est plus discuté. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact du nombre de lymphocytes NK sur l'ABMR chez les transplantés rénaux avec des DSA de novo. **Patients et méthodes.** Il s'agit d'une étude rétrospective incluant 131 patients adultes transplantés rénaux suivis à Tours avec des DSA (étude en Luminex One Lambda®) apparus après la transplantation et avec un nombre de NK disponible au moment de l'immunisation. Les patients avec un taux de NK < 1er quartile de la cohorte (« NK bas ») ont été comparés aux autres (« NK élevés ») pour la survie rénale (décès censurés), le débit de filtration glomérulaire estimé (DFGe, formule MDRD), la protéinurie et les lésions histologiques. **Résultats.** Les caractéristiques du donneur et du receveur étaient comparables entre les groupes. L'évolution au cours du temps du DFGe retrouvait une dégradation significative à 2 ans dans le groupe « NK élevés » (avant immunisation 50.4±17.1 vs 43.7±18.2 mL/min/1.73m² p=0.021) non retrouvée dans le groupe « NK bas ». De plus la protéinurie était moins élevée dans le groupe « NK bas » à l'immunisation (0.28±0.3g/L vs 0.59±0.7g/L, p=0.06). En comparant les 106 patients avec une biopsie disponible à l'immunisation (« NK bas »=22, « NK élevés »=84), seule la fréquence de la glomérulite apparaissait plus élevée chez les patients issus du groupe « NK élevés » (75% vs 54.5 %, p=0,01). Finalement, la survie des greffons tendait à être moins bonne dans le groupe « NK élevés » (log rank, p=0.055). **Discussion.** Un important nombre de NK circulants au moment de l'apparition de DSA est associé à une plus grande incidence de glomérulite, une plus importante dégradation de la fonction rénale au cours du temps, une plus forte protéinurie et pourrait influer sur le pronostic du greffon rénal. Cette étude supporte l'intérêt d'une étude longitudinale quantitative et fonctionnelle des lymphocytes NK chez les patients avec des DSA. De plus, le lymphocyte NK apparaît comme une cible thérapeutique potentielle pour prévenir et traiter le rejet humoral.

Mots clés : ABMR : antibody-mediated rejection / DSA : donor specific antibody / lymphocytes NK / DFGe : débit de filtration glomérulaire estimé / protéinurie / glomérulite / survie rénale

The impact of the count of lymphocytes NK in the antibody-mediated rejection in renal recipients with de novo donor specific antibodies

Abstract :

Introduction. Appearance of donor specific antibodies (DSA) and subsequent antibody-mediated rejection (ABMR) is the leading cause of kidney graft loss. Behind the complement with a well established role in development of kidney damages, a deleterious impact of natural killer cells (NK) is disputed. In this study, we assessed the impact of NK cells count on graft outcome in kidney transplant recipient with *de novo* DSA. **Patients and methods**. We retrospectively analyzed 131 adult KTR transplanted in Tours with de novo DSA (Single bead assay, OneLambda®) and a number of circulating NK cells available at the time of immunization. Patients with lower NK quartile (<67/mm3) were compared to others for death-censored graft survival, estimated glomerular filtration rate (eGFR, MDRD formula), proteinuria and pathological injuries (Banff classification). **Results**. Donor's and recipient's characteristics were not different between groups, except to azathioprine that was more frequently used in NK<67 group. eGFR decreased at one year in the group "NK> 67" (before immunization 50.4 ± 17.1 vs 43.7 ± 18.2 mL / min / 1.73m² p = 0.021) but not in NK>67 group. At the immunization, proteinuria was lower in the NK <67 group than in NK>67 group (0.28 vs. 0.59 g / L, p = 0.06). Proportion of patients with glomerulitis was more frequent in NK >67 group than in NK> 67 group (75% vs. 54.5%, p = 0.01). Finally, graft survival tended to be lower in the group "NK >67" (log rank, p = 0.055). **Discussion**. A high number of circulating NK at the time of DSA appearance is associated with a more important incidence of glomerulitis, a decrease of eGFR and a possible poorer graft outcome. These results support further prospective studies on NK monitoring. In addition, NK cells could be a target for prevention and treatment of ABMR.

Key words : ABMR : antibody-mediated rejection / DSA : donor specific antibody / NK cells / eGFR : estimated glomerular filtration rate / proteinuria / glomerulitis / graft survival

REMERCIEMENTS

Au Docteur Gatault de m'avoir proposé ce travail, encadré et aidé avec tant de détermination, de patience et de bonne humeur.

Au Professeur Büchler d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse ainsi que pour la richesse de son enseignement en transplantation rénale.

Au Professeur Thierry d'avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Au Professeur Baron d'avoir accepté de juger ce travail de thèse ainsi que pour son enseignement.

Au Professeur Thibault d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Au Professeur Halimi pour son excellente formation en néphrologie, pour le plaisir que j'ai pris à travailler dans son service et pour m'avoir montré ce que doit être un médecin médicalement et surtout humainement.

A Christelle et Hélène pour leur bonne humeur rendant le travail bien plus facile, pour m'avoir transmis leur savoir et m'avoir appris à survivre à un pneumothorax post-traumatique après avoir fait une erreur de prescription.

A Maud, Jean-François, Béatrice, Nolwen et Anne pour leur apprentissage et tous les moments passés et à venir.

A Sylvie, Elodie, Stéphane, Aurélie, Catherine, Nathalie, Marie-Brigitte, Brenda et Mélanie pour tous ces bons moments passés au pays des princesses et des fées pour finir en beauté mon internat.

A tous le personnel paramédical du service de Néphrologie, Transplantation et Dialyse pour tous ces hauts et ces quelques bas qui m'ont fait vous connaître, vous apprécier et m'ont permis de passer quatre années très enrichissantes humainement.

Au Professeur Bernard, au Docteur Bastides, à Zoha, Guillaume et Adrien pour m'avoir permis d'approcher le raisonnement en maladies infectieuses, m'avoir initié aux mystères de la microbiologie et avoir changé à tout jamais ma façon de voir la médecine.

Aux différents médecins et personnels paramédicaux avec qui j'ai eu la chance et le plaisir de travailler et qui ont eu la générosité de me transmettre leur précieux savoir pour le bien de tous.

A Jean-Frédérique, Charles et Diana sans qui rien de ce travail n'aurait été réalisable.

REMERCIEMENTS

A mes parents d'avoir été là pour moi dans les bons comme les mauvais moments depuis toujours, d'avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui et de m'avoir toujours compris et encouragé dans tout ce que j'ai entrepris. Vous rendre fiers a été et restera toujours un moteur pour moi.

A Guigui et Double Lu (salulu!) pour tous les moments magiques partagés dans notre enfance et tous ceux qui restent à venir.

A Jeanine et Michel pour veiller sur moi de là-haut en espérant vous rendre fiers.

A mes amis de toujours, Titus, Mundu, Nonos, L'Enragé, Pschitt, Soldat Munoz, Pantx, Boubou et tous les autres pour tous ces souvenirs qu'on a et tous ceux qu'on aurait pu avoir s'il nous restait plus de neurones (hey tchik hey tchak) et pour savourer à chaque fois le retour de Titi avec autant de panache.

A Jakes qui me montre tous les jours ce qu'est le vrai courage (jo ta ke irabazi arte)

A mes amis du Nord, Mathieu le looser de Fifa, Charles qui a essayé de saboter ma thèse en s'abonnant à Bein avant l'Euro, Antoine pour faire grandir chaque jour mon amour du bœuf, David pour cette photo gravée dans ma rétine qui me fait pleurer à chaque fois que j'y pense (oh non!!!), Benoît pour m'avoir appris la patience, Steph (alias le pop-corn) et AnneSo pour toutes ces sessions mythiques de surf à shooter des cavernes, Etienne (tu te calmes!)…

A mes co-internes passés et présents, Pinier (tout vient à point à qui sait attendre), Charlotte pour m'avoir motivé à travailler cette thèse, Vernier pour cette prose soviétique si chère à mes oreilles, Elodie pour avoir rallumé ma flamme pour les pottoks, John Noble World Master of St Malo Ricochet's Championship, Mélanie et Alex avec ses dictées de la Tourettienne qui vont tellement me manquer, Eloi pour m'avoir fait découvrir que l'amour d'un petit gerbille était plus fort que l'ail des ours, Claire et GoumGoum pour toutes ces soirées immémorables, Nico, Charlotte et Florent qui reprennent le flambeau avec fougue.

A Carbo pour ses deux magnifiques années et toutes celles à venir, et pour m'avoir tant aidé à la rédaction de ce travail : cette thèse c'est aussi la tienne (je te l'avais dit…)

Table des matières

1 – INTRODUCTION 16
2 – PATIENTS ET METHODES 18
1- Sélection des patients 18
2- Les patients à Tours 19
3- Les données recueillies 20
4- Analyse 20
3 – RESULTATS 22
1- Population 22
2- Impact du taux de lymphocytes NK à l'immunisation 25
3- Impact du taux de lymphocytes NK sur le devenir de la greffe 30
4 – DISCUSSION 35
5 – CONCLUSION 39
6 – REFERENCES 41

1 – INTRODUCTION

La transplantation rénale est le traitement de référence de l'insuffisance rénale chronique terminale. Elle est en effet associée à un meilleur pronostic et une meilleure qualité de vie. Cependant, l'incidence de la perte des greffons, au delà de la première année, demeure relativement stable au cours des dernières années (1). Ces pertes de greffons sont majoritairement causées par le développement de lésions chroniques dont on sait maintenant qu'elles sont le plus souvent le résultat d'une immunisation spécifiquement dirigée contre les allo-antigènes du donneur, et plus particulièrement liées à la présence de DSA (donor specific antibodies) (2).

Ces DSA, qui apparaissent le plus souvent dans les suites d'une exposition allogénique - transplantation d'organe, transfusion ou grossesse - peuvent être présents avant la transplantation (DSA préformés) ou apparaitre au décours (DSA de novo). Dans tous les cas, ils peuvent induire des lésions de rejet humoral (ABMR : antibody-mediated rejection) dont la présentation clinique est très variable, allant de formes très aiguës caractérisées par une dégradation rapide de la fonction rénale à des évolutions plus insidieuses lorsque les lésions se développent de façon infra-clinique avant que n'apparaissent une protéinurie et une insuffisance rénale d'aggravation progressive (3). Finalement cette dernière forme d'ABMR est la plus fréquente.

Beaucoup de travaux visent à stratifier le risque de perte de greffon chez le patient avec un ou plusieurs DSA préformés ou de novo. Si la fonction rénale et la présence de lésions d'ABMR (inflammation de la microcirculation, glomérulopathie d'allogreffe) au moment de la première identification du/des DSA sont importantes dans le pronostic rénal (4,5), d'autres facteurs intrinsèques au(x) DSA ont été établis. Il s'agit de la MFI (median fluorescence intensity), témoin indirecte de la quantité circulante du DSA (6,7), et de la présence de DSA de sous-

classe IgG1 et d'IgG3 (8,9). Ces sous classes étant connues comme les plus activatrices de la voie classique du complément (10), ces données plaident pour un rôle important du complément dans la pathogénie de l'ABMR. D'ailleurs, d'autres éléments vont dans le même sens : le fait que la capacité des DSA à lier le C1q/C3d in vitro soit associé à un moins bon pronostic (11), et la présence connue depuis longtemps, bien qu'inconstante, de C4d dans les capillaires péri-tubulaires des greffons rénaux en cas d'ABMR (12,13).

Il n'en demeure pas moins que la pathogénie d'ABMR ne met probablement pas en jeu que la cascade du complément, c'est à dire la CDC (complement dependent cytotoxicity) comme le laissait supposer la présence d'ABMR sans dépôts de C4d (13–15). En effet, Guidicelli et Loupy en 2016 ont confirmé que la présence de DSA C1qnégatif, n'activant pas le complément, altère la survie du greffon rénal(8,16). De plus il a récemment été montré que la présence de DSA IgG4 pouvait conduire à des lésions d'ABMR (17) alors que cette sous-classe n'active pas le complément. Les récents travaux de *Cornell & al* montrent également que les receveurs avec DSA pré-greffe recevant un traitement au long cours par eculizumab, permettant de bloquer l'effet du complément, développent des lésions d'ABMR(18). L'ensemble de ces données laisse présager un rôle pour l'ADCC dans la pathogénie de l'ABMR. Parmi les effecteurs cellulaires recrutés via les Fc récepteurs gamma, les lymphocytes NK (LyNK) sont l'objet d'un intérêt particulier. En effet, il a été montré que certains gènes exprimés exclusivement par les LyNK sont surexprimés dans l'ABMR alors même que la présence de LyNK était mise en évidence dans les capillaires péri-tubulaires sur les biopsies de greffons (19,20). De plus, il a été montré que le développement de la vasculopathie d'allogreffe chez le rat transplanté cardiaque est dépendante de la présence de LyNK (21,22). L'objectif de la présente étude est d'évaluer l'impact du taux de LyNK circulants sur la sévérité des rejets humoraux chez des patients transplantés rénaux présentant des DSA.

2 – PATIENTS ET METHODES

Il s'agit d'une étude rétrospective, observationnelle, monocentrique portant sur les patients transplantés rénaux entre 1985 et 2015 suivis au CHU de Tours.

1- Sélection des patients

Nous avons sélectionné les patients de l'étude parmi les 1616 patients dont au moins un sérum a fait l'objet d'une recherche d'anticorps anti-HLA en technique sensible Luminex One Lambda. Nous avons initialement exclu les patients immunisés avant la transplantation (n=393) pour sélectionner dans un second temps les 140 patients avec un ou plusieurs DSA apparus après la transplantation. Parmi ces 140 patients immunisés de novo, 3 patients ont été exclus de l'étude pour apparition de DSA après la reprise en dialyse, 2 pour présence de DSA le jour de la greffe, 2 car perdus de vue (changement de centre de suivi) et enfin 2 pour données manquantes portant à 131 le nombre de patients inclus dans l'étude (figure 1).

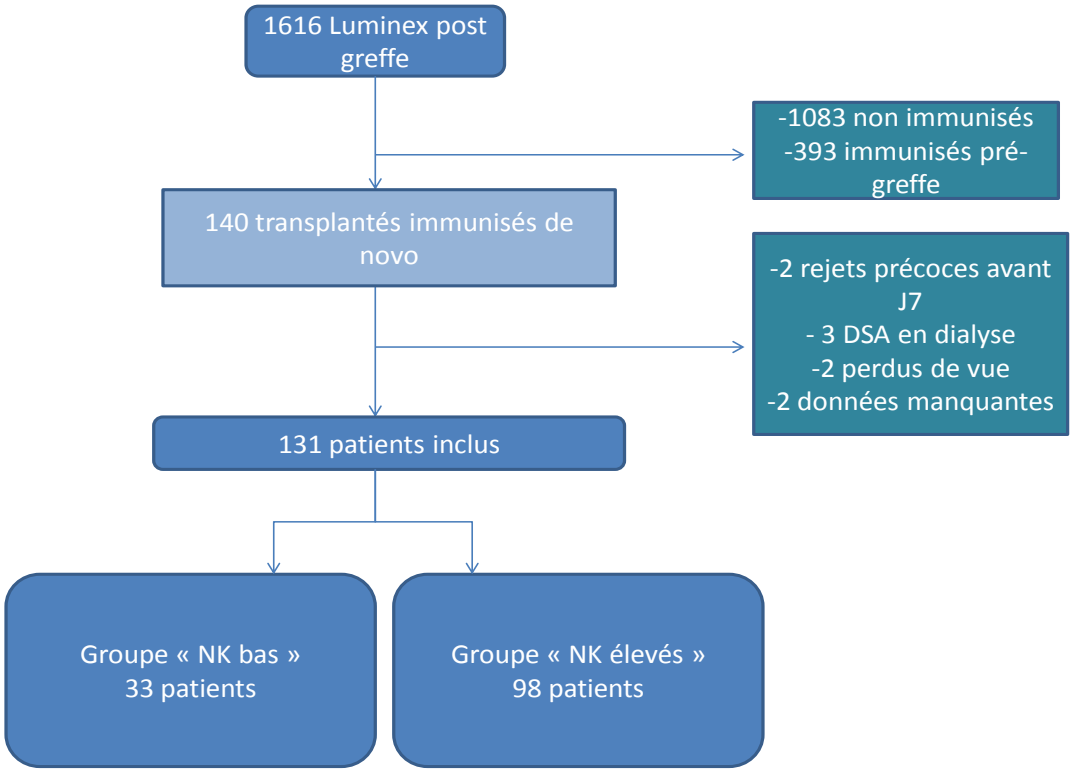

Figure 1 : diagramme de flux de l'étude

2- Les patients à Tours

Les patients transplantés rénaux au CHU de Tours bénéficient d'un traitement immunosuppresseur d'induction associant du méthylprednisolone (250mg en pré et post-opératoire) à du sérum anti-lymphocytaire durant 5 jours ou du basiliximab (Ac anti CD25) perfusé le jour de la greffe et au 4ème jour.

Le traitement d'entretien est une trithérapie qui comprend de la prednisone avec une décroissance progressive (dose moyenne à 3 mois : 10mg/j) ainsi que de l'acide mycophénolique ou de l'azathioprine. La 3ème molécule utilisée est soit du tacrolimus, de la ciclosporine, de l'everolimus ou du sirolimus. Les corticoïdes sont arrêtés au cours de la 1ère année chez les patients en 1ère greffe rénale sans risque immunologique, vascularite ou lupus.

Le dosage des sous-populations lymphocytaires, comprenant notamment les LyNK NK CD56+, est réalisé le jour de la transplantation en pré-opératoire, à M1, M3, M6, M12 puis de façon annuelle. Les échantillons sanguins sont mis en incubation avec des anticorps couplés à des fluorochromes (fluorescein isothiocyanate-anti CD3, phycoerythrin-anti CD19 et anti-CD56). Les analyses phénotypiques sont réalisées selon une procédure utilisant le système de cytométrie en flux Navios (Beckman Coulter Inc, Brea CA, USA).

La recherche d'anticorps anti-HLA est réalisée systématiquement au bilan annuel ainsi qu'en post-transfusionnel, lors de la réalisation de PBR ou au 4ème et 6ème perfusions d'immunoglobulines polyvalentes en cas de traitement d'un rejet humoral. La recherche d'Ac anti-HLA se fait en technique sensible Luminex One Lambda.

L'indication de PBR est posée en cas de présence d'Ac anti-HLA associé ou non à une élévation de la créatininémie ou de la protéinurie. Les PBR sont analysées en microscopie optique et immunofluorescence. Les biopsies sont interprétées selon la classification de Banff (13).

3- Les données recueillies

Au moment de la transplantation, les données suivantes ont été recueillies : cause d'IRC, type de donneur (vivant ou décédé), rang de greffe, temps d'ischémie froide, taux de LyNK, traitement d'induction immunosuppresseur, âge.

Au moment de la découverte des Ac anti-HLA : taux de LyNK, créatininémie, DFGe (formule MDRD), protéinurie en g/L, classe de DSA et MFI maximale, traitement immunosuppresseur d'entretien, âge.

Les mêmes paramètres ont également été recueillis au dernier bilan où le patient est connu non immunisé (PRE), à 6 mois (M6), 1 an (A1) et 2 ans (A2) après l'immunisation.

Le retour en dialyse, le décès ou le caractère fonctionnel ou non du greffon à la date la plus récente connue ont été relevés.

Les données histologiques pour les patients biopsiés, et notamment les résultats selon la classification de Banff, ont été recueillies avant l'instauration d'un éventuel traitement du rejet humoral.

4- Analyse

Nous avons constitué 2 groupes parmi les patients inclus en fonction du taux de lymphocytes NK :

- groupe « NK bas » comprenant les patients ayant une valeur de LyNK<67/mm3 au moment de la découverte des DSA (appelé temps de l'immunisation)

- groupe « NK élevés » comprenant les patients ayant une valeur de LyNK≥67/mm3 au moment de la découverte des DSA.

Le cut-off de 67/mm3 correspond à la valeur de LyNK du 1er quartile de notre population d'étude et a été choisi afin de sélectionner un groupe de patients avec un taux de LyNK faible, les normes des valeurs pour la population standard n'étant pas applicable à notre population. En effet nous avons fait l'hypothèse que les patients avec peu de LyNK avait un rapport effecteur-cible favorable (LyNK – cellule endothéliale) et éventuellement un meilleur pronostic rénal.

Nous avons comparé les 2 groupes pour :

- la survie des greffons rénaux après censure des décès

- la valeur de créatininémie, du DFGe et de la protéinurie au moment de la découverte des DSA (IMM) puis 6 mois (M6), 1 an (A1) et 2 ans (A2) après l'immunisation

- les lésions rénales histologiques de rejet humoral au moment de l'immunisation que sont la glomérulite (g), la capillarite (cpt) et la glomérulopathie d'allogreffe (cg). Pour l'analyse histologique, nous avons évalué la proportion de patients présentant des lésions inflammatoires de la micro-circulation (g et cpt) ou de glomérulopathie d'allogreffe ainsi que leur impact sur la survie des greffons rénaux quand ils sont présents.

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 avec utilisation du test de Mann-Whitney pour la comparaison de valeurs quantitatives entre les 2 groupes ainsi que du test de Fischer pour la comparaison de valeurs qualitatives. La réalisation des courbes de survie a été faite selon la méthode de Kaplan-Meier et la comparaison de 2 courbes via le test du log-rank. La significativité était définie par une valeur $p \leq 0.05$.

3 – RESULTATS

1- Population

Notre population d'étude comprenait 131 patients répartis en 2 groupes en fonction de leur taux de LyNK au moment de la découverte du ou des DSA.

Le groupe « NK bas » (valeur des lymphocytes NK au moment de l'immunisation <67/mm3) comprenait 33 patients alors que le groupe « NK élevés » en comprenait 98 (tableau 1).

Il n'existait pas de différence significative au niveau des valeurs de LyNK de notre cohorte entre le moment de l'immunisation, 1 an et 2 ans post-immunisation (immunisation : NK=128±90/mm3 - 1an : NK=132±103/mm3 p=0.91 - 2ans : NK=131.66±99.14/mm3 p=0.96).

La moyenne du taux de LyNK de notre cohorte à l'immunisation était de 128/mm3 avec une médiane de 110/mm3, un 3ème quartile à 180/mm3 et seulement 27 patients présentant un taux de NK>200/mm3 (norme basse du taux de lymphocytes NK au CHRU Tours).

Aucune différence significative n'a été retrouvée entre les 2 groupes au niveau du pourcentage de femme, de donneur vivant, de 1ère transplantation, de l'âge au moment de la transplantation et du délai d'immunisation, du traitement d'induction, de la protéinurie et du débit de filtration glomérulaire estimé par formule MDRD (DFGe) au bilan annuel précédant l'immunisation. On observait cependant dans le groupe « NK bas » un pourcentage supérieur de patients traités par azathioprine (p=0.01 pour le traitement initial à 3 mois de greffe, p<0.0001 pour le traitement d'entretien). On observait également un pourcentage de traitement par acide mycophénolique significativement plus important dans le groupe « NK élevés » (p=0.0003 au traitement à 3 mois, p=0.001 à l'entretien). On notait un taux significativement plus important de néphropathie interstitielle comme cause de l'insuffisance rénale chronique dans le groupe « NK bas » (p<0.0001).

Au cours du suivi (durée suivi moyen : 6 ±2.7ans) 10 décès (7.6% des patients) et 53 pertes de greffon (40.4% des patients) sont survenus.

La créatininémie moyenne de la cohorte avant immunisation était de 137 ±45.8µmol/L pour un DFG moyen à 50.90 ±16.94mL/min/1.73m² avec une protéinurie moyenne à 0.28 ±0.38g/L.

	cohorte 131 patients	NK bas 33 patients	NK élevés 98 patients	p
Hommes	83 (64.4%)	18 (54.5%)	66 (67%)	0.185
Age à la greffe (ans)	46.1 ± 16.61	46.42 ±14.63	45.15 ±17	0.59
Age à l'immunisation (ans)	52.14 ± 16.55	55.97 ±15.38	51.22 ±16	0.42
Délai greffe-immunisation (ans)	6.13	7.6 ±6	6.2 ±6.19	0.51
1ère greffe	128 (98%)	31 (94%)	98 (100%)	0.062
Donneur vivant	5 (3.8%)	0	5 (5.1%)	0.330
Tps ischémie froide (min)	1052 ±402	1138 ±354	1023 ±414	0.12
Induction				
Basiliximab	72 (55%)	15 (45.4%)	54 (55%)	0.337
SAL	58 (44%)	18 (54.5%)	41 (41%)	0.204
Entretien à 3 mois				
FK	46 (35%)	7 (21.2%)	28 (28.5%)	0.409
Ciclosporine	92 (70%)	22 (66.6%)	63 (63.5%)	0.804
Inhibiteur mtor	13 (10%)	4 (12.1%)	10 (10.2%)	0.758
MMF/MMA	94 (72%)	19 (57.5%)	85 (86.6%)	0.0003
Azathioprine	17 (13%)	10 (30.3%)	11 (11.2%)	0.01
Corticoïdes	124 (95%)	28 (84.8%)	93 (94.8%)	0.06
Entretien à l'immunisation				
FK	33 (25.2%)	6 (18%)	27 (27.5%)	0.284
Ciclosporine	73 (55.7%)	21 (63.6%)	52 (53%)	0.290
Inhibiteurs mtor	23 (17.5%)	5 (15.1%)	18 (18.3%)	0.675
MMF/MMA	114 (87%)	23 (69.6%)	91 (92.8%)	0.001
Azathioprine	8 (6.1%)	8 (24.2%)	0 (0%)	<0.0001
Corticoïdes	77 (58.7%)	19 (57.5%)	58 (59.1%)	0.871
Type DSA				
1	14 (10.90%)	11 (33.3%)	20 (20.4%)	0.131
MFI moyenne	3661 ± 2897	3065 ±2152	3988 ±3241	0.49
2	100 (75.9%)	28 (84.8%)	89 (90%)	0.337
MFI moyenne	6501 ± 3977	7189 ±4179	6269 ±3890	0.302
1+2	17 (13.2%)	6 (18.1%)	11(11.2%)	
Créatininémie pré-imm µmol/L	137 ±48	123 ±28	141 ±40	0.153
DFG pré-imm mL/min/1.73m²	50.9 ±16.9	52.5 ±14	50.4 ±17.1	0.629
Pu pré-imm g/L	0.28 ±0.38	0.18 ±0.4	0.32 ±0.38	0.490
Patients traités	68 (51.9%)	13(40%)	55(56%)	0.09
Causes IRC				
Glomérulopathie	37 (28%)	8 (25%)	29 (29.6%)	0.555
Diabète	8 (6.2%)	1 (3%)	7 (7.1%)	0.393
PKR	9 (6.9%)	0 (0%)	9 (9.2%)	0.111
Néphropathie interstitielle	16 (12.3%)	11 (33%)	5 (5.1%)	<0.0001
Uropathie	9 (6.9%)	0 (0%)	9 (9.2%)	0.111
Vasculaire	8 (6.2%)	0 (0%)	8 (8.1%)	0.201
Autres	44 (33.5%)	13 (39%)	31 (31.7%)	0.414

Tableau 1 : comparaison des caractéristiques des patients des 2 groupes de l'étude

2- Impact du taux de lymphocytes NK à l'immunisation

Fonction rénale

La créatininémie au moment de la découverte des DSA tendait à être moins élevée dans le groupe « NK bas » que dans le groupe « NK élevés » (134±33 µmol/L versus 174±111 µmol/L, p=0.08). Concernant le DFGe, il n'était pas observé de différence significative entre les 2 groupes au moment de l'immunisation (DFGe NK bas=48.9±14.4 mL/min/1.73m² vs NKélevés=45.2±18 mL/min/1.73m², p=0.350) (figure 2).

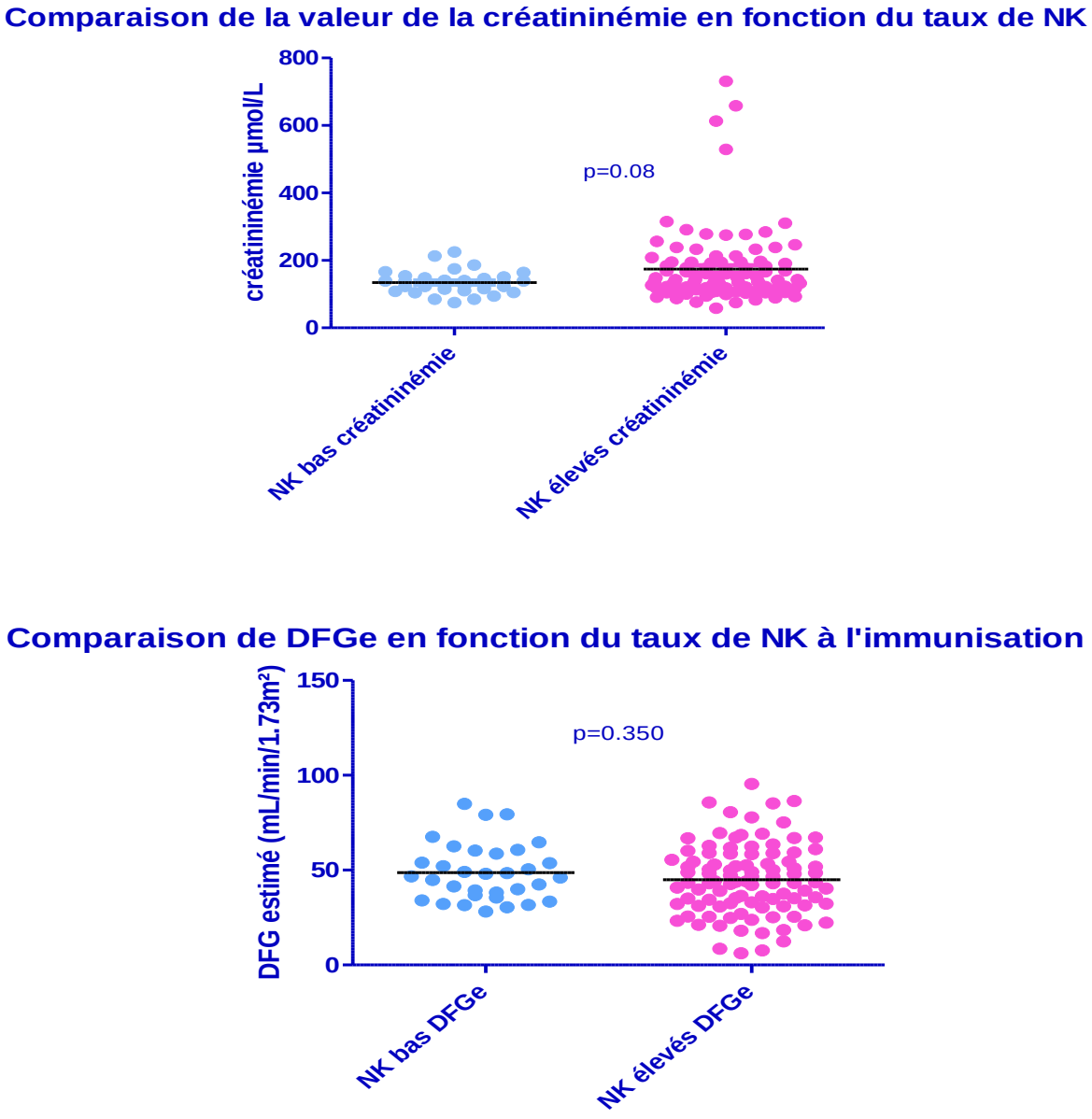

Figure 2 : créatininémie et DFGe au moment de l'immunisation selon le taux de Ly NK

Protéinurie

La comparaison du taux de protéinurie au moment de l'immunisation retrouvait une différence proche de la significativité avec un taux plus important dans le groupe « NK élevés » (Pu NK élevés=0.59±0.7g/L vs Pu NK bas=0.28±0.3 g/L p=0.06) (figure3). De plus la proportion de patient avec une protéinurie > 1g/L était de 16/98 (16.3%) dans le groupe « NK élevés » vs 1/33 (3%) dans le groupe « NK bas » (p=0.06) (figure4).

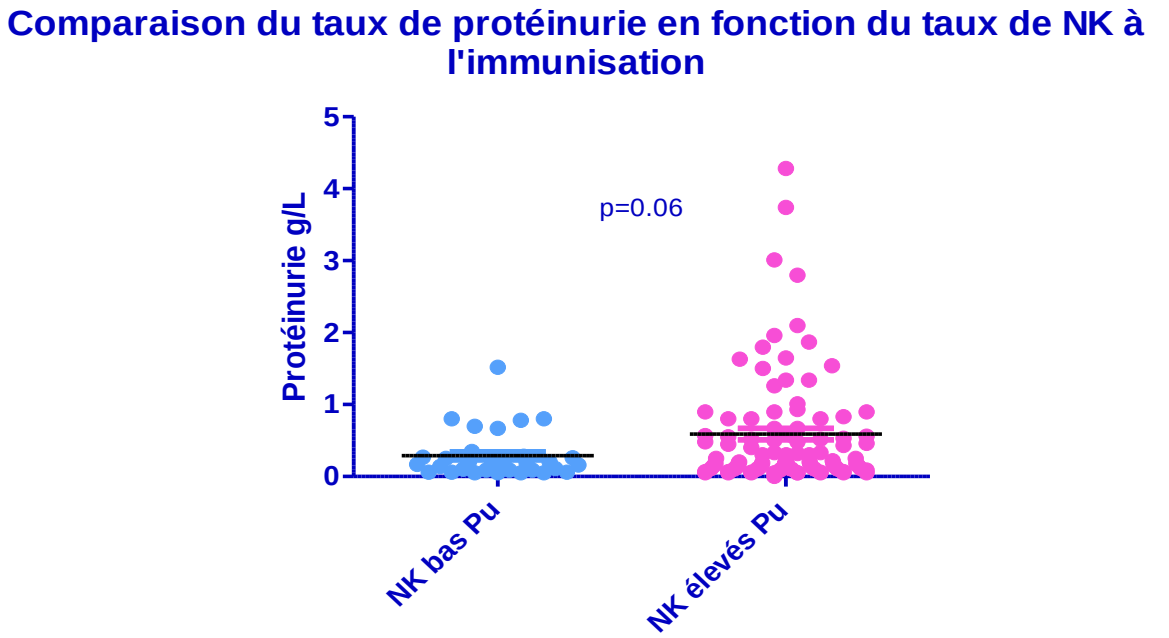

Figure 3 : taux de protéinurie en fonction du taux de Ly NK

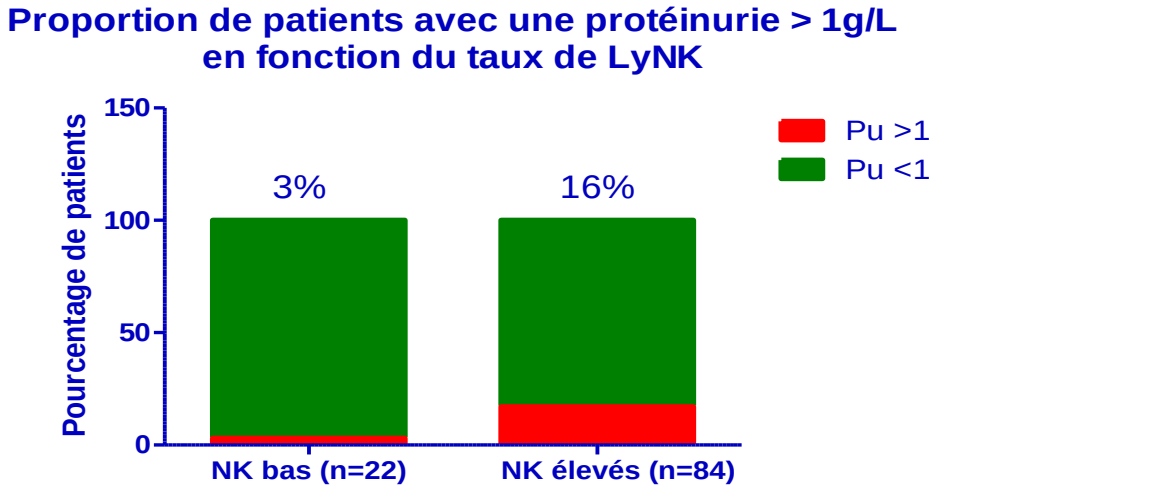

Figure 4 : proportion de patient avec protéinurie > 1g/L à l'immunisation selon taux de LyNK

Lésions histologiques

Parmi notre population, 106 patients ont été biopsiés avec des résultats contributifs (84 patients soit 85.7% des patients dans le groupe « NK élevés » ; 22 patients soit 71% des patients dans le groupe « NK bas »).

Parmi les patients non biopsiés (14 dans le groupe « NK élevés » ; 11 dans le groupe « NK bas ») différentes causes expliquaient l'absence de recherche d'histologie :

- groupe « NK bas » : 8 patients car fonction rénale normale ; 3 patients car présence d'une néoplasie évoluée

- groupe « NK élevés » : 7 car fonction rénale normale ; 3 car fonction rénale trop dégradée ; 1 car anticoagulation non arrêtable ; 1 car refus du patient ; 1 car démence évoluée ; 1biopsié mais sans matériel rénal récupéré.

La survie rénale chez ces patients non biopsiés était meilleure dans le groupe « NK bas » (médiane de survie « NK bas » non calculable vs 3.4 ans pour les patients « NK élevés » p=0.036 (figure 5).

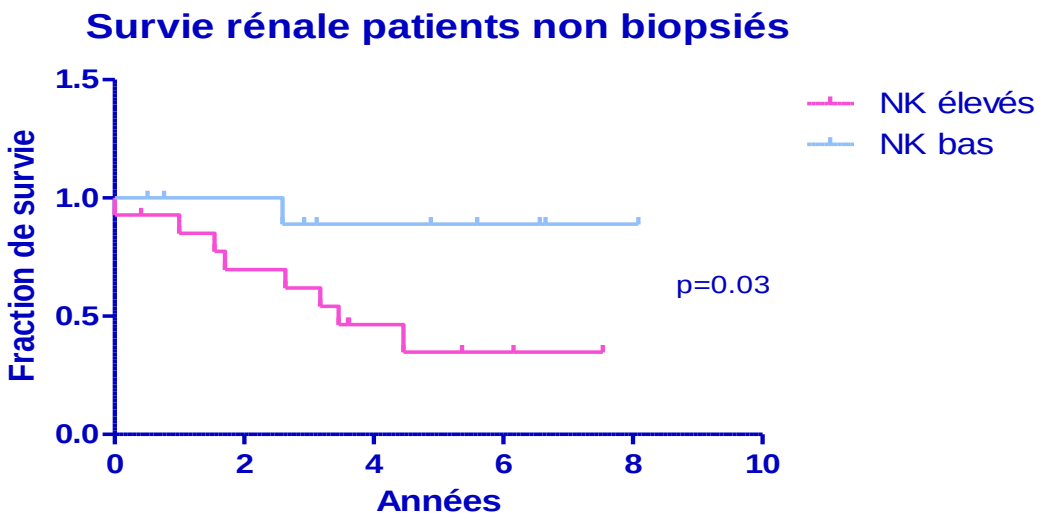

Figure 5 : survie rénale des patients non biopsiés en fonction du taux de Ly NK

L'analyse des données histologiques a mis en évidence une fréquence accrue de la glomérulite dans le groupe « NK élevés » (g>0 : 63 patients (75%) vs 12 patients (54%) p=0.01) alors que la proportion de patients avec une capillarite péri-tubulaire n'était pas influencer par le taux de LyNK au moment de l'immunisation (cpt>0 : 41 patients (48.8%) vs 9 patients (40.9%), p=0.36) et finalement la somme des scores de glomérulite et de capillarite était similaires. Enfin, la glomérulopathie d'allogreffe était retrouvées chez environ un tiers des patients dans chaque groupe (35.7% vs 36.3%, p=0.80) (tableau 2 et figure 6).

	Cohorte(n=106)	NK bas(n=22)	NK élevés(n=84)	p
g>0	75 (71%)	12 (54%)	63 (75%)	0.01
cpt>0	50 (47%)	9 (40.9%)	41 (48.8%)	0.47
g+cpt≥2	31 (29%)	5 (22%)	26 (31%)	0.60
cg>0	38 (35.8%)	8 (36.3%)	30 (35.7%)	0.80

Tableau 2 : Comparaison des lésions histologiques de glomérulite (g), capillarite (cpt) et glomérulopathie d'allogreffe (cg) en fonction du taux de Ly NK

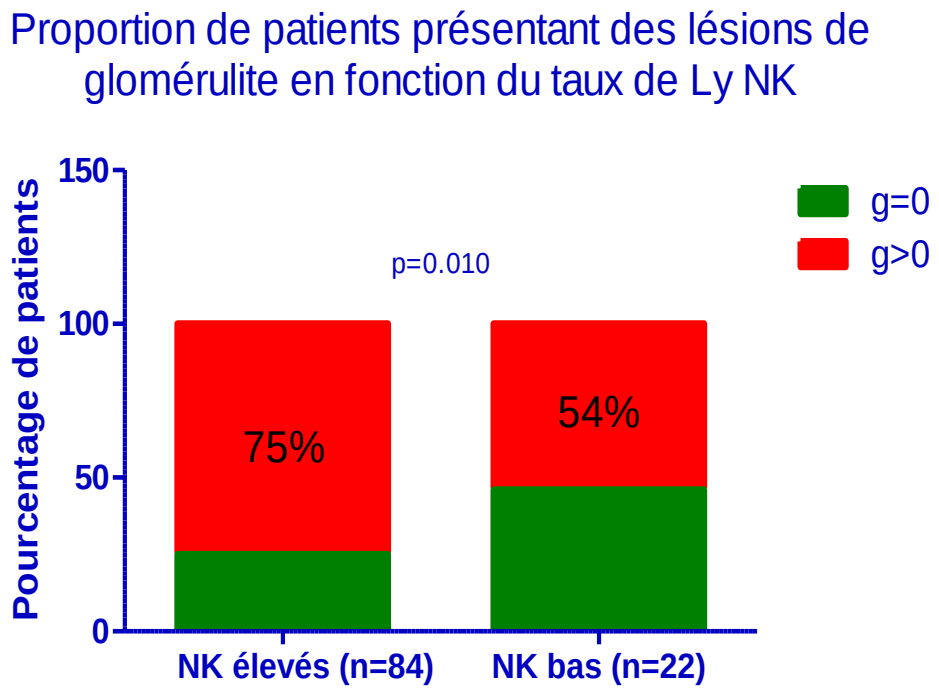

Figure 6 : proportion de patients présentant des lésions de glomérulite en fonction du taux de Ly NK

L’analyse de l’impact de la glomérulite (g>0) sur la survie rénale met en évidence un effet délétère avec une médiane de survie de 6.2 ans en présence de lésions versus 7.8 ans en leur absence (p=0.070). (figure 7)

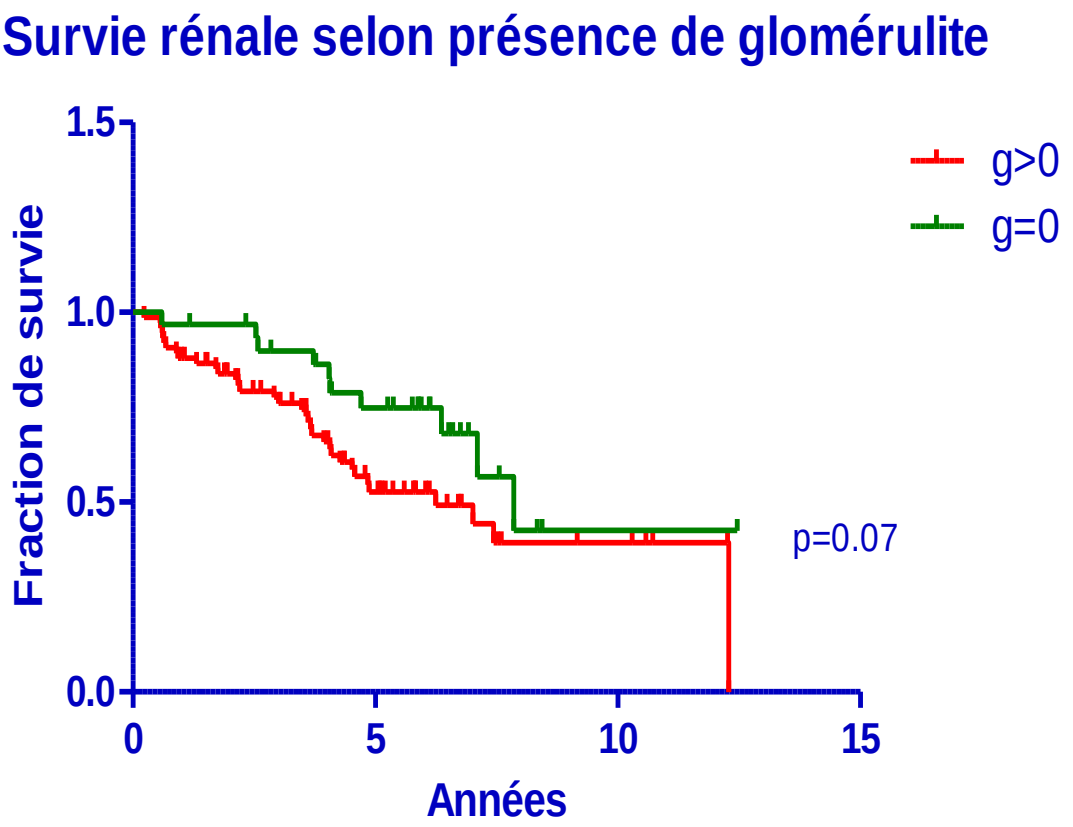

Figure 7 : impact de la glomérulite sur la survie rénale

3- Impact du taux de lymphocytes NK sur le devenir de la greffe

Fonction rénale

L'analyse de l'évolution du DFGe, à l'immunisation (IMM), à 6 mois (M6), 1 an (A1) et 2 ans post-immunisation (A2) ne retrouve de différence significative entre les groupes « NK bas » et « NK élevés » à aucun de ces 4 temps :

- immunisation : DFGe NK bas=48.9±14.4 vs NK élevés=45.2±18 mL/min/1.73m² ; p=0.350

- M6 : DFGe NK bas=49.8±18.2 vs NK élevés=44.6±19.3 mL/min/m² ; p=0.234

- A1 : DFGe NK bas=49.7±18.6 vs NK élevés=43.7±18.2 mL/min/1.73m² ; p=0.239

-A2 : DFGe NK bas=47.9±18.71 vs NK élevés=40.2±18.41 mL/min/1.73m² ; p=0.142

La différence entre les valeurs de DFGe moyen entre les 2 groupes tend cependant à se majorer au cours du temps avec une différence passant de 2.1 mL/min/1.73m² en pré-immunisation à 3.6 mL/min/1.73m² à l'immunisation puis 5.2 mL/min/1.73m² à 6 mois post-immunisation et enfin 7.7 mL/min/1.73m² à 1an post-immunisation (figure 8).

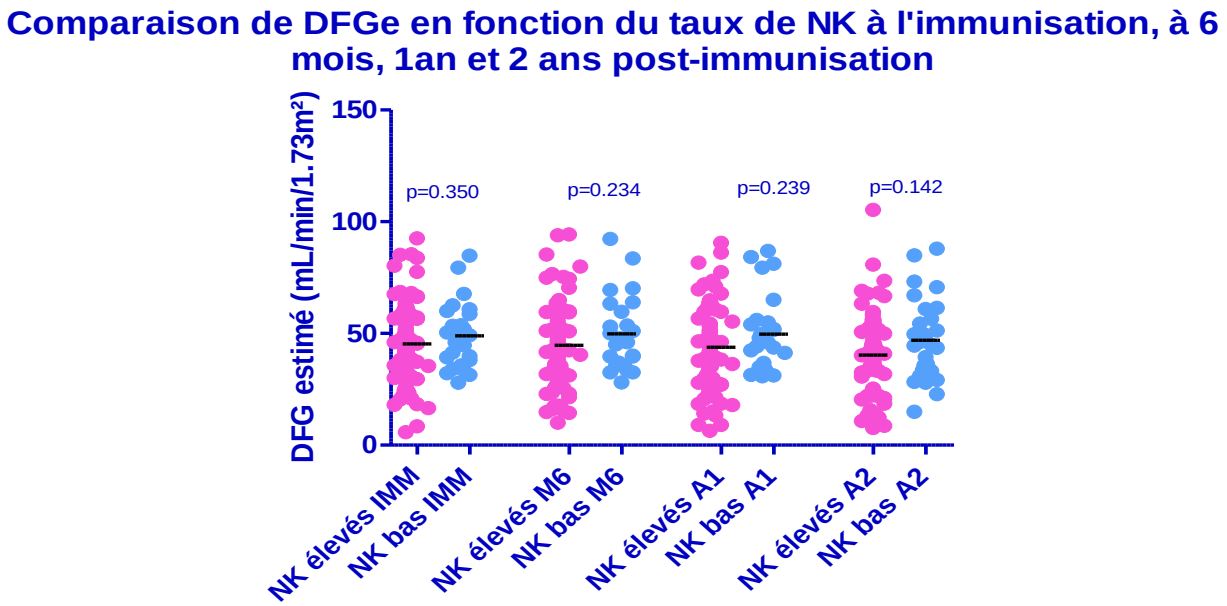

Figure 8 : DFGe à l'immunisation, à 6 mois, 1 an et 2 ans post-immunisation en fonction du taux de NK

L'analyse de l'évolution du DFGe au cours du temps des patients du groupe « NK élevés » montre une dégradation significative par rapport au DFG pré-immunisation :

DFGe PRE=50.4±17.1 vs DFGe IMM=45.2±17.5 mL/min/1.73m² p=0.045

PRE vs DFGe M6=44.6±17.9 mL/min/1.73m² p=0.024

PRE vs DFGe A1=43.7±18.2 mL/min/1.73m² p=0.021

PRE vs DFGe A2=40.2±18.6 mL/min/1.73m² p=0.0003 (figure 9).

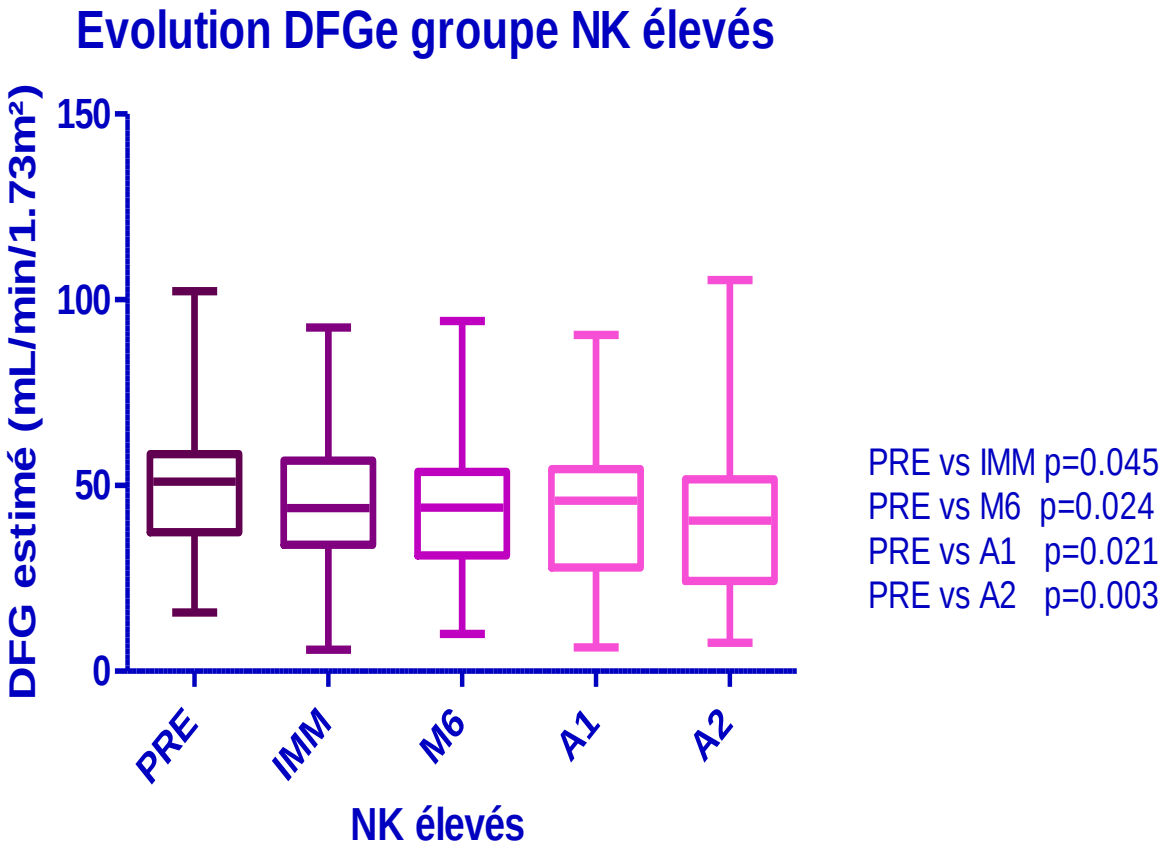

Figure 9 : évolution du DFGe au cours du temps dans le groupe « NK élevés »

L’analyse de l’évolution du DFGe au cours du temps des patients du groupe « NK bas » ne montre pas de dégradation significative par rapport au DFG pré-immunisation :

DFGe PRE=52.5±14 vs DFGe m IMM=48.9±14.4 mL/min/1.73m² p=0.336

PRE vs DFGe M6=49.8±16.1 mL/min/1.73m² p=0.345

PRE vs DFGe A1=49.7±17 mL/min/1.73m² p=0.284

PRE vs DFGe A2=47.9±18.7 mL/min/1.73m² p=0.134 (figure 10).

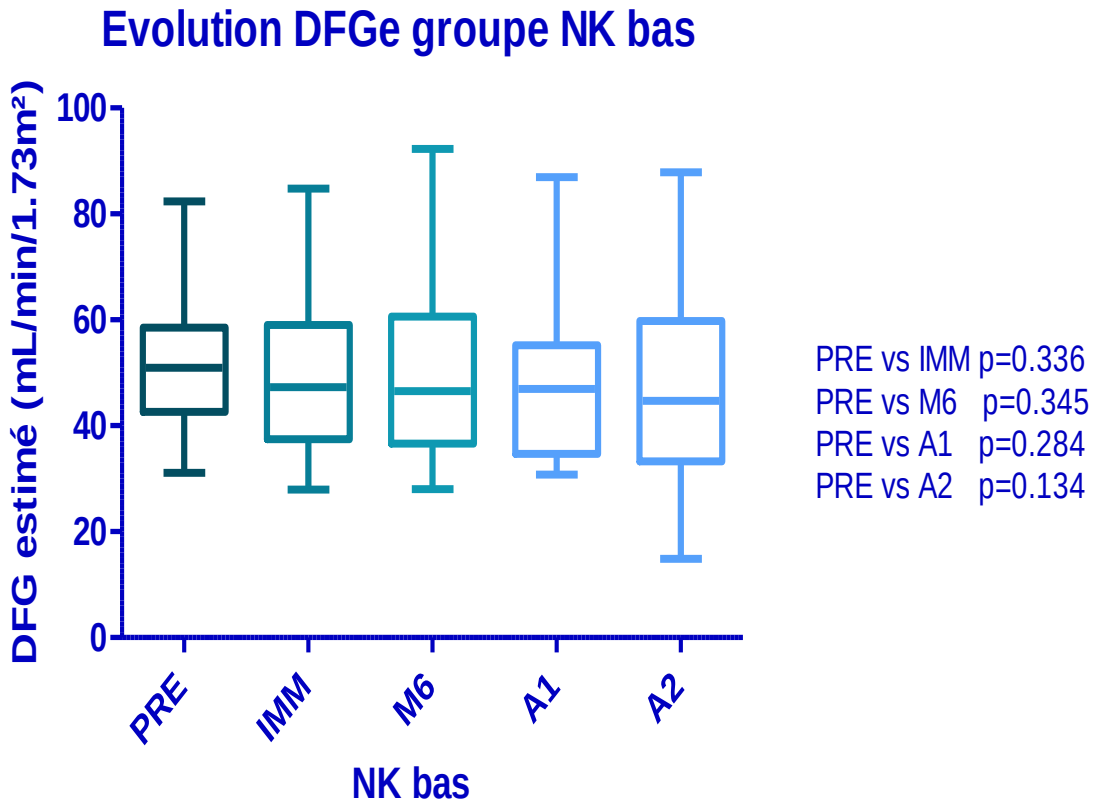

Figure 10 : évolution du DFGe au cours du temps dans le groupe « NK bas »

Protéinurie

L'analyse de la protéinurie aux différents temps de suivi (à l'immunisation, 6 mois et un an après immunisation) révèle une différence significative entre les taux de protéinurie des 2 groupes « NK bas » et « NK élevés » avec des valeurs moyennes de protéinurie plus élevées pour ce dernier groupe :

Pu IMM : NK élevés = 0.59±0.7 vs NK bas = 0.28±0.3 g/L p=0.06

Pu M6 : NK élevés = 0.70±0.8 vs NK bas = 0.36±0.4 g/L p=0.07

Pu A1 : NK élevés = 0.62±0.8 vs NK bas = 0.23±0.2 g/L p=0.005

Pu A2 : NK élevés = 0.78±1.1 vs NK bas = 0.36±0.4 g/L p=0.03 (figure 11)

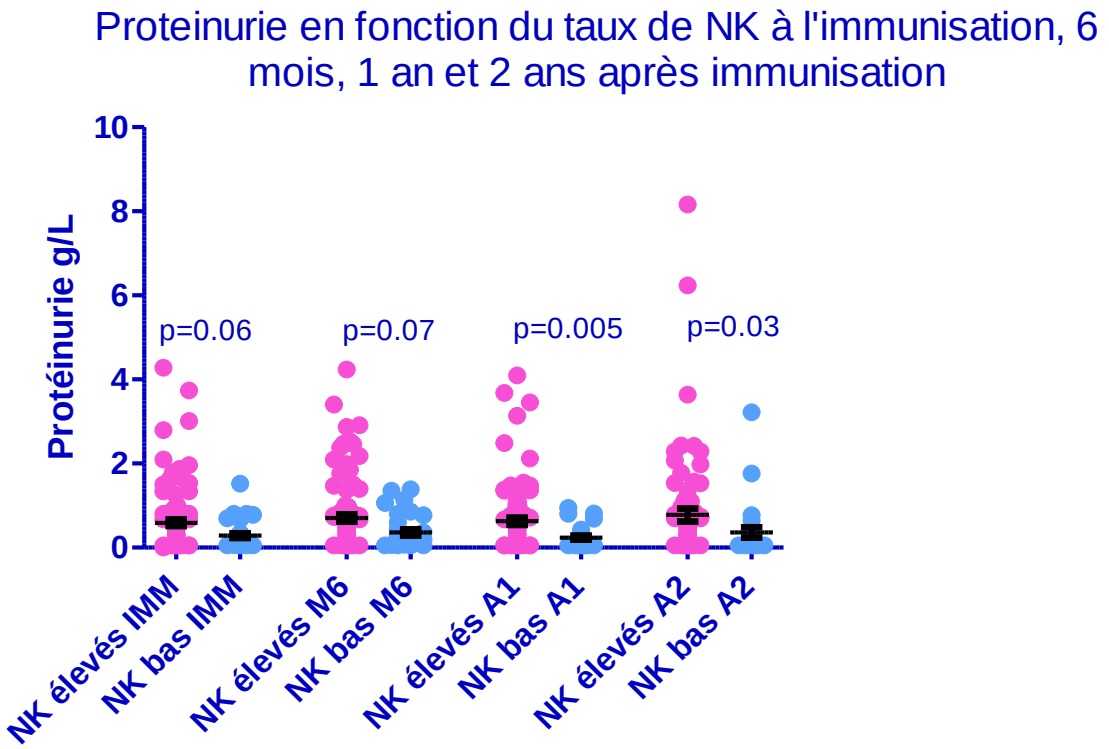

Figure 11 : protéinurie à l'immunisation, 6 mois, 1 an et 2 ans post-immunisation en fonction du taux de LyNK

Survie rénale

L'analyse des courbes de survie des greffons rénaux met en évidence une meilleure survie rénale dans le groupe « NK bas » (p=0.055, médiane de survie NK bas=10 ans / NK élevés=7.5 ans) (figure 12). Les patients décédés avec un greffon fonctionnel n'ont pas été considérés comme présentant l'évènement (la perte du greffon) mais comme censurés hormis un patient pour lequel il n'a pas été réalisé de reprise en dialyse suite à la perte du greffon compte tenu de l'état général.

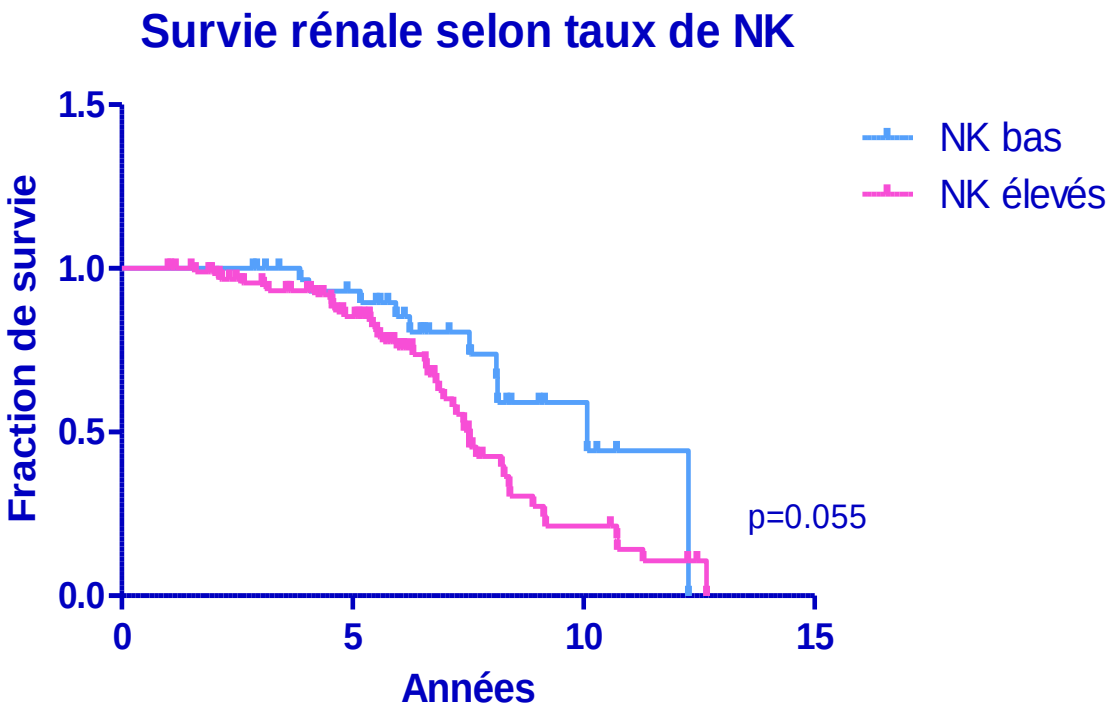

Figure 12 : survie rénale en fonction du taux de lymphocytes NK

4 – DISCUSSION

Cette étude met en évidence l'impact du taux de Ly NK circulants sur la sévérité des rejets humoraux chez les patients transplantés rénaux immunisés de novo. Nous mettons en évidence une fréquence accrue de patients avec une glomérulite sur la biopsie réalisée dans les suites de l'identification du DSA, ce qui peut être rapproché au niveau de protéinurie légèrement plus élevé lorsque le taux de NK est plus élevé. Surtout, nous montrons que la fonction rénale se dégrade dans le groupe avec le plus de NK et que finalement la perte de greffon est peut-être plus fréquente (résultat proche de la significativité).

Les analyses comparant les valeurs de DFGe entre les groupes « NK bas » et « NK élevés » à l'immunisation, 6 mois, 1 an et 2 an post-immunisation ne retrouvent pas de différence significative néanmoins la différence de DFGe entre les 2 groupes se majore au cours du temps et l'on observe une dégradation significative de la fonction rénale entre le temps de l'immunisation et à 2 ans post-immunisation dans le groupe « NK élevés », résultat non retrouvé dans le groupe « NK bas ». Le suivi pour cette analyse n'étant que de 2 ans et sachant que la médiane de survie de la cohorte de l'étude est de 7 ans, une durée de suivi plus longue pourrait faire apparaitre une différence significative concernant le DFGe.

Les analyses concernant la protéinurie retrouvent une protéinurie significativement plus faible dans le groupe « NK bas » avec des résultats devenant franchement significatifs à un an mettant en évidence également l'augmentation des différences entre les 2 groupes au cours du temps. On observe également une proportion de patient présentant une protéinurie > 1g/L supérieure dans le groupe « NK élevés ». Ces résultats sont d'autant plus importants que plusieurs équipes ont mis en évidence de façon significative que la protéinurie est un facteur de risque indépendant de perte de greffon et de décès (23,24).

Les analyses histologiques retrouvent un taux de glomérulite significativement moins élevé dans le groupe « NK bas ». Ce résultat est d'autant plus important que l'analyse de survie rénale en fonction de la présence ou non de glomérulite dans notre cohorte tend à montrer que cette atteinte histologique est un facteur de risque de perte de greffon. Les analyses histologiques de notre étude retrouvent également des résultats déjà décrits dans de précédents travaux (4,5,12,25) à savoir que la présence de lésions inflammatoires de la microcirculation sur la biopsie rénale est associée de façon significative à une survie rénale moindre. De plus ces résultats sont probablement minorés par le fait que, dans notre étude, parmi les patients non biopsiés, la survie rénale est nettement moins bonne dans le groupe « NK élevés » avec des patients présentant donc probablement des lésions histologiques plus sévères.

La pathogénie de la glomérulite chez le patient immunisé est discutée. En effet, bien qu'elle soit habituellement regroupée sous le couvert de "l'inflammation de la microcirculation" du fait de sa forte association avec la capillarite en présente de DSA (13), il est possible qu'elle résulte plus d'un mécanisme cellulaire qu'humoral. Ainsi, Homs *et al.* ont mis en évidence que le niveau d'expression génique (ARNm) de T-Bet, de l'interféron-ɣ et du granzyme B au sein des glomérules des patients avec une glomérulopathie d'allogreffe était plus élevé que chez les patients sans glomérulopathie d'allogreffe. Cette surexpression de granzyme B a été interprétée par les auteurs comme le témoin d'une activité cytotoxique des lymphocytes T CD8, mais l'implication des LyNK ne peut être exclue (26). Les équipes d'*Hidalgo & al* en 2015 retrouvaient également un infiltrat de lymphocytes NK au niveau des biopsies rénales de patients transplantés présentant un rejet humoral chronique ainsi qu'une augmentation de transcrits d'ARNm exprimés spécifiquement au niveau des Ly NK mettant ainsi en évidence une implication de la cytotoxicité NK dans l'ABMR (19). Un marquage CD56 sur nos différentes biopsies rénales permettrait de mettre en évidence le rôle de la cytotoxicité NK dans l'ABMR. De même, les équipes de *Hirohashi & al* et *Uehara & al* ont montré cette

implication par l'absence de développement de vasculopathie d'allogreffe sur des transplants cardiaques de souris immunisés avec des DSA en l'absence de Ly NK malgré un système du complément fonctionnel (21,22,27).

Notre étude suggère donc un impact du taux de lymphocytes NK dans le rejet humoral chez le greffé rénal avec un pronostic péjoratif en cas de taux de lymphocytes NK élevé >67/mm3.

Ces données laissent donc supposer un intérêt potentiel des lymphocytes NK comme cible thérapeutique lors du traitement du rejet humoral chez le greffé rénal. De précédentes études ont montré que les traitements utilisés habituellement en transplantation rénale impactent de manière différente les sous-populations lymphocytaires dont les lymphocytes NK. En 2006 *Vacher-Coponat & al* ont montré qu'une stratégie immunosuppressive associant FK/MMF permettait une meilleure préservation des fonctions d'immunité innée et de cytotoxicité des lymphocytes NK qu'une stratégie associant Ciclosporine/Azathioprine (28). Ces données sont retrouvées dans notre étude avec un pourcentage de patients traités par Azathioprine significativement supérieur dans le groupe « NK bas » et a contrario un taux de traitement par MMF significativement supérieur dans le groupe « NK élevés ». Ces éléments suggèrent de nouvelles modifications thérapeutiques lors du rejet humoral permettant de contrôler les fonctions des lymphocytes NK. Il faut néanmoins pondérer ces données par l'observation de la survenue de trois néoplasies évolutives dans le groupe « NK bas » alors qu'aucune n'étaient à déplorer dans le groupe « NK élevés » ainsi que le fait que le risque d'émergence de DSA est moindre chez les patients traités par acide mycophénolique en comparaison aux patients sous Azathioprine (29).

L'analyse de l'impact des LyNK dans le rejet humoral comprend un aspect quantitatif, observé dans notre étude, mais doit également évaluer l'aspect fonctionnel de ces cellules cytotoxiques. En 2016 *Legris & al* ont développé un test fonctionnel non invasif évaluant

l'activation des LyNK chez le patient greffé rénal et ont montré une association entre dégradation de fonction rénale et cette activation. Ils ont également identifié que le niveau d'engagement du FcyRIIIa (CD16), récepteur membranaire présent au niveau des lymphocytes NK permettant une interaction et une stimulation du lymphocyte par l'anticorps, est un marqueur spécifique de l'ABMR et est associé au pronostic rénal des greffons (30). La découverte du polymorphisme du FcyRIIIa158V-F qui modifie l'affinité du CD16 pour le Fc des IgG et ainsi la capacité d'activation des LyNK par l'anticorps a permis de mettre en évidence un phénotype avec une plus forte affinité du FcyRIIIa pour le Fc des IgG (FcyRIIIa158 V-V) (31–35). L'étude de l'impact du polymorphisme du FcyRIIIa sur le pronostic du greffon chez les patients immunisés pourrait donc s'avérer intéressante.

Un des principaux éléments discutables de cette étude est la décision d'avoir scindé notre cohorte en 2 groupes en prenant comme cut-off un taux de lymphocytes NK de 67/mm3. Nous pensons que cela pouvait être fait car il n'existe pas dans la littérature, à notre connaissance, de seuil de LyNK pour discriminer les patients "normaux" des autres, comme cela est le cas pour les lymphocytes T CD4. Cela est sûrement du à l'absence de pathologie associée au déficit en NK. Cela se traduit d'ailleurs par une grande variabilité de la borne « normale inférieure » entre les laboratoires, pouvant aller de 70 à 200/mm3 (les normes du laboratoire du CHU de Tours étant de 200 à 400/mm3). Notre population, de part la transplantation rénale et l'exposition aux traitements immunosuppresseurs pouvant impacter les sous-populations lymphocytaires, ne peut être comparée à la population standard sur laquelle les normes de taux de NK sont établies (28,36). En effet la moyenne du taux de lymphocytes NK de notre cohorte était de 128/mm3 avec une médiane de 110/mm3, un 3ème quartile à 180/mm3 et seulement 27 patients présentant un taux de NK>200/mm3 (norme basse du taux de lymphocytes NK au CHRU Tours).

Il s'agit d'une étude rétrospective, monocentrique pouvant donc entrainer un biais de sélection concernant les patients de notre cohorte. Néanmoins nous avons pu inclure la quasi-totalité des patients avec DSA de novo suivis à Tours (131 patients inclus sur 140 patients identifiés avec DSA de novo).

Plusieurs résultats dans cette étude sont à la limite de la significativité comme l'analyse de survie rénale. Cet aspect peut être expliqué par les faibles effectifs de nos 2 groupes, notamment le groupe « NK bas » avec seulement 33 patients. Cela peut aussi témoigner que l'ADCC reste un mécanisme moins important que le complément dans la pathogénie de l'ABMR et donc plus difficile à mettre en évidence.

Néanmoins, cette étude observationnelle supporte l'intérêt d'une étude longitudinale de plus grande envergure (effectifs plus importants, durée de suivi plus longue).

Il s'agit de la première étude portant sur l'impact de l'ADCC dans la sévérité du rejet humoral avec une cohorte relativement importante de 131 patients.

5 – CONCLUSION

Un taux de LyNK circulants élevé chez les patients greffés rénaux immunisés de novo implique une fréquence accrue de glomérulite, une dégradation de la fonction rénale à long terme, un niveau de protéinurie élevé se majorant au cours du temps et enfin pourrait entrainer une survie rénale moindre. Ces données, à travers l'étude des LyNK, font approcher le rôle de l'ADCC dans la pathogénie de l'ABMR.

6 – REFERENCES

1. Meier-Kriesche H-U, Schold JD, Kaplan B. Long-Term Renal Allograft Survival: Have we Made Significant Progress or is it Time to Rethink our Analytic and Therapeutic Strategies? Am J Transplant. 2004 Aug;4(8):1289–95.

2. Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al. Understanding the Causes of Kidney Transplant Failure: The Dominant Role of Antibody-Mediated Rejection and Nonadherence: Attributing Causes of Kidney Transplant Loss. Am J Transplant. 2012 Feb;12(2):388–99.

3. Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Lefaucheur C, Anglicheau D, Zuber J, et al. Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. 2009 Nov;9(11):2561–70.

4. de Kort H, Willicombe M, Brookes P, Dominy KM, Santos-Nunez E, Galliford JW, et al. Microcirculation Inflammation Associates With Outcome in Renal Transplant Patients With *De Novo* Donor-Specific Antibodies: Microcirculation and *De Novo* DSA. Am J Transplant. 2013 Feb;13(2):485–92.

5. 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 Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. 2009 Nov;9(11):2520–31.

6. Mujtaba MA, Goggins W, Lobashevsky A, Sharfuddin AA, Yaqub MS, Mishler DP, et al. The strength of donor-specific antibody is a more reliable predictor of antibody-mediated rejection than flow cytometry crossmatch analysis in desensitized kidney recipients. Clin Transplant. 2011 Feb;25(1):E96–102.

7. O'Leary JG, Kaneku H, Susskind BM, Jennings LW, Neri MA, Davis GL, et al. High Mean Fluorescence Intensity Donor-Specific Anti-HLA Antibodies Associated With Chronic Rejection Postliver Transplant: DSA Found in Post-OLT Chronic Rejection. Am J Transplant. 2011 Sep;11(9):1868–76.

8. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen J-P, Mooney N, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. N Engl J Med. 2013 Sep 26;369(13):1215–26.

9. O'Leary JG, Kaneku H, Banuelos N, Jennings LW, Klintmalm GB, Terasaki PI. Impact of IgG3 Subclass and C1q-Fixing Donor-Specific HLA Alloantibodies on Rejection and Survival in Liver Transplantation: IgG3 and C1q-Fixing DSA in Liver Transplantation. Am J Transplant. 2015 Apr;15(4):1003–13.

10. Bindon CI, Hale G, Brüggemann M, Waldmann H. Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. J Exp Med. 1988;168(1):127–42.

11. Yabu JM, Higgins JP, Chen G, Sequeira F, Busque S, Tyan DB. C1q-Fixing Human Leukocyte Antigen Antibodies Are Specific for Predicting Transplant Glomerulopathy and Late Graft Failure After Kidney Transplantation: Transplantation. 2011 Feb;91(3):342–7.

12. Loupy A, Hill GS, Suberbielle C, Charron D, Anglicheau D, Zuber J, et al. Significance of C4d Banff Scores in Early Protocol Biopsies of Kidney Transplant Recipients with Preformed Donor-

Specific Antibodies (DSA): Significance of C4d Banff Scores in Early Protocol Biopsies. Am J Transplant. 2011 Jan;11(1):56–65.

13. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. 2014 Feb;14(2):272–83.

14. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. 2009 Oct;9(10):2312–23.

15. Miura M, Ogawa Y, Kubota KC, Harada H, Shimoda N, Ono T, et al. Donor-specific antibody in chronic rejection is associated with glomerulopathy, thickening of peritubular capillary basement membrane, but not C4d deposition. Clin Transplant. 2007;21(s18):8–12.

16. Guidicelli G, Guerville F, Lepreux S, Wiebe C, Thaunat O, Dubois V, et al. Non-Complement-Binding De Novo Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Kidney Allograft Survival. J Am Soc Nephrol JASN. 2016 Feb;27(2):615–25.

17. Lefaucheur C, Viglietti D, Bentlejewski C, Duong van Huyen J-P, Vernerey D, Aubert O, et al. IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury. J Am Soc Nephrol. 2016 Jan 1;27(1):293–304.

18. Cornell LD, Schinstock CA, Gandhi MJ, Kremers WK, Stegall MD. Positive Crossmatch Kidney Transplant Recipients Treated With Eculizumab: Outcomes Beyond 1 Year: Late Outcomes After Eculizumab. Am J Transplant. 2015 May;15(5):1293–302.

19. Hidalgo LG, Sis B, Sellares J, Campbell PM, Mengel M, Einecke G, et al. NK Cell Transcripts and NK Cells in Kidney Biopsies from Patients with Donor-Specific Antibodies: Evidence for NK Cell Involvement in Antibody-Mediated Rejection: Transcripts Selective for Donor-Specific Antibody. Am J Transplant. 2010 Jul 15;10(8):1812–22.

20. Hidalgo LG, Sellares J, Sis B, Mengel M, Chang J, Halloran PF. Interpreting NK Cell Transcripts Versus T Cell Transcripts in Renal Transplant Biopsies: NK Cell Transcripts in Transplant Biopsies. Am J Transplant. 2012 May;12(5):1180–91.

21. Hirohashi T, Chase CM, Della Pelle P, Sebastian D, Alessandrini A, Madsen JC, et al. A novel pathway of chronic allograft rejection mediated by NK cells and alloantibody. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. 2012 Feb;12(2):313–21.

22. Uehara S, Chase CM, Kitchens WH, Rose HS, Colvin RB, Russell PS, et al. NK Cells Can Trigger Allograft Vasculopathy: The Role of Hybrid Resistance in Solid Organ Allografts. J Immunol. 2005 Sep 1;175(5):3424–30.

23. Halimi J-M, Buchler M, Al-Najjar A, Laouad I, Chatelet V, Marlière J-F, et al. Urinary Albumin Excretion and the Risk of Graft Loss and Death in Proteinuric and Non-proteinuric Renal Transplant Recipients. Am J Transplant. 2007 Mar;7(3):618–25.

24. Amer H, Cosio FG. Significance and Management of Proteinuria in Kidney Transplant Recipients. J Am Soc Nephrol. 2009 Dec 1;20(12):2490–2.

25. Gupta A, Broin PÓ, Bao Y, Pullman J, Kamal L, Ajaimy M, et al. Clinical and molecular significance of microvascular inflammation in transplant kidney biopsies. Kidney Int. 2016;89(1):217–25.

26. Homs S, Mansour H, Desvaux D, Diet C, Hazan M, Buchler M, et al. Predominant Th1 and Cytotoxic Phenotype in Biopsies from Renal Transplant Recipients with Transplant Glomerulopathy. Am J Transplant. 2009 May;9(5):1230–6.

27. Hirohashi T, Uehara S, Chase CM, DellaPelle P, Madsen JC, Russell PS, et al. Complement independent antibody-mediated endarteritis and transplant arteriopathy in mice. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. 2010 Mar;10(3):510–7.

28. Vacher-Coponat H, Brunet C, Moal V, Loundou A, Bonnet E, Lyonnet L, et al. Tacrolimus/Mycophenolate Mofetil Improved Natural Killer Lymphocyte Reconstitution One Year After Kidney Transplant by Reference to Cyclosporine/Azathioprine: Transplantation. 2006 Aug;82(4):558–66.

29. Lederer SR, Friedrich N, Banas B, Welser G, Albert ED, Sitter T. Effects of mycophenolate mofetil on donor-specific antibody formation in renal transplantation. Clin Transplant. 2005 Apr;19(2):168–74.

30. Legris T, Picard C, Todorova D, Lyonnet L, Laporte C, Dumoulin C, et al. Antibody-Dependent NK Cell Activation Is Associated with Late Kidney Allograft Dysfunction and the Complement-Independent Alloreactive Potential of Donor-Specific Antibodies. Front Immunol [Internet]. 2016 Aug 11 [cited 2016 Sep 7];7. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00288

31. Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, et al. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. Cancer Res. 2004 Jul 1;64(13):4664–9.

32. Hatjiharissi E, Xu L, Santos DD, Hunter ZR, Ciccarelli BT, Verselis S, et al. Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the Fc RIIIa-158 V/V and V/F polymorphism. Blood. 2007 Oct 1;110(7):2561–4.

33. Qu Y-H, Li Y, Wu Y-F, Fang J-P, Huang S-L, Huang Y, et al. [Influence of FcγRIIIa polymorphism on rituximab-dependent NK cell-mediated cytotoxicity to Raji cells]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi Zhongguo Bing Li Sheng Li Xue Hui J Exp Hematol Chin Assoc Pathophysiol. 2010 Oct;18(5):1269–74.

34. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, Borne AEGK von dem, Haas M de. FcγRIIIa-158V/F Polymorphism Influences the Binding of IgG by Natural Killer Cell FcγRIIIa, Independently of the FcγRIIIa-48L/R/H Phenotype. Blood. 1997 Aug 1;90(3):1109–14.

35. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene. Blood. 2002 Feb 1;99(3):754–8.

36. Neudoerfl C, Mueller BJ, Blume C, Daemen K, Stevanovic-Meyer M, Keil J, et al. The Peripheral NK Cell Repertoire after Kidney Transplantation is Modulated by Different Immunosuppressive Drugs. Front Immunol [Internet]. 2013 [cited 2016 Sep 7];4. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00046/abstract

Vu, le Directeur de Thèse

Vu, le Doyen

de la Faculté de médecine de TOURS

Faculté de Médecine de TOURS

MOLES Thibault

46 pages – 2 tableaux – 12 figures

Résumé : Introduction. Le rejet humoral (ABMR) chronique, causé par les anticorps anti-HLA spécifiques du greffon (DSA), est la principale cause de perte de greffons rénaux. La pathogénicité des DSA repose certainement sur l'activation du complément. Le rôle délétère du recrutement des lymphocytes natural killers (NK) par les DSA est plus discuté. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact du nombre de lymphocytes NK sur l'ABMR chez les transplantés rénaux avec des DSA de novo. **Patients et méthodes.** Il s'agit d'une étude rétrospective incluant 131 patients adultes transplantés rénaux suivis à Tours avec des DSA (étude en Luminex One Lambda®) apparus après la transplantation et avec un nombre de NK disponible au moment de l'immunisation. Les patients avec NK < 1er quartile (« NK bas ») ont été comparés aux autres (« NK élevés ») pour la survie rénale (décès censurés), le débit de filtration glomérulaire estimé (DFGe, formule MDRD), la protéinurie et les lésions histologiques. **Résultats.** Les caractéristiques du donneur et du receveur étaient comparables entre les groupes. L'évolution au cours du temps du DFGe retrouvait une dégradation significative à 1 an dans le groupe « NK élevés » (avant immunisation 50.4±17.1 vs 43.7±18.2 mL/min/1.73m² p=0.021) non retrouvée dans le groupe « NK bas ». De plus la protéinurie était moins élevée dans le groupe « NK bas » à l'immunisation (0.28 vs 0.59 g/L, p=0.06). En comparant les 106 patients avec une biopsie disponible à l'immunisation (« NK bas »=22, « NK élevés »=84), seule la fréquence de la glomérulite apparaissait plus élevée chez les patients issus du groupe « NK élevés » (75% vs 54.5 %, p=0,01). Finalement, la survie des greffons tendait à être moins bonne dans le groupe « NK élevés » (log rank, p=0.055). **Discussion.** Un important nombre de NK circulant au moment de l'apparition de DSA est associé à une plus grande incidence de glomérulite, une plus importante dégradation de la fonction rénale au cours du temps, une plus forte protéinurie et pourrait influer sur le pronostic du greffon rénal. Cette étude supporte l'intérêt d'une étude longitudinale quantitative et fonctionnelle des lymphocytes NK chez les patients avec des DSA. De plus, le lymphocyte NK apparaît comme une cible thérapeutique potentielle pour prévenir et traiter le rejet humoral.

Mots clés : ABMR : antibody-mediated rejection / DSA : donor specific antibody / lymphocytes NK / DFGe : débit de filtration glomérulaire estimé / protéinurie / glomérulite / survie rénale

Jury :

Président : Monsieur le Professeur BÜCHLER Matthias

Membres : Monsieur le Professeur BARON Christophe

Monsieur le Professeur THIERRY Antoine

Monsieur le Professeur THIBAULT Gilles

Monsieur le Docteur GATAULT Philippe

Date de la soutenance : 19/10/2016